

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

**PRE VE/VEYA POSTNATAL DÖNEMDE
UYGULANAN ELEKTRİK ALANIN
ELEKTROFİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
PARAMETRELERE ETKİSİ**

Deniz AKPINAR

Doktora Tezi

Antalya, 2011

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

**PRE VE/VEYA POSTNATAL DÖNEMDE
UYGULANAN ELEKTRİK ALANIN
ELEKTROFİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
PARAMETRELERE ETKİSİ**

Deniz AKPINAR

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2009.03.0122.001)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 05/07/2010 tarih ve 02/11 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/07/2010 tarih ve 14/127 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurt dışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (orjinalleri ekte sunulmuştur).

- 1- Akpınar D., Yargıoğlu P, Derin N, Aslan M, Agar A.: Effect of aminoguanidine on visual evoked potentials (VEPs), antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. Brain Res. 1186:87-94, 2007.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Doktora Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 12.08.2011

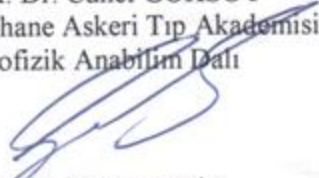
Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Üye:

Prof. Dr. Cünet GÖKSOY
Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Biyofizik Anabilim Dalı



Üye:

Doç. Dr. Narin DERİN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Üye:

Doç. Dr. Şükrü Özen
Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Elektrik-Elektronik Bölümü



Üye:

Yrd. Doç. Dr. Nazmi YARAŞ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Onay:

Bu tez, Enstitü Yönetimi Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu' nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Elektrikle çalışan cihazlardan, binadaki elektrik hatlarından veya kablolardan, alternatif akım (AC) iletim ve dağıtım sistemlerinden, halkın çoğu çok düşük frekanslı (0-300 Hz) elektrik alanlara maruz kalır. Elektrik alan şiddeti elektrikle çalışan cihazların etrafında 0.5 kV/m, yüksek gerilim hatlarının altında mesafeye bağlı olarak 12 kV/m, elektrik üretim istasyonları etrafında ise 16 kV/m'nin üzerindedir. Bu konuyla ilgili çalışmalarda birçok doku ve plazmada, uygulanan şiddet ve süreye bağlı olarak lipid peroksidasyonun arttığı ve antioksidan enzimlerin değiştiği saptanmakla birlikte, beyin dokusu üzerine yapılan çalışma yok denecek kadar azdır. Ayrıca, 50 Hz AC elektrik alanların sıçanlardan elde edilen Uyumsuzluk Negativitesi (MMN) üzerinde ne gibi etkilerinin olduğunu araştıran herhangi bir çalışmaya da rastlanılmamıştır. Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda, 50 Hz AC elektrik alanların sıçanlardan kaydedilen MMN üzerinde oluşturduğu etkilerle birlikte, beyinde apoptozis ve oksidan hasarın olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmamızda Wistar albino sıçanlar kullanılarak, Kontrol grubu (K), 3 haftalık prenatal (Pr), 3 aylık postnatal (Po) ve Prenatal + postnatal (Pr+Po) dönemlerinde elektrik alana maruz bırakılan erkek yavruların oluşturduğu gruplar olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Pr grubunu oluşturan erkek yavrular sadece prenatal dönemde, Po grubunu oluşturan erkek yavrular sadece postnatal dönemde, Pr+Po grubunu oluşturan erkek yavrular hem pre hem de postnatal dönemde 50 Hz frekanslı 12 kV/m şiddetindeki elektrik alana günde 1 saat süreyle maruz bırakılmışlardır. Deneysel sürenin sonunda erkek sıçanlar ürethanla (1.2 g/kg) anestezi edildikten sonra stereotaksik cihaza konularak elektrotlar yerleştirilmiştir. Bu işlemi takiben MMN kayıtları için deneysel paradigmda her bir uyarının süresi 50 ms olacak şekilde, 85 dB şiddetindeki frekansı 2000 Hz olan standart tonlar ile aynı şiddette, fakat frekansı 2500 Hz olan aykırı tonlar kullanılmıştır. Uyarılar arası sürenin 500 ms olduğu 1000 işitsel uyarı (900 standart uyarı, 100 aykırı uyarı, %10 oranında) sağ kulağa 15 cm mesafedeki bir hoparlör aracılığıyla verilmiştir. Sıçanların MMN kayıtları alındıktan sonra beyin dokuları çıkarılarak apoptotik hücre, 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve protein karbonil tayinleri yapılmıştır.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4- HNE ve protein karbonil değerlerinin Pr grubunda değişmediği, Pr+Po grubunda azaldığı, Po grubunda ise 4-HNE düzeyinin arttığı fakat benzer artışın protein karbonil düzeylerinde görülmediği tespit edilmiştir. Beyin dokusundan alınan kesitler Tunel metodu ile yapılan incelemede kontrol ve deney gruplarında apoptotik hücrelere rastlanılmamıştır. Uygulanan deneysel paradigma sonrası alınan MMN kayıtlarından elde edilen standart, nadir ve fark eğrilerinin gruplar arası karşılaştırmaları incelendiğinde latens değerleriyle birlikte P1N1 ve N1P2 genliklerinde herhangi bir farkın olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte, kaydedilen potansiyeller karşılaştırıldığında bütün gruplarda P2N2 genliğinin nadir uyarı durumunda standart uyarıya göre önemli derecede arttığı bulunmuştur. Ayrıca, fark eğrilerinin gruplar arası karşılaştırmasında, kontrol grubuna göre elektrik alana maruz kalan bütün deney gruplarında MMN aktivitesini temsil eden P2N2 genliklerinin istatistiksel yönden anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, elektrik alanının MMN genliğini azalttığı izlenirken, lipid peroksidasyonu artırabileceği ve protein oksidasyonuna neden olabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Elektrik alan, Uyumsuzluk negativitesi, 4-Hidroksi-2-nonenal, protein karbonil, apoptozis

ABSTRACT

Most public exposure to extremely low frequency (ELF, 0-300 Hz) electric fields (EFs) comes from electrical appliances, household wiring, and alternating current (AC) transmission and distribution lines. Electric field strength around appliances and electricity generating stations can be in the range of 0.5 and 16 kV/m, respectively. Underneath overhead AC transmission lines, electric field strengths may be 12 kV/m depending on the distance. Increased lipid peroxidation and altered antioxidant enzyme activities have been shown in many tissues and plasma after exposure to 50 Hz AC electric field. However, similar studies investigating brain lipid peroxidation status are limited. Moreover, no study examining mismatch negativity (MMN) in rats, following exposure to 50 Hz AC electric field has been encountered. Our study aimed to investigate MMN as well as apoptosis and oxidative brain damage in rats exposed to 50 Hz electric field.

In our study, Wistar albino rats were divided into four groups. The groups were as follows: control group (C), prenatal group were exposed to EF during pregnancy for 3 weeks (Pr), Post-natal group were exposed to EF after pregnancy during 3 months (Po), pre+postnatal group were exposed to EF during pregnancy and continued to be exposed to EF (Pr+Po). The pregnant rats of the prenatal group were exposed to EF during pregnancy and their male pups unexposed to EF during 3 months. The pregnant rats of the postnatal group were unexposed to EF during pregnancy and their male pups exposed to EF during 3 months. The pregnant rats of the pre+postnatal group were exposed to EF during pregnancy and their male pups continued to be exposed to EF during 3 months. Experimental groups were exposed to 50 Hz EF at 12 kV/m intensity (1 h/day). At the end of the experimental period, male rats were anesthetized with urethane (1.2 g/kg), the head of the animal was attached to the stereotaxic instrument and electrodes were positioned to the surface of the dura. In the oddball condition for MMN recordings, frequencies of standard and deviant tones were 2000 Hz and 2500 Hz, respectively. Deviant tones were pseudorandomized to occur at a 10% probability (900 standard tones, 100 deviant tones) in a sequence of standard tones presented at the inter-stimulus interval of 500 ms. The duration of the 85 dB tones was 50 ms and the tones were presented through a loudspeaker at a distance of 15 cm from the right ear. After MMN recordings, animals were killed by exsanguination and their brain tissues removed for apoptotic cell, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), and protein carbonyl analysis.

Protein carbonyl and 4-HNE levels were not changed in the Pr group and decreased in the Pr+Po group whereas 4-HNE levels were increased in the Po group in comparison with the C group. However, TUNEL-positive cells in experimental groups did not differ from the C group. In MMN recordings, no significant difference could be observed in latencies of all components and amplitudes of P1N1 and N1P2 in all groups. There were differences in the amplitudes of P2N2 between the responses to the standard and the deviant tones in all groups. Also, in difference waves, amplitudes of P2N2 in all experimental groups were significantly decreased compared with the C group. In conclusion, it is determined that electric field decreased MMN amplitudes and could be induced by lipid and protein oxidation. It is thought that lipid peroxidation could play a role in cognitive function of rats exposed to EF.

Key words: Electric field, Mismatch negativity, 4-hydroxy-2-nonenal, protein carbonyl, apoptosis

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesinde yol gösteren ve her aşamasında destek olan hocam Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU'na, özverili çabalarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Nazmi YARAŞ'a, bana her aşamada yardımcı olan Araş. Gör. Deniz KANTAR GÖK'e, emekleri geçen Doç. Dr. Şükrü Özen'e, Prof. Dr. Mutay ASLAN ve ekibine, Prof. Dr. Necdet DEMİR ve ekibine, Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına, her türlü destek ve yardımını esirgemeyen sevgili eşim Havva AKPINAR'a ve şu anda hayatta olmayan, ancak hayatta oldukları süre boyunca eğitim ve öğretimim için gereken maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgememiş olan anneme ve babama sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Olaya İlişkin Potansiyeller (Event-Related Potential;ERP)	4
2.1.1. Olaya İlişkin Potansiyel Bileşenleri	6
2.2. Uyumsuzluk Negativitesi (Mismatch Negativity;MMN)	8
2.3. Çok Düşük Frekanslı Alanlar	10
2.4. Apoptozis	15
2.4.1. Apoptozis Morfolojisi	15
2.4.2. Apoptozis ve Nekrozis Farkı	16
2.4.3. Apoptozis yolağı	16
2.4.4. Apoptozisde Görev Alan Aracılar	18
2.4.5. Apoptozis ve Oksidatif Stres	19
2.5. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları	20
2.5.1. Antioksidan Sistem	22
GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Gruplandırma	24
3.2. Deney Protokolü	
3.3. Elektrik Alan Modeli	25
3.4. Uyumsuzluk Negativitesi (MMN) Kayıtlarının Alınması	26
3.5. Biyokimyasal Yöntemler	28
3.5.1. 4-Hidroksinonenal (4-HNE) Aktivitesinin Tayini	28
3.5.2. Protein Karbonil Ölçümü	29
3.6. Histolojik Parametreler	30
3.6.1. Doku Takibi	30
3.6.2. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labelling) Metodu	30
3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi	31

BULGULAR	32
4.1. Genel Görünüm	32
4.2. Besin Tüketimi	32
4.3. Ağırlık Değişimi	32
4.4. Uyumsuzluk Negativitesi (MMN) Sonuçları	33
4.5. 4-Hidroksinonenal (4-HNE) Aktivitesi Sonuçları	42
4.6. Protein Karbonil Ölçümü Sonuçları	42
4.7. TUNEL Analizi Sonuçları	42
TARTIŞMA	45
SONUÇLAR	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	68
EKLER	69
Ek-1.	<u>Akpınar D.</u> Yargicoglu P, Derin N, Aslan M, Agar A.: Effect of aminoguanidine on visual evoked potentials (VEPs), antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. Brain Res. 1186:87-94, 2007.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EEG	: Elektroensefalogram
EP	: Uyarılmış Potansiyel
ERP	: Olaya İlişkin Potansiyel
MMN	: Uyumsuzluk Negativitesi
VEP	: Görsel uyarılma potansiyelleri
BAEP	: Beyin sapı işitsel uyarılma potansiyelleri
AEP	: İşitsel uyarılma potansiyelleri
SEP	: somatosensöryel uyarılma potansiyelleri
NMDA	: N-metil D-aspartat
GABA	: Gamma amino butirik asit
Hz	: Hertz
dB	: desibel
ELF	: çok düşük frekans
T	: Tesla
AC	: Alternatif akım
PKC	: Protein kinaz C
TBARS	: Tiobarbitürik asit reaktif ürünleri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
TNF	: Tümör nekrozis faktör
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Ca²⁺	: Kalsiyum
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labelling
OH•	: Hidroksil radikali
O₂	: Moleküler oksijen
Fe⁺³	: Ferrik demir
Cu⁺²	: Bakır
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
SOD	: Süperoksit dismutaz
Fe⁺²	: Ferröz demir
LOO•	: Peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksitler
MDA	: Malondialdehit
TBA	: Tiobarbitürik asit
CAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidad
GSH	: Redükte glutasyon
TNFR-1	: Tümör nekrozis faktör reseptörü-1
FADD	: Fas associated death domain

TRADD	: TNFR1 associated death domain
DISC	: Death inducing signaling complex
Smac/DIABLO	: Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI
MMP	: Mitokondrial membran permeabilizasyonu
L•	: Yağ asidi radikali
¹O₂	: Tekil oksijen
ADA	: Adenozin deaminaz
MPO	: Miyeloperoksidaz
XO	: Ksantin oksidaz
NAC	: N-acetyl-L-cystein
EGCG	: Epigallocatechingallate
NO	: Nitrik oksit
HO	: Hem oksijenaz
HP	: Hidroksiprolin
PCO	: Protein karbonil içeriği
CAD	: Caspase- Activated DNase
AIF	: Apoptozisi indükleyen faktör
ICAD	: Inhibitor of Caspase-Activated DNase
4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
SDS-PAGE	: Sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
ISI	: Uyarılar arası süre
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ICE	: İnterlökin-1β dönüştürücü enzim
ER	: Endoplazmik retikulum
PS	: Fosfatidilserin
PUFA	: Doymamış yağ asidi
GSSG-R	: Glutasyon redüktaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	1929'da Hans Berger'in insandan aldığı ilk EEG kaydı	4
2.2.	Olaya İlişkin Potansiyel bileşenleri	5
2.3.	1978'de Naatanen ve arkadaşlarının aldığı ilk MMN kaydı	8
2.4.	Farklı şiddetlerde uygulanan elektrik alanların serbest radikal seviyeleri ve antioksidan mekanizma üzerine etkileri	14
2.5.	Elektrik alanın neden olduğu oksidonitrosatif stres ile NAC ve EGCG'nin olası antioksidan etkileri	14
3.1.	50 Hz frekanslı AC elektrik alanının oluşturulması için paralel plaka sistemi prensip şeması	25
3.2.	50 Hz frekanslı AC elektrik alanı oluşturan paralel plaka sistemi	26
3.3.	MMN kayıtlarının alınması	27
3.4.	SDS-PAGE ve Western Blot Analizi	28
4.1.	Deney grubu hayvanların haftalık yem tüketimleri	32
4.2.	Deney grubu hayvanların haftalık ağırlık değişimleri	32
4.3.	Kontrol grubu hayvanlarına Standart (S) ve nadir (N) tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan eğriler ile nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark (F) eğrisi	34
4.4.	Pr grubu hayvanlarına Standart (S) ve nadir (N) tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan eğriler ile nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark (F) eğrisi	34
4.5.	Po grubu hayvanlarına Standart (S) ve nadir (N) tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan eğriler ile nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark (F) eğrisi	35
4.6.	Pr+Po grubu hayvanlarına Standart (S) ve nadir (N) tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan eğriler ile nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark (F) eğrisi	35
4.7.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen <u>fark</u> dalgalarına ait latenslerin bar grafik şeklinde gösterimi (ms)	37

4.8.	Kontrol grubu hayvanlarına ait standart (S) ve nadir (N) tonlara cevap olarak zamana bağlı ortaya çıkan ortalama ERP eğrilerinin grup içi tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları	39
4.9.	Pr grubu hayvanlarına ait standart (S) ve nadir (N) tonlara cevap olarak zamana bağlı ortaya çıkan ortalama ERP eğrilerinin grup içi tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları	39
4.10.	Po grubu hayvanlarına ait standart (S) ve nadir (N) tonlara cevap olarak zamana bağlı ortaya çıkan ortalama ERP eğrilerinin grup içi tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları	40
4.11.	Pr+Po grubu hayvanlarına ait standart (S) ve nadir (N) tonlara cevap olarak zamana bağlı ortaya çıkan ortalama ERP eğrilerinin grup içi tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları	40
4.12.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen <u>fark</u> dalgalarının tepeden tepeye genliklerinin bar grafik şeklinde gösterimi (μV)	41
4.13.	Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusu protein boyaması	43
4.14.a	Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusu 4-HNE Western Blot analizi	43
4.14.b	Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusu 4-HNE Western Blot Dansitometrik analizi	43
4.15.	Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusu protein karbonil değerleri	44
4.16.	Pr+Po grubu beyin dokusu işitsel korteksten alınan kesitlerde TUNEL immünreaktivitesi. A) DAPI ile işaretlenen nukleuslar, B) Apoptotik hücreleri belirlemek için kırmızı filtre uygulaması, C) A ve B'nin birleşimi	44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
4.1.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan ERP bileşenlerinin latensleri (ms)	36
4.2.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen <u>fark</u> dalgalarının latensleri (ms)	37
4.3.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan tepeden tepeye ERP genlikleri (μV)	38
4.4.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen <u>fark</u> dalgalarının tepeden tepeye genlikleri (μV)	41

GİRİŞ

Nüfus artışı ile birlikte endüstriyel ve teknolojik gelişmelerden dolayı, elektrik enerjisine, iletim hatlarına ve yüksek voltajlı güç hatlarına ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Bu sebeple, özellikle son yarım yüzyılda dünya geneline yayılan elektrik hatlarının oluşturduğu çok düşük frekanslı (0-300 Hz) elektrik alanların biyolojik etkileri ilgi çekmekte ve tartışılmaktadır.

Güç hatlarıyla ilgili uluslar arası yönergeler, güç hatlarının yerleşim yerlerinin dışına inşa edilmesinin gerekliliğini belirtmesine rağmen, gelişmekte olan ülkelerde kontrolsüz bir şekilde yayılan kentleşmeden dolayı yerleşim alanlarından geçen güç hatları insan sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır (1). Zira, yüksek gerilim hatlarının altında, hat voltajına ve hat ile yer arasında ki mesafeye bağlı olarak elektrik alan şiddeti 12 kV/m'den daha yüksek olup, elektrik üretim istasyonları etrafında ise elektrik alan şiddeti 16 kV/m'nin üzerine çıkmaktadır (2). Bu bilgiler doğrultusunda, güç hatlarının çevrelerinde yüksek şiddette elektriksel alanlar oluşturmaları nedeniyle, olumsuz etkilerinin araştırılması, saptanması ve gerekli önlemlerin alınması canlılar açısından öncelikle ele alınması gereken önemli bir konudur.

Literatürdeki bilgiler değerlendirildiğinde, elektromagnetik alanların biyolojik parametreler üzerine (in vivo ve in vitro) etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir (2,4,8). Ayrıca, elektrik ve magnetik alanların birlikte uygulandığı çalışmalara paralel olarak son zamanlarda magnetik alanlar üzerine çalışmaların yoğunlaştığı saptanmıştır (6,10). Ancak, elektrik alanların biyolojik etkileriyle ilgili bilgilerin çok az olduğu dikkati çekmiştir.

Düşük frekanslı alanların etkileri ile ilgili çalışmalarda, 50 Hz elektrik alanının birçok doku (karaciğer, akciğer, böbrek) ve plazmada, uygulanan şiddet ve süreye bağlı olarak lipid peroksidasyonu artırdığı (1,3,4,5,6) ve antioksidan enzim düzeylerini değiştirdiği (1,3,7,8) bulunmuştur. Güler G ve ark.(1) 0.3- 1.8 kV/m arası değişen şiddette uyguladıkları elektrik alanların, karaciğer, akciğer, böbrek ve plazmada süperoksit dismutaz (SOD) ve tiyobarbitürük asit reaktif ürünleri (TBARS) değerlerini anlamlı olarak artırdığını göstermişlerdir. Romodanova ve ark. (9) 320 kV/m şiddetinde ki elektrik alanının diğer dokularda olduğu gibi beyin dokusunda da lipid peroksidasyon indeksi malondialdehid artırdığını, redükte glutatyonu (GSH) azalttığını tespit etmişlerdir. Bu konu ile ilgili diğer bir çalışmada ise, elektrik alanının beyin dokusunda Deoksiribonükleik Asit (DNA) kırıkları oluşturduğu ve bu hasarın uygulama süresine paralel olarak arttığı saptanmıştır (10). Bilindiği gibi lipid peroksidasyona neden olan serbest radikaller hücrenin temel yapı taşları proteinler ve karbonhidratlar yanında DNA'da da ciddi hasarlar oluşturarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve hücre ölümüne (apoptozis) neden olurlar (11,12,13). Özellikle kromozomal DNA fragmentasyonu, nükleer fragmentasyon, kromatin birikimi ve hücre membranındaki değişiklikler apoptozisin oluşmasındaki en önemli faktörlerdir

(14). Apoptozis sürecinde serbest radikallerin yanı sıra, lipid peroksidasyonun son ve stabil ürünü 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE)'nin apoptozisi indüklediği farklı laboratuvarlarda ve farklı hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (15,16). Sonuç olarak, serbest radikal artışı ile nöron ölümleri arasındaki ilişki elektrik alana maruz bırakılan sıçanlarda apoptozisin indüklenebileceğini düşündürmektedir.

Daha önceki araştırmalarda 10 ile 150 kV/m arası şiddetteki elektrik alanların sıçanların üremeleri ve gelişimleri üzerine etkileri çalışılmış ve sıçanların verimliliğinin azaldığı yeni doğanlarda ise sakatlıkların arttığı bulunmuştur (17). Marino ve ark.(18), farelere uygulanan 60 Hz, 15 kV/m şiddetindeki elektrik alanın hayvanların vücut ağırlıklarını azalttığını ve 3 nesil boyunca ölüm oranını artırdığını göstermişlerdir. Rommerreim ve ark.(19) da prenatal ve postnatal (laktasyon) dönemde 19 saat süreyle 60 Hz 65 ve 130 kV/m şiddetindeki elektrik alana maruz kalan sıçanların ağırlıklarının azaldığını tespit etmişlerdir. Bunlara ek olarak, literatürde elektrik güç hatlarının ya da yüksek voltaj tesisatlarının yakınında yaşayan çocuklarda kanser riskinin arttığı ile ilgili çalışmalarda yer almaktadır (20,21,22,23,24).

Diğer taraftan insanlarda yapılan çalışmalarda, beyin fonksiyonlarının göstergesi olan Elektroensefalogram (EEG), Beyin Sapı İşitsel Uyarılma Potansiyeli (BAEP), Görsel Uyarılma Potansiyeli (VEP), İşitsel Uyarılma Potansiyeli (AEP) ve Somatosensöryel Uyarılma Potansiyel (SEP)'ler üzerine magnetik alanın etkileri incelenmiştir (25,26,27,28,29). Jaffe ve ark. (30), postnatal dönemde (11 ile 20. gün arası) günde 20 saat 60 Hz 65 kV/m şiddetindeki elektrik alana maruz kalan sıçanların görsel uyarılma cevaplarının değiştiğini saptamışlardır. Ayrıca, insanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise uygulanan farklı şiddette ki elektrik ve magnetik alanların (6 kV/m–10 μ T, 9 kV/m–20 μ T ve 12 kV/m–30 μ T) P300 potansiyelinin genlik ve latensinde önemli bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (31). Bu potansiyelin kognitif işlemleri yansıtan önemli bir Olaya İlişkin Potansiyel (Event-Related Potential, ERP) bileşeni olduğu ifade edildiğinden (32,33,34) elektrik ve magnetik alanların kognitif işlemlere önemli bir etkisinin olduğu söylenebilir. Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda, 50 Hz alternatif akım (AC) elektrik alanın sıçanlarda kaydedilmesi planlanan Uyumsuzluk negativitesi (Mismatch Negativity, MMN) üzerine etkileri incelenmiştir.

Uyumsuzluk negativitesi, beynin değerlendirilmesinde objektif bir yöntem olarak kullanılan diğer bir ERP bileşeni olup (35), deneysel paradigma durumunda uyarının başlangıcından sonraki 100–200 ms'de ortaya çıkmaktadır (36,37,38,39). Bilindiği gibi bütün olaya ilişkin potansiyellerin kayıtlanmasında, kognitif veya motor hazırlık süreçlerini oluşturmak üzere çok farklı şekillerde tasarlanan deneysel paradigma (Oddball paradigma) olarak bilinen deney desenleri kullanılmaktadır (40). Deneysel paradigma, ardı ardına uygulanan bir uyarı serisinde standart uyarılar içerisinde rastgele serpiştirilmiş nadir uygulanan hedef uyarılar içerir. Dolayısıyla, rasgele bir biçimde %5-20 olasılıkla verilen seyrek (nadir) uyarının standart uyara göre frekans, şiddet veya süre bakımından farklı olduğu durumlarda MMN'nin oluştuğu gösterilmiştir (41). Standart uyarı ile nadir uyarı arasındaki frekans farkı arttıkça MMN'in genliğinin arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (34,41,42).

İnsanlardan alınan kayıtlarda MMN'nin kaynağı olarak, sağ ve sol supratemporal işitsel kortekste yatay olarak yerleşmiş dipoller (jeneratörler) gösterilmektedir. Küçük frekans değişimleri için MMN, her bir hemisferin supratemporal işitsel korteksindeki bir dipol kaynağı ile modellenirken, büyük frekans değişimleri için ise her bir hemisferde ki iki dipol kaynağı ile modellenmiştir (43). Uyarıya dikkat edilmediğinde, anestezi altında, komada veya uyku esnasında otomatik olarak ortaya çıkması nedeniyle, MMN'nin işitsel kortekste ki nöral aktiviteyi yansıttığı düşünülmektedir (41). En iyi işitsel modalite de kaydedilen MMN'nin, seyrek uyarının standart uyarandan farkını kısa süreli işitsel hafıza (ekoik bellek) aracılığıyla belirleyen nöronal bir süreç ile oluştuğu düşünülmektedir. (36). Erken kognitif gelişmenin bir indeksi olarak kabul edilen MMN'nin, ayrıca anadil sesleri için gerekli uzun süreli hafızanın da duyarlı bir göstergesi olduğu ortaya konmuştur (44,45). Diğer yandan, işitsel gelişmenin erken aşamalarında ortaya çıkan MMN'nin şizofreni, konuşma zorlukları ve öğrenme problemleri gibi çeşitli hastalıklarda değişikliğe uğradığı saptanmıştır. Dolayısıyla, bu özellikleri nedeniyle insanlarda kaydedilen MMN'nin hastalıkların erken evrede belirlenmesi için bir kriter olabileceği ileri sürülmüştür (36). Sonuç olarak, komada ve uyku esnasında da kaydedilen ve işitsel hafıza ile yakın ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konan MMN birçok avantajlarından dolayı başta klinik olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (35,37,42).

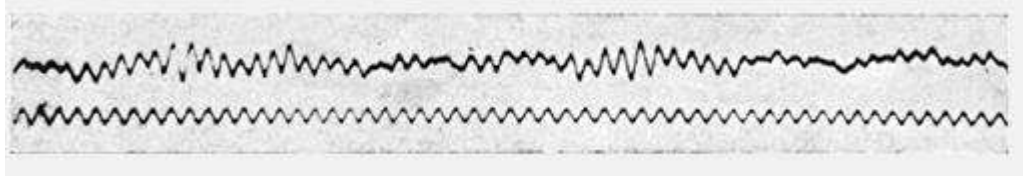
Magnetik ve elektrik alanların ERP üzerine etkileri ile ilgili araştırmalar incelendiğinde, literatürde yer alan çalışmalarda ERP kayıtlarının sınırlı sayıda olduğu ve sıçanlarda gerçekleştirilen herhangi bir çalışmanın olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, çalışmamızda ERP bileşeni olan MMN üzerine 50 Hz AC elektrik alanının etkisi de ilk kez araştırılmıştır. Bu bilgilerin ışığı altında, dünya geneline yayılan elektrik hatlarının özellikle son yarım yüzyılda artmasının insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebileceği düşüncesiyle planlanan çalışmamızda 4 temel amaç hedeflenmiştir.

1. Prenatal ve/veya postnatal dönemde uygulanan elektrik alanının MMN'nin konvansiyonel parametreleri (latens ve genlik) üzerine etkilerinin araştırılması.
2. Prenatal ve/veya postnatal dönemde uygulanan elektrik alanının beyin dokusunda oluşturacağı protein ve lipid oksidasyon değişikliklerinin saptanması.
3. Prenatal ve/veya postnatal dönemde uygulanan elektrik alanlarının MMN üzerine etkileri ile oksidan hasar arasındaki ilişkinin belirlenerek farklı gelişme dönemlerindeki etki mekanizmasının aydınlatılması
4. Beyinde apoptotik hücrelerin değerlendirilmesi ile prenatal ve/veya postnatal dönemde elektrik alanının nöron ölümleri üzerine etkisinin tespit edilmesi ve mekanizmasına ışık tutulması.

GENEL BİLGİLER

2.1. Olaya İlişkin Potansiyeller (Event-Related Potential;ERP)

İnsan beyni 10^{12} nöronu, bu sayının yaklaşık 50 katı glia hücresi ve bu hücreler arasındaki sürekli değişim gösteren etkileşimleri ile bilinen en karmaşık yapıyı oluşturmaktadır. Beynin işlevlerinin incelenmesinde bu yapıya açılan pencerelerden birini oluşturan beyin elektriksel aktivitesi 19. yüzyılda tanımlanmış olmasına karşın, sistematik olarak ilk kayıt Alman psikiyatrist Hans Berger tarafından 1920'li yılların sonunda gerçekleştirilmiştir (46,47). Hans Berger 1929 yılında insanlar üzerinde yaptığı çalışmada, kafatasından aldığı ve elektroensefalogram (EEG) olarak adlandırdığı voltaj değişimlerini kaydederek insan beyninin elektriksel aktivitesini ölçmeyi başarmıştır (48) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. 1929'da Hans Berger'in insandan aldığı ilk EEG kaydı

Belirli bir uyarana cevap niteliğinde ortaya çıkan ve beyinden kaydedilen, ölçülebilir elektriksel büyüklüğe “uyarılma potansiyeli (evoked potential)” veya kısaca EP adı verilmiştir. Uyarıya cevap olarak ortaya çıkan potansiyelin iki bileşeni bulunur. Yani tek bir EP kaydı, uyarımın beyin elektriksel aktivitesinde ortaya çıkardığı değişiklikler ile beyin spontan aktivitesinin (EEG) toplamından oluşmaktadır. Tek bir EP'deki dalga ve tepelerden hangilerinin uyarım sonucu meydana geldiğini anlamak çoğu zaman mümkün olmadığından, EEG'nin temizlenmesi ve yalnızca uyarıya ilişkin yanıt potansiyellerinin elde edilmesi gerekmektedir. Bu sorun 1954 yılından sonra geliştirilen klasik ortalama yönteminin bilgisayara uyarlanmasıyla çözülmüştür. Klasik ortalama yönteminde, ardı ardına ölçülen EP'ler ölçüm sırasında üst üste eklenerek bunların zamansal ortalaması alınır. Böylece, uyarım ile ilgili olmayan ve rastgele bir biçimde ortaya çıkan EEG değişikliklerinin birbirini yok etmesi ve her uyarıya yanıt olarak aynı biçimde ortaya çıkan değişikliklerin ise birbirini desteklemesi sağlanır (49,50,51,52).

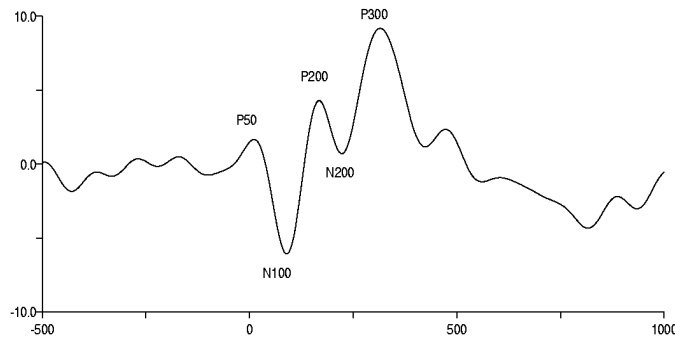
Periferal bir uyarı sonucu oluşan uyarılma potansiyelleri genellikle uyarının cinsine (işitsel, görsel) göre görsel uyarılma potansiyelleri (VEP-visual evoked potentials), beyin sapı işitsel uyarılma potansiyelleri (BAEP-brain stem auditory evoked potentials), somatosensoriyal uyarılma potansiyelleri (somatosensory evoked potentials) (46,47) olarak isimlendirilir. Özellikle 1970'lerden sonra, birden fazla

veya karmaşık uyaranlar kullanılarak, bunlar arasındaki yapısal ya da zamansal ilişkiler ile tetiklenen beyin potansiyelleri kaydedilmeye başlanınca, EP yerine, “Olaya İlişkin Potansiyel” (Event-Related Potential=ERP) adı kullanılmaya başlanmıştır. “Belirli bir olay ile zamansal ilişki içinde ortaya çıkan elektriksel beyin cevapları” şeklinde kısaca ve genel olarak tanımlanabilen bu ERP’ler, kognitif potansiyeller, “beklenti potansiyelleri” ve istemli hareket-öncesi kaydedilen “motor potansiyeller”i de kapsamaktadır.

Olaya ilişkin potansiyellerde kognitif veya motor hazırlık süreçlerini oluşturmak üzere çok farklı şekillerde tasarlanan deneysel paradigma (Oddball paradigma) olarak bilinen deney desenleri kullanılmaktadır (40). Deneysel paradigma, ardı ardına uygulanan bir uyarı serisinde standart uyaranlar içerisinde rastgele serpiştirilmiş nadir olarak uygulanan hedef uyaranlar içerir (39).

Bütün beyin potansiyelleri ekstrasellüler ortamlarda ortaya çıkan akımların oluşturduğu dipollerin yersel ve zamansal olarak toplanması sonucu ortaya çıkar. Vücut içindeki bir hücre veya hücreler grubunda ortaya çıkan akımların, aktif ve inaktif bölgeler arasında akması ile bir potansiyel farkı meydana gelir. Dış ortama elektriksel akım yayan noktalara kaynak (source), bu akımı toplayan noktalara bataklık (sink), üzerinde elektrik akımının meydana geldiği 3 boyutlu iletken ortama da hacimsel iletkenlik (volume conductor) denir ve böyle bir ortamda, kaynak ile bataklık arasında meydana gelen elektrik akımı uzaklara yayılabilme özelliğine sahiptir. Hacimsel iletkenlik içerisindeki kaynak ve bataklık noktaları arasında oluşan akım ve bu akımın uzaktaki etkisini inceleyen teorik model dipol ile tanımlanmaktadır. Nöronal elemanların çokluğu ile oluşan dipollerin karmaşık geometrisi, uyarıcı ve inhibe edici çalışma sistemleri kortikal iletilebilen beyin potansiyellerinin oluşumunu belirler. Potansiyel akımındaki belirleyici jeneratörler post-sinaptik potansiyeller olup, aksiyon potansiyellerinin görevi yoktur (53).

Olaya ilişkin potansiyellerin dalga formları tipik olarak pozitif ve negatif pikler (sırtmalar) olarak tanımlanır. Dalga formlarının adlandırılması birbirini izleyen piklerin oluşma sıraları ve polaritelerine göre yapılmaktadır (Şekil 2.2). Örneğin N1, dalga formundaki ilk negatif pik, P2 ise ikinci pozitif piktir. Aynı zamanda, ERP bileşenlerinde ki pozitif ve negatif pikler, uyarının başlangıcından sonraki zaman olarak tanımlanan latenslerine göre de adlandırılmaktadır. Örneğin, N100 denildiği zaman uyarı başlangıcını takiben 100 ms’de oluşan negatif pikten, P300’de ise uyarı başlangıcını takiben 300 ms’de oluşan pozitif pikten bahsedilir (50).



Şekil 2.2. Olaya İlişkin Potansiyel bileşenleri

2.1.1. Olaya İlişkin Potansiyel Bileşenleri

P1 Bileşeni:

Olaya ilişkin potansiyel bileşeni olan P1 dalgası, işitsel bir uyarının başlangıcından sonra yaklaşık 50 ms’de (aynı zamanda bu dalga P50 olarak bilinir) ya da görsel uyarının başlangıcından sonra yaklaşık 100 ms’de ortaya çıkmaktadır. Fonksiyonel olarak bu bileşen, duysal uyarana seçici dikkatin nörofizyolojik göstergesi olarak yorumlanır. İşitsel P1 frontal ve/veya sentral bölgeler üstünde geniş genlikli, posterior bölge üstünde ise kısa latensli olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bileşen sıklıkla işitsel inhibisyonla ilişkilendirilir ve tipik olarak uyarılar arası sürenin uyarı süresinden kısa olduğu duysal kapılama paradigmlarında ölçülmektedir (50).

N1 Bileşeni:

Bu bileşen dikotik dinleme paradigmlarında ortaya çıkmaktadır ve çok kolay bir şekilde tanımlanabilen bileşenlerden biridir. Genellikle N1’in uygulanan uyarının şiddet,süre gibi değişikliklerine karşı oluşan seçici dikkati yansıttığı düşünülmektedir. Ortaya çıkan pikin latens ve genliği uyarı modalitesine bağlıdır. İşitsel uyarı da görsel uyarıya göre daha büyük genlikli ve daha kısa latensli olarak uyarı başlangıcından sonra yaklaşık 100 ms’de ortaya çıkmaktadır ve frontosentral alanlar ve verteks üzerinde maksimum genliğe sahiptir. İşitsel N1’in genliği uyarılar arası sürenin ve uyarıya olan dikkatin artmasıyla artmaktadır. Görsel N1 bileşeninin genliği genellikle inferior temporal bölgelerde ya da oksipital bölge üstünde artmaktadır. Tipik olarak N1 genliğinin, uyarılar arasında ki farkın belirlenmesi durumunda arttığı, uyarılar arasında ki sürenin kısalması durumunda ise azaldığı saptanmıştır (50).

P2 Bileşeni:

Kişilerarası düşük değişkenlik ve yüksek tekrarlanabilirlik gibi özelliklere sahip olan P2 bileşeni kısa süreli hafıza, özellik belirleme süreçleri, uyarı değişikliği ve seçici dikkati içeren farklı birçok kognitif görevlerde belirlenebilmektedir. İşitsel modalitede P2 çoğu kez N1 ile birlikte ortaya çıktığından dolayı genellikle N1 ve P2’den N1-P2 kompleksi olarak bahsedilir. Bu iki pik birbirlerinden deneysel ve gelişimsel olarak ayrılır. Bu bileşenin maksimum genliği N1 ile karşılaştırıldığında geniş bir latens aralığında (150–275 ms) ortaya çıkmaktadır. En yüksek genliği sentral bölge üzerinden kaydedilen P2 bileşenine “verteks potansiyeli” ya da “verteks pozitivitesi” de denmektedir. Sesin gürlüğü ve tonu gibi uyarının fiziksel parametrelerine P2’nin duyarlı olduğu ve uyarı şiddeti arttıkça N1 bileşenine benzer olarak P2’nin genliğinin de arttığı görülmektedir. Görsel uyarı verilmesi durumunda P2’nin topografik olarak frontal bölge üzerinde 150-200 ms latens aralığında ortaya çıktığı ve kompleks uyarılar verildiğinde genliğinin arttığı belirlenmiştir (50).

N2 Bileşeni:

Bu bileşenin uyarılar arası sürenin kısa olması durumunda latensinin kıaldığı ve genliğinin azaldığı görülmektedir. Bu bileşen ile ilgili yapılan az sayıdaki çalışmalarda katılımcılara verilen görsel uyarı dizisi içerisinde beklenenden farklı bir uyarı geldiği zaman frontal dağılımlı geniş N2 piki gözlenmiştir. Belirli bir uyarı ile

deneğin beklentisi arasında ki sapmanın belirlenmesinde kullanılan N2 ve uyumsuzluk negativitesi (MMN)'nin bazı özellikleri benzer olmakla birlikte, MMN'den farklı olarak, N2 bileşeni için deneğin uyarıya ilgi göstermesi gerekmektedir. İşitsel uyarı santral parietal bölge üzerinde, görsel uyarı ise preoksipital bölge üzerinde yüksek N2 genliğinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (50).

N170 Bileşeni:

Bu bileşen N2 ailesinin bir üyesidir ve 156–189 ms arasında ortaya çıkmaktadır. Bu bileşenin insan yüzlerinin görsel olarak işlenmesiyle ilişkili olduğu ve tanıdık olan ya da olmayan yüzler için oksipitotemporal bölgeler üzerinde geniş bir topografik dağılım gösterdiği saptanmıştır (50).

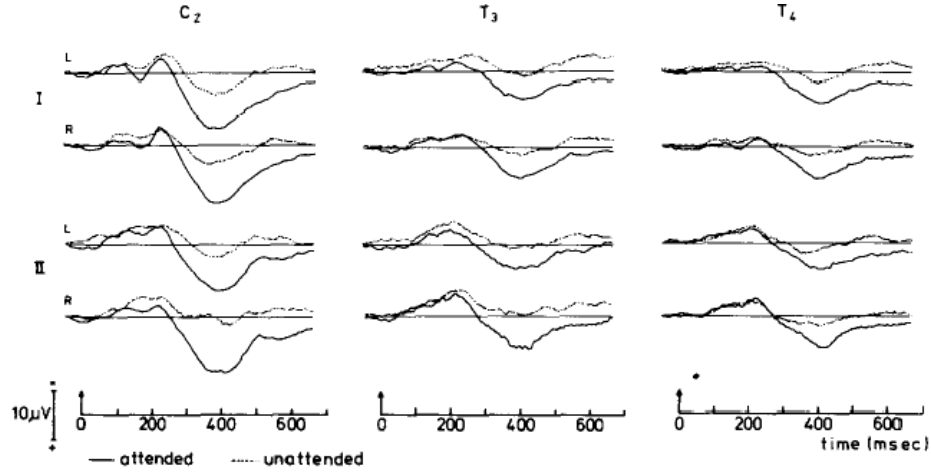
P3 Bileşeni:

İnsanlarda yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda, kafatasından kaydedilen olaya ilişkin potansiyellerin uyarı ile ilgili seçici işlemleri yansıttığı gösterilmiştir. Bu potansiyeller içerisinde P3 veya P300 olarak bilinen bileşen, kognitif işlemlerle ilişkisi yönünden ilgi çekmiş ve pekçok araştırmaya konu olmuştur (54,55,56,57,58,59). İlk defa 1965 yılında Sutton ve ark. (60) tarafından kaydedilen bu kognitif potansiyelin işitsel, görsel veya somatik tarzda, beklenen bir seri uyarıda bir uyarının atılması veya beklenmedik nadir (hedef) bir uyarının denek tarafından değerlendirilmesi ile oluştuğu saptanmıştır (56,61,62,63,64,65). P3 dalgası uyarı olasılığı ve iş ilişkisinden etkilenmekle birlikte, uyarının fiziksel özelliklerinden bağımsız endojen tabiatlıdır (55,59,64,65). Dolayısıyla P3 duyuşal işlemlerden ziyade dikkat, hafıza, öğrenme, karar verme gibi kognitif fonksiyonların nöral ilişkisi olarak ortaya çıkmaktadır (55,56,65,66,67,68). P3 bileşeninin kaynağı kesin olarak belirlenememekle birlikte geniş santral ve parietal kafatası dağılımına sahiptir. Bununla birlikte, derin elektrot kayıtları P3'ün kaynağı olarak hipokampal bölgeyi, parahipokampal girusu, amigdalay ve talamusu göstermektedir (50). Bu bileşen uyarı başlangıcından sonraki yaklaşık 300 ms'de ortaya çıkmakla birlikte deneklerin yaşları, hedef uyarının modalitesi ve uyarının niteliği latensi etkilemektedir. Hedef uyarı basit veya denek genç ise P3 dalgası daha kısa latenste oluşurken, hedef uyarının kompleks veya deneğin yaşlı olması durumunda latens uzamaktadır (60). Latens yanında diğer bir önemli parametre de genliktir. Nadir ve işe bağlı (hedef uyarıyı sayma ya da hedef uyarı geldiğinde düğmeye basma gibi) uyarılar daha büyük genlikli P3 oluşturur (69). İşteki zorluk arttıkça genliğin artması, P3 genliğinin işteki zorluğu ve farklılığı yansıtan bir bileşen olduğunu vurgulamaktadır. Diğer yandan bireyin nadir ve işe bağlı uyarıya verdiği önem ve dikkat fazla ise genliğin daha büyük olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla P3 genliği dikkat ölçümünde kullanılan bir parametre olarak kliniğe girmiştir. Ayrıca P3 dalgasının öğrenme ile ilişkili olduğu da görülmüştür. Öğrenmeye paralel olarak genliğinin arttığı, latensinin kısaldığı saptanmıştır (70).

Olaya ilişkin potansiyel bileşenlerinden biri de çalışmamızda kullandığımız uyumsuzluk negativitesidir.

2.2. Uyumsuzluk Negativitesi (Mismatch Negativity;MMN)

İlk kez 1978 yılında Naatanen ve arkadaşları tarafından kaydedilen Uyumsuzluk Negativitesi (Mismatch Negativity, MMN) (Şekil 2.3), ERP'nin negatif bileşeni olup deneysel paradigmanda uygulanan işitsel uyarının başlangıcından sonra 100–200 ms arasında ortaya çıkmaktadır (71).



Şekil 2.3. 1978'de Naatanen ve arkadaşlarının aldığı ilk MMN kaydı

Bütün olaya ilişkin potansiyellerde kognitif veya motor hazırlık süreçlerini oluşturmak üzere ardı ardına uygulanan bir uyarı serisinde standart uyarılar içerisinde rastgele serpiştirilmiş nadir olarak uygulanan hedef uyarıların olduğu deneysel paradigma (Oddball paradigma) olarak bilinen ve çok farklı şekillerde tasarlanan deney desenleri kullanılmaktadır (40). Görsel uyarıların yer aldığı deney desenlerinde elde edilmesi zor olmakla birlikte, işitsel bir uyarı dizisi içinde ayırt edilebilir herhangi bir değişiklik olduğunda MMN kolaylıkla ortaya çıkmaktadır. Bu ayırt edilebilir değişiklik hedef uyarı için frekansın, şiddetin, uyarı süresinin ve uyarılar arası sürenin değiştirilmesi gibi farklı tiplerde olabileceği gibi ses kaynağının yerinin değiştirilmesi ya da uyarı verilmemesi şeklinde de olabilmektedir (72). Bununla birlikte, bir uyarı dizisi içinde standart uyarılar arasına rastgele bir biçimde %5–20 olasılıkla nadir uyarılar verilmesi gerekmektedir (41). Nadir uyarıların verilme olasılığının artmasıyla MMN'nin genliğinin düştüğü tespit edilmiştir (73). Verilen işitsel uyarı dizisi içinde standart uyarı 1000 Hz olarak seçildiği takdirde nadir uyarı frekansının standart uyarının frekansından en az %2 fazla ya da az olması durumunda bile MMN ortaya çıkmaktadır (39).

Uyumsuzluk negativitesinin kaynağı olarak sağ ve sol işitsel korteks gösterilmektedir. Kulaklardan birine standart uyarı diğerine ise nadir uyarı verilerek kafatası yüzeyinden alınan MMN kayıtlarında, uyarılan kulak tarafında ki hemisferin işitsel korteks aktivitesinin diğer hemisferdeki işitsel korteks aktivitesine göre daha güçlü olduğu bulunmuştur. Uyumsuzluk negativitesinin bilateral işitme korteksi kaynaklarına ek olarak, işitme korteksine göre biraz daha geç aktive olan frontal jeneratörlerinin de olduğu saptanmıştır. Bu frontal jeneratörlerin aktive olmasının, nadir uyarının işitme korteksinde yol açtığı etki nedeniyle, algı öncesi ve istem dışı dikkat yönelmesi ile ilgili olduğu söylenmektedir. Bunlara ek olarak, farklı supratemporal nöral grupların da hedef uyarının frekans, şiddet ve süre değişikliklerinde MMN'ye katkı sağladıkları ifade edilmektedir. Bununla ilgili olarak

öne sürülen modele göre, küçük frekans değişimlerinde ortaya çıkan MMN'nin her bir hemisferin supratemporal işitsel korteksinde oluşan bir dipolle, büyük frekans değişimlerinde ortaya çıkan negativitenin ise her bir hemisferde oluşan iki dipolle ilişkili olduğu ifade edilmektedir (43).

Uyumsuzluk negativitesinin en önemli özelliklerinden birisi de dikkatin yokluğunda bile ortaya çıkmasıdır (42). Bu özelliği nedeniyle MMN yeni doğanlarda, bebeklerde ve çocuklarda rahatlıkla kaydedilebildiğinden dolayı en erken kaydedilebilen kognitif ERP bileşenidir. Bununla birlikte, MMN, işitsel kortekste ki gelişimsel problemlerin sonucu olarak ortaya çıkan damak yarıklığı ve konuşma bozukluğu gibi hastalıkların önceden belirlenmesinde de kullanılabilir (42). Ayrıca, uyku ya da koma gibi durumlarda (72) kaydedilebilen MMN'nin kullanıldığı klinik araştırmalardan biride şizofrenidir ve bu hastalarda MMN genliğinin azaldığı gözlenmiştir. Şizofreni hastalığında merkezi işitsel fonksiyonların etkilenmesine bağlı olarak N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör sisteminin yetersiz çalışması sonucu MMN genliğinin azaldığı ileri sürülmektedir (42). Bununla birlikte, NMDA antagonisti ketamin verilmesi durumunda MMN genliğinin önemli ölçüde düştüğü saptanmıştır (74). Diğer yandan, MMN oluşumu için dopamin, serotonin, nikotinik, muskarinik ve gamma amino butirik asit (GABA) reseptörlerinin rolleri ise tartışmalıdır. Zira bazı çalışmalarda reseptör antagonistlerinin verilmesi durumunda MMN genliğinin azaldığı (75,76), arttığı (77,78,79) ya da herhangi bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir (80).

Her bir ses uyarısı işitsel sistemde bir hafıza izi (memory trace) oluşturur. Deneyisel paradigma içerisinde verilen standart uyaranların işitsel bellekte bir nöral temsilinin olduğu ve nadir uyaran verildiğinde nöral iz hala aktif olduğu için otomatik değişim saptama mekanizmasının harekete geçerek MMN oluşturduğu düşünülmektedir. Uyarılar arası süre (ISI) yeterince uzun seçilirse, her bir uyarının hafıza izi, bir sonraki uyarı gelene kadar silindiğinden MMN ortadan kaybolmaktadır (81). Dolayısıyla, uyumsuzluk negativitesinin bir diğer önemli özelliği de ekoik hafıza süresinin belirlenmesinde kullanılmasıdır Bu periyodun süresi ekoik hafıza olarak tanımlanır ve normal kişilerde bu sürenin en az 10 s olduğu tespit edilmiştir (72). Ekoik hafızanın süresi Alzheimer'lı hastalarda ise 3 s olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, damak yarığı olan okul çağındaki çocuklarda, yaşlanmada ve kronik alkolizmde bu sürenin kısaldığı bulunmuştur (35,73).

MMN ve sıçan çalışmaları:

Ruusuvirta ve ark.(36)'nın ürethanla anestezi edilen Wistar sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, sıçanların işitsel korteksi üzerinde 5x5 mm'lik bir alan açılarak (Bregmanın 3 mm arkasında ve orta hattın 5 mm lateralinde) vida elektrotlar yerleştirilmiş ve işitsel oddball paradigması uygulanarak sıçanların MMN kayıtları alınmıştır. Uygulanan paradigmada, standart uyarı olarak 2000 Hz, nadir uyarı olarak ise 2500 Hz frekansında tonlar verilmiştir. Ses uyarıları şiddetleri 85 dB, süreleri 50 ms, uyarılar arası süre 500 ms ve rastgele uygulanan nadir uyarıların verilme sıklığı %5 olmak üzere 15 cm mesafedeki bir hoparlör aracılığıyla sağ kulaktan verilmiştir. Yapılan deneylerde uyarının başlangıcından sonra 63-253 ms arasında izlenen pozitif polaritedeki MMN benzeri aktivitenin insanlarda negatif

polaritede elde edilene zıt olduğu ve bunun sebebinin referans elektrotun yerleştirildiği bölgeyle ilişkili olabileceği ifade edilmiştir.

Lazar ve Metherate (41)'nin ürean ve ksilazin karışımı ile anestezi edilen Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, elektrotlar sağ işitsel korteks üzerine yerleştirilmiştir. Tekrarlı bir şekilde uygulanan 10 seri içinde, her bir seride nadir uyarı olarak 10 kHz saf ton sabit tutulup 9.75, 9.5, 9.0, 5.0, 2.5 ve 1.25 kHz frekanslarında ki saf tonlar standart uyarı olarak ayrı ayrı verilmiştir. Oddball paradigması uyarıların şiddetleri 70 dB, süreleri 100 ms, uyarılar arası süre 500 ms ve nadir uyarıların verilme sıklığı %10 seçilerek uygulanmıştır. Bu çalışmada MMN'nin ortaya çıkmadığı, sıçanlarda MMN'yi elde edebilmek için daha farklı özellikte uyarıların uygulanması ve/veya uyanıklık gibi diğer durumlarda kayıtların alınması gerektiği söylenmektedir.

Eriksson ve Villa (37)'nin araştırmalarında yapay sesli harfleri içeren uyarılar, serbest halde dolaşan Long-Evans sıçanlara oddball paradigması içinde verilerek beyin potansiyelleri kaydedilmiştir. Bu çalışmada, nadir uyarıya cevap olarak 100-200 ms'lik latens aralığında MMN oluştuğu bulunmuştur.

Astikainen ve ark. (82)'nin yaptıkları çalışmada, üreanla anestezi edilen sıçanların işitsel korteksi üzerinde 5x5 mm'lik bir alan açılarak (Bregmanın 3 mm arkasında ve orta hattın 5 mm lateralinde) vida elektrotlar yerleştirilmiş ve farklı işitsel oddball paradigmaları uygulanarak MMN kayıtları alınmıştır. Bu paradigmalarda standart ile nadir uyarıların frekans (1000 ve 750 Hz) ve şiddet (50 ve 70 dB) gibi sesin farklı özellikleri değiştirilerek sırasıyla uygulanmıştır. Ses uyarıları süreleri 50 ms, uyarılar arası süre 350 ms ve nadir uyarının verilme sıklığı %5 seçilerek 10 cm mesafedeki bir hoparlör aracılığıyla sağ kulaktan verilmiştir. Uyarının başlangıcından sonra 53-109 ms arasında pozitif polaritede MMN benzeri aktivite saptanmıştır.

Tikhonravov ve ark. (83)'nin Hannover pentobarbital sodyumla anestezi edilen sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, kafatasında sağ işitsel korteks üzerine (Bregmanın 4.5 mm arkası ve orta hattın 3.5 mm laterali) vida elektrot yerleştirilmiş ve oddball paradigması uygulanarak MMN kayıtları alınmıştır. Uygulanan paradigma da, standart uyarı olarak 2000 Hz, standart uyarıların arasına rastgele olarak dağıtılan nadir uyarı olarak ise 2500 Hz frekansında tonlar verilmiştir. Uyarıların şiddetleri 85 dB, süreleri 50 ms, uyarılar arası süre 450 ms ve nadir uyarının verilme sıklığı %4.4 seçilmiştir. Ayrıca bu çalışmada sıçanlara farklı dozlarda NMDA reseptör antagonisti MK-801 verilerek MMN benzeri cevaplar elde edilmiş ve MK-801'in doza bağımlı olarak MMN benzeri bileşenin oluşumunu bloke ettiği gösterilmiştir.

2.3. Çok Düşük Frekanslı Alanlar

Nüfus fazlalığı ile endüstriyel ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak, elektrik enerjisine, iletim hatlarına ve yüksek voltajlı güç hatlarına ihtiyaç gittikçe arttığından özellikle son yarım yüzyılda dünya geneline yayılan elektrik hatlarının oluşturduğu çok düşük frekanslı (extremely-low frequency; ELF, 0–300 Hz) elektrik (metre başına volt; V/m) ve magnetik (Tesla, T) alanların biyolojik etkileri ilgi çekmekte ve

tartışılmaktadır. Zira, yüksek gerilim hatlarının altında, hat voltajına ve hat ile yer arasında ki mesafeye bağlı olarak elektrik alan şiddetinin 12 kV/m'den daha yüksek olduğu, elektrik üretim istasyonlarının etrafında ise elektrik alan şiddetinin 16 kV/m'nin üzerine çıktığı saptanmıştır (2). Bu sebeple, yüksek voltaj iletim hatlarının bakım/onarımında ya da elektrik üretim istasyonlarında çalışan işçilerin ortalama olarak 24 kV/m şiddetinde elektrik alana maruz kaldığı belirlenmiştir (84). Ayrıca, evlerin içerisinde yer alan kabloların ve cihazlarında elektrik alan maruziyetinin en yaygın kaynakları olduğu belirtilmektedir (1-10 V/m) (84).

Çoğu bireyin 20 kV/m'den ve 1.5 mT'dan daha büyük elektrik ve magnetik alanları, değişen elektrik yükünün vücut kıllarında titreşmeye neden olmasıyla algılayabildiği saptanmıştır (2). Bireylerin bu kadar yüksek şiddette elektrik ve magnetik alanlara maruz kalmaları sonucunda deride ürperme, döküntü ve sıcaklık hissinin yanı sıra baş ağrısı, yorgunluk, konsantre olmada zorluk, uyku bozukluğu ve baş dönmesi gibi birçok semptom ortaya çıkmaktadır (2). Ayrıca, bu alanların bireylerde amyotrofik lateral sklerosis oluşumunu (85), Alzheimer hastalığına yakalanma riskini (86), depresyonu (87) ve intihar (88) eğilimini arttırdığı bulunmuştur. Diğer yandan, ELF alanların kardiyovasküler sistem üzerine etkileri de araştırılmıştır. Bireylere 60 Hz elektrik ve magnetik alan birlikte uygulandığında (9 kV/m, 0.02 mT) kardiyak fonksiyonlarda küçük değişiklikler olduğu, maruziyet süresince ya da hemen sonra dinlenim kalp hızının az miktarda fakat anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (dakika da 3-5 atım) (89). Ancak bu şiddetler yerine farklı değerler uygulandığında örneğin elektrik ve magnetik alan şiddetinin artırılmasının (12 kV/m, 0.03 mT), azaltılmasının (6 kV/m, 0.01 mT) ya da sadece elektrik alan (10 kV/m) uygulamasının kardiyak fonksiyonlarda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (90,91).

Çok düşük frekanslı alanların en önemli etkilerinden biri de kanser oluşumuna neden olmasıdır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, üretim istasyonlarında çalışanların, güç hattını onaran işçilerin, elektrikçilerin, kaynakçıların ve elektrikli tren sürücülerinin akut lenfoblastik olmayan ve akut miyeloid lösemiye yakalanma olasılığının ve beyin de tümör oluşma riskinin arttığı gösterilmiştir (92,93,94). Bununla birlikte, bu işçilerin lösemiye yakalanma riskinin önemli derecede arttığını gösteren bulgulara (92,93,94) zıt olarak bir riskin olmadığını belirten çalışmalarda (95,96) bulunmaktadır. Ayrıca, çocukların ve hamilelik dönemi boyunca kadınların elektrikli battaniye, saç kurutucusu gibi cihazları kullanmasıyla lösemiye yakalanma riski arasında bir ilişki bulunamazken (97), başka bir çalışmada ise riskin 4.7 kat arttığı bulunmuştur (98). Bunlara ilaveten, bir diğer çalışmada televizyon izleyen çocukların lösemi olma olasılığının 1.5'ten 2.4'e çıktığı bildirilmiştir (98). Başka bir araştırmada ise işyerinde ve evde elektrik alana maruz kalan kişilerde lösemi riskinin arttığı saptanmıştır (2). Araştırmaların sonuçları karşılaştırıldığında, magnetik alana göre elektrik alanın lösemi için daha büyük bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (99). Diğer yandan, magnetik alanın (60 Hz, 0.1 mT) fare kemik hücrelerinde ve insan pre-B lösemi hücrelerinde protein kinaz C (PKC) aktivitesini arttırdığı, insan Jurkat T-lenfosit membranının PKC'nin translokasyonunda değişiklikler oluşturduğu ve Jurkat T-lenfosit hücrelerinde inozitol trifosfat miktarını arttırdığı saptanmıştır (2). Ayrıca, ELF alanların, kalsiyum

iyonunun hücre membranından geçişini ve hücre içi konsantrasyonunu, protein sentez sürecini, sodyum-potasyum ATPaz aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (2).

Kanserin gelişimini etkileyen ajan ya da promoter gibi davranan çok düşük frekanslı alanların gen ekspresyonunda ya da hücre sinyal iletimi yollarında değişimlere neden oldukları, ornitin dekarboksilaz (tümör oluşumu ve hücre çoğalmasıyla ilişkili enzim) ve PKC (tümör oluşumunda rolü olan forbol esterlerle ilişkili enzim) aktivitelerini arttırarak tümör oluşturan yollar üzerinde etkilerini gösterdikleri ifade edilmektedir (2).

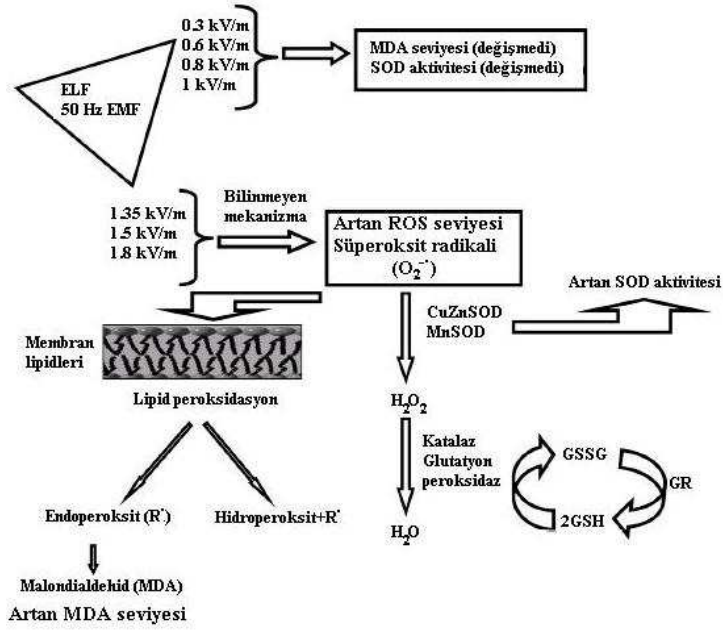
Çok düşük frekanslı alanların bir başka etkisi de, işitsel ya da görsel uyarıya cevap olarak ortaya çıkan uyarılma potansiyellerinin genliklerini veya latenslerini değiştirmesidir. Olaya ilişkin potansiyellerin geç ortaya çıkan bileşenlerinden biri olan P300 bileşeninin; 60 Hz 6 kV/m şiddetinde elektrik ve 10 μ T şiddetinde magnetik alanların birlikte uygulanması durumunda latensinin, alan şiddetinin 9 kV/m ve 20 μ T olduğu durumda ise latensinin ve genliğinin arttığı bulunmuştur (100,101,102,103). Elektrik ve magnetik alanın (9 kV/m ve 20 μ T) sürekli uygulanması durumunda N2-P3 genliğinin arttığı (100,101), kesikli uygulanmasında ise latensinin uzadığı tespit edilmiştir (102). N2-P3 genliğinde benzer artış elektrik ve magnetik alanın 6 kV/m ve 10 μ T şiddetinde sürekli uygulanmasında da gözlenmiştir (102,103). Magnetik alanın 1260 μ T şiddetinde uygulanması sonucunda, P300 bileşeni üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenirken, N100 bileşeninin genlik ve latensinde bir azalma bulunmuştur (104,105). Bununla birlikte, 100 μ T şiddetinde magnetik alanın N100 dalgasının genliğini anlamlı derecede artırdığı, fakat uyumsuzluk negativitesi (MMN) üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. (106). Diğer yandan, elektrik ve magnetik alanların (5 mT, 12 kV/m) işitsel beyin sapı (BAEP), görsel (VEP), işitsel (AEP) ve somatosensöryel (SEP) uyarılma potansiyellerinde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı gözlenmekle birlikte (107,108,109,110), yüksek şiddette (60 mT) uygulanan magnetik alanın VEP'lerde önemli değişikliklere neden olduğu saptanmıştır (110,111,112). Ayrıca, 60 Hz 78 μ T ve 45 Hz 1.26 mT şiddetlerindeki magnetik alanların, EEG güç spektrumlarının alfa ve beta bantlarında gözlenen ortalama frekans ve güç yoğunluğunu anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir (2).

Çok düşük frekanslı alanların en önemli etkilerinden biri de serbest radikal oluşumunu ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu arttırmasıdır. Birçok çalışmada, ELF alanların serbest radikal mekanizmalarını kullanarak biyokimyasal reaksiyonların sayısını ve hızını değiştirdiği gösterilmiştir (1,3). Statik ve zamanla değişen elektrik ve magnetik alanların süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidroksil radikali (OH^-) gibi serbest oksijen radikallerinin üretiminde artışa neden olduğu ileri sürülmektedir (1). Aynı zamanda, ELF alanların etkisiyle singlet durumdan triplet durumuna geçen serbest radikallerin, yaşam sürelerinin nano saniyelerden mikro saniyelere çıkmasıyla oluşturdukları zararın arttığı ifade edilmektedir (113).

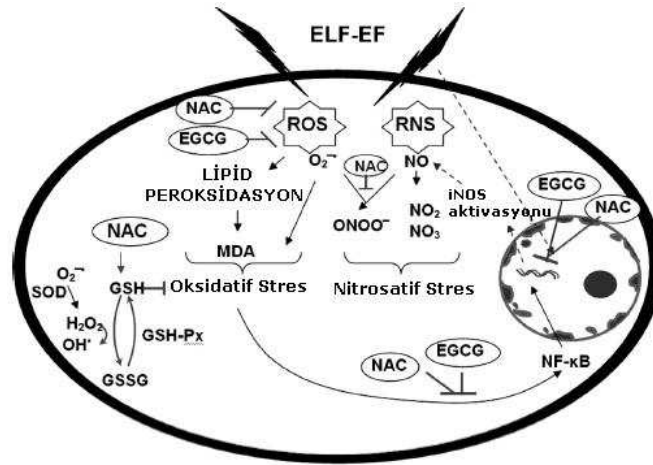
Hücreler serbest radikal oluşumundan ve onların zararlı etkilerinden korunmak için antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar da inaktif peroksitler için enzimlerin, geçiş metalleri için proteinlerin ve serbest radikaller için bazı bileşiklerin görev aldığı belirlenmiştir. Oksijen

radikallerine karşı enzimatik savunma sistemlerinin en önemlileri olan SOD, Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin ölçülmesi antioksidan durumun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (114).

Statik ve düşük frekanslı elektrik alanların etkilerini araştırmak için yapılan çalışmalarda, uygulanan elektrik alanların şiddetleri, uygulama süreleri ve uygulama periyotları değiştirilerek farklı doku ve plazmalarda lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim düzeyleri incelenmiştir. Güler ve arkadaşlarının (1) yaptığı çalışma da, kobaylar 50 Hz 1.35 kV/m şiddetinde elektrik alana 1 ile 10 gün arasında günde 8 saat süreyle maruz bırakılarak karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ile plazmalarında TBARS ve SOD düzeylerine bakılmıştır. Elektrik alan şiddetinin sabit tutulup uygulanan gün sayısı değiştirilerek yapılan bu çalışmada, artan uygulama periyoduna paralel olarak TBARS ve SOD değerlerinin arttığı bulunmuştur. Bu çalışmaya paralel olarak başka çalışmalarda da, elektrik alana uzun süreli maruziyetin canlı organizma üzerinde daha büyük etkilere sebep olduğu gösterilmiştir (1,114,115). Özellikle TBARS değerlerinin elektrik alan şiddetiyle orantılı olarak arttığı bulunmuştur (1). Benzer şekilde, elektrik alanın uygulama periyodunun artışına paralel olarak hidrokspirolin, gama glutamil transferaz, kolesterol, trigliserit, üre, ürik asit, fosfat, glukoz, kreatin, kalsiyum, klorin, aspartateaminotransferaz, alkalın fosfataz, alanin aminotransferaz, laktat dehidrogenaz, total kan protein, albumin miktarlarının arttığı bulunmuştur (1,3). Ayrıca, Romodanova ve ark. (9) 320 kV/m şiddetinde ki elektrik alanın beyin dokusunda lipid peroksidasyon indeksi malondialdehid artırdığını, redükte glutasyonu (GSH) azalttığını tespit etmişlerdir. Diğer yandan, yapılan başka bir çalışmada ise, günde 8 saat süreyle 3 gün boyunca kobaylara 0.3 ile 5 kV/m arası değişen şiddetlerde elektrik alan uygulandıktan sonra beyin dokusu Malondialdehit (MDA), SOD, CAT, GSH-Px, adenoazin deaminaz (ADA), ksantin oksidaz (XO) ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitelerinde kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık saptanmamıştır (3,116). Farklı şiddetlerde uygulanan elektrik alanların serbest radikal seviyeleri ve antioksidan mekanizma üzerine etkileri şekil 2.4'de özetlenmiştir (1). Yapılan bazı çalışmalarda ise, kobaylara 7 gün süresince günde 8 saat süreyle 50 Hz 12 kV/m şiddetinde elektrik alan uygulandıktan sonra akciğer dokusunun MDA, nitrik oksit (NO), hem oksijenaz (HO) ve hidrokspirolin (HP) seviyelerinde bir değişiklik gözlenmezken, protein karbonil içeriği (PCO) seviyesinde istatistiksel bir artış bulunmuştur. Uygulanan elektrik alanın karaciğer dokusunda MDA ve NO değerlerini istatistiksel olarak arttırdığı, SOD, GSH-Px ve MPO değerlerini azalttığı tespit edilmiştir. Antioksidan olarak N-acetyl-L-cystein (NAC; oksijen türevi serbest radikal temizleyicisi ve glutasyon prekürsörü) ve epigallocatechingallate (EGCG; serbest radikalleri nötralize eden güçlü bir antioksidan) verilerek elektrik alanın etkisine bakıldığında, MDA ve NO'nun azaldığı, GSH-Px ve MPO'nun ise arttığı gözlenmiştir. Elektrik alanın neden olduğu oksidonitrosatif stres ile NAC ve EGCG'nin olası antioksidan etkileri şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Farklı şiddetlerde uygulanan elektrik alanların serbest radikal seviyeleri ve antioksidan mekanizma üzerine etkileri



Şekil 2.5. Elektrik alanın neden olduğu oksidonitrosatif stres ile NAC ve EGCG'nin olası antioksidan etkileri

Bu konu ile ilgili diğer bir çalışmada ise, elektrik alanın beyin dokusunda DNA kırıkları oluşturduğu ve bu hasarın uygulama süresine paralel olarak arttığı saptanmıştır (10). Bilindiği gibi lipid peroksidasyona neden olan serbest radikaller hücrenin temel yapı taşları proteinler ve karbonhidratlar yanında DNA'da da ciddi hasarlar oluşturarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve hücre ölümüne (apoptozis) neden olurlar (11,12,13). Özellikle kromozomal DNA fragmentasyonu, nükleer fragmentasyon, kromatin birikimi ve hücre membranındaki değişiklikler apoptozisin oluşmasındaki en önemli faktörlerdir (14). Apoptozis sürecinde serbest

radikallerin yanı sıra, lipid peroksidasyonun son ve stabil ürünü 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE)'nin apoptozisi indüklediği farklı laboratuvarlarda ve farklı hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (15,16). Sonuç olarak, serbest radikal artışı ile nöron ölümleri arasındaki ilişki elektrik alana maruz bırakılan sıçanlarda apoptozisin indüklenebileceğini düşündürmektedir.

2.4. Apoptozis

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevredeki diğer hücrelere zarar vermeden programlı olarak öldürülmesidir. Bu süreç enerji kullanılarak, hücresel yaralanma ve inflamasyon olmaksızın gerçekleşir (117,113). Apoptozis embriyonik dönemden başlayarak, yaşlanmaya dek süren gelişim sürecinde homeostazise katkıda bulunur (118).

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak çevredeki diğer hücrelerde inflamasyon oluşturan hücre ölümü “nekrozis” olarak tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozisden daha farklı bir hücre ölümü gösterilmiş ve buna Yunancada apo (= ayrı) ve ptosis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş, sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelen “apoptozis” adı verilmiştir (117).

2.4.1. Apoptozis Morfolojisi

Ölümcül bir uyarıdan sonra apoptozisin başlama süresi, hücre tipine göre değişiklik gösterir. Ancak, bütün hücre tiplerinde, apoptozise ait morfolojik değişiklikler benzerdir ve çekirdek, sitoplazma ve hücre yüzeyinde meydana gelen değişimler birbiri ile uyumludur. Bu değişiklikler üç evrede gerçekleşir;

- I. evre: Hücre büzülmesi ve çekirdek yoğunlaşması,
- II. evre: Hücre tomurcuklanmasını takiben “apoptotik cisimciklerin” oluşumu,
- III. evre: Apoptotik cisimciklerin fagositozsidir (118).

Birinci evrede apoptozise gidecek olan hücreler komşu hücrelerden ayrılır ve membran yapısı bozulur. Çekirdekte ise endonükleaz enzimlerinin aktive olmasıyla DNA 180-200 baz çifti uzunluğunda kırılmaya başlar ve çekirdek kromatini dağılır. Çekirdek kromatini, çekirdek zarındaki porları kapatacak şekilde çekirdek zarının altında yoğunlaşarak farklı boyutlarda ve şekillerde çekirdeğin iç yüzeyine yapışır (118). Bundan dolayı çekirdek zarı bölünerek parçalara ayrılır. Sitoplazmik proteinlerin yoğunlaşması ve hacmin azalmasına bağlı olarak hücrede büzülme ortaya çıkar. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarının aktivasyonunun bozulmasına bağlıdır (117). Dolayısıyla apoptotik hücreler sağlıklı hücrelerden daha küçük gözlenir. Daha sonra hücre zarlarında çıkıntılar ve kıvrımlar oluşurken, endoplazmik retikulum (ER) genişler ve hücre zarı ile birleşerek yüzeyde kraterler oluşturur, fakat bu süreçte mitokondrilerin yapısında önemli bir değişiklik görülmez (118).

İkinci evrede hücre zarında büzülmenin artmasıyla bleblerin oluşumu gözlenir. Bunun devamında hücre, sitoplazma, organel ve çekirdek parçaları içeren zarla çevrili apoptotik cisim olarak adlandırılan parçalara ayrılır. Apoptotik

cisimlerin bir kısmı yoğun olarak hücre organellerini içerirken, bir kısmında çekirdek kalıntıları mevcuttur (117).

Üçüncü evrede ise apoptotik cisimler bulundukları hücreler arası alanlarda makrofajlar ve komşu hücreler tarafından hızlıca fagosite edilirler (117). Apoptozis sırasında hücre içi makromoleküller dışarı çıkmadığından herhangi bir inflamatuvar cevaba neden olmaz ve komşu hücrelerde zarar oluşturmaz (119). Bu evreler sırasında apoptozisin deneysel olarak saptanması ancak 2. ve 3. evrelerde mümkündür (120,121,122).

2.4.2.Apoptozis ve Nekrozis Farkı

Apoptozis, nekrozdan oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekrozis, kontrolsüz ve pasif bir süreçtir, fizyolojik bir olay değildir (patolojik) ve genelde geniş alanları, hücreleri etkiler. Aksine apoptozis kontrollü, enerji bağımlı bir süreçtir, hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir ve tek bir hücreyi veya hücre grubunu etkiler. Nekrozis de ise hücrede enerji desteği kesilir ve direkt hücre zarının hasara uğradığı gözlenir (123). Bu hasara bağlı olarak hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken “cell swelling”, apoptotik hücre tam tersine küçülür “cell shrinkage” (123).

2.4.3.Apoptozis Yolağı

Birçok fizyolojik ve patolojik durum veya faktör apoptozise neden olabilir. Fakat her hücre aynı faktöre apoptozisle cevap vermez (123) . Apoptozise yol açan nedenler; büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, viral enfeksiyonlar, kanser ilaçları, radyasyon, yüksek doz glukokortikoid, Fas veya tümör nekrozis faktör reseptörü-1 (TNFR-1) reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfositler, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53’ ün aktive olması, hücre içi Ca^{+2} miktarındaki artış ve oksidatif stres olarak sıralanabilir (123).

Apoptozis araştırmalarında birbirini etkileyebilen iki ana yolak olduğu gösterilmiştir:

- 1) Ekstresek veya ölüm reseptör yolağı
- 2) İntrensek veya mitokondriyal yolak

Ekstresek ve intrensek yolaklar aynı son noktada yani infaz yolağında birleşirler. Bu yolak kaspaz-3 ayrımıyla başlar ve DNA parçalanması, hücre iskeletinin ve çekirdek proteinlerinin yıkılması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak da hücrenin fagositozu ile sonuçlanır (124).

Ekstresek veya ölüm reseptör yolağı:

Ekstresek yolak, transmembran reseptör-aracılı etkileşimler ile başlar ve bu reseptörler tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör ailesinin üyeleri olan “ölüm reseptörleri” dir (125). TNF reseptör ailesi üyeleri, sistinden zengin hücre dışı bağlanma bölgeleri (domain) ve yaklaşık 80 aminoasitten oluşan hücre içi “ölüm bağlantı bölgesi” (death domain) adı verilen bağlama bölgelerinden meydana gelir (126). Bu ölüm domaini apoptotik sinyali hücrenin dış yüzeyinden hücre içi sinyal yolağına iletmekle görevlidir (126,127,128).

Apoptozisin ekstresek yolağında meydana gelen olaylar dizisi en iyi FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri ile tanımlanmıştır. Bu modellerde reseptör ve bunlara bağlanan ligandların etkileşimi ve sonrasındaki olaylar bir dizi halinde meydana gelir. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanmasıyla FADD (Fas associated death domain), TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanmasıyla TRADD (TNFR1 associated death domain) adı verilen sitoplazmik adaptör proteinleri reseptörlerin membran iç yüzeylerine bağlanırlar (129). Bağlanmayı takiben ölüm efektör bağlantı bölgesinin dimerizasyonu sonucunda prokaspaz-8 ile etkileşime girerek, prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan bir ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (death inducing signaling complex (DISC)) oluştururlar (130).

İntrensek veya mitokondriyal yolak:

İntrensek yolak doğrudan hücre içi hedeflere etki eden reseptörden bağımsız, mitokondriyal başlangıçlı olaylar zinciridir. Hücre içindeki büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve hormonların eksikliği, radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller intrensek yolağı başlatabilir (124). Tüm bu uyarılar, mitokondriyal membran geçirgenliğinin değişmesine, mitokondriyal transmembran potansiyelinde bozukluğa ve sit-c, Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI), serin proteaz HtrA2/Omi (High-temperature requirement) adı verilen pro-apoptotik proteinlerin intermembran boşluklardan sitozole salınmalarına neden olurlar (109). Bu proteinler kaspaz aracılı mitokondriyal yolağı aktive ederler. Sitokrom-c, prokaspaz-9'a ve Apaf-1'e bağlanarak "apoptozom" oluşumunu sağlar (131,132,133). Bu molekülün asıl oluşma nedeni kaspaz-9'u aktive etmektir.

Diğer pro-apoptotik proteinler olan kaspazla aktive edilen DNAaz (CAD: Caspase- Activated DNase) apoptozis süresince mitokondriden salınır, fakat apoptozisi indükleyen faktör (AIF) hücre ölümüne teslim olduktan sonra salınır. Apoptozisi indükleyen faktör, DNA'nın parçalara ayrılmasına ve periferik nükleer kromatinin yoğunlaşmasına neden olur (134). Kaspazla aktive edilen DNAaz, kaspaz-9 ile etkileşime girerek oligonükleozomal DNA parçalanmasına ve ilerlemiş kromatin yoğunlaşmasına neden olur (135).

Mitokondriyal apoptotik yolların kontrolü ve regülasyonu Bcl-2 protein ailesi üyeleri tarafından yapılır (136). Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 ailesi proteinlerinin düzenlenmesinde önemlidir. Bcl-2 protein ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirir ve sit-c salınması için düzenleyici rol oynar (137). Bu proteinlerin mitokondri membranına etkisi, hücrenin apoptozise gideceğinin ya da apoptozis sürecinin bozulacağının belirlenmesi yönünden özel öneme sahiptir (137).

İnfaz yolağı:

Ekstresek ve intrensek yollarının ikisi de apoptozisin son yolağı olarak düşünülen infaz (execution) fazında sonlanırlar. Bu faz, efektör kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu sonucu başlar. Efektör kaspazlar, proteazları aktive ederek nükleer ve sitoplazmik hücre iskelet proteinlerini parçalarlar. Dolayısıyla hücrede apoptozise ait morfolojik ve biyokimyasal

değişikliklere neden olurlar (138). Kaspaz-3 en önemli efektör kaspazlardan biridir ve başlatıcı kaspazla (kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10) aktive olarak proteolitik kaskadın başlamasına neden olur. Kaspaz-3 aktivasyonu, kaspazla aktive edilen DNAaz inhibitörü (ICAD:Inhibitor of Caspase-Activated DNase) ile birleşik halde bulunan endonükleaz CAD'ı inhibitöründen ayırarak aktive eder. Takiben CAD çekirdekteki kromozomal DNA' yı parçalar ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur (139).

Apoptotik hücrelerin fagositozisi apoptozisin son basamağıdır. Bu hücrelerin yüzeyinde fosfolipid asimetrisi ve fosfatidilserinin membran iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması, diğer hücrelerin fagositozis için uyarılmasını sağlar ve non-inflamatuar fagositik tanıma kolaylaştırarak hücreler erkenden ortadan kaldırılırlar (140).

2.4.4. Apoptozisde Görev Alan Aracılar

p53: Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, apoptozise neden olabilmektedir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. Bir tümör supresör geni olan p53 proteini nükleusta lokalizedir ve harekete geçtiğinde esas fonksiyonu, pek çok diğer genin transkripsiyonunu indüklemektir (141). Bu nedenle p53' ün mutasyonu veya homozigot kaybı sonucu DNA hasarlanması tamir edilemez (142). Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni, apoptotik sinyal sonucu aktif hale geldiğinde ve DNA hasarını tamir edelemeyecek düzeydeyse, bcl-2 grubu proteinlerden bax proteinini aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar (141).

Bcl-2 protein ailesi: Mitokondriyal yolda işlev gören ve apoptoziste çok önemli rol oynayan moleküllerdendir (143). Bcl-2 ailesi, birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur: üyelerinin bir kısmı apoptozisi indüklerken (Pro-apoptotik üyeler: Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), diğer bir kısmı ise apoptozisi inhibe eder (Anti-apoptotik üyeler: Bcl-2, Bcl-X_l). Hücrenin hayatta kalması, pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin rölatif oranına bağlıdır. Dolayısıyla oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır.

Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada por oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sit-c ve AIF' in mitokondriden sitozole çıkmasını sağlayarak apoptozisi indükler (144).

Anti-apoptotik Bcl-2 gen ailesi (Bcl-2, Bcl-X_l), pek çok proteinin sitozolden intrasellüler membrana dağılımını düzenleyen adaptör bir protein olarak etki göstererek kaspazların aktivasyonuna yardım eden sit-c'nin ve AIF'in mitokondriden çıkışını engeller ve böylece apoptozisi inhibe eder (144).

Kaspazlar: Apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan ve aktif merkezinde sistein bulunduğundan "sistein proteazlar" olarak adlandırılan enzimlerdir. Aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarak görevlidirler (145).

Hücrede inaktif proenzim olarak sentezlenirler. Aktivasyonları sırasında aspartat bağının ayrılmasıyla proenzimden, subünitler içeren aktif enzim oluşur ve birbirlerini aktifleştirerek proteolitik kaskada neden olurlar (146). Bu enzimlerin, apoptozis sürecinde genomik DNA'nın 50-200 kb parçalar halinde kırılması, proteinlerin parçalanması, fosfotidilserinin hücre zarı iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması gibi farklı evrelerde rol aldığı gözlemlenmiştir (147,148).

Kaspazlar fonksiyonlarına göre üç gruba ayrılırlar:

1. Başlatıcı Kaspazlar: Bu grup kaspaz 2, 8, 9 ve 10'u içerir ve bu kaspazlar pro-apoptotik sinyali alarak, yolağın devamındaki diğer kaspaz üyelerinin aktive olmasını sağlarlar. Her biri 100 aminoasitten oluşan başlatıcı kaspazlar, transmembran reseptörleri veya sitotoksik moleküller ile etkileşerek aktif hale geçerler. Daha sonra efektör kaspazları aktifleştirirler ve apoptotik mekanizmanın hücre içerisinde farklı yollarda devam etmesine neden olurlar (149).

2. Efektör Kaspazlar: Bu gruba kaspaz 3, 6 ve 7 dahildir. Bu kaspazlar çeşitli hücre içi proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (150).

3. Sitokinleri Aktive Eden Kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14' den oluşan bu grup ise hücre sinyal iletiminde önemli role sahip sitokinlerin aktivasyonları için gereklidir. Bu gruba dahil olan Kaspaz 1, interlökin-1 β dönüştürücü enzim (ICE) olarak bilinmekte ve öncül interlökin-1 β 'nin aktif hale geçmesine neden olmaktadır (150).

2.4.5. Apoptozis ve Oksidatif Stres

Organizmada reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşum hızı ile bunların intrasellüler ve ekstrasellüler ortamdan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır. Bu dengenin bozulması sonucu oksidatif stres meydana gelir. ROS'lar hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşenlerinin yapılarının bozulmalarına neden olurlar (151,152).

Birçok hücrede ROS'un primer kaynağı mitokondridir (153). Mitokondriyal ROS'un aşırı üretimi ve/veya mitokondriyal redoks homeostazisinin bozulması mitokondriyal membran geçirgenliği (mitokondriyal membran permeabilizasyonu :MMP)'nin bozulmasına yol açar. Buna bağlı olarak intrasellüler su homeostazisi bozularak mitokondriyal matriksin ozmotik olarak şişmesine neden olur (154).

Anormal ROS üretimi, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinde (Bax, Bid vb.) konformasyonel değişiklik meydana getirir. Bu değişiklik sonucu, MMP bozulur ve apoptozis indüklenir (155,156). Apoptozis sürecinde oluşan mitokondriyal disfonksiyon, aşırı ROS üretimini tetikler ve Bcl-2 ailesi üyelerinde redoks-aracılı değişiklikler meydana getirerek, hücredeki diğer mitokondrilerle etkileşime girer ve bu mitokondrilerin MMP'sini değiştirerek apoptozisi alevlendirilir (157).

Aynı zamanda ROS üretimi ve buna bağlı olarak oluşan oksidatif stres, redoks-aracılı olarak ER'den sitoplazmaya Ca⁺² salınımına neden olur. Böylece

hücre içi serbest Ca^{+2} 'un artışı, Ca^{+2} -bağımlı enzimlerin (endonükleazlar ve fosfolipazlar) aktivasyonunu değiştirerek birçok farklı mekanizma ile apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunur. Bununla beraber, intrasellüler Ca^{+2} homeostazisindeki bozukluk, sitokinleri aktive eden kaspaz-12'nin aktivasyonunu indükler. Kaspaz-12 kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'u aktive ederek proteolitik kaspaz kaskadının başlamasına neden olur (158).

ROS üretimindeki artış, Ca^{+2} 'un hücre içine girişini arttırmasının yanı sıra, fosfolipidlerinin (PS) oksidasyonuna ve plazma membranının dış yüzeyine translokasyonuna neden olarak hücreyi fagositik yolağa sokar. Dolayısıyla ROS'un fagositik yolda da görev aldığı ve apoptozisi indüklediği gözlenmiştir (159).

Sitoplazmik Ca^{+2} artışını ve PS translokasyonunu indükleyen diğer bir faktör seramid sentezinin artmasıdır (160). Seramid hücre membranında bol miktarda bulunan bir fosfolipid olan sfingomiyelinden sfingomiyelinaz enzimi aracılığıyla oluşur ve oksidatif stres, Fas ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak apoptozis aracısı olarak görev yapar (161,162). Aynı zamanda seramid artışı, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerini aktive ederek apoptozisi kaspaz-bağımsız olarak arttırır (160). Sonuç olarak, ROS'un artması, sfingomiyelinaz enzimini aktive ederek seramid oluşumunu dolayısıyla apoptozis oluşumunu indükler (163).

2.5. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Stabil moleküllerin çoğunun dış yörüngelerinde biri diğerine zıt yönde hareket eden elektron çiftleri bulunmaktadır. Bu elektron çiftleri, molekülün kararlı kalmasını sağlar. Dış yörüngelerinde en az bir adet eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir (164,165). Serbest radikaller rastlantısal bir şekilde metabolizmanın yan ürünleri olarak veya belli bir amaca yönelik olarak (ör: fagositoz) hücre içerisinde sürekli üretilirler. Serbest radikaller üç yoldan oluşabilirler:

1. Normal bir molekülün kovalent bağının homolitik ayrılmasıyla
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesiyle
3. Normal bir moleküle elektron eklenmesiyle (166)

Biyolojik etkileri en önemli olan serbest radikaller oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest oksijen radikalleri biyokimyasında anahtar rol oynayan maddeler oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördünün reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşmaktadır (167,168,169).

Süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$):

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) meydana gelmektedir (170). Süperoksitin asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksitin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türevi olan peroksinitrit oluşmaktadır (168).

Hidrojen peroksit (H_2O_2):

Hidrojen peroksitin üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olmaktadır. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni

oluşturmaktadır. Hidrojen peroksit düşük elektriksel yükü ve noniyonize özelliklerinden dolayı hücre membranlarından hızlıca geçer. Geçiş grubu metal iyonlarının varlığında yüksek derecede reaktif serbest radikaller oluşturur (170,171).

Hidroksil radikali (•OH):

Hidrojen peroksit süperoksit radikali ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilmektedir. Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır. Fakat geçiş metalleri, metal şelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde demir benzeri geçiş metalleri, demir içeren maddeler (transferrin, laktoferrin, hemoglobin, adenozin, 5'-difosfat ferrin iyon) mevcuttur. Süperoksit radikali ferrik (Fe^{+3}) demiri, ferröz (Fe^{+2}) demire indirger. Bu sırada H_2O_2 , hidroksil radikaline dönüşür (172,173).

Serbest radikallerin lipidlerle reaksiyonu:

Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturmaktadır. Poliansatüre yağ asitlerinin (poly unsaturated fatty acid- PUFA) oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin poliansatüre yağ asitlerinin yan zincirlerindeki metillenmiş karbonlardan hidrojen atomu koparmasıyla başlar. PUFA'nın oksidasyonu, bir oksijen alarak çabucak peroksil radikaline ($LOO\bullet$) dönüşebilen yağ asidi radikalinin ($L\bullet$) oluşmasına yol açar (166,174,175). Peroksil radikali, membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını koparıp peroksidatif zincir reaksiyonunu başlatmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra devam eder (176,177).

Lipid hidroperoksitler de ($LOOH$) yıkılarak $LO\bullet$, $LOO\bullet$ gibi radikaller ve aldehidlerin oluşmasına neden olurlar. Lipid hidroperoksit yıkım ürünleri membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olmakta ve membranın bazı fonksiyonlarını değiştirmektedir. Ayrıca DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girmekte, mutajenik, genotoksik ve karsinogenik etki göstermektedir (178,179).

Molekül ağırlığı 156 kDa olan 4-hidroksi-2-nonenol (4-HNE) doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonun son ürünlerinden biri olarak ortaya çıkmaktadır. Suda çözülebilir bir bileşik olan 4-HNE'nin lipofilik özellikleri daha baskındır. Bu nedenle 4-HNE fosfatidiletanolamin gibi fosfolipidlerle ve taşıyıcılar, iyon kanalları ve reseptörler gibi proteinlerle hızlı bir şekilde reaksiyona girmektedir (180). Özellikle amino ve tiol gruplarına sahip biomoleküller 4-HNE'nin hedefleri arasında yer almaktadır (181). Ayrıca, 4- HNE membran akışkanlığının değişimi ya da fosfolipid asimetrisinin kaybı gibi biyokimyasal modifikasyonlara da neden olmaktadır (181,182). Bununla birlikte, 4-HNE proteinlerdeki sistein, lizin ve histidin yan zincirleriyle etkileşime girerek protein fonksiyonlarını inhibe eder (183). Glutamat, glukoz ve iyonların taşınmasında görev alan taşıyıcı proteinlerin fizyolojik fonksiyonları da 4-HNE tarafından inhibe edilmektedir (184). Diğer yandan 4-HNE'nin DNA bazları ile etkileşime girerek mutasyon hızını artırdığı gösterilmiştir (185).

Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Amyotrofik Lateral Sklerozis, Huntington hastalığı gibi nörolojik hastalıklarla 4-HNE arasında bir ilişkinin olduğu ifade edilmektedir (186). Nitekim, Alzheimer hastalarının beyin dokularında HNE-Lizin bileşiğinin nörofilament kümelerinde lokalize olduğu bulunmuştur (187). Benzer şekilde, Parkinson hastalarının beyin dokusunda HNE-Lizin bileşiği histokimyasal olarak belirlenirken (188), plazma ve serobrospinal sıvılarında da 4-HNE değerinin istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır (189). Amyotrofik Lateral Sklerozis ve Huntington hastalığında da 4-HNE değerinin arttığı görülmüştür (190,191).

Süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve lipid hidroperoksitleriyle kolayca reaksiyona girerek antioksidan savunmaya katılan Vitamin C, aynı zamanda 4-HNE ile Vitamin C-HNE kompleksini oluşturarak HNE'nin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmaktadır (192). Ayrıca, protein tiollerle 4-HNE'nin oluşturduğu bileşikler GSH gibi düşük moleküler ağırlıklı tiollerin varlığında geri dönüşümlü olmaktadır. Glutasyonun fizyolojik konsantrasyonları (örn; 4mM), protein disülfid izomerazlı bileşiklerden 4-HNE'nin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Bu tür bir reaksiyon HNE ve diğer lipid peroksidasyon ürünlerinden dolayı oluşan protein inaktivasyonuna karşı bir koruma mekanizması olarak gösterilmektedir (193).

Serbest radikallerin proteinlerle reaksiyonu:

Peptid ve protein makromoleküllerinin yapı taşları olan aminoasitlerde, serbest radikallerin hedefleri içerisinde yer almaktadır. Aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerde de fiziksel değişikliklere neden olmaktadır. Bu fiziksel değişiklikler üç gruba ayrılabilir; fragmantasyon, agregasyon ve proteolitik yıkıma duyarlılık (165).

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri:

Yapılan çalışmalarda, α -hidroksialdehid yapıya sahip karbonhidratların, metal iyonlarının varlığında hızlı bir şekilde otooksidasyona uğradıkları ve bunun sonucunda dikarbonil bileşikler ve hidrojen peroksit oluşturdukları belirtilmiştir (170,194).

Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri:

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme neden olmaktadır. Hücre içinden ve dışından kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (170,195,196).

2.5.1. Antioksidan Sistem

Antioksidan sistem, serbest radikallere karşı organizmanın en önemli silahıdır. Hem hücre içinde hem de hücre dışında oluşan radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemi öğelerinin ortaklaşa çalışmaları sonucu ortadan kaldırılır (197,198,199).

Antioksidan savunma sistemi iki ana gruba ayrılır:

1. Primer antioksidan savunma:

- Antioksidan enzimler: SOD, CAT ve peroksidazlar
- Antioksidan bileşikler: Vit E, Vit C, Vit A, glutasyon, ürik asit, lipoik asit, bilirubin, L-karnitin vs.

2. Sekonder antioksidan savunma: Sekonder savunmanın temel görevi oksidan stresin yarattığı hasarlı ve fonksiyonu bozulmuş çeşitli yapıları ortadan kaldırarak hücrede birikmesini engellemektir. Başlıca; lipolitik (fosfolipazlar) ve proteolitik enzimler (proteazlar, peptidazlar) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (170,200).

Primer antioksidan savunma:

Antioksidan enzimler:

Süperoksit dismutaz (SOD):

SOD enzimi süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir (168,169).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px):

Bir çok canlıda bulunan bu enzim, hücre içinde mitokondrial matriks ve sitozolde bulunur. Glutasyon peroksidaz organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksidin indirgenme reaksiyonlarını katalizler (170,201).

Katalaz (CAT):

Katalaz hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktadır. Peroksizomlarda lokalizedir (168). H_2O_2 seviyesinin düşük olduğu durumlarda, organik peroksitler tercihen peroksidaz tarafından metabolize edilirken, H_2O_2 konsantrasyonunun yüksek olduğu koşullarda katalaz tarafından metabolize edilirler (170,202).

Glutasyon redüktaz (GSSG-R):

Glutasyon redüktaz yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) β -nikotinamid adenin dinükleotit (NADPH)'e bağımlı olarak indirgenmiş glutatona katalizleyen bir flavoproteindir (203,204).

Antioksidan bileşikler:

Vitamin C (Askorbik asit): $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ ve lipid hidroperoksitleriyle kolayca reaksiyona girer. Ayrıca Vit C'nin en önemli fonksiyonu yükseltgenmiş Vitamin E'nin antioksidan özelliklerini yenilemesidir (170,205,206).

Vitamin E (α -tokoferol): E vitamini hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerinin serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksil radikallerini ve diğer radikalleri indirgemektedir (205).

Vitamin A (Karotenoidler): Karotenoidlerin serbest radikalleri temizleyerek lipid peroksidasyona karşı koruduğu, süperoksit radikallerini temizlediği ve peroksi radikalleriyle etkileşerek antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır (170).

Glutasyon (GSH): $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ ve H_2O_2 gibi bileşiklerle etkileşerek indirgeyici görev görür. Redükte glutasyon doğrudan süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve organik radikallerle reaksiyona girip yükseltgenebilir veya Vitamin A gibi antioksidanların yükseltgenmiş formdan indirgenmiş forma geçmesini sağlayarak antioksidan etki gösterir (170,207).

GEREÇ VE YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik, Biyokimya, Histoloji ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen çalışmamızda Wistar sıçanlar kullanılmıştır.

3.1. Gruplandırma

Sıçanlar her grupta 12'şer hayvan olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur.

Grup 1: Kontrol grubu (K)

Grup 2: Prenatal grup (Pr)

Grup 3: Postnatal grup (Po)

Grup 4: Pre+postnatal grup (Pr+Po)

3.2. Deney protokolü

Deney gruplarını oluşturmak üzere 20 adet 3 aylık dişi sıçan erkek sıçanların kafeslerine konulmuştur. Ertesi günden itibaren dişi sıçanların hamilelikleri vajinal sürüntü (smear) testi ile takip edilmiştir. Hamile olduğu tespit edilen sıçanlar başka bir kafese alınarak deneye başlanmıştır.

Kontrol grubunu oluşturmak için seçilen dişi sıçanlar, hamile oldukları tespit edildikleri günden itibaren doğum yapana kadar elektrik alana maruz bırakılmadan bekletilmiştir. Doğumun gerçekleştiği günden laktasyon dönemi sona erene kadar, dişi sıçanlar yavrularla birlikte aynı kafeste tutulmuşlardır. Laktasyon döneminden sonra, yavrular içerisinde seçilen erkek sıçanlar ayrı kafeslere alınıp 3 aylık olana kadar normal laboratuvar ortamında, hiçbir deneysel işleme maruz kalmadan bekletilerek kontrol grubu oluşturulmuştur.

Pr grubunu oluşturmak için seçilen dişi sıçanlar, hamile oldukları tespit edildikleri günden itibaren doğum yapana kadar elektrik alana maruz bırakılmışlardır. Laktasyon döneminden sonra, yavrular içerisinde seçilen erkekler 3 aylık olana kadar normal laboratuvar ortamında hiçbir uygulamaya maruz kalmadan kayıt gününe kadar bekletilmiştir.

Po grubunu oluşturmak için seçilen dişi sıçanlar, hamile oldukları tespit edildikleri günden doğum yapana kadar normal laboratuvar ortamında hiçbir işlem yapılmadan tutulmuşlardır. Daha sonra doğumun gerçekleştiği günden laktasyon dönemi sona erene kadar dişi sıçanlar yavrularla birlikte, laktasyon döneminden sonra da yavrular içerisinde seçilen erkek sıçanlar 3 aylık olana kadar elektrik alana maruz bırakılmışlardır.

Pr+Po grubunu oluşturmak için hamileliklerinin ilk gününden başlanarak doğuma kadar elektrik alana maruz kalan dişi sıçanlar, doğumdan sonra da yavrularıyla birlikte laktasyon dönemi sonuna kadar elektrik alana maruz

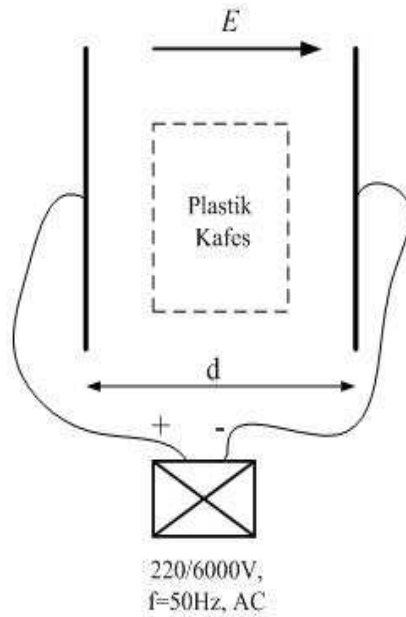
bırakılmışlardır. Laktasyon dönemini takiben, yavrular içerisinde seçilen erkekler 3 aylık olana kadar elektrik alana maruz bırakılmışlardır.

Tüm deney gruplarında, yavrular içerisinde seçilen erkekler deney süresi boyunca, her kafeste 4 hayvan olacak şekilde, 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulmuşlardır. Bu süre içinde hayvanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. Yem-su tüketimleri günlük olarak, ağırlık değişimleri ise haftada bir kez ölçülerek takip edilmiştir.

Deney süresince, deney hayvanlarına günde 1 saat süreyle 12 kV/m şiddetinde elektrik alan uygulanmıştır. Elektrik alan uygulaması her gün saat 10:00–14:00 arasında yapılmıştır. Deney süresinin sonunda, üretilen anestezisi altında hayvanların beyin potansiyelleri kayıtları alındıktan sonra aynı gün feda edilmişlerdir.

3.3. Elektrik Alan Modeli

Elektrik alan Aydın ve ark. (208) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. 50 Hz frekanslı elektrik alanın oluşturulması için paralel plaka sistemi kullanılmıştır. Prensipten aşağıda verilen bu sistemde (Şekil 3.1), plakalara 50 Hz frekanslı, sinüzoidal karakterli, AC gerilim uygulanarak elektrik alan oluşturulmuştur. Paralel plaka olarak 2 mm kalınlığında çinko ile kaplanmış 80x50 cm boyutlarında bakır levhalar kullanılmıştır. Elektrik alan dağılımında homojen yapıyı sağlamak için levhaların keskin köşe dönüşleri yuvarlatılmış ve plakalar tahta blok üzerine dikey ve birbirlerine paralel olacak şekilde yerleştirilmiştir. Elektrik alan dağılımında bozucu etkilerin oluşmaması amacıyla besleme kabloları plakaların dış orta noktalarına bağlanmıştır. Sıçanların birbirlerini elektrik alana karşı perdelemekten rahatça dolaşabilecekleri standart ölçülerde (425 x 265 x 185 mm) olan plastik sıçan kafesleri kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. 50 Hz frekanslı AC elektrik alanının oluşturulması için paralel plaka sistemi prensip şeması

Plakalar arasında oluşan elektrik alan şiddeti E (volt/metre), V plakalar arasındaki elektrik potansiyeli, d plakalar arası uzaklığı göstermek üzere, $E=V/d$ eşitliğine göre hesaplanmaktadır. Gerilim kaynağı olarak 6000 V (6 kV) çıkışa sahip bir transformatör kullanılmıştır (220 Vrms/6000 Vrms). Transformatörün primer (218.5–226.5 V) ve sekonder (5850–5945 V) voltajları Max 3000 TRMS Multimetre (Chauvin Arnoux, France) kullanılarak ölçülmüştür. Elektrik alan şiddeti plakalar arasındaki mesafe değiştirilerek ayarlanmıştır. $E=V/d$ eşitliğinden faydalanarak sıçanlara 12 kV/m değerinde elektrik alan uygulamak için, plakalar arası mesafe 50 cm olarak ayarlanmıştır ve elektrik alan şiddeti 11700–11890 V/m olarak ölçülmüştür (Max 3000 TRMS Multimetre, Chauvin Arnoux, France). Paralel plaka sisteminin maksimum magnetik alan şiddeti 0.1 μ T olarak ölçülmüştür (Digital Gauss/ Tesla Meter, Unilab, UK). Paralel plaka sisteminde elektrik alan şiddetinin homojenliği test edilmiş (HI-3804 Electromagnetic Field Survey Meter-Industrial Compliance Meter) ve maksimum değişimin %1'den düşük olduğu görülmüştür.



Şekil 3.2. 50 Hz frekanslı AC elektrik alanı oluşturan paralel plaka sistemi

3.4. Uyumsuzluk Negativitesi (MMN) Kayıtlarının Alınması

Çalışmamızda, sıçanların MMN kayıtları Ruusuvirta ve ark. (36)'nın yöntemine göre alınmıştır. Sıçanların anestezisi için kullanılan üretan (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) 1.2 g/kg dozunda serum fizyolojik içinde çözülerek (24 g/100 ml) intraperitoneal olarak verilmiştir. Anestezik madde verildikten sonra stereotaksik cihaza yerleştirilen sıçanların kafası cihazın kulak çubuklarıyla sabitlenmiştir. Sıçanların kafa derisi orta hattın bistüri ile kesilerek açıldıktan sonra referans nokta olan bregma tespit edilmiş ve kafatasına matkapla 2 delik açılarak kayıt almak için gerekli olan vida elektrotlar duranın yüzeyine tutturulmuştur. Kayıt elektrodu sol hemisferde işitsel korteks üzerinde (bregmanın 4.5 mm arkası ve orta hattın 3.5 mm laterali), referans elektrodu sağ serebellar korteks üzerinde ve toprak elektrodu hayvanın kuyruğunda olacak şekilde yerleştirilmiştir. Elektrotlar yerleştirildikten sonra sıçan stereotaksik cihazdan çıkarılarak kayıt odasına alınmıştır (Şekil 3.3). Kayıt odasının arka plan gürültü seviyesi 46 dB olarak ölçülmüştür (Testo 816 Sound Level Meter, Germany).



Şekil 3.3. MMN kayıtlarının alınması

Çalışmamızda, EEG üzerinden işitsel uyarıya cevap olarak ortaya çıkan ERP'lerden elde edilen MMN kaydı için kullanılan deneysel paradigma, ardı ardına verilen standart ses uyarıları içerisinde rasgele serpiştirilen nadir uyarıları içerecek şekilde düzenlenmiştir. Deneysel paradigmanda her bir uyarının süresi 50 ms olacak şekilde, 85 dB ve 2000 Hz olan standart tonlar ile aynı şiddette, fakat frekansı 2500 Hz olan nadir tonlar kullanılmıştır. Uyarılar arası süresi (ISI) 500 ms olan 1000 işitsel uyarı (900 standart uyarı, 100 nadir uyarı, %10 oranında) sağ kulağa 15 cm mesafedeki bir hoparlör aracılığıyla verilmiştir.

Sıçanlardan alınan EEG sinyali sürekli olarak kaydedilmiştir (Brainamp EEG/EP Amplifier, Brain Products, Munich, Germany). EEG kayıtları sırasında 0.1–1000 Hz band geçiren filtre uygulanmış ve potansiyeller 1000 Hz örnekleme hızında sayısallaştırılmıştır (Brainvision Recorder, Brain Products, Munich, Germany).

Kontrol ve deney grubundan alınan EEG kayıtlarının görsel kontrolü yapıp kayıt esnasında ortaya çıkan gürültüler (artefaktlar) atıldıktan sonra, traselere band geçiren (2-20 Hz) filtre uygulanmıştır. Filtreleme işlemi takiben, standart ve nadir uyarıdan sonra zamana bağlı olarak ortaya çıkan cevapların ortalamaları alınmıştır. EEG kayıtlarının değerlendirilmesi için uyarıdan önceki 100 ms baz olarak kullanılmıştır (EEGLab 7).

Her bir sıçan için standart ve nadir tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan ortalama eğrilerden, ERP'lerin pik genlikleri ve latensleri belirlenmiştir. Nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak her bir sıçana ait fark dalgaları elde edilmiştir.

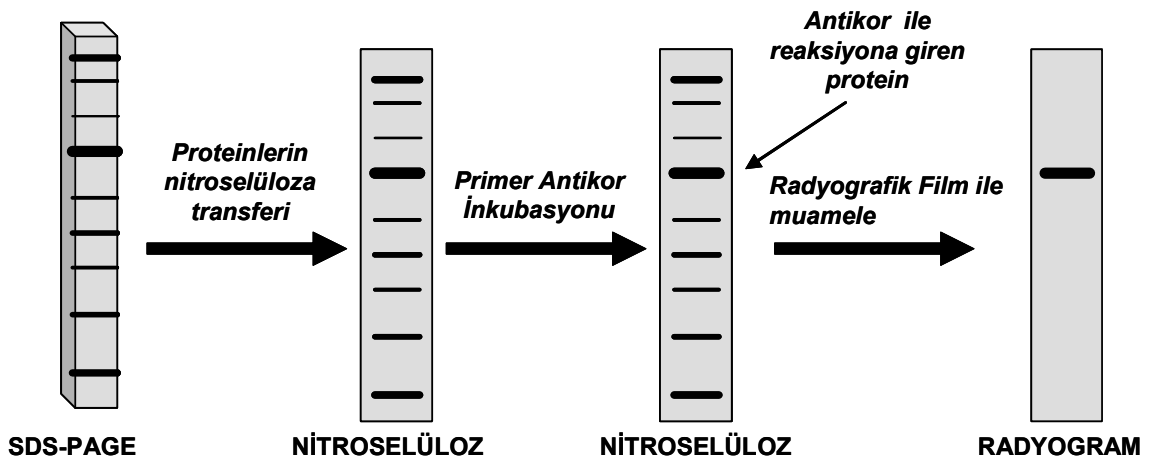
3.5. Biyokimyasal Yöntemler

Beyin potansiyelleri kayıtlarının alınmasının hemen ardından heparinli izotonik kullanılarak kardiyak perfüzyon ile beyin dokuları kandan arındırılmış ve çıkarılan beyin dokuları sıvı nitrojen içerisinde dondurularak -80 °C’de saklanmıştır. Çıkarılan beyin dokuları 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve protein karbonil parametrelerinin ölçümleri için ayrılmıştır.

3.5.1. 4-Hidroksinonenal (4-HNE) Aktivitesinin Tayini

Prensip: Western Blot Analizi için beyin homojenatlarından elde edilen proteinler sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıldıktan sonra jeldeki proteinler nitroselüloza transfer edilerek anti-4-hidroksinonenal (anti-4-HNE) ile inkübe edilmişlerdir. Daha sonra ortama peroksidaz bağımlı sekonder antikor ilave edilerek immünoreaktif bantlar kemilüminesans yöntemle gözlenmiştir.

İşlemler: 4-hidroksinonenal ölçümü için ayrılan beyin dokuları soğuk homojenizasyon tamponunda (50 mM K₂HPO₄, 80 µM leupeptin, 2.1 mM Pefablok, 1mM phenylmethylsulfonyl florid, 1 µg/ml aprotinin, (pH= 7.4) buz üzerinde homojenize edilmiş, elde edilen homojenatların 4 °C’da, 15000 x g’de, 30 dakika santrifüj edilmesinden sonra ayrılan süpernatantlar -80 °C’da saklanmıştır. 4-hidroksinonenal aktivite tayini PAGE-western blot yöntemiyle yapılmıştır (Şekil 3.4). Elde edilen hücre lizatları santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda protein konsantrasyonu 595 nm’de Coomassie reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Bu ölçümde bovin serum albumin standard olarak kullanılmıştır. Elde edilen protein homojenatı Laimle tamponu ile 1:2 oranında karıştırılmış, %7,5’luk poliakrilamid jele tatbik edilerek elektroforetik ayırım sağlanmıştır. Jelde ayrılan protein, selüloz asetata transfer edilerek western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrılan hücre proteinleri ayrı olarak primer anti-HNE antikor (Anti-HNE-Michael Adducts, Reduced Rabbit pAb) içerisinde (1:1000 dilüsyonda) 1 saat 25 °C’da bekletildikten sonra HRB-bağılı sekonder antikor (ZYMED, San Fransisco, California) (1:10 000 dilüsyona) ile muamele edilmiştir. Reaktif doku proteinleri kemilüminesans yöntemle belirlenmiştir.



Şekil 3.4. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

4-HNE Aktivitesinin Hesaplanması: Görüntülenen protein bantlarının dansitometrik analizi, NIH image 1.61 yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3.5.2. Protein Karbonil Ölçümü

Protein Karbonil ölçümleri ticari bir kit (Cat. #10005020. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapılmıştır (Tietze F. Enzymic method for quantitative).

Prensip: Protein karboniller DNPH ile reaksiyona girerek Schiff bazı oluştururlar ve son ürün olarak gösterilen protein hidrazon bileşikler meydana gelir. 360-385 nm’de absorbans veren bu bileşikler aracılığı ile protein karboniller spektrofotometrik olarak tayin edilir.

Reaktifler

- 1) Hidroklorik Asit
- 2) DNPH
- 3) TCA Solüsyon
- 4) Guanidin Hidroklorit
- 5) Etanol
- 6) Etil Asetat

İşlemler: Dondurulmuş halde bulunan beyin dokuları 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K₂HPO₄ (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde homojenize edilip (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc.,Connecticut, USA) 4 °C’de 10,000 g’de 15 dak santrifüj edilerek süpernatanı atılmıştır. Numuneden 400 µl alınarak, 200 µl bir tüpe (numune tüpü), kalan 200 µl diğer tüpe (kontrol tüpü) aktarılmıştır. Numune tüpüne 800 µl DNPH, kontrol tüpüne 800 µl HCl ilave edilerek 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bütün tüpler sırası ile %20 ve %10 TCA eklenerek 5 dakika inkübe edilmiş ve her basamağın ardından 4 °C’de 10,000 g’de 10 dak santrifüj edilmiştir. Pelet (1:1) etanol/etil asetat karışımı içerisinde resüspanse edilerek 4 °C’de 10,000 g’de 10 dak santrifüj edilmiştir. Bu basamak iki kere daha tekrarlanıp son yıkamadan sonra protein peletleri 500 µl guanidin hidroklorit içerisinde vortekslenerek resüspanse edilmiş ve 4 °C’de 10,000 g’de 10 dak santrifüj edilmiştir. Absorbanslar, plate reader’da 360-385 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Protein Karbonil miktarının hesaplanması: Kontrol örneklerinin ortalama absorbansı, numune örneklerinin ortalama absorbansından çıkartılarak elde edilen absorbans değerleri dilüsyon faktörü ile çarpılıp Dinitrofenilhidrazin için 370 nm’de molar absorblama katsayısı ve (mg/ml) protein miktarına bölünerek hesaplanan protein karbonil miktarı (nmol/mg) olarak ifade edilmiştir.

3.6. Histolojik Parametreler

3.6.1. Doku Takibi

Çıkarılan beyin dokuları TUNEL yönteminde kullanılmak üzere %10 formalin solüsyonunda yaklaşık 1 gün süreyle bekletilmiştir. Ertesi gün 4 saat akan su altında yıkanarak formalinin fazlasının uzaklaşması sağlandıktan sonra yükselen alkol serilerine yarım gün maruz bırakılmıştır (%70, %80, %90, %100). Dört saat %100'lük alkolde bekletildikten sonra ksilolde şeffaflaştırılmış ve dokular parafine gömülüp, 5'er mikronluk hipokampus, işitsel ve frontal korteksten kesitler alınarak önceden hazırlanmış poly-L-Lizinli lamlara yapıştırılmıştır. TUNEL reaksiyonlarına başlamadan 1 gece önce slaytlar 45 derecelik etüvde bekletilerek dokunun lamlara iyice yapışması sağlanmıştır.

3.6.2. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labelling) Metodu

Bu yöntem in vitro ortamda apoptozise giren hücrelerin miktarını belirlemek için kullanılmıştır.

Kullanılan Malzemeler:

- 1- Tunel kit (Roche#11684795910)
- 2- PBS
- 3- Permeabilizasyon Solüsyonu: 10 ml. 1x PBS içerisine 200 µl. Triton-X 100 ilave edilmiş ve oda ısısında saklanmıştır.
- 4- Floresan boyanmaya spesifik DAPI'li kapatma solüsyonu (Vector lab # H1200)

İn vitro koşullarda, hücre popülasyonunda apoptozisi göstermek amacıyla kullanılan TUNEL kiti, apoptoziste ortaya çıkan DNA kırıklarının 3-OH ucuna (terminal deoksinnükleotid transferaz (TdT) enziminin floresan işaretli 12-dUTP'nin katılımı ile) bağlanarak apoptotik hücrelerin floresan mikroskobu altında tespit edilmesine imkan tanımaktadır.

Seri kesitler, 5-7µm kalınlığında poli-L lizin kaplı lamlara alınıp, 24 saat ya da daha uzun süreyle oda ısısında kurutma yapılmıştır. Kesitler boyanmanın uygulanacağı günden 1 gece önce, 45°C'lik etüvde gece boyu ve uygulamadan 1 saat önce de 60°C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyonun (2 kez, 5'er dakika ksilol solüsyonunda) ardından, rehidratasyon işlemi (Alçalan alkol derecelerinde; %100, %90, %80, %70 5'er dakika sürelerle) uygulanmıştır. Devamında PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkanan kesitler, 100 ml distile su +100 µl Triton-X hazırlandıktan sonra, 0.1 gr sodyum sitrat çözülerek hazırlanan permeabilizasyon solüsyonunda +4°C'de (buzdolabında ya da oda ısısında buz üzerinde) 8 dakika bekletilmiştir. Tekrar PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapılmış kesitlere 50µl enzim solüsyonu + 450 µl işaretleme solüsyonu + 500 µl TUNEL dilüsyon tamponu (pozitif sinyaller için) eklenerek hazırlanan TUNEL (reagent) solüsyonu damlatılarak 37°C'de, karanlık ve nemli ortamda (humidified chamber), 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapılmış ve DAPI'li kapatma solüsyonu ile kapatılıp floresan mikroskobunda incelenmiştir.

3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uyan veriler için parametrik olan Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey Post Hoc Testi, uymayanlarda ise nonparametrik olan Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. Grup içi karşılaştırmalarda ise paired-samples T test uygulanmıştır. $P<0.05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

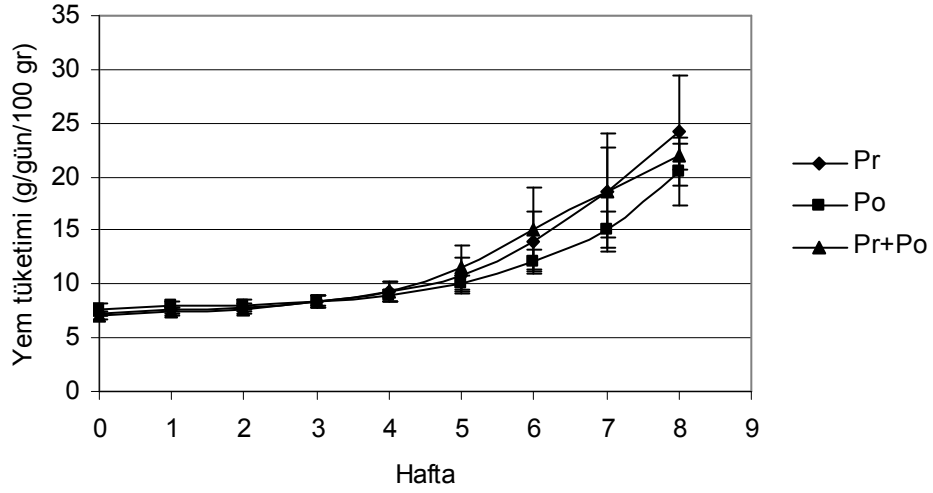
BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

Deney süresince hayvanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

4.2. Besin Tüketimi

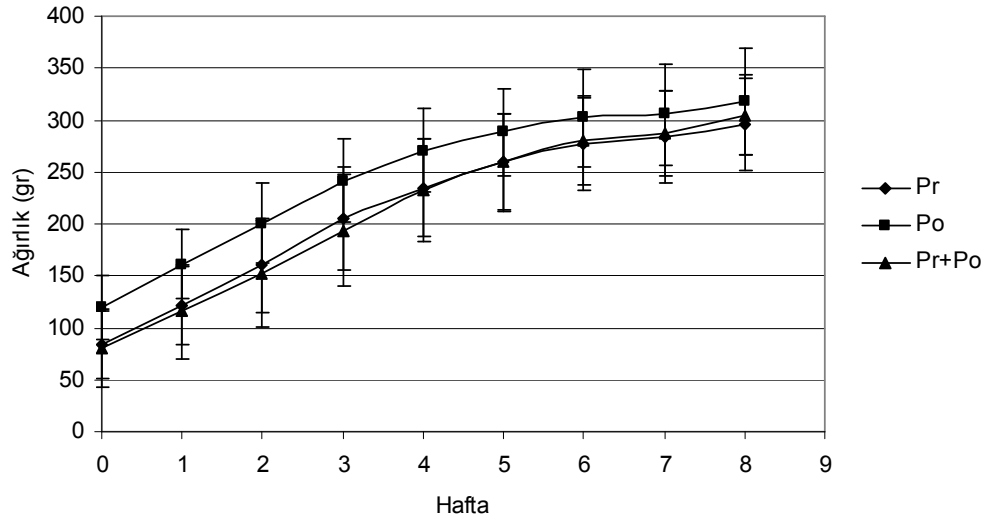
Grupların laktasyon dönemi ile kayıt günü arasındaki 8 haftalık deney süreleri boyunca günlük yem tüketimleri takip edilmiş ve bulgular 100 gram vücut ağırlığı başına gr/gün olarak hesaplanmıştır. Grupların besin tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Deney grubu hayvanların haftalık yem tüketimleri

4.3. Ağırlık Değişimi

Deney gruplarının haftalara göre ağırlık değişimleri Şekil 4.2’de verilmiştir. Deney süresi boyunca tüm deney gruplarındaki hayvanların haftalık vücut ağırlıkları takip edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.



Şekil 4.2. Deney grubu hayvanların haftalık ağırlık değişimleri

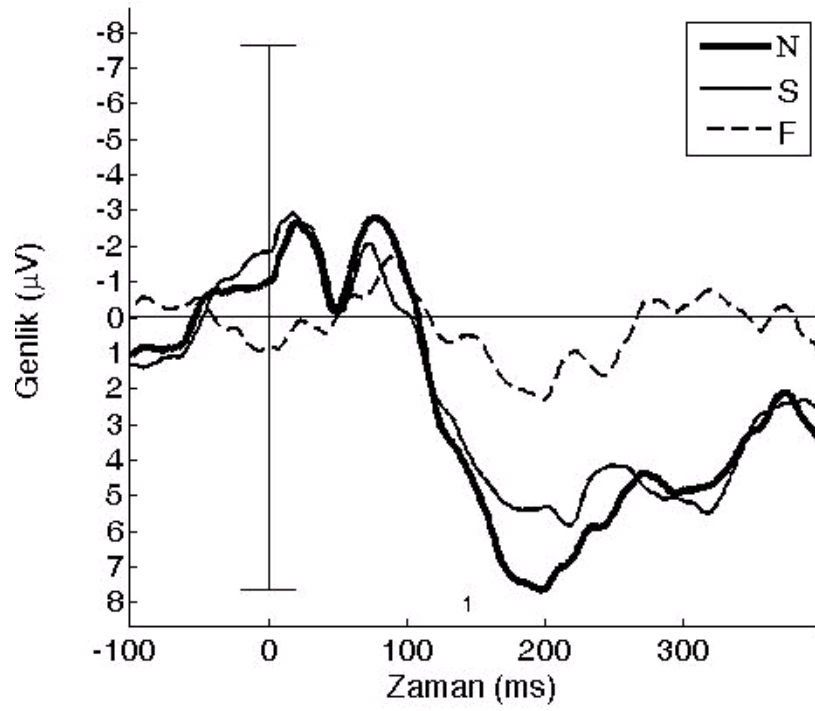
4.4. Uyumsuzluk Negativitesi (MMN) Sonuçları

Olaya İlişkin Potansiyel kayıtları incelenerek tüm gruplardaki her bir sıçan için standart ve nadir tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan ortalama eğrilerden, ERP'lerin pik genlikleri ve latensleri belirlenmiştir. Nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak her bir sıçana ait fark eğrileri elde edilmiştir. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen standart, nadir ve fark eğrileri Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6'da sunulmuştur.

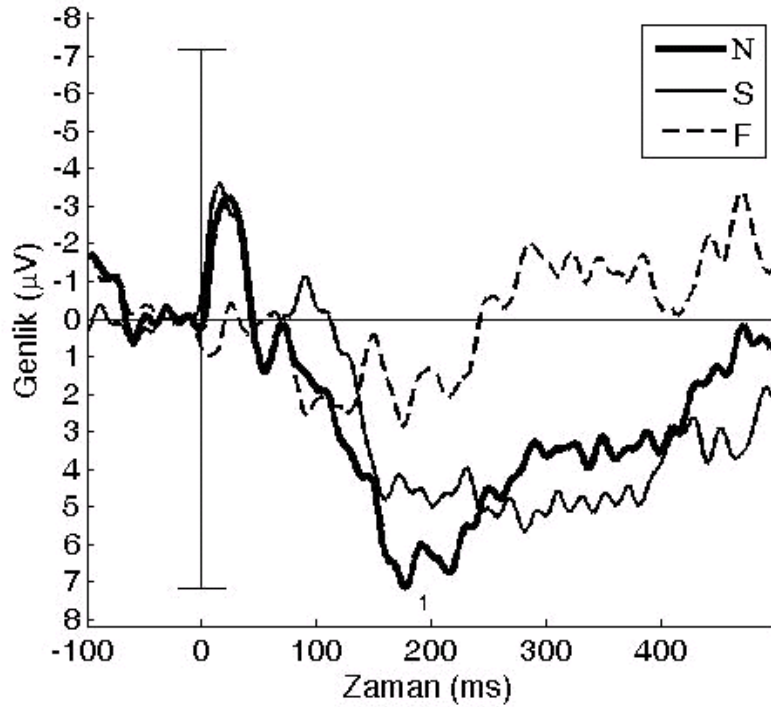
Olaya İlişkin Potansiyellerin pik latenslerinin ve tepeden tepeye genliklerinin ortalama değerleri, standart hataları ve Tukey testi sonuçları Tablo 4.1 ve 4.2'de verilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan ERP'lerin tüm bileşenlerinin latenslerinde bir değişiklik görülmemiştir (Tablo 4.1). Benzer şekilde, nadir uyarıya ait yanıtta standart uyarıya ait yanıt çıkarılarak elde edilen fark eğrilerinin latenslerinde de istatistiksel olarak herhangi bir değişim saptanmamıştır (Tablo 4.2 ve Şekil 4.7).

Tepeden tepeye genlik değerleri incelendiğinde standart uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan ERP'lerde gruplar arası herhangi bir fark gözlenmemiştir. Nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan ERP'lerin P_2N_2 genliğinin ise kontrol grubuna göre P_0 grubunda azaldığı saptanmış, P_1N_1 ve N_1P_2 genlik değerleri için gruplar arası bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.3). Standart ve nadir uyarıya cevap olarak elde edilen eğrilerin latens ve genlik değerlerinin grup içi karşılaştırmaları paired-samples t testi ile yapılmıştır. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının standart ve nadir uyarıya bağlı olarak ortaya çıkan ortalama ERP bileşenlerinin grup içi latens karşılaştırmaları yapıldığında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları için yapılan istatistiksel değerlendirmede, tüm gruplar için nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan ERP'lerde P_2N_2 genliğinin standart uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan ERP'lerdeki P_2N_2 genliğine göre önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. P_1N_1 ve N_1P_2 genliklerinin grup içi karşılaştırmalarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11).

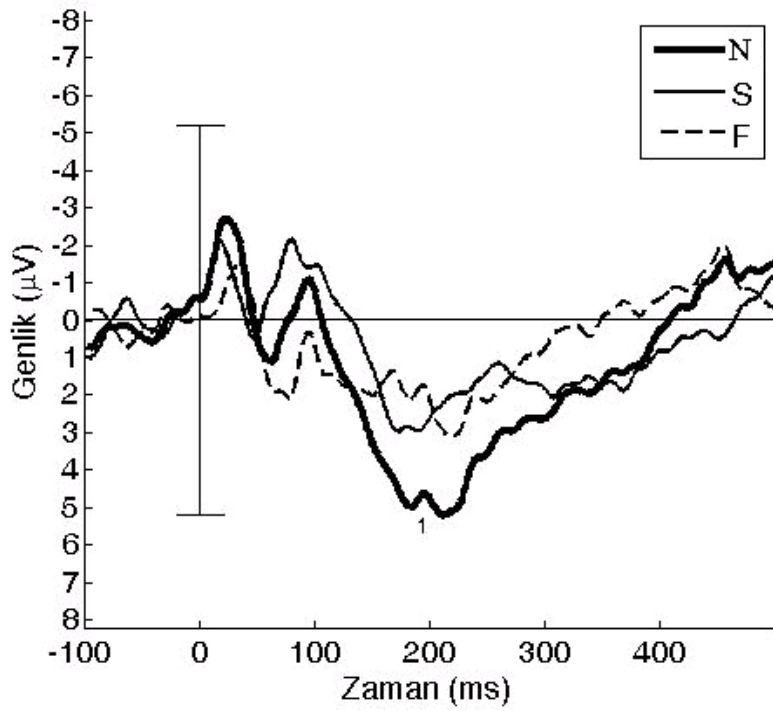
Fark eğrilerinin tepeden tepeye genlikleri değerlendirildiğinde, P_2N_2 genliğinin tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı, P_1N_1 ve N_1P_2 genliklerinde ise gruplar arası istatistiksel bir farkın olmadığı izlenmiştir. (Tablo 4.4 ve Şekil 4.12).



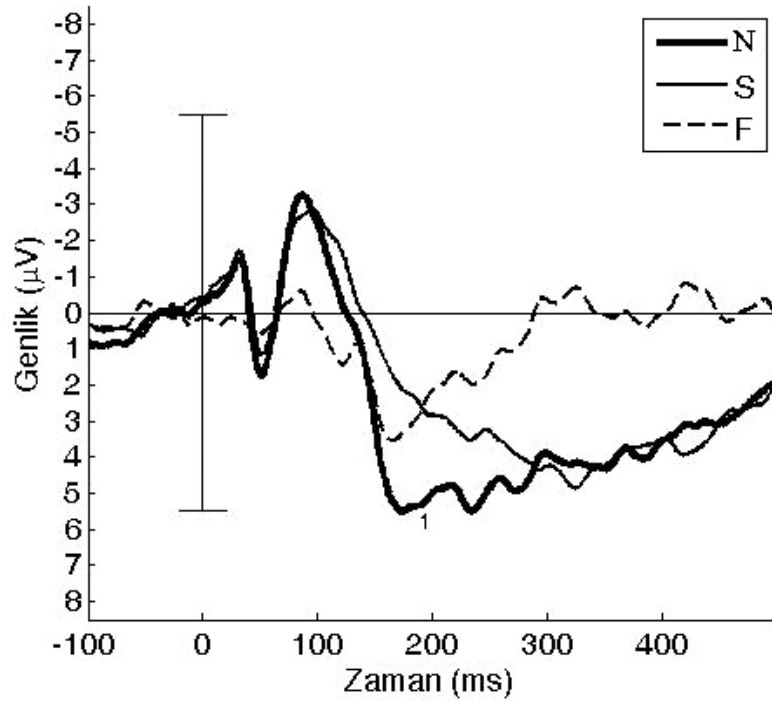
Şekil 4.3. Kontrol grubu hayvanlarına Standart (S) ve nadir (N) tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan eğriler ile nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark (F) eğrisi



Şekil 4.4. Pr grubu hayvanlarına Standart (S) ve nadir (N) tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan eğriler ile nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark (F) eğrisi



Şekil 4.5. Po grubu hayvanlarına Standart (S) ve nadir (N) tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan eğriler ile nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark (F) eğrisi



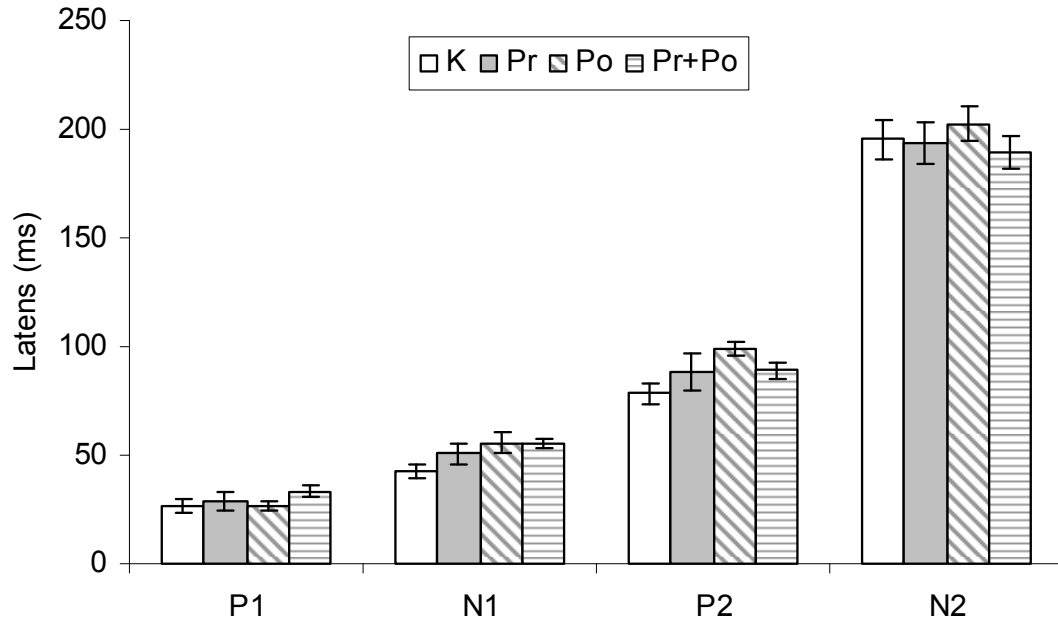
Şekil 4.6. Pr+Po grubu hayvanlarına Standart (S) ve nadir (N) tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan eğriler ile nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark (F) eğrisi

Tablo 4.1. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan ERP bileşenlerinin latensleri (ms)

Gruplar	P ₁ (ms)		N ₁ (ms)		P ₂ (ms)		N ₂ (ms)	
	Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir
K	27.22±3.16	25.00±2.26	50.22±1.25	42.62±3.36	76.88±3.24	78.75±3.60	200.00±8.13	194.22±8.58
Pr	24.30±2.91	27.50±3.71	58.20±4.56	55.11±4.66	90.80±8.28	97.50±7.96	190.36±11.58	193.90±10.10
Po	26.18±3.11	25.81±1.86	46.90±3.30	51.90±4.24	87.36±3.80	90.63±3.51	193.00±7.90	199.72±6.89
Pr+Po	31.83±2.54	30.33±2.47	53.16±2.15	50.66±2.00	91.66±3.88	86.83±3.30	185.66±7.83	190.41±8.06

Tablo 4.2. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark dalgalarının latensleri (ms)

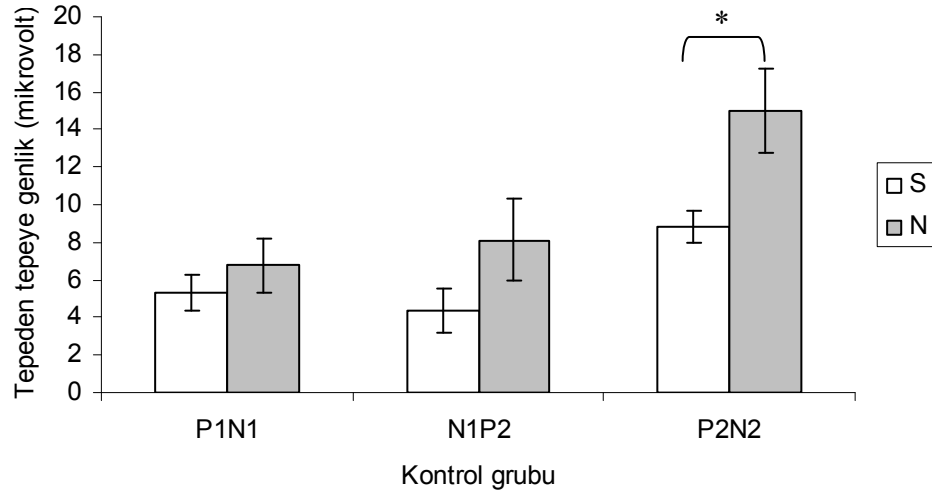
Gruplar	P ₁ (ms)	N ₁ (ms)	P ₂ (ms)	N ₂ (ms)
K	26.55±3.00	42.66±2.85	78.33±5.02	195.33±8.63
Pr	28.40±4.13	50.60±5.03	88.50±8.40	193.54±9.69
Po	26.72±2.22	55.54±4.89	98.54±3.13	202.54±7.72
Pr+Po	33.16±2.62	55.25±2.14	88.91±4.09	188.91±7.44



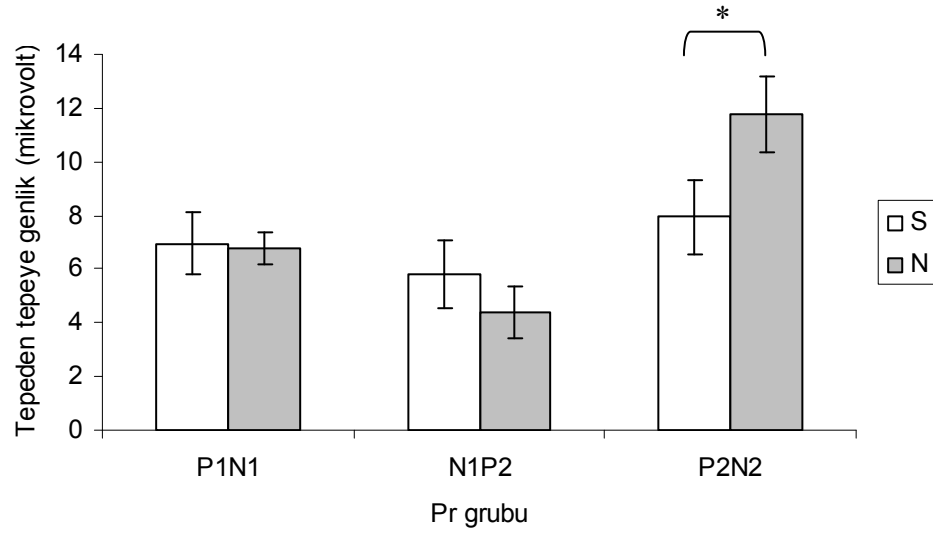
Şekil 4.7. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark dalgalarına ait latenslerin bar grafik şeklinde gösterimi (ms)

Tablo 4.3. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından standart ve nadir uyarıya yanıt olarak ortaya çıkan tepeden tepeye ERP genlikleri (μV) (*: $p<0.05$ Kontrol grubuna göre fark)

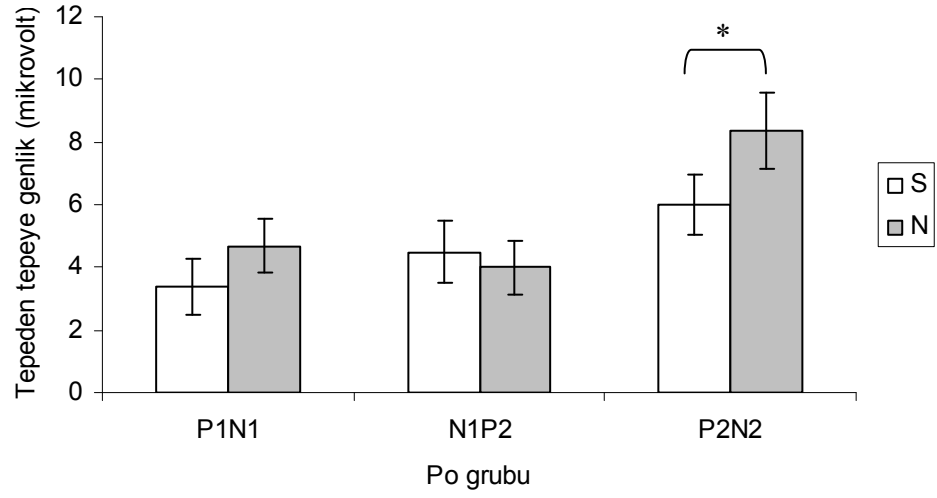
Gruplar	P ₁ N ₁ (μV)		N ₁ P ₂ (μV)		P ₂ N ₂ (μV)	
	Standart	Nadir	Standart	Nadir	Standart	Nadir
K	5.34 $\pm$ 0.93	6.77 $\pm$ 1.46	4.39 $\pm$ 1.18	8.12 $\pm$ 2.15	8.84 $\pm$ 0.89	14.97 $\pm$ 2.24
Pr	6.96 $\pm$ 1.13	6.76 $\pm$ 0.59	5.79 $\pm$ 1.27	4.41 $\pm$ 0.97	7.94 $\pm$ 1.35	11.78 $\pm$ 1.41
Po	3.36 $\pm$ 0.90	4.68 $\pm$ 0.88	4.48 $\pm$ 1.00	3.99 $\pm$ 0.84	6.00 $\pm$ 0.93	8.36 $\pm$ 1.20*
Pr+Po	4.93 $\pm$ 0.98	4.78 $\pm$ 0.85	5.76 $\pm$ 0.93	7.12 $\pm$ 1.26	7.67 $\pm$ 1.07	11.17 $\pm$ 1.19



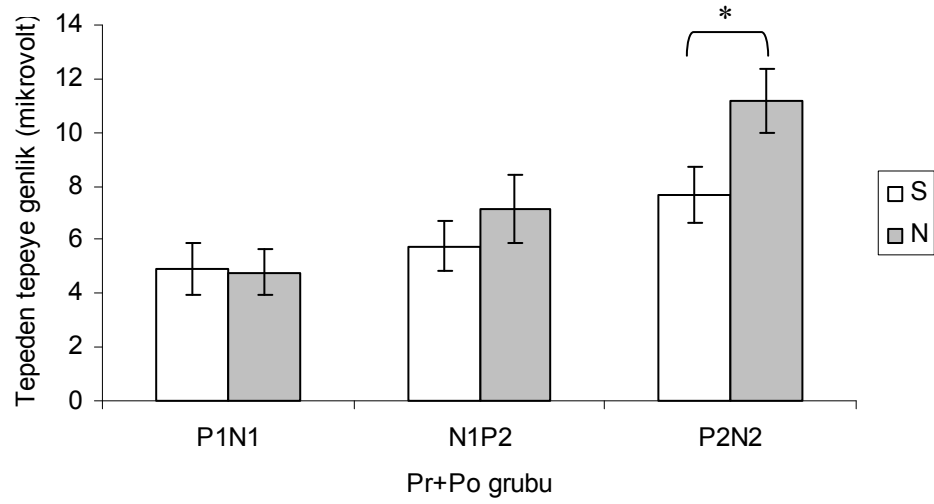
Şekil 4.8. Kontrol grubu hayvanlarına ait standart (S) ve nadir (N) tonlara cevap olarak zamana bağlı ortaya çıkan ortalama ERP eğrilerinin grup içi tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları (*:p<0.05)



Şekil 4.9. Pr grubu hayvanlarına ait standart (S) ve nadir (N) tonlara cevap olarak zamana bağlı ortaya çıkan ortalama ERP eğrilerinin grup içi tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları (*:p<0.05)



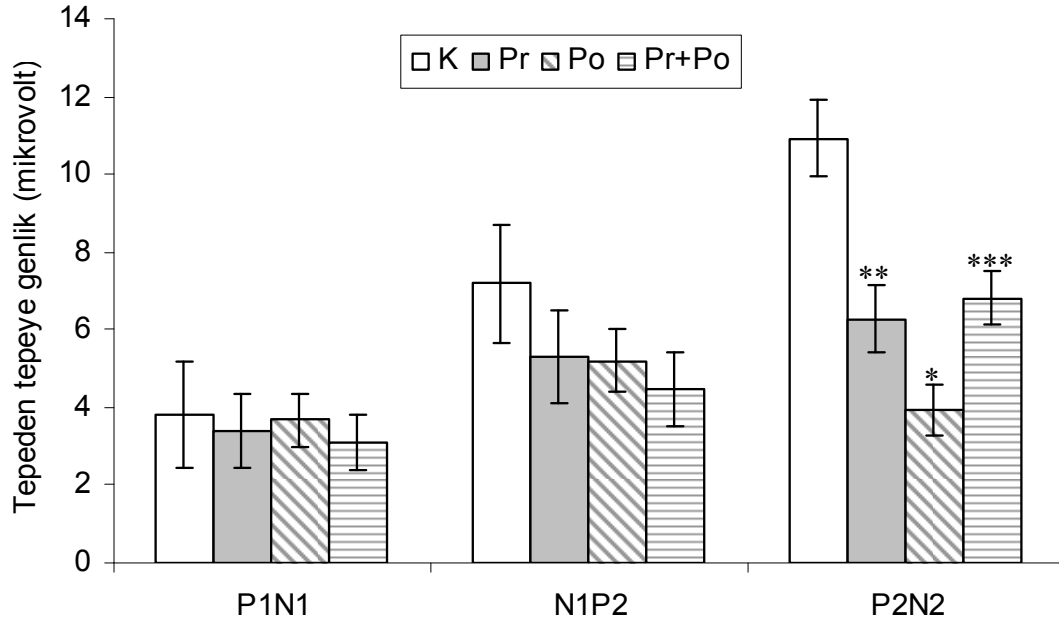
Şekil 4.10. Po grubu hayvanlarına ait standart (S) ve nadir (N) tonlara cevap olarak zamana bağlı ortaya çıkan ortalama ERP eğrilerinin grup içi tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları (*:p<0.05)



Şekil 4.11. Pr+Po grubu hayvanlarına ait standart (S) ve nadir (N) tonlara cevap olarak zamana bağlı ortaya çıkan ortalama ERP eğrilerinin grup içi tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları (*:p<0.05)

Tablo 4.4. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark dalgalarının tepeden tepeye genlikleri (μV) (Kontrol grubuna göre fark *: $p<0.001$; **: $p<0.005$; ***: $p<0.01$)

Gruplar	P ₁ N ₁ (μV)	N ₁ P ₂ (μV)	P ₂ N ₂ (μV)
K	3.81 $\pm$ 1.37	7.18 $\pm$ 1.52	10.93 $\pm$ 1.01
Pr	3.38 $\pm$ 0.95	5.32 $\pm$ 1.19	6.28 $\pm$ 0.87**
Po	3.67 $\pm$ 0.69	5.21 $\pm$ 0.79	3.93 $\pm$ 0.67*
Pr+Po	3.10 $\pm$ 0.70	4.47 $\pm$ 0.96	6.81 $\pm$ 0.69***



Şekil 4.12. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak elde edilen fark dalgalarının tepeden tepeye genliklerinin bar grafik şeklinde gösterimi (μV) (Kontrol grubuna göre fark *: $p<0.001$; **: $p<0.005$; ***: $p<0.01$)

4.5. 4-Hidroksinonenal (4-HNE) Aktivitesi Sonuçları

Kontrol ve deney gruplarının beyin dokularında yapılan protein boyaması sonuçları Şekil 4.13’de verilmiştir. Kontrol ve deney gruplarının beyin dokularında gerçekleştirilen 4-HNE western blot ve dansitometrik analiz sonuçları Şekil 4.14’te gösterilmiştir. Şekilde gözlenen bantların aynı olması her kuyucuğa eşit miktarlarda protein içeren doku süpernatantı konulduğunu teyit etmiştir.

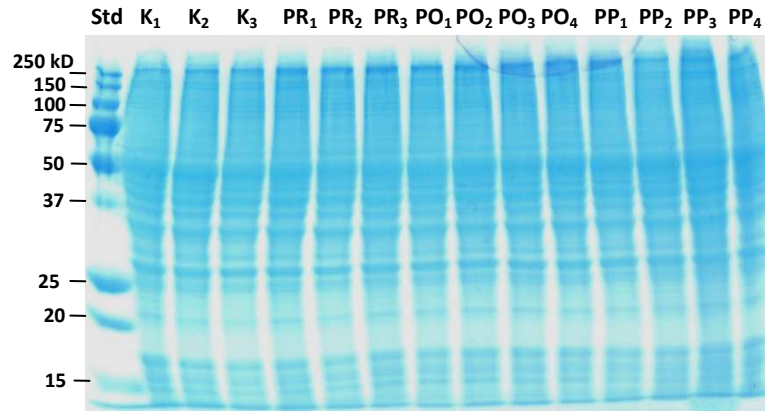
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Po grubunun 4- HNE miktarında artış olduğu tespit edilmiştir. Pr+Po grubunun 4-HNE miktarının kontrol grubu değerlerine göre azalmakla birlikte istatistiksel bir farkın olmadığı, Pr ve Po grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır.

4.6. Protein Karbonil Ölçümü Sonuçları

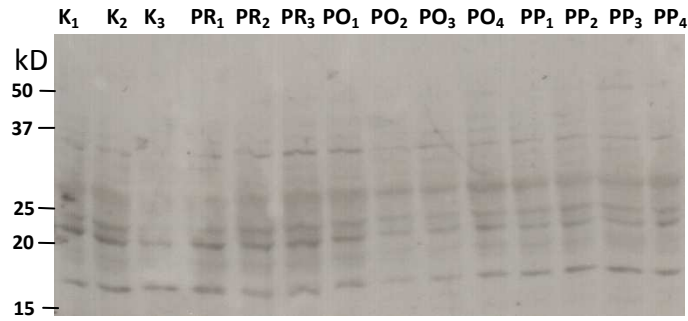
Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusu protein karbonil içeriği tayini ile elde edilen ölçüm değerleri Şekil 4.15’te verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede kontrole göre protein karbonil içeriğinin Pr+Po grubunda önemli ölçüde azaldığı, Pr ve Po gruplarında ise istatistiksel yönden anlamlı olmamakla birlikte arttığı tespit edilmiştir.

4.7. TUNEL Analizi Sonuçları

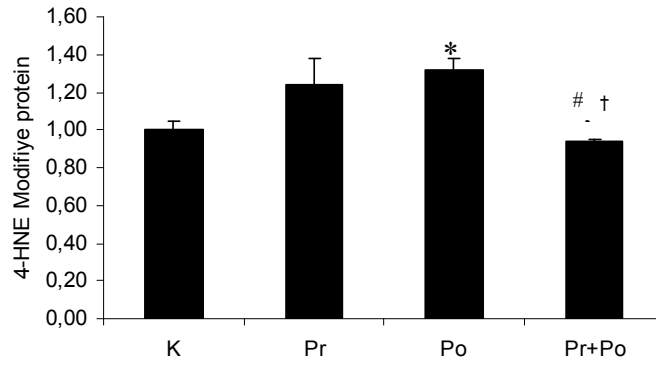
Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusunda ölüm yoluna girmiş hücreleri belirleyebilmek için Tunel analizi yapılmıştır. Tüm grupların beyin dokusunun hipokampus (Şekil 4.16), işitsel ve frontal korteksinden alınan kesitlerin Tunel analizi sonucunda Tunel pozitif hücrelere rastlanılmamıştır.



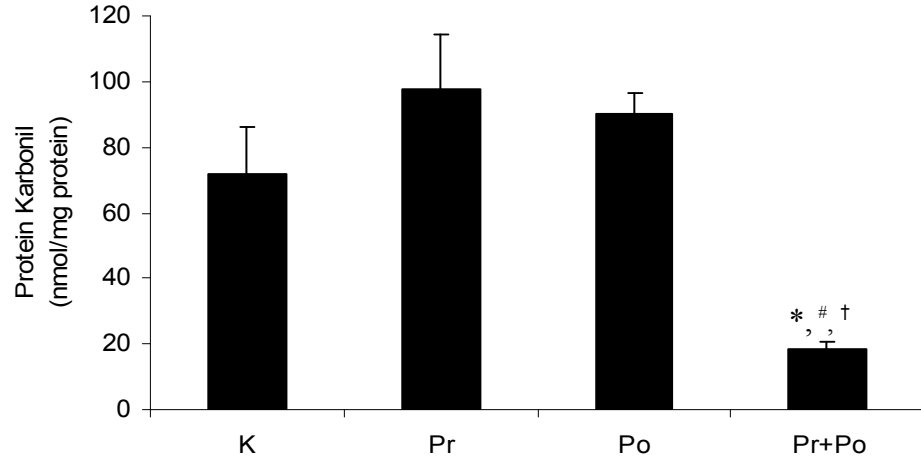
Şekil 4.13. Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusu protein boyaması



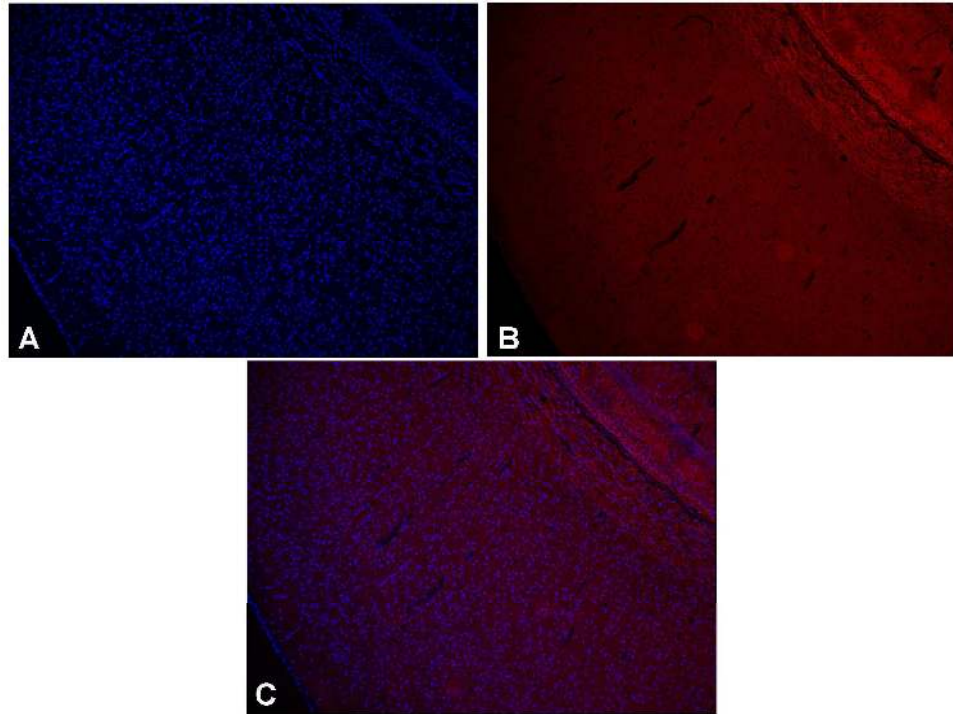
Şekil 4.14.a. Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusu 4-HNE Western Blot analizi



Şekil 4.14.b. Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusu 4-HNE Western Blot Dansitometrik analizi (*:p<0.05 Kontrol grubuna göre fark, #:p<0.05 Pr grubuna göre fark, †:p<0.05 Po grubuna göre fark)



Şekil 4.15. Kontrol ve deney gruplarının beyin dokusu protein karbonil değerleri (*:p<0.05 Kontrol grubuna göre fark, #:p<0.01 Pr grubuna göre fark, †:p<0.01 Po grubuna göre fark)



Şekil 4.16. Pr+Po grubu beyin dokusu işitsel korteksten alınan kesitlerde TUNEL immünreaktivitesi. A) DAPI ile işaretlenen nukleuslar, B) Apoptotik hücreleri belirlemek için kırmızı filtre uygulaması, C) A ve B'nin birleşimi

TARTIŞMA

Büyük bir hızla artan endüstriyel ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak elektromanyetik enerji kullanımına olan ihtiyaçta artmaktadır. Elektromanyetik kirliliğin önemli kaynaklarından birisi de yüksek gerilim hatlarıdır. Uluslar arası yönergeler, yüksek gerilim hatlarının yerleşim yerlerinin dışına inşa edilmesinin gerekliliğini belirtmektedir. Ancak, gelişmekte olan ülkelerde nüfus fazlalığına bağlı olarak kontrolsüz bir şekilde yayılan kentleşmeden dolayı yüksek gerilim hatları yerleşim alanlarından geçmektedir. Bu sebeple, hatların yakınında ya da altında yaşayan yetişkin bireylerle birlikte anne karnında ve/veya doğduktan sonra bebekler de farklı şiddetlerde elektrik alanlara maruz kalmaktadırlar. Yüksek gerilim hatlarının altında, hat voltajına ve hat ile yer arasında ki mesafeye bağlı olarak elektrik alan şiddeti 12 kV/m'den daha yüksek olup, elektrik üretim istasyonları etrafında ise elektrik alan şiddeti 16 kV/m'nin üzerine çıkmaktadır (2). Bu verilere dayanarak ve elektrik alan maruziyetinin özellikle yüksek gerilim hatlarının yakınında oldukça yüksek seviyelere ulaşabileceği düşünülerek, çalışmamızda pre ve/veya postnatal dönemde uygulanan elektrik alanın şiddeti 12 kV/m olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, karaciğer ve akciğer gibi dokularda etkileri araştırılsa da beyinde bu şiddetin kullanıldığı herhangi bir bilginin olmadığı dikkati çekmiştir. Bu nedenle planlanan çalışmamızda daha önceki araştırmalarla uygunluk içerisinde olduğu izlenen 50 Hz 12 kV/m elektrik alan şiddetinin uygulanması tercih edilmiştir (115,209,210).

Statik ve düşük frekanslı elektrik alanlarla ilgili çalışmalarda, şiddeti, süreleri ve periyotları değiştirilerek uygulanan elektrik alanların plazma ve farklı dokulardaki lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim düzeylerine olan etkileri incelenmiştir (1,3,4,5,6,7,8). Güler ve arkadaşlarının (1) yaptıkları çalışmada, 50 Hz 1.35 kV/m şiddetindeki elektrik alana 1 ile 10 gün arasında günde 8 saat süreyle maruz bırakılan kobayların karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ile plazmalarında TBARS ve SOD düzeyleri ölçülmüştür. Elektrik alan şiddetinin sabit tutulup uygulanan gün sayısı değiştirilerek yapılan bu çalışmada, uygulama süresi ile TBARS ve SOD düzeylerinin artışı arasında önemli bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmaya ek olarak başka çalışmalarda da, elektrik alana uzun süreli maruziyetin canlı organizma üzerinde TBARS ve SOD değerlerini daha fazla artırdığı gösterilmiştir (1,114,115). Ayrıca, yapılan başka bir çalışmada, 3 gün boyunca günde 8 saat süreyle 0.3 ile 5 kV/m arası değişen şiddetlerde uygulanan elektrik alanların kobayların beyin MDA, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık oluşturmaması uygulanan şiddetin de önemini vurgulamaktadır. (3,116). Nitekim, Romodanova ve ark. (9) 320 kV/m şiddetinde ki elektrik alanın beyin dokusunda lipid peroksidasyon indeksi MDA'yı artırdığını, GSH'ı azalttığını tespit etmesi de, şiddet arttıkça etkilerinin arttığını açıkça ortaya koyan destekleyici bir bulgudur. Dolayısıyla, elektrik alan şiddetinin ve süresinin artışıyla biyokimyasal parametre değerlerinin değişimi arasında paralellik olduğunu vurgulayan bu

alışmalar dikkate alınarak planlanan projemizde üç ay gibi daha uzun süreli elektrik alan uygulaması seçilmiştir.

Çok düşük frekanslı alanların neden olduğu fonksiyonel ve yapısal değişikliklerin mekanizması tam bilinmemekle birlikte, bugüne kadar yapılan çalışmalar bir çok hastalığın mekanizmasında olduğu gibi (11,211,212), elektrik alan uygulanması sonucunda oluşan değişikliklerde de serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonun sorumlu olabileceğini (1,3,4,5,6) işaret etmiştir. Bilindiği gibi serbest radikaller, hücrenin yapı taşları olan lipidler, proteinler, karbondhidratlar ve nükleik asitlere zarar verip fonksiyonlarını bozmaktadır (213). Özellikle beyinde doymamış yağ asitlerinin bol miktarda bulunması, bu dokuyu serbest radikallere karşı daha duyarlı hale getirmektedir. Böylece, membran lipidlerinin oksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyon ürünleri membran fonksiyonlarında önemli değişikliklere yol açmaktadır (211,214,215). Birçok alışmada, ELF alanların serbest radikal mekanizmalarını kullanarak biyokimyasal reaksiyonların sayısını ve hızını değiştirdiği gösterilmiştir (1,3). Statik ve zamanla değişen elektrik ve magnetik alanların O_2^- ve OH^- gibi serbest oksijen radikallerinin üretiminde artışa neden olduğu ileri sürülmektedir (1). Aynı zamanda, ELF alanların etkisiyle singlet durumdan triplet durumuna geçen serbest radikallerin, yaşam sürelerinin nano saniyelerden mikro saniyelere çıkmasıyla oluşturdukları zararında arttığı ifade edilmektedir (113).

Serbest radikallerin yarı ömürlerinin kısa, konsantrasyonlarının düşük ve reaktif olmaları *in vivo* şartlarda ölçülmesini zorlaştırmaktadır. Bu yüzden, oksidan stresin oluşturduğu ikincil ürünlerin llmesine dayanan dolaylı yöntemler geliştirilmiştir. Birçok araştırmada çok basit ve hızlı olması nedeniyle tercih edilen ve lipid peroksidasyon indeksi olarak kabul edilen MDA'nın ölçülmesinde bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır. Daha nceki bazı araştırmalarda, thiobarbitrik asitin MDA dışında diğer bileşiklerle de (aminoasitler, şekerler, lipid oksidasyon ürünleri) etkileşime girmesi nedeniyle, TBARS yönteminin yeteri kadar duyarlı olmadığı ileri sürülmektedir. Dolayısıyla, son yıllarda, 4-HNE gibi daha duyarlı başka metodlar geliştirilerek TBARS yerine bunların lipid peroksidasyon indeksi olarak kullanılması önerilmektedir. Oksidan stres sonucu lipid hidroperoksitlerin ayrılma reaksiyonları ile bozulmaları, alkanlar, 2-alkenler, 2,4-alkadrenaller ve 4-hidroksi alkenler gibi aldehitlerin oluşmasına yol açar. Aldehitler özellikle de 4-hidroksinonenal sitotoksik, hepatotoksik, mutajenik ve genotoksik özellikler içerir. Bu bileşiklerin ölçümü, hem lipid peroksidasyonun genişliğinin indeksini hem de belirli patojenik durumlara sebebiyet veren ajan olarak rollerini belirlemede destek olması nedeniyle yüksek kabul görmektedir (216). Bu bilgilerin ışığında, oksidan stresin oluşturduğu ikincil ürünlerin llmesine dayanan ve lipid peroksidasyon göstergesi olan 4-HNE tayini yapılmıştır. Elektrik alanın, kontrol grubuna göre Pr ve Po gruplarında beyin 4-HNE düzeylerini arttırdığı fakat Po grubundaki bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Bilindiği gibi, çok düşük frekanslı alanlar serbest radikalleri ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu artırmaktadır. Dolayısıyla, Pr ve Po gruplarında lipid peroksidasyon göstergelerinden biri olan 4-HNE'nin artma eğilimi göstermesi en doğal beklentidir. Ayrıca, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Po grubunda gözlenen istatistiksel artış, daha önce yapılan çalışmalarda ifade edildiği üzere (1,114,115) elektrik alana uzun süreli maruziyetin canlı organizma üzerinde daha

büyük etkilere sebep olması ile açıklanabilir. Diğer yandan, elektrik alanın Pr ve Po gruplarında gözlenen bu etkisine zıt olarak, Pr+Po grubunda 4-HNE düzeylerini kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşürdüğü gözlenmiştir. Elektrik alanın Pr+Po grubu üzerindeki inhibisyon etkisi, Pr ve Po grupları üzerindeki eksite edici etkisi ile çelişmekte olup literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmaması nedeniyle bu sonucun tartışması yapılamamıştır. Bununla birlikte, Pr+Po grubunda prenatal dönemde annenin antioksidan savunma sisteminin yavrunun savunma sistemine destek olması ve postnatal dönemde de uzun süreli elektrik alana maruziyetin devam etmesi nedeniyle bir adaptasyon mekanizmasının devreye girerek protein oksidasyonu üzerinde koruyucu bir etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, Pr+Po grubu protein karbonil değerlerinin orijinal bir sonuç olduğu dikkate alındığında bu konuya açıklık getirecek daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Serbest radikallerin hedefleri içerisinde peptid ve protein makromoleküllerinin yapı taşları olan aminoasitlerde yer almaktadır. Aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerde de fiziksel değişikliklere neden olmaktadır (165). Aynı zamanda, 4-HNE'de protein oksidasyonuna katılarak proteinlerdeki sistein, lizin ve histidin yan zincirleriyle etkileşime girip protein fonksiyonlarını inhibe etmektedir (183). Şekerlerin ve membran lipidlerinin ROS aracılı oksidasyonunu takiben oluşan karboniller; biyolojik aktivitelerinin değişmesine neden olan ve genellikle yapısal proteinler ile CO-proteinler (karbonil grubu taşıyan proteinler) olarak bilinen bileşikler oluşturabilir (217). Proteinlerdeki reaktif karbonil grupları protein yan zincirlerinin direk oksidasyonu ile de oluşabilir (218). Reaktif oksijen türleri amino asit rezidü yan zincirlerini keton ya da aldehit türevlerine okside edebilir. Histidin, arjinin ve lizin ROS-aracılı protein karbonil oluşumuna en hassas aminoasitlerdir (219). Dolayısıyla, karbonil grupların ölçümünün oksidatif stresin proteinler üzerinde meydana getirdiği hasarın belirlenmesi için iyi bir yöntem olduğu düşünüldüğünden (220), çalışmamızda elektrik alanın proteinler üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla protein karbonil içeriği ölçülmüştür. Veriler incelendiğinde protein karbonil içeriği ile 4-HNE sonuçlarının birbiriyle benzer olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Pr ve Po gruplarında istatistiksel olmasa da bir artış gözlenirken Pr+Po grubunda istatistiksel olarak önemli ölçüde bir azalma saptanmıştır. Bu sonuçların benzerlik göstermesi, elektrik alanın oksidan stresi tetikleyerek Pr ve Po gruplarında protein karbonil değerlerinin artmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde, Pr+Po grubunda 4-HNE değerlerinin azalmasına bağlı olarak protein karbonil değerlerinin de azaldığı izlenmekle birlikte, literatürde beyin dokusunda ki bu bulgumuzu destekleyen ya da desteklemeyen herhangi bir bilgiye ulaşamamıştır. Bununla birlikte, Güler ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda (209,210), günde 8 saat ve 7 gün boyunca uygulanan 12 kV/m şiddetindeki elektrik alanın protein karbonil değerlerini akciğer dokusunda artırırken, karaciğer dokusunda değiştirmede bulunmuştur. Dolayısıyla, daha önceki yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde, uygulama süresi ve periyodu aynı bile olsa elektrik alanların değişik dokular üzerinde farklı etkilere sebep olabileceği söylenebilir. Daha önceki yayınlar dikkate alındığında araştırmamızda 12 kV/m şiddetindeki elektrik alanın akciğer dokusunda olduğu gibi beyinde de protein karbonil değerlerini istatistiksel olmasada artırdığı tespit edilmiştir.

Elektrik alanın serbest radikaller aracılığıyla lipid peroksidasyona neden olmasının yanında öne sürülen en önemli etkilerinden birinin de beyin dokusunda DNA kırıkları oluşturduğu ve bu hasarın uygulama süresine paralel olarak arttığı saptanmıştır (10). Bilindiği gibi lipid peroksidasyona neden olan serbest radikaller hücrenin temel yapı taşları proteinler ve karbonhidratlar yanında DNA’da da ciddi hasarlar oluşturarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve hücre ölümüne neden olurlar (11,12,13). Özellikle kromozomal DNA fragmentasyonu, nükleer fragmentasyon, kromatin birikimi ve hücre membranındaki değişiklikler apoptozisin oluşmasındaki en önemli faktörlerdir (14). Apoptozis sürecinde serbest radikallerin yanı sıra, lipid peroksidasyonun son ve stabil ürünü 4-HNE’nin apoptozisi indüklediği farklı laboratuvarlarda ve farklı hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (15,16). Sonuç olarak, serbest radikal artışı ile nöron ölümleri arasındaki ilişki, elektrik alana maruz bırakılan sıçanlarda apoptozisin indüklenebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda, elektrik alana maruz bırakılan sıçanların beyin dokusunda apoptozise uğrayan hücreleri belirleyebilmek için apoptozisin bir karakteristiği olan DNA fragmentasyonuna Tunel analizi ile bakılmıştır. Tunel analizi sonucunda, elektrik alanın etkisiyle artan 4-HNE değerlerine paralel olarak Pr ve Po gruplarından alınan kesitlerde az da olsa apoptotik hücrelere rastlanması beklenirken tüm grupların beyin dokusu kesitlerinde herhangi bir apoptotik hücre görülmemiştir. Elektrik alanın lipid peroksidasyonu artırıcı etkisine karşın apoptozisin gözlenmemesi ile ilgili olarak literatürde herhangi bir bilginin olmayışı, elektrik alanın etkisiyle oluşan lipid peroksidasyonla apoptozis arasında ki yolağın daha detaylı olarak araştırılmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Çok düşük frekanslı alanların amyotrofik lateral sklerosis oluşumunu (85), Alzheimer hastalığına yakalanma riskini (86), depresyonu (87) ve intihar (88) eğilimini artırmasının yanı sıra olan BAEP, VEP, AEP, SEP gibi beyin fonksiyonlarının göstergesi olan potansiyelleri de etkilediği ifade edilmiştir (25,26,27,28,29). Ayrıca, uygulanan farklı şiddette ki elektrik ve magnetik alanların (6 kV/m–10 μ T, 9 kV/m–20 μ T ve 12 kV/m–30 μ T) P300 potansiyelinin genlik ve latensinde önemli bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (31). Bu potansiyelin kognitif işlemleri yansıtan önemli bir ERP bileşeni olduğu ifade edildiğinden (32,33,34) elektrik ve magnetik alanların kognitif işlemlere önemli bir etkisinin olduğu söylenebilir. Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda, 50 Hz AC elektrik alanın sıçanlardan kaydedilen Uyumsuzluk Negativitesi üzerine etkileri incelenmiştir.

Olaya İlişkin Potansiyeller, standart uyarılar arasına rasgele serpiştirilen nadir uyarıları içerecek şekilde düzenlenen deneysel paradigma uygulanarak, işitsel korteks üzerine yerleştirilen vida elektrotlar aracılığıyla kaydedilmiştir. Alınan kayıtlar incelenerek tüm gruplardaki her bir sıçan için standart ve nadir tonların uygulanması sonucu zamana bağlı olarak ortaya çıkan ortalama eğrilerden, ERP’lerin pik genlikleri ve latensleri belirlenmiştir. Nadir tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisinden, standart tonlara cevap olarak ortaya çıkan ortalama ERP eğrisi çıkarılarak her bir sıçana ait MMN eğrileri elde edilmiştir. Çalışmamızda 170 ile 225 ms arasında elde edilen MMN aktivitesinin pozitif polaritede olduğu

görülmektedir. Kaydedilen MMN aktivitesinin insanlardan negatif polaritede kaydedilen ile ters polaritede olduğu bulunmuştur. Bunun muhtemel nedeni elektrot yerleşimi ile ilişkilidir. Nitekim, kayıt sırasında referans elektrodunun mastoid yerine buruna takılması durumunda insanlarda da MMN'nin pozitif polaritede olduğu görülmektedir (221). Sıçanlardan alınan kayıtlarda referans elektrodun serebellar korteks üzerine yerleştirilmesiyle elde edilen MMN eğrilerinin pozitif polaritede ortaya çıkması daha önceki çalışmalarla uyum içerisindedir (36,222,223).

Kontrol ve deney grubu hayvanlarının standart ve nadir uyarıya bağlı olarak ortaya çıkan ortalama ERP bileşenlerinin grup içi latens karşılaştırmaları yapıldığında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Tepeden tepeye genlik karşılaştırmaları için yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, P_1N_1 ve N_1P_2 genliklerinin grup içi karşılaştırmalarında anlamlı bir fark görülmezken MMN olarak kabul edilen P_2N_2 genliğinin önemli derecede arttığı tespit edilmiştir.

Tikhonravov ve ark. (83)'nin anestezi madde olarak pentobarbital sodyum (60mg/kg) kullanarak yaptığı çalışmada, içerisinde işitsel tonların yer aldığı deneysel paradigmanın uygulanmasından sonra alınan kayıtlardan ERP bileşenlerinin latens ve genlik değerleri incelenmiştir. Sıçanlara uygulanan deneysel paradigmada, standart uyarı olarak 2500 Hz nadir uyarı olarak 2000 Hz frekansında tonlar 50 ms süreyle uygulanmıştır. Uyarı şiddetinin 85 dB ve uyarılar arası sürenin 450 ms olduğu deneysel paradigmada standart uyarı %95.6 ve nadir uyarı %4.4 olasılıkla verilmiştir. Bu çalışmada elde edilen ERP bileşenlerinin genlik değerleri bizim bulgularımızla uyumlu olmakla birlikte latens değerleri arasında 2-3 katlık fark çıkmıştır. Bu farkın sebebi, çalışmamızda üretilen kullanılması nedeniyle diğer araştırmada kullanılan anestezi maddenin değişik olmasının yanı sıra deneysel paradigmada yer alan nadir uyarının verilme sıklığının ve uyarılar arası sürenin farklı olması ile açıklanabilir.

Olaya ilişkin potansiyel kayıtlarından elde edilen standart, nadir ve fark eğrilerinin gruplar arası karşılaştırmaları incelendiğinde latens değerleriyle birlikte P_1N_1 ve N_1P_2 genliklerinde herhangi bir farkın olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte, nadir uyarı için Po grubunda P_2N_2 genliğinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir. Benzer şekilde, standart uyarı için de P_2N_2 genliğinin azaldığı, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Fark eğrilerinin gruplar arası karşılaştırmasında, kontrol grubuna göre en fazla Po grubunda olmak üzere tüm deney gruplarında P_2N_2 genliklerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, çalışmamızda sadece Po grubundaki artış istatistiksel yönden önemli olmakla birlikte 4-HNE değerlerinin Pr ve Po gruplarında kontrole göre arttığı görülmüştür. Bu verilere paralel olarak MMN genliklerinin de azaldığı saptanmıştır. Dolayısıyla, araştırmamızın sonuçları MMN genliklerinin elektrik alanın indüklediği lipid peroksidasyon nedeniyle azaldığını düşündürmektedir. Nitekim daha önce yaptığımız ön çalışmada, 2 hafta boyunca günde 1 saat süreyle uygulanan 12 ve 18 kV/m şiddetindeki elektrik alanların VEP bileşenlerini etkilediği saptanmış ve yapılan biyokimyasal ölçümler ile elektrofizyolojik karşılaştırmalar bunda lipid peroksidasyonun rolünün olabileceğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak daha önceki çalışmamızla paralellik içerisinde olan verimiz MMN genliğinin lipid peroksidasyon nedeniyle azaldığını destekler niteliktedir.

Protein karbonil ve 4-HNE değerlerinin kontrole göre Po ve Pr gruplarında artma, Pr+Po grubunda ise azalma eğilimi gösterdiği saptanmıştır. Diğer yandan, Pr+Po grubundaki MMN genliğinin prenatal grupla aynı düzeyde olduğu izlenmiştir. Biyokimyasal veriler ile uygunluk içerisinde gözlenen MMN aktivitesinin bu grupta elektrik alan uygulamasından daha az etkilendiği söylenebilir. Bu sonuç, prenatal dönemde uygulanan elektrik alanın postnatal dönemdeki elektrik alanın etkisine karşı koruyucu bir etki oluşturduğunu ima etmektedir.

Özetle çalışmamız; pre ve/veya postnatal dönemde çok düşük frekanslı elektrik alana yüksek şiddette maruziyetin beyin dokusunda lipid peroksidasyonu artırabileceğini, protein oksidasyonuna neden olabileceğini ve MMN genliklerini azaltabileceğini göstermekte olup elektrik alanın oksidatif hasara bağlı kognitif bozukluklara yol açabileceğini ortaya koymaktadır.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçları şöylece özetlenebilir:

1. Postnatal dönemde uygulanan elektrik alanın lipid peroksidasyonu artırdığı tespit edilmiştir.
2. Pre+postnatal dönemde uygulanan elektrik alanın 4-HNE ve protein karbonil seviyelerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır.
3. Pre ve/veya postnatal dönemde uygulanan elektrik alanın apoptozise neden olmadığı gösterilmiştir.
4. Standart ve nadir uyarı içeren deneysel paradigma ile kaydedilen uyumsuzluk negativitesinin şekli ve latensinin daha önceki çalışmalarla uygunluk içerisinde olduğu görülmüştür.
5. Pre ve/veya postnatal dönemde uygulanan elektrik alanın MMN latenslerini etkilemediği gözlenmiştir.
6. Elektrik alanın MMN genliklerini önemli ölçüde etkilediği ve bunun serbest radikal artışı ve protein karbonil düzeyleri ile ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Guler G, Seyhan N, Aricioglu A. Effects of static and 50 Hz alternating electric fields on superoxide dismutase activity and TBARS levels in guinea pigs. *Gen Physiol Biophys* 25(2):177-93, 2006.
2. Repacholi MH, Greenebaum B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics* 20(3):133-60, 1999.
3. Seyhan N, Guler G. Review of in vivo static and ELF electric fields studies performed at Gazi Biophysics Department. *Electromagn Biol Med* 25(4):307-23, 2006.
4. Yokus B, Cakir DU, Akdag MZ, Sert C, Mete N. Oxidative DNA damage in rats exposed to extremely low frequency electro magnetic fields. *Free Radic Res* 39(3):317-23, 2005.
5. Benov LC, Antonov PA, Ribarov SR. Oxidative damage of the membrane lipids after electroporation. *Gen Physiol Biophys* 13(2):85-97, 1994.
6. Watanabe Y, Nakagawa M, Miyakoshi Y. Enhancement of lipid peroxidation in the liver of mice exposed to magnetic fields. *Ind Health* 35(2):285-90, 1997.
7. Harakawa S, Inoue N, Hori T, Tochio K, Kariya T, Takahashi K, Doge F, Suzuki H, Nagasawa H. Effects of a 50 Hz electric field on plasma lipid peroxide level and antioxidant activity in rats. *Bioelectromagnetics* 26(7):589-94, 2005.
8. Bediz CS, Baltaci AK, Mogulkoc R, Oztekin E. Zinc supplementation ameliorates electromagnetic field-induced lipid peroxidation in the rat brain. *Tohoku J Exp Med* 208(2):133-40, 2006.
9. Romodanova EA, Paranich AV, Chaikina LA. Effect of chronic effect of the electrostatic field on various biochemical indicators of the tissues. *Fiziol Zh* 36(3):30-4, 1990.
10. Lai H, Singh NP. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ Health Perspect* 112(6):687-94, 2004.
11. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74(1): 139-162, 1994.
12. Hassan HM, Fridovich L. Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. *Eur J Rheumatol. Inflamm.* 4(2): 160-172, 1981.
13. Kasai H, Nishimura S, Kurokawa Y, Hayashi Y. Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-

hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis*. 8(12):1959-61, 1987.

14. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 (5203): 1456–62, 1995.
15. Cheng JZ, Singhal SS, Sharma A, Saini M, Yang Y, Awasthi S, Zimniak P, Awasthi YC. Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling. *Arch Biochem Biophys*. 392: 197-207, 2001.
16. Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem*, 274: 2234-42, 1999.
17. Juutilainen J. Developmental effects of electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 7:S107-15, 2005.
18. Marino AA, Becker RO, Ullrich B. The effect of continuous exposure to low frequency electric fields on three generations of mice: a pilot study. *Experientia*. 15;32(5):565-6, 1976.
19. Rommereim DN, Rommereim RL, Sikov MR, Buschbom RL, Anderson LE. Reproduction, growth, and development of rats during chronic exposure to multiple field strengths of 60-Hz electric fields. *Fundam Appl Toxicol*. 14(3):608-21, 1990.
20. Wertheimer N, Leeper D. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *AmJEpidemiol* 109:273-84, 1979.
21. Tomenius L. 50-Hz electromagnetic environment and the incidence of childhood tumours in Stockholm County. *Bioelectromagnetics* 7:191-207, 1986.
22. Savitz DA, Wachtel H, Barnes FA, John EM, Tvrdik JG. Case-control study of childhood cancer and exposure to 60-Hz magnetic fields. *Am J Epidemiol* 128:21-38, 1988.
23. London SJ, Thomas DC, Bowman JD, Sobel E, Cheng T-C, Peters JM. Exposure to residential electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia. *AmJEpidemiol* 134:923-37, 1991.
24. Coleman MP, Bell CMJ, Taylor HL, Primic-Zakelj M. Leukaemia and residence near electricity transmission equipment: a case-control study. *Br J Cancer* 60:793-8, 1989.
25. Graham C, Cook MR, Cohen HD, Riffle DW, Hoffman S, Gerkovich MM. Human exposure to 60-Hz magnetic fields: neurophysiological effects. *Int J Psychophysiol* 33(2):169-75, 1999.
26. Bell GB, Marino AA, Chesson AA, Struve FA. Human sensitivity to weak magnetic fields. *Lancet* 338:1521-1522, 1991.

27. Bell GB, Marino AA, Chesson AL. Alterations in brain activity caused by magnetic fields: Detecting the detection process. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 83:389-397, 1992.
28. Lyskov E, Juutilainen J, Jousmäki V, Hänninen O, Medvedev S, Partanen J. Influence of short-term exposure of magnetic field on the bioelectrical processes of the brain and performance. *Int J Psychophysiol* 14:227-231, 1993.
29. Lyskov E, Juutilainen J, Jousmäki V, Partanen J, Medvedev S, Hänninen O. Effects of 45-Hz magnetic fields on the functional state of the human brain. *Bioelectromagnetics* 14:87-95, 1993.
30. Jaffe RA, Lopresti CA, Carr DB, Phillips RD. Perinatal exposure to 60-Hz electric fields: effects on the development of the visual-evoked response in rats. *Bioelectromagnetics*. 4(4):327-39, 1983.
31. Graham C, Cook MR, Cohen HD, Gerkovich MM. Dose response study of human exposure to 60 Hz electric and magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 15(5):447-63, 1994.
32. Demiralp T, Yordanova J, Kolev V, Ademoglu A, Devrim M, Samar VJ. Time-frequency analysis of single-sweep event-related potentials by means of fast wavelet transform. *Brain Lang* 66(1):129-45, 1999.
33. Picton TW. The P300 wave of the human event-related potential. *J Clin Neurophysiol*, 9: 456-479, 1992.
34. Polich J. P300 in clinical applications: meaning, method, and measurements. In: E. Niedermeyer and F.H. Lopes da Silva (Eds.), *Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields*. Baltimore: Williams & Wilkins, pp: 1073-1091, 1999.
35. Naatanen R. Mismatch negativity (MMN): perspectives for application. *Int J Psychophysiol* 37(1):3-10, 2000.
36. Ruusuvirta T, Penttonen M, Korhonen T. Auditory cortical event-related potentials to pitch deviances in rats. *Neurosci Lett*. 248(1):45-8, 1998.
37. Eriksson J, Villa AE. Event-related potentials in an auditory oddball situation in the rat. *Biosystems* 79(1-3):207-12, 2005.
38. Yagcioglu S, Urgan P. The 'Franssen' illusion for short duration tones is preattentive: a study using mismatch negativity. *Brain Res* 23;1106(1):164-76, 2006.
39. Naatanen R, Alho K. Mismatch negativity: A unique measure of sensory processing in audition. *Int J Neurosci* 80:317-337, 1995.
40. Basar-Eroglu C, Demiralp T. Event-related theta oscillations: an integrative and comparative approach in the human and animal brain. *Int J Psychophysiol* 39(2-3):167-95, 2001.
41. Lazar R, Metherate R. Spectral interactions, but no mismatch negativity, in auditory cortex of anesthetized rat. *Hear Res* 181(1-2):51-6, 2003.

42. Naatanen R. Mismatch negativity: clinical research and possible applications. *Int J Psychophysiol.* 48(2):179-88, 2003.
43. Alho K. Cerebral generators of mismatch negativity (MMN) and its magnetic counterpart (MMNm) elicited by sound changes. *Ear Hear* 16(1):38-51, 1995.
44. Pulvermüller F, Shtyrov Y, Ilmoniemi R. Brain signatures of meaning access in action word recognition. *J Cogn Neurosci.* 17(6):884-92, 2005.
45. Pulvermüller F, Shtyrov Y. Language outside the focus of attention: the mismatch negativity as a tool for studying higher cognitive processes. *Prog Neurobiol.* 79(1):49-71, 2006.
46. Ogden TE. Clinical electrophysiology. Stephen JR. *Retina*, Vol.1, C.V. Mosby Company, St. Louis. Baltimore-Toronto, 285-296, 1989.
47. Gündüz K, Doğan ÖK. Elektrodiagnostik yöntemler I, II, III, *Türk Oftalmoloji Gazetesi.* 18:423-446, 1988.
48. Berger H. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten.* 87: 527-570, 1929.
49. Dawson GE. A summation technique for the detection of small evoked potentials. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 6:65-84, 1954.
50. Key AP, Dove GO, Maguire MJ. Linking brainwaves to the brain: an ERP primer. *Dev Neuropsychol.* 27(2):183-215, 2005.
51. Reinvang I. Cognitive event-related potentials in neuropsychological assessment. *Neuropsychol Rev.* 9(4):231-48, 1999.
52. Duncan CC, Barry RJ, Connolly JF, Fischer C, Michie PT, Näätänen R, Polich J, Reinvang I, Van Petten C. Event-related potentials in clinical research: guidelines for eliciting, recording, and quantifying mismatch negativity, P300, and N400. *Clin Neurophysiol.* 120(11):1883-908, 2009.
53. Jörg J. und Hielscher H. Evozierte potentiale (VEP, SEP, AEP) in klinik und praxis. Springer-Verlag, Berlin, Heilderberg. 1-69, 1984.
54. Donchin E. Presidential address, 1980. Surprise!...Surprise? *Psychophysiology.* 18(5):493-513, 1981.
55. Ullsperger P, Neumann U, Gille HG, Pietschmann M. P300 and anticipated task difficulty. *Int J Psychophysiol.* 5(2):145-9, 1987.
56. Hammond EJ, Meador KJ, Aung-Din R, Wilder BJ. Cholinergic modulation of human P3 event-related potentials. *Neurology.* 37(2):346-50, 1987.
57. Hohnsbein J, Falkenstein M, Hoormann J, Blanke L. Effects of crossmodal divided attention on late ERP components. I. Simple and choice reaction tasks. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 78(6):438-46, 1991.

58. Verleger R, Kömpf D, Neukäter W. Event-related EEG potentials in mild dementia of the Alzheimer type. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 84(4):332-43, 1992.
59. Burkhart MA, Thomas DG. Event-related potential measures of attention in moderately depressed subjects. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 88(1):42-50, 1993.
60. Sutton S, Braren M, Zubin J, John ER. Evoked-potential correlates of stimulus uncertainty. *Science.* 150(700):1187-8, 1965.
61. Polich J, Ehlers CL, Otis S, Mandell AJ, Bloom FE. P300 latency reflects the degree of cognitive decline in dementing illness. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 63(2):138-44., 1986.
62. Başar E, Başar-Eroglu C, Rosen B, Schütt A. A new approach to endogenous event-related potentials in man: relation between EEG and P300-wave. *Int J Neurosci.* 24(1):1-21, 1984.
63. Sklare DA, Lynn GE. Latency of the P3 event-related potential: normative aspects and within-subject variability. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 59(5):420-4, 1984.
64. Kramer AF. The interpretation of the component structure of event-related brain potentials: an analysis of expert judgments. *Psychophysiology.* 22(3):334-44, 1985.
65. Brandeis D, Lehmann D. Event-related potentials of the brain and cognitive processes: approaches and applications. *Neuropsychologia.* 24(1):151-68, 1986.
66. Naumann E, Huber C, Maier S, Plihal W, Wustmans A, Diedrich O, Bartussek D. The scalp topography of P300 in the visual and auditory modalities: a comparison of three normalization methods and the control of statistical type II error. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 83(4):254-64, 1992.
67. Michalewski HJ, Prasher DK, Starr A. Latency variability and temporal interrelationships of the auditory event-related potentials (N1, P2, N2, and P3) in normal subjects. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 65(1):59-71, 1986.
68. Fleck KM, Polich J. P300 and the menstrual cycle. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 71(2):157-60, 1988.
69. Lang SF, Nelson CA, Collins PF. Event-related potentials to emotional and neutral stimuli. *J Clin Exp Neuropsychol.* 12(6):946-58, 1990.
70. Mäntysalo S, Gaillard AW. Event-related potentials (ERPs) in a learning and memory test. *Biol Psychol.* 23(1):1-20, 1986.
71. Näätänen R, Gaillard AW, Mäntysalo S. Early selective-attention effect on evoked potential reinterpreted. *Acta Psychol (Amst).* 42(4):313-29, 1978.

72. Garrido MI, Kilner JM, Stephan KE, Friston KJ. The mismatch negativity: A review of underlying mechanisms. *Clin. Neurophys.* 120:453-463, 2009.
73. Naatanen R, Paavilainen P, Rinne T, Alho K. The mismatch negativity (MMN) in basic research of central auditory processing: a review. *Clin Neurophysiol.* 118(12):2544-90, 2007.
74. Ehrlichman RS, Maxwell CR, Majumdar S, Siegel SJ. Deviance-elicited changes in event-related potentials are attenuated by ketamine in mice. *J Cogn Neurosci.* 20:1403–14, 2008.
75. Kähkönen S, Ahveninen J, Jääskeläinen IP, Kaakkola S, Näätänen R, Huttunen J, et al. Effects of haloperidol on selective attention: a combined whole-head MEG and high-resolution EEG study. *Neuropsychopharmacology* 25:498–504, 2001.
76. Pekkonen E, Jousmäki V, Reinikainen K, Partanen J. Automatic auditory discrimination is impaired in Parkinson's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 95:47–52, 1995.
77. Baldeweg T. Repetition effects to sounds: evidence for predictive coding in the auditory system. *Trends Cogn Sci* 10:93–4, 2006.
78. Dunbar G, Boeijinga PH, Demazieres A, Cisterni C, Kuchibhatla R, Wesnes K, et al. Effects of TC-1734 (AZD3480), a selective neuronal nicotinic receptor agonist, on cognitive performance and the EEG of young healthy male volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 191:919–29, 2007.
79. Engeland C, Mahoney C, Mohr E, Ilivitsky V, Knott VJ. Acute nicotine effects on auditory sensory memory in tacrine-treated and nontreated patients with Alzheimer's disease: an event-related potential study. *Pharmacol Biochem Behav.* 72:457–64, 2002.
80. Leung S, Croft RJ, Baldeweg T, Nathan PJ. Acute dopamine D(1) and D(2) receptor stimulation does not modulate mismatch negativity (MMN) in healthy human subjects. *Psychopharmacology* 194:443–51, 2007.
81. Kujala T, Tervaniemi M, Schröger E. The mismatch negativity in cognitive and clinical neuroscience: theoretical and methodological considerations. *Biol Psychol.* 74(1):1-19, 2007.
82. Astikainen P, Ruusuvirta T, Wikgren J, Penttonen M. Memory-based detection of rare sound feature combinations in anesthetized rats. *Neuroreport.* 17(14):1561-4, 2006.
83. Tikhonravov D, Neuvonen T, Pertovaara A, Savioja K, Ruusuvirta T, Näätänen R, Carlson S. Effects of an NMDA-receptor antagonist MK-801 on an MMN-like response recorded in anesthetized rats. *Brain Res.* 1203:97-102, 2008.
84. Kheifets L, Renew D, Sias G, Swanson J. Extremely low frequency electric fields and cancer: assessing the evidence. *Bioelectromagnetics.* 31(2):89-101, 2010.

85. Davanipour Z, Sobel E, Bowman JD, Qian Z, Will AD. Amyotrophic lateral sclerosis and occupational exposure to electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 18:28–35, 1997.
86. Sobel E, Davanipour Z. EMF exposure may cause increased production of amyloid beta and eventually lead to Alzheimer's disease. *Neurology* 47:1594–1600, 1996.
87. Chevalier A, Bonenfant S, Picot MC, Chastang JF, Luce D. Occupational factors of anxiety and depressive disorders in the French National Electricity and Gas Company. *J Occup Environ Med.* 38:1098–1107, 1996.
88. Baris D, Armstrong BG, Deadman J, The'riault G. A mortality study of electrical utility workers in Quebec. *Occup Environ Med* 53:25-31, 1996.
89. Cook MR, Graham C, Cohen HD, Gerkovich MM. A replication study of human exposure to 60-Hz fields: effects on neurobehavioral measures. *Bioelectromagnetics* 13:261–285, 1992.
90. Graham C, Cohen HD, Cook MR, Gerkovich MM, Riffle DW. Human cardiac response to 60-Hz fields: exposure parameters and individual differences. In: Blank M, editor. *Electricity and magnetism in biology and medicine*. San Francisco: San Francisco Press. p 767–769, 1992.
91. Hauf R. Electric and magnetic fields at power frequencies with particular reference to 50 and 60 Hz. In: Suess MJ, editor. *Nonionizing radiation protection*. Copenhagen: World Health Organization. p 175–197, 1982.
92. Miller AB, To T, Agnew DA, Wall C, Green LM. Leukemia following occupational exposure to 60-Hz electric and magnetic fields among Ontario electric utility workers. *Am J Epidemiol* 144(2):150–160, 1996.
93. Kheifets L, Afifi A, Buffler P, Zhang Z. Occupational EMF exposure and brain cancer: a meta-analysis. *J Occup Environ Med* 37:1–15, 1995.
94. Kheifets L, Ahdelmonem A, Afifi A, Buffler P, Zhang A, Matkin C. Occupational electric and magnetic field exposure and leukaemia: ameta-analysis. *J Occup Environ Med* 39:1074-1091, 1997.
95. Savitz DA, Loomis DP. Magnetic field exposure in relation to leukaemia and brain cancer mortality among electric utility workers. *Am J Epidemiol* 141:123–134, 1995.
96. Sahl JD, Kelsh MA, Greenland S. Cohort and nested case-control studies of hematopoietic cancers and brain cancer among electric utility workers. *Epidemiology* 4:104–114, 1993.
97. Savitz DA, John EM, Kleckner RC. Magnetic field exposure from electric appliances and childhood cancer. *Am J Epidemiol* 131:763–773, 1990.
98. London SJ, Thomas DC, Bowman JD, Sobel E, Cheng TC, Peters JM. 1991. Exposure to residential electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia. *Am J Epidemiol* 134(9):923–937, 1991.

99. Villeneuve PJ, Agnew DA, Miller AB, Corey PN, Purdham JT. Leukemia in electric utility workers: The evaluation of alternative indices of exposure to 60 Hz electric and magnetic fields. *Am J Ind Med* 37(6):607–617, 2000.
100. Graham, C., Cohen, H. D., Cook, M. R., Phelps, J. W., Gerkovich, M. M. and Fotopoulos, S. S. A double-blind evaluation of 60-Hz field effects on human performance, physiology and subjective state. In: 23rd Annual Hanford Life Sciences Symposium on Interaction of Biological Systems with Static and ELF Electric and Magnetic Fields. Richland, Washington, 2–4 October pp 472–485, 1984.
101. Graham C., Cohen, H. D., Cook, M. R., Phelps, J. W., Gerkovich, M. M. and Fotopoulos, S. S. A double-blind evaluation of 60-Hz field effects on human performance, physiology, and subjective state. In: Interaction of biological systems with static and ELF electric and magnetic fields, Eds. L. E. Anderson et al (Springfield: VANTIS) CONF-841041, pp. 471–486, 1987.
102. Graham, C., Cohen, H. D. and Cook, M. R. Immunological and biochemical effects of 60-Hz electric and magnetic fields in humans. Final report RA-338-C, 30 January pp 1–80, 1990.
103. Graham, C., Cook, M. R., Cohen, H. D. and Gerkovich, M. M. Dose response study of human exposure to 60 Hz electric and magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 15, 447–463, 1994.
104. Lyskov, E. B., Juutilainen, J., Jousmaäki, V., Partanen, J., Medvedev, S. and Hañinen, O. Effects of 45-Hz magnetic fields on the functional state of the human brain. *Bioelectromagnetics* 14, 87–95, 1993.
105. Lyskov, E., Juutilainen, J., Jousmaki, V., Hañinen, O., Medvedev, S. and Partanen, J. Influence of short-term exposure of magnetic field on the bioelectrical processes of the brain and performance. *Int. J. Psychophysiol.* 14, 227–231, 1993.
106. Crasson, M. Absence of 50 Hz, 100 μ T magnetic FIELD exposure effect on human performance and psychophysiological Parameters. 1991.
107. Sander, R., Brinkman, J. and Kuñne, B. Laboratory studies on animals and human beings exposed to 50 Hz electric and magnetic fields. International conference on large high voltage electric systems, 29th Session, 1982, II, 1–9 September, CIGRE, Paris, 1982.
108. Lyskov, E., Sandstrom, M. and Mild, K. H. Provocation study of persons with perceived electrical hypersensitivity and controls using magnetic field exposure and recording of electrophysiological characteristics. *Bioelectromagnetics* 22(7), 457–462, 2001.
109. Graham, C., Cook, M. R., Cohen, H. D., Riffle, D. W., Hoffman, S. and Gerkovich, M. M. Human exposure to 60-Hz magnetic fields: neurophysiological effects. *Int. J. Psychophysiol.* 33(2), 169–175, 1999.

110. Crasson, M., Legros, J. J., Scarpa, P. and Legros, W. 50 Hz magnetic field exposure influence on human performance and psychophysiological parameters: two double-blind experimental studies. *Bioelectromagnetics* 20(8), 474–486, 1999.
111. Silny, J. Influence of low-frequency magnetic field (LMF) on the organism. In: *Proceeding of the 4th Symposium on Electromagnetic Compatibility*, Zurich, 10–12 March, Paper 33 G2, pp. 175–180, 1981.
112. Silny, J. The influence threshold of the time-varying magnetic field in the human organism. In: *Biological effects of static and extremely low frequency magnetic fields*, Ed. J. H. Bernhardt. Papers presented at the symposium in Neuherberg, 13– 15 May, 1985. *Bga-Schriften* 3/1986, 105–112, 1986.
113. Guimaraes CA, Linden R. Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 271: 1638–1650, 2004.
114. Guler G, Turkozer Z, Seyhan N. Electric field effects on guinea pig serum: The role of free radicals. *Electromagn Biol Med* 26(3):207-223, 2007.
115. Guler G, Turkozer Z, Tomruk A, Seyhan N. The protective effects of N-acetyl-L-cysteine and epigallocatechin-3-gallate on electric field-induced hepatic oxidative stress. *Int J Radiat Biol.* 84(8):669-680, 2008.
116. Turkozer Z, Guler G, Seyhan N. Effects of exposure to 50 Hz electric field at different strengths on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain tissue of guinea pigs. *Int J Radiat Biol* 84(7):581-590, 2008.
117. Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus*; 1:1-19, 1998.
118. Mountz JD and Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. In: Kopman WJ ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams &Wilkins, 2001.
119. Willingham MC. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *The Journal of Histochemistry&Cytochemistry.* 47:1101-1109, 1999.
120. Robins SL and Kumar V. Cell injury and cell death. *Pathologic Basis of Disease*. Chapter 1; 18-25, 1999.
121. Nakano R. Apoptosis: Gene-Directed Cell Death. *Horm. Res.* 48: 2-4, 1997.
122. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267: 1456-1462, 1995.
123. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35:495-516, 2007.
124. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*; 2: 277–88, 2002.

125. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104: 487–501, 2001.
126. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305–8, 1998.
127. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. A new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 32401–10, 1997.
128. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas) - mediated apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 545–51, 1998.
129. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF kappa B activation. *Cell* 81: 495–504, 1995.
130. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo. J.* 14: 5579–88, 1995.
131. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, Van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23: 2861–74, 2004.
132. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.* 1: 5–15, 1999.
133. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo. J.* 23: 2134–45, 2004.
134. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga- Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 410: 549–54, 2001.
135. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391: 43–50, 1998.
136. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2: 647–56, 2002.
137. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 15; 64: 7183-90, 2004 .
138. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276: 7320–6, 2001.

139. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391: 96–9, 1998.
140. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* 272: 26159–65, 1997.
141. Lowe SW and Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21: 485-495, 2000.
142. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Cell Injury and Cell Death. In: Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia. WB Saunders. 18-25, 1999.
143. Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck*. 23: 409-25, 2001.
144. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular apoptosis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, 88: 386-401, 1996.
145. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell*, 87: 171 1996.
146. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6: 1028-1042, 1999.
147. Chang, HY and Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiology and Mol. Biol. Rev.* 64, 821–846, 2000.
148. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br. Med. Bull.* 53 (3), 478-490, 1997.
149. Krauss, G. Biochemistry of signal transduction and regulation, Wiley-Vch, Darms, 456-467, 2001.
150. Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Momoi T, Srinivasan A, Nicholson DW, Lazebnik Y. and Flavell RA. Deficiency in caspase-9 and caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat. Med.* 6, 1241–1247, 2000.
151. Thornberry NA, Bull H G, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR and Aunins J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 356, 768–774, 1992.
152. Aliyev V. Sigara içenlerde oksidatif stres göstergelerinin değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
153. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive species. *J. Physiol.* 522: 335–344, 2003.
154. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. *Trends Cell Biol.* 8: 267– 271, 1998.

155. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 100: 1810–1816, 2002.
156. Kim M, Park SY, Pai HS, Kim TH, Billiar TR, Seol DW. Hypoxia inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by blocking Bax translocation. *Cancer Res*. 64: 4078–4081, 2004.
157. Boya P, Morales MC, Gonzalez-Polo RA. The chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis through a mitochondrial pathway regulated by proteins from the Bcl-2 family. *Oncogene*. 22: 6220–6230, 2003.
158. Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp. Cell. Res*. 283: 156–166, 2003.
159. Kagan VE, Gleiss B, Tyurina YY. A role for oxidative stress in apoptosis: Oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol*. 169: 487–499, 2002.
160. Eisele K, Lang PA, Kempe DS. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 210: 116–22, 2006.
161. Smyth MJ, Perry DK, Zhang J, Poirier GG, Hannun YA, Obeid LM. pRICE: A downstream target for ceramide-induced apoptosis and for the inhibitory action of Bcl-2. *Biochem. J*. 316: 25–28, 1996.
162. Goswami R, Kilkus J, Scurlock B, Dawson G. CrmA protects against apoptosis and ceramide formation in PC12 cells. *Neurochem. Res*. 27: 735–741, 2002.
163. France-Lanord V, Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: A putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 69: 12–21, 1997.
164. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int*. 49: 91–102, 1999.
165. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, De Giuli F, Albertini A. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr*. 53: 215–222, 1991.
166. Cheeseman KH, Slater TF.: An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 49(3): 481–493, 1993.
167. Kusterer K, Pihan G, Szabo S. Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH or ischemia. *Am J Physiol*. 252(15): 811–816, 1987.
168. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler, ss: 85–91, 1995.

169. Betteridge J. What is oxidative stress? *Metabolism*. 49(2): 3-8, 2000.
170. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 74(1): 139-162, 1994.
171. Auroma OL, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroğlu M. Copper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 273(Pt 3): 601-604, 1991.
172. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit. Care Med*. 21(9):1376-1386, 1993.
173. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 689: 1905-12, 1999.
174. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 41(12): 1819-1828, 1995.
175. Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biol. Interact*. 91: 133-140, 1994.
176. Koster JF, Biemond P, Stam H. Lipid peroxidation myocardial ischaemic damage: cause or consequence? *Basic Res Cardiol*. 82 Suppl 1: 253-60, 1987.
177. Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids*. 45(2-4):251-268, 1987.
178. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest*. 47(5): 412-426, 1982.
179. Winyard P, Lunec J, Brailsford S, Blake D. Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin. *Int. J. Biochem*. 16(12): 1273-8, 1984.
180. Sagone AL, Greenwald J, Kraut EH, Bianchine J, Sing D. Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *J. Lab. Clin. Med*. 101: 97-104, 1983.
181. Koster JF, Slee RG, Montfoort A, Lang J, Esterbauer H. Comparison of the inactivation of glucose-6-phosphatase by in situ lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal and exogenous 4-hydroxynonenal. *Free Radic Res*. 1:273-287, 1986.
182. Subramaniam R, Roediger F, Jordan B, Mattson MP, Keller JN, Waeg G, Butterfield DA. The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins. *J Neurochem* 69:1161-1169, 1997.
183. Castegna A, Lauderback CM, Mohammad-Abdul H, Butterfield DA. Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: Implications for Alzheimer's disease. *Brain Res* 1004:193-197, 2004.
184. Doorn JA, Petersen DR. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chem Biol Interact* 143:93-100, 2003.

185. Pedersen WA, Cashman NR, Mattson MP. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Exp Neurol* 155:1–10, 1999.
186. Kowalczyk P, Ciesla JM, Komisarowski M, Kusmierik JT, Tudek B. Long-chain adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutations in M13 phage. *Mutat Res* 550:33–48, 2004.
187. Zarkovic K. 4-Hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 24:293–303, 2003.
188. Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68:2092–2097, 1997.
189. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno M. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2696–2701, 1996.
190. Selley ML. (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 25:169–174, 1998.
191. Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: A potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62:1758–1765, 2004.
192. Stoy N, Mackay GM, Forrest M, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem* 93:611–623, 2005.
193. Sowell J, Frei B, Stevens JF. Vitamin C conjugates of genotoxic lipid peroxidation products: Structural characterization and detection in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17964–17969, 2004.
194. Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z, Petersen DR. Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase. *Chem Res Toxicol* 18:1324–1331, 2005.
195. Hassan HM, Fridovich L. Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. *Eur J Rheumatol. Inflamm.* 4(2): 160-172, 1981.
196. Kasai H, Nishimura S, Kurokawa Y, Hayashi Y. Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis* 8(12):1959-61, 1987.
197. Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF. Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J. Nutr.* 108(6): 981-987, 1978
198. Leung HW, Morrow PE. Interaction of glutathione and ascorbic acid in guinea pig lungs exposed to nitrogen dioxide. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 31(1): 111-118, 1981.

199. Leung KH, Post GB, Menzel DB. Glutathione S-sulfonate a sulfurdioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77(3): 388-394, 1985.
200. Rivett AJ. High molecular mass of intracellular proteases. *Biochem.J.* 263(3): 625-33, 1989.
201. Wendel A, Cikryt P. The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS-Lett.* 120(2): 209-11, 1980.
202. Thomas CE, Aust SD. Rat liver microsomal NADPH-dependent release of iron from ferritin and lipid peroxidation. *J. Free. Radic. Biol. Med.* 1(4): 293-300, 1985.
203. Ji LL, Stratman FW, Lardy HA. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch. Biochem. Biophys.* 263(1): 150-60, 1988.
204. Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Fernandez A, Barba C, Barja de Quiroga G. Brain glutathione reductase induction increases early survival and decreases lipofuscin accumulation in aging frogs. *J. Neurosci. Res.* 34(2): 233-42, 1993.
205. Traber MG. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Miner. Electrolyte Metab.* 23: 135-139, 1997.
206. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human diseases: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 19(6): 598-620, 1992.
207. Al-Turk WA, Stohs SJ, El-Rashidy FH, Othman S, Shaheen O. Changes in glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology.* 34(1): 1-8, 1987.
208. Aydin MA, Comlekci S, Ozguner M, Cesur G, Nasir S, Aydin ZD. The influence of continuous exposure to 50 Hz electric field on nerve regeneration in a rat peroneal nerve crush injury model. *Bioelectromagnetics* 27(5):401-413, 2006.
209. Guler G, Türközer Z, Ozgur E, Seyhan N. Antioxidants alleviate electric field-induced effects on lung tissue based on assays of heme oxygenase-1, protein carbonyl content, malondialdehyde, nitric oxide, and hydroxyproline. *Sci Total Environ.* 407(4):1326-1332, 2009.
210. Guler G, Türközer Z, Ozgur E, Tomruk A, Seyhan N, Karasu C. Protein oxidation under extremely low frequency electric field in guinea pigs. Effect of N-acetyl-L-cysteine treatment. *Gen Physiol Biophys.* 28(1):47-55, 2009.
211. Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, Urano S. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Annals of the New York Academy of Science* 928: 168-175, 2001.

212. Kennet BB, Ames NB. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78(2): 547-581, 1998.
213. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic process. *Frontiers in Bioscience.* 4: 339-345, 1999.
214. Matsumoto K, Yabimoto K, Huong NTT, Abdel-Fattah M, Hien TV, Watanabe H. Psychological stress-induced enhancement of lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. *Brain Research.* 839:74-84, 1999.
215. Fukui K, Omoi N, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 959: 275-284, 2002.
216. Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol Biol.* 44:25-8, 1996.
217. Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.* 319: 428-36, 2000.
218. Reznick A.Z., Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233: 357-63, 1994.
219. Stadtman E.R., Berlett B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol.* 10(5): 485-94, 1997.
220. Stadtman E.R., Oliver C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem.* 266(4): 2005-8, 1991.
221. Naatanen R. The role of attention in auditory information processing as revealed by event-related potentials and other brain measures of cognitive function. *Behav. Brain Sci.* 13:201-288, 1990.
222. Csepe V., Molnar M., Karmos G., Winkler I. Effect of changes in stimulus frequency on auditory evoked potentials in awake and anaesthetized cats. In J. Horne and P. Lavie (Eds.), *Sleep '88*, Gustav Fischer, Stuttgart, pp. 210-211, 1989.
223. Kraus N., McGee T., Littman T., Nicol T., King, C. Nonprimary auditory thalamic representation of acoustic change, *J. Neurophysiol.* 72:1270-1277, 1994.

ÖZGEÇMİŞ

Deniz AKPINAR. 1978 yılında Burdur'un Ağlasun ilçesinde doğdu, ilk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 1996 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümünü'nde üniversite eğitime başladı. Lisans diplomasını 2000 yılında aldı ve 2001 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Yüksek Lisans diplomasını 2004 yılında aldı ve 2005 yılında aynı bölümde Doktora eğitime başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir. Evli ve bir erkek çocuk babasıdır.

EKLER

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH****Research Report****Effect of aminoguanidine on visual evoked potentials (VEPs), antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress****Deniz Akpınar^a, Piraye Yargicoglu^{a,*}, Narin Derin^a, Mutay Aslan^b, Aysel Agar^c**^aAkdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Arapsuyu, 07070 Antalya, Turkey^bAkdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Turkey^cAkdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 26 September 2007

Available online 4 October 2007

Keywords:

Restraint stress

VEPs

Aminoguanidine

Lipid peroxidation

Antioxidant enzyme

ABSTRACT

The purpose of the study was to investigate the effect of aminoguanidine (AG) on visual evoked potentials (VEPs), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the activities of Cu, Zn superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT), and nitrite/nitrate levels. Forty healthy male Wistar rats, aged 3 months, were divided into four equal groups: Control (C), the group treated with aminoguanidine (A), the group exposed to restraint stress (S), the group exposed to restraint stress and treated with aminoguanidine (AS). Chronic restraint stress was applied for 21 days (1 h/day) and aminoguanidine (50 mg/kg/day) was injected intraperitoneally to the A and AS groups for the same period. Aminoguanidine treatment significantly decreased retina and brain TBARS levels in rats exposed to restraint stress compared to rats exposed to restraint stress alone. Aminoguanidine treatment produced a significant decrease in brain and retina nitrite and nitrate levels with respect to the control groups. Aminoguanidine increased all antioxidant enzyme activities in both brain and retina in rats exposed to restraint stress compared to rats exposed to restraint stress alone. All VEP components were significantly decreased in AG treated rats exposed to restraint stress compared to rats exposed to restraint stress alone. Our study clearly showed that AG has the potential to prevent changes caused by stress.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Stress is conceived as any physical, psychological and/or environmental stimulus which disturbs physiological homeostasis and may result in widespread changes in a variety of biological systems (Chrousos, 1998; Masood et al., 2003). Restraint stress is an easy and well-known method to induce chronic physical and emotional stress (Romanova et al., 1994).

Accumulating evidence indicates that stress can stimulate numerous pathways leading to an increased production of

oxidants (Liu et al., 1996; Liu and Mori, 1999; Matsumoto et al., 1999; Shaheen et al., 1993). Under normal conditions, there is also a natural defense system provided by several enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) which performs a vital role for detoxification of free radicals. However, stress has been shown to cause depletion of the glutathione-based antioxidant defense and a decrease in the level of vitamin C (Zaidi et al., 2003; Zaidi and Banu, 2004). The deleterious effects of an imbalance between free radical production and the available

* Corresponding author. Fax: +90 242 2274495.

E-mail address: pakkiraz@akdeniz.edu.tr (P. Yargicoglu).

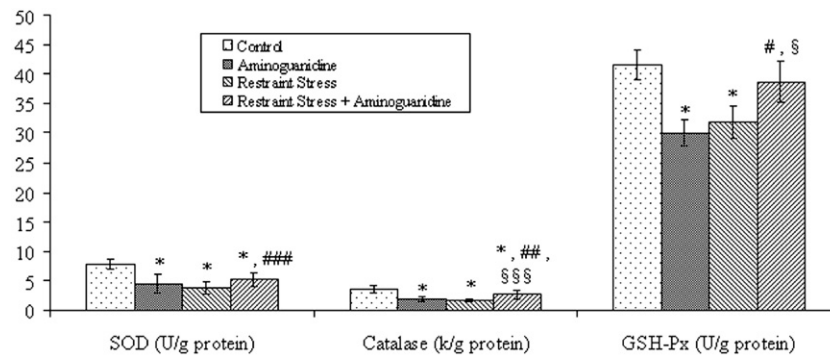


Fig. 1 – SOD, GSH-Px and catalase values of brain tissues. Values are means $\pm$ standard deviations. * $p < 0.001$ vs. control. # $p < 0.001$ vs. restraint stress. ## $p < 0.01$ vs. restraint stress. ### $p < 0.05$ vs. restraint stress. § $p < 0.001$ vs. aminoguanidine. §§ $p < 0.05$ vs. aminoguanidine.

antioxidant defense capacity, termed oxidative stress, have been implicated in stress pathogenesis (Yu, 1994). Considering that the retina and brain tissues include a high content of polyunsaturated fatty acids, increased production of oxidants due to restraint stress can produce marked damage to the structure and function of cell membranes in these tissues (Jain et al., 1991; Matsumoto et al., 1999). Indeed, earlier studies (Liu et al., 1996; Liu and Mori, 1999; Matsumoto et al., 1999; Olivenza et al., 2000; Yargicoglu et al., 2003) have shown lipid peroxidation as the major biochemical alteration underlying stress-induced cell injury.

Previous studies suggested that stress increases rates of reactive nitrogen-derived species production which also mediates the oxidation of lipids (Matsumoto et al., 1999; McCann, 1997). In this context, not only constitutive formation of NO, but also inducible expression of iNOS has been found to occur in the brain during chronic stress (Leza et al., 1998; Olivenza et al., 2000). This concept has been further supported by our previous study (Yargicoglu et al., 2004), which has shown the involvement of NO in stress-induced-lipid peroxidation. Endogenous NO arises from the conversion of L-arginine to L-citrulline by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). Three NOS isoforms, encoded by different genes, have been found to date and are richly distributed throughout the body (Moncada et al., 1993; Sanches et al.,

2003). Constitutive expression of two NOS isoforms (neuronal and endothelial NOS) is responsible for low basal levels of NO synthesis in neural and endothelial cells. In this regard, NO has been shown to have an important role in neurotransmission and vascular signaling. However, accelerated NO production by inducible NOS results in cytotoxicity via direct reactions of NO and the formation of secondary species capable of oxidation and nitration reactions (Danielisova et al., 2004). NO may interact with oxygen, superoxide anion and thiol compounds, generating reactive nitrogen species (NOx), peroxynitrite (ONOO⁻) and nitrosoglutathione (GSNO), respectively. Lipid peroxidative effect of NO may be mediated through ONOO⁻ which is a potent and long-lived oxidant (Chiueh, 1999; Rubbo et al., 2000; Siu et al., 1999). Thus, in the central nervous system NO seems to be a ubiquitous messenger that, under certain conditions, such as its excessive release or the absence of antioxidant system, may be toxic to cells while in others acts as a neuroprotective agent (Chiueh, 1999). Nitric oxide (NO) plays an important role in the processing of vision from the lowest level of retinal transduction to the control of neuronal excitability in the visual cortex (Cudeiro and Rivadulla, 1999). Thus, stress-induced lipid peroxidation resulting from increased reactive nitrogen species production can cause changes in brain and retina functions. Consequently, it could be expected that

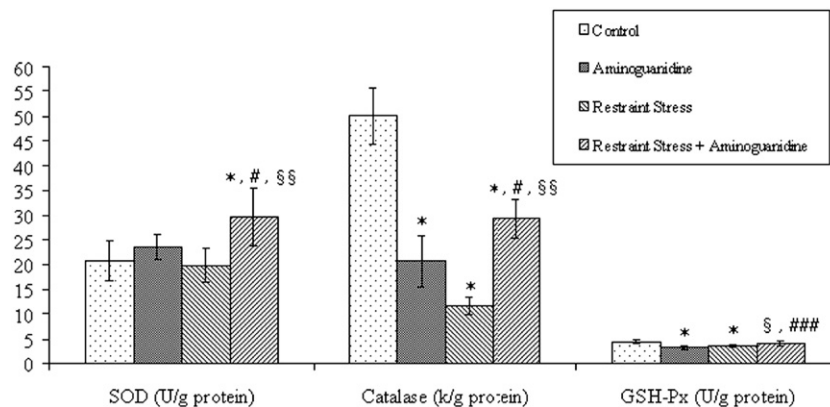


Fig. 2 – SOD, GSH-Px and catalase values of retina tissues. Values are means $\pm$ standard deviations. * $p < 0.001$ vs. control. # $p < 0.001$ vs. restraint stress. ### $p < 0.05$ vs. restraint stress. § $p < 0.001$ vs. aminoguanidine. §§ $p < 0.01$ vs. aminoguanidine.

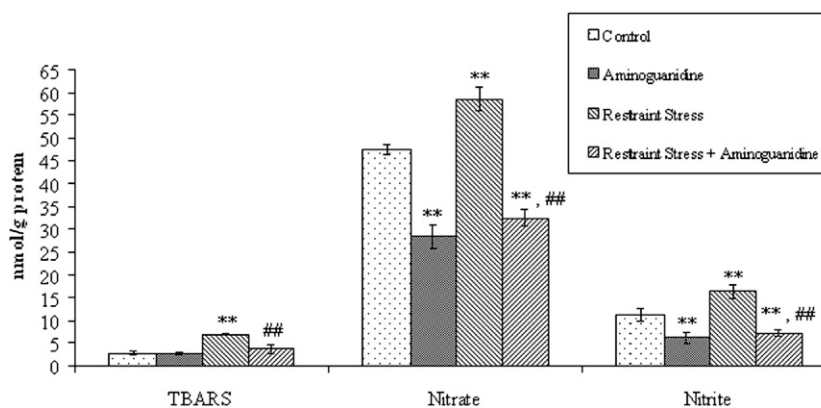


Fig. 3 – TBARS, nitrate and nitrite values of brain tissues. Values are means $\pm$ standard deviations. ** $p < 0.01$ vs. control. ## $p < 0.01$ vs. restraint stress.

stress results in visual system changes. Visual evoked potentials (VEPs) are known to be sensitive and reliable indicators of the visual system changes and consist of several components arising from retina, optic pathway, subcortex and cortex (Celesia, 1984; Halliday et al., 1972). Therefore, in this study we tried to determine the changes expected to occur in VEPs during stress and to clarify the possible role of NO on these changes by using aminoguanidine (AG), a selective iNOS inhibitor. In this context, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured as an indicator of lipid peroxidation. Additionally, Cu, Zn-SOD, GSH-Px and CAT activities were evaluated to determine whether AG could improve antioxidant status and oxidative stress. Furthermore, total levels of nitrates and nitrites which are stable nitric oxide metabolites were measured for corroborative purposes in the brain and retina.

2. Results

In the present study, body weight and food intake were not significantly affected by exposure to stress and/or aminoguanidine (data not shown).

Mean values of brain and retina antioxidant enzyme activities are given in Figs. 1 and 2, respectively. TBARS, nitrite and nitrate levels of brain and retina tissues are shown in Figs. 3 and 4, respectively. Statistically significant increments in brain and retina TBARS levels were detected in the stress group compared with the control group. Brain and retina TBARS levels were significantly lower in aminoguanidine treated rats exposed to restraint stress compared to rats exposed to restraint stress alone.

Restraint stress significantly decreased brain and retina GSH-Px and CAT activities compared to the control group. Cu, Zn-SOD activity was also decreased in the brain, but not in the retina, of rats exposed to restraint stress. Aminoguanidine treatment alone, significantly reduced brain Cu, Zn-SOD, brain and retina GSH-Px and CAT activities, whereas it had no effect on retina Cu, Zn-SOD activity when compared to the C group. Aminoguanidine treatment significantly increased antioxidant enzyme activities in both brain and retina of rats exposed to restraint stress compared to rats exposed to restraint stress alone.

A marked increase was observed in brain and retina nitrite and nitrate levels of rats exposed to stress when compared to the C group. Aminoguanidine treatment significantly reduced

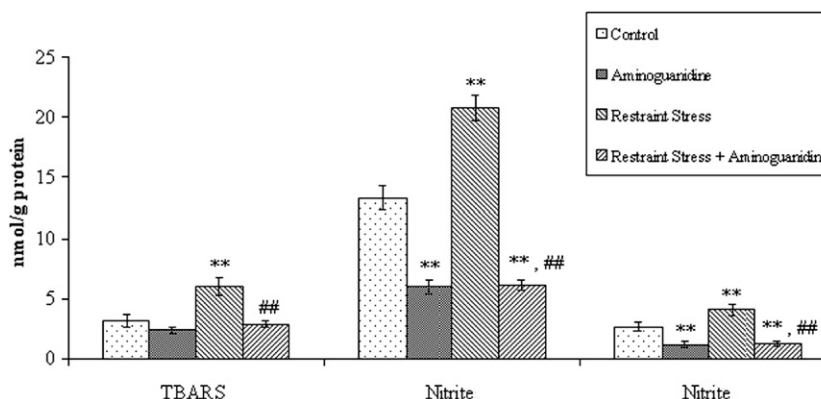


Fig. 4 – TBARS, nitrate and nitrite values of retina tissues. Values are means $\pm$ standard deviations. ** $p < 0.01$ vs. control. ## $p < 0.01$ vs. restraint stress.

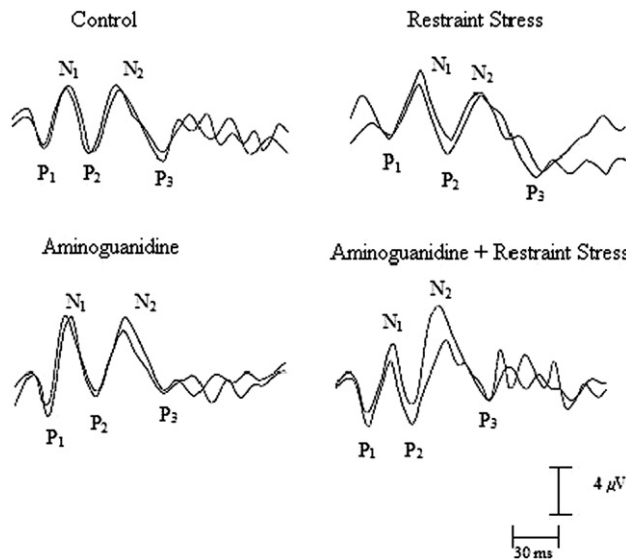


Fig. 5 – Characteristic visual evoked potentials of the four groups. Three positive (P_1 , P_2 , P_3) and two negative (N_1 , N_2) potentials were seen in all groups.

brain and retina nitrite and nitrate levels of A and AS groups when compared to the C and S groups.

Representative waveforms of VEPs for the all groups are presented in Fig. 5. Measurements were made on three positive and two negative potentials which were seen in all of the groups. Differences of VEP parameters were analyzed by ANOVA. No significant difference was observed in VEP latencies and amplitudes between right and left eyes. Therefore, based on the analysis, the data from stimulation of both eyes were averaged. The means and standard deviations of peak latencies of VEP components of all groups, and the results of the statistical analysis are shown in Table 1.

The mean latencies of P_1 , N_1 , P_2 , N_2 and P_3 components were significantly prolonged in rats exposed to restraint stress compared to the C group. Aminoguanidine treatment significantly decreased all VEP components in rats exposed to restraint stress compared to rats exposed to restraint stress alone (Table 1).

When comparing the amplitudes of the groups, it was observed that there were no significant differences in amplitudes of VEP among experimental groups (data not shown).

The correlation between biochemical parameters and VEP latencies was also investigated (Table 2). We found a

significant correlation among VEP latencies and TBARS levels of retina and brain (Table 2A). A significant correlation was also observed among VEP latencies and nitrate/nitrite levels of brain and retina (Table 2B and C). There was also a significant correlation between TBARS and nitrite/nitrate levels of brain and retina (Table 2D).

3. Discussion

In the current study, we recorded the visual evoked potentials of rats that were exposed to restraint stress and treated with AG. The amplitudes and latencies of VEP components found in our laboratory are generally in agreement with those found in other laboratories (Dyer et al., 1987; Sisson and Siegel, 1989). The present study showed that stress exposure resulted in prolongation of all components of VEPs. In view of the fact that VEPs have been shown to be a sensitive and reliable method to evaluate the earliest changes in the visual system (Chiappa and Ropper, 1982; Halliday, 1976; Hudnell and Boyes, 1991; Lehman and Harrison, 2002), these results probably indicate that stress markedly affects the visual system. The changes in the initial portion of the VEP waveform suggest altered function in the “front end” of the visual system (Herr et al., 1995; Schroeder et al., 1991). The prolongation of late components (N_2 , P_3) of VEPs may also reflect altered cortical processing of the visual stimulus (Herr et al., 1995; Schroeder et al., 1991). From our findings (Yargicoglu et al., 2004) together with previous results (Herr et al., 1995; Schroeder et al., 1991), it could be concluded that stress-induced increase in VEP latencies may be due to delayed input to the visual cortex and/or alterations at the cortical level.

Our results indicated that stress increased lipid peroxidation and caused VEP changes. Moreover, there was a positive correlation between TBARS levels and VEP latencies. Therefore, it could be concluded that lipid peroxidation might have a role in the prolongation of all VEP components. The exact mechanism of stress has not yet been clearly defined. However, there have been many reports suggesting that free radicals play an aberrant role in the mechanism of stress (Kovacs et al., 1996; Liu and Mori, 1999; Olivenza et al., 2000; Shaheen et al., 1993). Stress-induced lipid peroxidation observed in brain and retina is also in agreement with previous studies (Liu et al., 1996; Liu and Mori, 1999; Matsumoto et al., 1999; Yargicoglu et al., 2003). Additionally, restraint stress weakened antioxidative defense mechanisms in accordance with earlier reports (Liu et al., 1994; Liu and Mori, 1999; Zaidi et al., 2003). Therefore, it is reasonable to

Table 1 – The means and standard deviations of peak latencies for each VEP components (the mean value of each component was determined by averaging the data of both eyes)

Groups	P_1 (ms)	N_1 (ms)	P_2 (ms)	N_2 (ms)	P_3 (ms)
Control	20.90±1.19	35.90±1.29	51.20±1.75	70.50±3.41	99.00±2.21
Aminoguanidine	20.20±0.91	37.70±1.05	53.00±1.69	71.80±3.91	98.10±3.28
Restraint stress	27.80±1.87*	45.40±5.21*	65.40±7.93*	88.80±7.30*	120.90±4.43*
Restraint stress + aminoguanidine	21.20±1.03 [#]	36.50±1.08 [#]	49.90±1.79 [#]	70.20±3.35 [#]	101.80±2.04 [#]

* $p < 0.001$ vs. control group.

[#] $p < 0.001$ vs. restraint stress.

Table 2 – (A) Correlation values among brain and retina TBARS levels and VEP latencies, (B) correlations values among brain and retina nitrate levels and VEP latencies, (C) correlations values among brain and retina nitrite levels and VEP latencies, (D) correlations values between TBARS and nitrate and nitrite levels in brain and retina

Pearson's R		
A		
Brain TBARS, P ₁	y = 15.99 + 1.59x	0.863 *
Brain TBARS, N ₁	y = 30.90 + 1.94x	0.749 *
Brain TBARS, P ₂	y = 42.25 + 3.07x	0.748 *
Brain TBARS, N ₂	y = 59.05 + 396x	0.787 *
Brain TBARS, P ₃	y = 84.52 + 4.97x	0.912 *
Retina TBARS, P ₁	y = 15.57 + 1.92x	0.865 *
Retina TBARS, N ₁	y = 29.68 + 2.54x	0.814 *
Retina TBARS, P ₂	y = 40.06 + 4.09x	0.827 *
Retina TBARS, N ₂	y = 56.85 + 5.10x	0.842 *
Retina TBARS, P ₃	y = 84.15 + 5.75x	0.876 *
B		
Brain nitrate, P ₁	y = 14.05 + 0.20x	0.748 *
Brain nitrate, N ₁	y = 29.79 + 0.22x	0.570 *
Brain nitrate, P ₂	y = 38.75 + 0.39x	0.638 *
Brain nitrate, N ₂	y = 54.42 + 0.50x	0.676 *
Brain nitrate, P ₃	y = 79.77 + 0.60x	0.752 *
Retina nitrate, P ₁	y = 17.51 + 0.43x	0.808 *
Retina nitrate, N ₁	y = 33.17 + 0.49x	0.655 *
Retina nitrate, P ₂	y = 44.96 + 0.86x	0.717 *
Retina nitrate, N ₂	y = 62.65 + 1.10x	0.749 *
Retina nitrate, P ₃	y = 90.26 + 1.27x	0.802 *
C		
Brain nitrite, P ₁	y = 15.98 + 0.64x	0.806 *
Brain nitrite, N ₁	y = 32.01 + 0.67x	0.602 *
Brain nitrite, P ₂	y = 43.32 + 1.13x	0.639 *
Brain nitrite, N ₂	y = 60.03 + 1.49x	0.690 *
Brain nitrite, P ₃	y = 86.23 + 1.83x	0.780 *
Retina nitrite, P ₁	y = 17.59 + 2.14x	0.786 *
Retina nitrite, N ₁	y = 33.46 + 2.35x	0.614 *
Retina nitrite, P ₂	y = 45.85 + 3.91x	0.645
Retina nitrite, N ₂	y = 63.81 + 4.99x	0.672 *
Retina nitrite, P ₃	y = 91.19 + 5.96x	0.742 *
D		
Brain TBARS, brain nitrate	y = 22.43 + 4.69x	0.691 *
Brain TBARS, brain nitrite	y = 3.24 + 1.70x	0.732 *
Retina TBARS, retina nitrate	y = 1.14 + 0.21x	0.888 *
Retina TBARS, retina nitrite	y = 1.18 + 1.06x	0.864 *

* p < 0.01.

expect that the decrease of antioxidant enzymes may be a risk factor for enhancement of lipid peroxidation, because of their protecting effect against free radical damage (Zaidi and Banu, 2004). The antioxidant mechanism fails either due to overproduction of free radicals or decreased activities of scavenging enzymes. Since lipid peroxidation is a self-propagating chain reaction, the initial oxidation of only a few lipid molecules leads to irreversible alterations in cellular metabolism and structure, especially so in polyunsaturated fatty acid rich brain and retina tissues. Indeed, lipid peroxidation has been identified as the major biochemical alteration underlying stress-induced cell injury (Jain et al., 1991; Matsumoto et al., 1999). In agreement with the concept of lipid

peroxidation process that may ultimately result in alterations in neural functions, it is conceivable to conclude that stress-induced lipid peroxidation may play an important role in changes of VEPs parameters (Yaras et al., 2003). This concept has been further supported by the present study which revealed a significant positive correlation between brain and retina TBARS levels and VEP latencies.

One of the reasons for the stress-induced enhancement of free radicals may be the elevation of nitric oxide (NO) production (Matsumoto et al., 1999; McCann, 1997). This is further supported by the present determination of nitrite and nitrate levels, which revealed a significant increase in brain and retina NO levels in restrained stressed rats. Both constitutive formation of NO and inducible expression of iNOS have been reported to occur in the brain and retina during chronic stress. While under normal conditions NO plays a physiological role as a neurotransmitter in the central nervous system, excessive release of NO may be toxic to cells. In fact, previous data (Madrigal et al., 2001; Olivenza et al., 2000) have shown decreased lipid preoxidation in rats exposed to stress that were treated with AG, an inhibitor of iNOS.

Since neuroprotection by AG has been ascribed primarily to its inhibitory effect on the inducible isoform of NOS (Ally et al., 2006; Wakita et al., 2001), our findings strongly suggest that the iNOS-mediated elevation of NO production is at least implicated in the enhancement of lipid peroxidation in restraint stress. Thus, the neuroprotective effect of AG suggests that NO formed through iNOS may play an injurious role in stress and that iNOS may also contribute to neuronal damage through the production of peroxynitrite (Danielisova et al., 2004). Specially, it is shown that NO reacts rapidly with superoxide anion leading to the formation of highly reactive peroxynitrite (Kostic et al., 2000). This strong oxidative agent causes protein fragmentation and thus alters enzyme activity and in addition induces many injury processes associated with oxidative biological damage (Asahi et al., 1995). Therefore, previous studies suggested that elevated NO during stress may trigger a lipid peroxidation reaction in the brain and retina, probably via being converted to peroxynitrite (Matsumoto et al., 1999; McCann et al., 1998). In the current study, the alleviating effect of AG on the oxidative status correlated well with previous studies.

A second approach for the protective action of AG is through antioxidant property. Giardino et al. (1998) demonstrated that AG can act as an antioxidant in vivo and its mechanism of action appears to be primarily that of hydroxyl radical quenching. They also found that preincubation with AG prevented the twofold increase in oxidant-induced lipid peroxides in rat retinal cells. Aminoguanidine also antagonized the stress-induced enhancement of lipid peroxidation in the brain and retina by increasing antioxidant enzymes. These data clearly indicate that NO mediates stress-induced inhibition of the antioxidant defense system. As reported previously (Brown, 1995), CAT and GSH-Px were inhibited by the increased production of NO and possibly peroxynitrite.

Depletion of glutathione (GSH) observed under conditions of stress was shown to be the result of decreased activities of free radical scavenging enzymes (Zaidi and Banu, 2004) and the peroxynitrite radical (Radi et al., 1991). Decreased levels of tissue GSH result in a significant decrease in GSH-Px activity

which can lead to a loss of protection against lipid peroxidation, because GSH-Px can also interact directly with lipid peroxides and is sensitive to lower concentrations of H_2O_2 (Kurata et al., 1993). Consequently, it could be concluded that the depletion of GSH that occurs in stress (Liu et al., 1996) could be an important factor for the enhancement of lipid peroxidation. The decrease in brain GSH-Px, CAT and SOD activities that occur during chronic stress exposure could be important in induced lipid peroxidation.

In the present study, our results have indicated that the latencies of VEP components were significantly prolonged in the stressed rats and returned to control levels following AG administration. These findings could be explained by stress-induced lipid peroxidation, which is reduced by AG administration. On the other hand, AG increased all enzyme activities in the stress group whereas it decreased brain SOD and brain and retina GSH-Px and CAT activities in the A group compared with their corresponding control groups. This result could be interpreted as that AG treatment has opposite effects on antioxidant enzymes in the stressed and non-stressed animals. Since no comparable report is available in the literature concerning the effect of AG on antioxidant enzymes in the control rats, we could not explain the mechanism by which AG decreased antioxidant enzymes in the non-stressed animals. But, in order to explain this paradoxical effect of aminoguanidine, more comprehensive studies requires.

In conclusion, the present study demonstrated that restraint stress caused a significant enhancement of lipid peroxidation in the brain and retina and that this enhancement is, in part, due to an increase in NO production mediated by iNOS. Our finding that AG administration prevented VEP alterations caused by restraint stress also confirms this idea.

4. Experimental procedure

4.1. Preparation of animals

Forty healthy male albino rats, aged 3 months, were used in this study. They were randomly divided into four groups: Control (C), the group exposed to restraint stress (S), the group treated with aminoguanidine (A), the group exposed to restraint stress and treated with aminoguanidine (AS). Animals were housed in groups of 10 rats in stainless steel cages at standard conditions ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ and $50 \pm 5\%$ humidity) with 12 h light–dark cycles. Aminoguanidine (50 mg/kg/day) was injected intraperitoneally to the A and AS groups for 21 days. Distilled water was injected intraperitoneally to the C and S group for 21 days. All experimental protocols conducted on rats were performed in accordance with the standards established by the Institutional Animal Care and Use Committee at Akdeniz University Medical School. The experiments were performed between 9:00 and 12:00.

4.2. Restraint stress

Restraint stress model was performed according to the methods described by Gamaro et al. (1999). Rats were exposed

to 1 h of restraint stress daily for 21 days in which movement was limited by placing the animal in a 25×7 cm plastic bottle, fixed with plaster tape on the outside. Aeration, maintained via a 1.5-cm hole at one end of the bottle, allowed animals to breathe.

Daily food and water consumption of every cage and weekly weight of each rat was recorded during the feeding period. The mean daily food and water consumption was estimated from the recorded values. At the end of the experimental period, rats were deprived of food for 24 h and then prepared for experimental procedure.

4.3. VEP recordings

Visual evoked potentials were recorded with stainless steel subdermal electrodes (Nihon Kohden NE 223 S, Nihon Kohden Corporation, Tokyo 161, Japan) under ether anesthesia. The reference and active electrodes were placed 0.5 cm in front of and behind bregma, respectively. The active electrode was also placed 0.4 cm lateral to the midline over area 17 of visual cortex. A ground electrode was placed on the tails of animals. After 5 min of dark adaptation, a photic stimulator (Nova-Strobe AB, Biopac System Inc., Santa Barbara, CA 93117, USA) at the lowest intensity setting was used to provide the flash stimulus at a distance of 15 cm, which allowed lighting of the entire pupilla from the temporal visual field. Repetition rate of flash stimulus was 1 Hz and flash energy was 0.1 J. VEP recordings from both right and left were obtained, and throughout the experiments the eye not under investigation was occluded by appropriate black carbon paper and cotton. Body temperature was maintained between 37.5 and 38°C by a heating pad (Hetzler et al., 1988).

The averaging of 100 responses was accomplished with the averager of Biopac MP100 data acquisition equipment (Biopac System Inc., Santa Barbara, CA 93117, USA). Analysis time was 300 ms. The frequency bandwidth of the amplifier was 1 Hz–100 Hz. The gain was selected $20 \mu\text{V}/\text{div}$. The microprocessor was programmed to reject any sweeps contaminated with larger artifacts, and at least two averages were obtained to ensure response reproducibility. Peak latencies of the components were measured from the stimulus artifact to the peak in milliseconds. Amplitudes were measured as the voltage between successive peaks.

4.4. Chemical analysis

After VEP recordings, animals were sacrificed by cardiac puncture. The isolated retina and brain tissues were placed in 2 ml and 4 ml of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 at $0\text{--}4^\circ\text{C}$. All tissues were rapidly sonicated in a thermally regulated sonicator (Branson Sonifier 250, G. Heinemann Ultraschall-und Labortechnik, Erwin-Rommel-Str. 42, D-73525 Schwäbisch Gmünd, Germany) for 1 min. A part of the tissue sonicates were centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 min at 4°C in an eppendorf microcentrifuge and the supernatants were used for the assay of TBARS nitrite, nitrate and protein.

TBARS levels were measured by a fluorometric method, as described by Wasowicz et al. (1993) using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as a standard. Results are given as nmol/g protein.

Nitrite levels were measured by a fluorometric assay defined by Misko et al. (1993). Nitrite values are expressed as nanomoles per gram soluble protein.

Nitrate levels were measured by the method of Bories and Bories (1995). Nitrate values are expressed as nanomoles per gram soluble protein.

The protein levels were evaluated by Lowry's method (Lowry et al., 1951).

Tissue sonicates were centrifuged at 20,000×g for 60 min at 0–4 °C and supernatants were employed for the enzymatic assay of GSH-Px and SOD. SOD activity was assayed by the method described by Misra and Fridovich (1972). Data were expressed as U/g protein. GSH-Px activity was measured by the method of Paglia and Valentine (1967). Data are expressed as mU/mg protein.

A part of the sonicates were centrifuged at 700×g for 10 min and was used for the assay of catalase (CAT). Catalase activity was assayed by the method of Aebi (1987), with hydrogen peroxide as the substrate. Enzyme activity was expressed as k/g protein (k: rate constant of the first order reaction as defined by Aebi (1987)).

4.5. Statistical analysis

ANOVA was performed for all parameters of VEPs for the factors of side (right and left) and groups. Differences of other data were also analyzed by ANOVA. Post hoc comparisons of the means were carried out using the Tukey's test. Number of rats was 10 for all groups studied. Finally, for correlations, Pearson's correlation was used. Significance levels were set at $p < 0.05$.

Acknowledgments

This study was carried out as part of a MSc thesis by D. Akpınar presented to Akdeniz University Health Sciences Institute.

This study was supported by a grant from Akdeniz University Research Foundation, Turkey (Grant No: 2002.0122.05).

REFERENCES

- Aebi, H.E., 1987. Catalase of enzymatic analysis. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Enzyme 1: Oxidoreductases, Transferases*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 273–285.
- Ally, A., Phattanarudee, S., Kabadi, S., Patel, M., Maher, T.J., 2006. Cardiovascular responses and neurotransmitter changes during static muscle contraction following blockade of inducible nitric oxide synthase (iNOS) within the ventrolateral medulla. *Brain Res.* 1090, 123–133.
- Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., Seo, H.G., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M., Fujii, S., Taniguchi, N., 1995. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 270, 21035–21039.
- Bories, P.N., Bories, C., 1995. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin. Chem.* 41, 904–907.
- Brown, G.C., 1995. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem.* 232, 188–191.
- Celesia, G.G., 1984. Evoked potentials techniques in the evaluation of visual function. *J. Clin. Neurophysiol.* 1, 55–76.
- Chiappa, K.H., Ropper, A.H., 1982. Evoked potentials in clinical medicine second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 306, 1205–1211.
- Chiueh, C.C., 1999. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 890, 301–311.
- Chrousos, G.P., 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 851, 311–335.
- Cudeiro, J., Rivadulla, C., 1999. Sight and insight-on the physiological role of nitric oxide in the visual system. *Trends Neurosci.* 22, 109–116.
- Danielisova, V., Nemethova, M., Burda, J., 2004. The protective effect of aminoguanidine on cerebral ischemic damage in the rat brain. *Physiol. Res.* 53, 533–540.
- Dyer, R.S., Clark, C.C., Boyes, W.K., 1987. Surface distribution of flash-evoked and pattern reversal evoked potentials in hooded rats. *Brain Res. Bull.* 18, 227–234.
- Gamaro, G.D., Michalowski, M.B., Catelli, D.H., 1999. Effect of repeated restraint stress on memory in different tasks. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 341–347.
- Giardino, I., Fard, A.K., Hatchell, D.L., Brownlee, M., 1998. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 47, 1114–1120.
- Halliday, A.M., 1976. Visual evoked responses in optic nerve disease. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 96, 372–376.
- Halliday, A.M., McDonald, W.I., Mushin, J., 1972. Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet* 17758, 982–985.
- Herr, D.W., King, D., Barone, S., Crofton, K.M., 1995. Alteration in flash evoked potentials FEPs in rats produced by 3,3'-iminodipropionitrile IDNP. *Neurotoxicol. Teratol.* 17, 645–656.
- Hetzler, B.E., Boyes, W.K., Creason, J., Dyers, R.S., 1988. Temperature dependent changes in visual evoked potentials of rats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 70, 137–154.
- Hudnell, H.K., Boyes, W.K., 1991. The comparability of rat and human visual-evoked potentials. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 159–164.
- Jain, A., Martensson, J., Stole, E., Auld, P.A., Meister, A., 1991. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1913–1917.
- Kostic, T.S., Andric, S.A., Maric, D., Kovacevic, R.Z., 2000. Inhibitory effects of stress-activated nitric oxide on antioxidant enzymes and testicular steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75, 299–306.
- Kovacs, P., Juranek, I., Stankovicova, T., Svec, P., 1996. Lipid peroxidation during acute stress. *Pharmazie* 51, 51–53.
- Kurata, M., Suzuki, M., Agar, N.S., 1993. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 106, 477–487.
- Lehman, D.M., Harrison, J.M., 2002. Flash visual evoked potentials in the hypomyelinated mutant mouse shiverer. *Doc. Ophthalmol.* 104, 83–95.
- Leza, J.C., Salas, E., Sawicki, G., Russell, J.C., Radomski, M.W., 1998. The effect of stress on homeostasis in JRC: LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 1397–1403.
- Liu, J., Mori, A., 1999. Stress, aging, and oxidative damage. *Neurochem. Res.* 24, 1479–1497.
- Liu, J., Wang, X., Mori, A., 1994. Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione. *Int. J. Biochem.* 26, 511–517.
- Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M.K., Yeo, H.C., Mori, A., Ames, B.N., 1996. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J.* 10, 1532–1538.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Far, A.L., Randel, R.J., 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Madrigal, J.L., Olivenza, R., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P.,

- Rodrigo, J., Leza, J.C., 2001. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24, 420–429.
- Masood, A., Banerjee, B., Vijayan, V.K., Ray, A., 2003. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 458, 135–139.
- Matsumoto, K., Yabimoto, K., Huang, N.T.T., Abdel-Fattah, M., Hien, T.V., Watanabe, H., 1999. Psychological stress-induced enhancement of lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. *Brain Res.* 839, 74–84.
- McCann, S.M., 1997. The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Exp. Gerontol.* 32, 431–440.
- McCann, S.M., Licinio, J., Wong, M.L., Yu, W.H., Karanth, S., Rettori, V., 1998. The nitric oxide synthesis of aging. *Exp. Gerontol.* 33, 813–826.
- Misko, T.P., Schilling, R.J., Salvemini, D., Moore, W.M., Currie, M.G., 1993. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal. Biochem.* 214, 11–16.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, A., 1993. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Olivenza, R., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernandez, A.P., Rodrigo, J., Bosca, L., Leza, J.C., 2000. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J. Neurochem.* 74, 785–791.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 481–487.
- Romanova, T.P., Karpel, G.G., Brill, G.F., Markow, K.V., 1994. Mechanism of disorders of the cerebral blood supply during stress in spontaneously hypertensive rats. *Pathol. Fiziol. Eksp. Ter.* 3, 5–8.
- Rubbo, H., Radi, R., Anselmi, D., Kirk, M., Barnes, S., Butler, J., Fiserich, J.P., Freeman, B.A., 2000. Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J. Biol. Chem.* 275, 10812–10818.
- Sanches, D.B., Carnio, E.C., Branco, L.G., 2003. Central nNOS is involved in restraint stress-induced fever: evidence for a cGMP pathway. *Physiol. Behav.* 80, 139–145.
- Schroeder, C.E., Tenke, C.E., Givre, S.J., Arezzo, J.C., Vaughan, H.G.J., 1991. Striate cortical contribution to the surface-recorded pattern-reversal VEP in the alert monkey. *Vis. Res.* 31, 1143–1157.
- Shaheen, A., Hamdy, M.A., Kheir-Eldin, A.A., Lindstrom, P., El-Fattal, A.A., 1993. Effect of pretreatment with vitamin E or diazepam on brain metabolism of stressed rats. *Biochem. Pharmacol.* 46, 194–197.
- Sisson, D.F., Siegel, J., 1989. Chloral hydrate anesthesia: EEG power spectrum analysis and effects on VEPs in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 11, 51–56.
- Siu, A.W., Reiter, R.J., To, C.H., 1999. Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J. Pineal Res.* 27, 122–128.
- Wakita, T., Shintani, F., Yagi, G., Asai, M., Nozawa, S., 2001. Combination of inflammatory cytokines increases nitrite and nitrate levels in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Brain Res.* 905, 12–20.
- Wasowicz, W., Jean, N., Peratz, A., 1993. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum. Importance of extraction pH and influence of sample, preservation and storage. *Clin. Chem.* 39, 2522–2526.
- Yaras, N., Yargicoglu, P., Agar, A., Gumuslu, S., Abidin, I., Ozdemir, S., 2003. Effect of immobilization and cold stress on visual evoked potentials. *Int. J. Neurosci.* 113, 1055–1067.
- Yargicoglu, P., Yaras, N., Agar, A., Gumuslu, S., Bilmen, S., Ozkaya, G., 2003. The effect of vitamin E on stress-induced changes in visual evoked potentials VEPs in rats exposed to different experimental stress models. *Acta Ophthalmol. Scand.* 81, 181–187.
- Yargicoglu, P., Yaras, N., Agar, A., Gumuslu, S., Abidin, I., Bilmen, S., 2004. Effects of N-nitro L-arginine methyl ester L-NAME, a potent nitric oxide synthase inhibitor, on visual evoked potentials of rats exposed to different experimental stress models. *Acta Physiol. Scand.* 180, 307–316.
- Yu, B.P., 1994. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74, 139–162.
- Zaidi, S.M., Banu, N., 2004. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin. Chim. Acta* 340, 229–233.
- Zaidi, S.M., Al-Qirim, T.M., Hoda, N., Banu, N., 2003. Modulation of restraint stress induced oxidative changes in rats by antioxidant vitamins. *J. Nutr. Biochem.* 14, 633–636.