



**TAVŞAN BEYNİNDEKİ PREFRONTAL KORTEKS,
HİPPOKAMPUS, ENTORİNAL KORTEKS, HİPOTALAMUS
VE SUBSTANTİA NİGRA BÖLGELERİ ÜZERİNE
DENEYSEL AKUT TOLUEN TOKSİSİTESİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Mustafa ÇİÇEK

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

2017

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**TAVŞAN BEYNİNDEKİ PREFRONTAL KORTEKS,
HİPPOKAMPUS, ENTORİNAL KORTEKS, HİPOTALAMUS VE
SUBSTANTİA NİGRA BÖLGELERİ ÜZERİNE DENEYSEL AKUT
TOLUEN TOKSİSİTESİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE
BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Mustafa ÇİÇEK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Genel Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**TAVŞAN BEYNİNDEKİ PREFRONTAL KORTEKS, HİPPOKAMPUS,
ENTORİNAL KORTEKS, HİPOTALAMUS VE SUBSTANTİA NİGRA
BÖLGELERİ ÜZERİNE DENEYSEL AKUT TOLUEN TOKSİSİTESİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN danışmanlığında, Mustafa ÇİÇEK tarafından hazırlanan bu çalışma, 23/03/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Genel Biyoloji Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Suat ÇOLAK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 30.03.2017 tarih ve 13.30 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2014/183

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

TAVŞAN BEYNİNDEKİ PREFRONTAL KORTEKS, HIPPOKAMPUS, ENTORİNAL KORTEKS, HİPOTALAMUS VE SUBSTANTİA NİGRA BÖLGELERİ ÜZERİNE DENEYSEL AKUT TOLUEN TOKSİSİTESİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Mustafa ÇİÇEK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Toluen endüstride oldukça yaygın olarak kullanılan ve sağlık üzerine olumsuz etkileri olan uçucu bir maddedir. Bu çalışmada yüksek dozda Toluen'in tavşan beyin korteksi üzerine akut dönemdeki histopatolojik ve biyokimyasal etkileri araştırıldı. On yedi adet New Zeland cinsi tavşan (*Oryctolagus cuniculus*) iki guruba bölündü. Grup 1 kontrol grubu (n=7) olarak kullanılırken Grup 2'ye (n=10) yüksek doz Toluen verildi (876 mg/kg/ip). Üç saatlik deneysel maruziyetin sonunda öldürülen hayvanlardan biyokimyasal analizler için kan örnekleri alındı. Histopatolojik analizler için de beyin doku örnekleri %10'luk nötral formaline alınıp parafine gömüldü ve (5 µm) kalınlığında kesitler alındı. H&E ve Kristal viyolet boyamaları ile Bax ve Kaspaz-3 immunhistokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak histolojik incelemeler yapıldı. Ayrıca serum ve plazmalardan NGF, TNF alfa, Dopamine, GFAP, Na, K, GSH, MDA ve NO testleri yapıp biyokimyasal hasarın düzeyi belirlendi. Toluen verilen tavşanlarda histopatolojik olarak prefrontal ve entorinal beyin korteksinde fokal vakuoler dejenerasyon (abseleşmeler), gliozis, perivasküler demiyelinizasyon, çok sayıda piknotik hücre ve nekroz alanları izlendi. Hipotalamus ve hippocampus alanlarında kan damarlarında aşırı genişlemeler, hücreler arasında kompenzasyonda dejenerasyon, dağılmış hücre sınırları ve amiloid plak oluşumu görülmektedir. Toluen grubunda Na, K ve, MDA, seviyelerinde önemli ölçüde artış, GSH ve NO seviyelerinde ise anlamlı derecede azalma izlendi. Çalışmamızda prefrontal korteks, hippocampus, hipotalamus, substantia nigra ve entorinal korteks bölgelerinin biyokimyasal değerlendirmesinde, beyinde TNF alfa seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmış olduğu saptandı. Substantia nigra bölgelerinden salgılanan dopamin, hippocampal nöronlardan gelişen NGF ve astrosit hücrelerinden salınan GFAP serum seviyelerinin Toluen grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görüldü (p<0,05). Bunun yanında Toluen beyin korteksi hücre sitoplazmalarında şiddetli derecede (3+) Bax ve Kaspaz 3 immün reaktivitesinde önemli oranda artış meydana geldiği tespit edildi. Bu çalışma sonucunda yüksek doz Toluenin beyinin farklı bölgelerinde akut dönemde ciddi hasarlar oluşturabileceği gösterildi.

2017, 111 sayfa

Anahtar Kelimeler; Toluen, Oksidatif hasar, Bax, Kaspaz-3 ve Amiloid plak.

ABSTRACT

Ph. Dr. Thesis

IMMUNOHISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF EXPERIMENTAL ACUTE TOLUENE TOXICITY ON THE PREFRONTAL CORTEX, HIPPOCAMPUS, ENTORHINAL CORTEX, HYPOTHALAMUS AND SUBSTANTIA NIGRA REGIONS OF THE RABBIT BRAIN

Mustafa ÇİÇEK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Discipline of General Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Toluene is a volatile substance that is widely used in the industry and has adverse health effects. This study aimed to investigate the histopathological and biochemical effect of high dose Toluene on brain cortex in acute period of treated rabbits. Seventeen adult female New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were divided into 2 groups. Group I was used as a control group (n=7), while Group II was administered to high dose of Toluene (876 mg/kg/ip) (n=10). After the 3 hours experimental exposure, blood samples for biochemistry analyses and brain tissues for histopathological analyses were fixed from sacrificed animals and fixed in %10 neutral formalin, then, embedded in paraffin and sectioned (5 µm). Histological examinations were performed using H&E, Crystal violet staining Bax and Caspase-3 immunohistochemical staining. In addition, NGF, TNF alpha, Dopamine, GFAP, Na, K, GSH, MDA and NO tests were performed on serum and plasma to determine the level of biochemical damage. Histopathologically, focal vacuolar degeneration (abscesses), gliosis, perivascular demyelination, numerous picnic cells and necrosis areas were observed in the prefrontal and entorhinal brain cortex in toluene-administered rabbits. In the hypothalamus and hippocampus regions, excessive dilatation of blood vessels, degeneration in the compensation between cells, scattered cell boundaries and amyloid plaque formation have been observed. There was a significant increase in Na, K, MDA levels in the toluene group, but a significant decrease in GSH and NO levels was observed. In our study, in the biochemical evaluation of the prefrontal cortex, hippocampus, hypothalamus, substantia nigra and entorhinal cortex, the TNF alpha levels in the brain were found significantly higher than the control group. Levels of dopamine, secreted from substantia nigra, NGF developed from the hippocampal neurons, and GFAP, secreted from astrocyte cells were detected significantly lower in the Toluene-receiving group than the control group (p<0.05). Toluene group was found to show a serious increase in immunoreactivity against Bax and Caspase-3. Furthermore, Toluene was found to cause a serious increase in immunoreactivity against Bax and caspase-3 in cell cytoplasm of brain cortex. As a result of this study, it was shown that high doses of Toluene could cause serious damage in acute phase in different regions of the brain.

2017, 111 pages

Keywords: Toluene, Oxidative damage, Bax, Caspase-3 and Amyloid plaque.

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Bölümü ve Patoloji Bölümü Laboratuvarı ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi ve Histolojisi Laboratuvarı'nda yapılmış, Atatürk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından BAP 2014/183 nolu proje ile desteklenmiştir.

Öncelikle bu tezin belirlenip hazırlanmasında destek ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN'a, Sayın Prof. Dr. Ümit İNCEKARA'ya, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet DEMİR'e ve Sayın Doç. Dr. Atilla YOLDAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tezin hazırlık aşamasındaki desteklerinden dolayı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çene Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Kemal TÜMER'e teşekkür ederim.

Ve son olarak da tezimin çalışma ve yazım aşamasında ve hayatımın her alanında bana olan desteklerini esirgemeyen ve varlıkları ile beni onurlandıran eşim Halime Azra ÇİÇEK'e, kızım Mehlika Sevde ÇİÇEK'e, annem Emine ÇİÇEK'e, babam Vehbi ÇİÇEK'e, kayınvalidem Meliha GÜRBÜZ'e ve kayınpederim Av. Mehmet GÜRBÜZ'e teşekkür ederim.

Mustafa ÇİÇEK

Mart, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Toluen.....	1
1.1.1. Toluen'in kimyasal yapısı ve formülü.....	1
1.1.2. Toluenin üretimi ve kullanımı	2
1.1.3. Toluenin standartları, kabul edilir sınırları ve letal dozu.....	3
1.1.4. Toluenin vücuda alınımı.....	4
1.1.5. Toluenin vücutta dağılımı	4
1.1.6. Toluenin vücuttaki metabolizması	5
1.1.7. Toluen'in vücuttan atılması.....	6
1.1.8. Toluen'in toksik etkileri ve klinik belirtileri.....	7
1.1.8.a. Karaciğer üzerine toksik etkileri.....	7
1.1.8.b. Sinir sistemi üzerine toksik etkileri	8
1.1.8.c. Göz ve deri üzerine toksik etkileri.....	8
1.1.8.d. Teratojenik etkileri	9
1.1.8.e. Karsinojenik etkileri	9
1.1.9. Toluen'in toksik etkilerini arttıran faktörler	9
1.1.10. Toluen'in kötüye kullanımı	10
1.2. Beyin (Telencephalon, Cerebrum)	10
1.2.1. Prefrontal korteks	14
1.2.2. Hipotalamus.....	16
1.2.3. Substantia nigra	17
1.2.4. Entorinal korteks	18
1.2.5. Hippocampus.....	19
1.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar.....	22

1.4. Apoptozis.....	24
1.4.1. Apoptozis düzenleyicileri.....	26
1.4.2. Apoptozis morfolojisi.....	26
1.5. Nekroz	28
1.6. İmmunohistokimya.....	29
1.6.1. İmmunoglobulinlerin yapısı	30
1.6.2. Monoklonal ve Poliklonal Antikorlar.....	30
2. KAYNAK ÖZETLERİ	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	41
3.1. Materyal.....	41
3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	42
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	43
3.2. Yöntem	43
3.2.1. Doku takip işlemleri ve dokuların bloklanması	43
3.2.2. Histopatolojik yöntemler	43
3.2.2.a. Hematoksilen-eozin metodu	44
3.2.2.b. BAX ve Kaspaz-3 için boyama metodu	44
3.2.2.c. Histopatolojik, immunohistokimyasal analiz ve değerlendirme	47
3.2.4. Biyokimyasal yöntemler	48
3.2.4.a. ELISA	49
3.2.4.b. Serum örneklerinde MDA tayini	50
3.2.4.c. Serum örneklerinde nitrik oksit tayini	50
3.2.4.d. Serum örneklerinde GSH tayini	50
3.2.5. İstatistiksel analiz	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	52
4.1. Makroskobik Bulgular.....	52
4.2. Histopatolojik Bulgular	52
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	64
4.4. Biyokimyasal Bulgular.....	71
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR	97
EKLER.....	111

EK 1.....	109
ÖZGEÇMİŞ	110



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
ACB	: Nukleus Accumbens
ATSDR	: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CA	: Cornu Ammonis
CAT	: Katalaz
DA	: Dopamin
dL	: Desilitre
DMH	: Dorsomedial Nükleus
EPA	: Environmental Protection Agency
EPHC	: Environment Protection and Heritage Council
GFAP	: Glial Fibriler Asidik Protein
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
H&E	: Hematoksilen-eosin
HPA	: Health Protection Agency
K	: Potasyum
M	: Molar
MDA	: Malonaldehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mmol	: Milimol
Na	: Sodyum
NANA	: N-Asetilnöraminik Asit
NGF	: Nerve Growth Faktör
NK	: Natural Killer
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
OEHHA	: Office of Environmental Health Hazard Assessment

OSHA	: The Occupational Safety and Health Agency
PFK	: Prefrontal Korteks
PVN	: Paraventriküler Nükleus
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TDI	: Toluen-2,4-diisosiyanat
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
VTA	: Ventral Tegmental Alan



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Toluenin kimyasal yapısı.....	2
Şekil 1.2. İnsanda Toluen metabolizmasının şematik gösterimi.....	6
Şekil 1.3. Prefrontal korteks ve hippokampus iletim yolağı.....	16
Şekil 1.4. Hipotalamus, Substantia nigra ve Dopamine metobolizması.....	18
Şekil 1.5. Beyin yapılarının gösterimi	21
Şekil 1.6. Aşama aşama apoptozis ve morfolojisi	28
Şekil 1.7. Apopitozis ve nekrozun morfolojik farklılığı.....	29
Şekil 3.1. Deney protokolünde kullanılan deneklerin örnek gösterimi	41
Şekil 3.2. Deney hayvanlarından çıkarılan beyin dokusunun örnek gösterimi	42
Şekil 4.1. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının bakılan tüm beyin bölgelerinde ki skorların grafik gösterimi....	52
Şekil 4.2. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyama.....	57
Şekil 4.3. Prefrontal Kortekste ki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi.....	57
Şekil 4.4. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyama.....	58
Şekil 4.5. Entorinal Kortekste ki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi.....	58
Şekil 4.6. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyanma 40X büyütme.....	59
Şekil 4.7. Hipotalamusta ki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi.....	59
Şekil 4.8. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyama.....	60
Şekil 4.9. Hipokampusta ki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi.....	60
Şekil 4.10. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyama.....	61
Şekil 4.11. Substantia nigra daki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı	

histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi	61
Şekil 4.12. Toluen maruziyeninin Kristal Viyoleto boyanmasında senil ve amiloid plakların oluşumu 40X büyütme	63
Şekil 4.13. Toluen maruziyeninin Kristal Viyoleto boyanmasında senil ve amiloid plakların oluşumu 40X büyütme	63
Şekil 4.14. Toluen maruziyeninin Kristal Viyoleto boyanmasında senil ve amiloid plakların oluşumu 40X büyütme	64
Şekil 4.15. Toluen maruziyeninin Kristal Viyoleto boyanmasında senil ve amiloid plakların oluşumu 40X büyütme	64
Şekil 4.16. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	66
Şekil 4.17. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	66
Şekil 4.18. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	67
Şekil 4.19. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	67
Şekil 4.20. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	68
Şekil 4.21. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	69
Şekil 4.22. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	69
Şekil 4.23. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	70
Şekil 4.24. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	70
Şekil 4.25. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi	71
Şekil 4.26. TNF-alpha serum seviyeleri grafiği	73
Şekil 4.27. Dopamin serum seviyeleri grafiği	73
Şekil 4.28. NGF serum seviyeleri grafiği	74

Şekil 4.29. GFAP serum seviyeleri grafiğı	75
Şekil 4.30. Serum sodyum değęrlerinin gösterimi	78
Şekil 4.31. Serum potasyum değęrlerinin gösterimi	78
Şekil 4.32. Serum MDA değęrlerinin gösterimi	79
Şekil 4.33. Serum NO değęrlerinin gösterimi	79
Şekil 4.34. Serum GSH değęrlerinin gösterimi	80



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Bax ve Kaspaz-3 için immün boyama tekniği.....	45
Çizelge 3.2. Hematoksilen-Eozin boyama ile histopatolojik semikantitatif analiz değerlendirme parametreleri	48
Çizelge 3.3. Bax, Kaspaz-3 ve Kristal Violet boyamaları semikantitatif analiz değerlendirme parametreleri	48
Çizelge 4.1. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının bakılan tüm beyin bölgelerinde ki ortalama skorların toplamı ve istatistiki analiz.....	53
Çizelge 4.2. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının prefrontal korteks ve entorinal kortekste ki gösterimi.....	54
Çizelge 4.3. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının hipotalamus ve hipokampusta ki gösterimi	55
Çizelge 4.4. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının substantia nigra'da ki gösterimi	56
Çizelge 4.5. Kristal Violet boyama ile senil plak (amiloid plak) yoğunluk bulguları ..	62
Çizelge 4.6. Bax boyama ile immünreaktivite yoğunluk bulguları	65
Çizelge 4.7. Kaspaz-3 boyama ile immünreaktivite yoğunluk bulguları.....	68
Çizelge 4.8. TNF- α , Dopamine, NGF ve GFAP serum seviyeleri.....	71
Çizelge 4.9. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı biyokimyasal ELISA analizlerinin skorlarının gösterimi	72
Çizelge 4.10. Deney ve kontrol grubu kan serum örneklerindeki Na, K, NO, GSH ve MDA değerleri	76
Çizelge 4.11. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı biyokimyasal Na, K ve antioksidan analizlerinin skorlarının gösterimi.	77

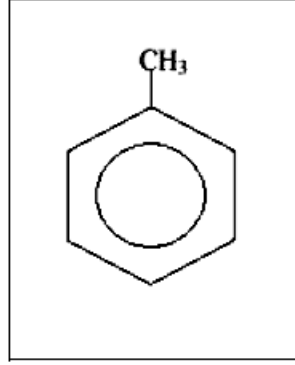
1. GİRİŞ

1.1. Toluen

1.1.1. Toluen'in kimyasal yapısı ve formülü

Toluen berrak, rengi olmayan, keskin ve hoş kokulu uçucu bir sıvı hidrokarbondur (OEHHA 1999, EPA 2005). 4,4°C üzerindeki sıcaklıklarda kolayca tutuşabildiğinden, oda sıcaklıklarında yanma tehlikesi yüksektir. Organik çözücülerle rahatça karışım yapmasına rağmen suda çok zayıf bir şekilde çözünür. Yoğunluğu suyun yoğunluğundan azdır ve bu yüzden de su yüzeyinde kalır (OEHHA 1999; EPA 2005). Temel fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıda belirtilmiştir (HPA 2007) (Şekil 1.1).

Cas no	: 108-88-3
Görünüm	: Berrak, renksiz sıvı
Molekül formülü	: C ₆ H ₅ CH ₃
Molekül ağırlığı	: 92,13 gr/mol
Kaynama noktası	: 111°C (760 mm/Hg)
Donma noktası	: -139°C
Yoğunluk	: 0,861 g/cm ³
Erime sıcaklığı	: -95°C
Buhar basıncı	: 28,1 mm/Hg
Parlama noktası	: 4°C
Spesifik ağırlığı	: 0,87 (su=1)
Gaz yoğunluğu	: 3,2 (hava=1)
Çözünürlük	: Organik solventlerle karışabilir
Koku eşiği	: 0,08-8 ppm
Konversiyon faktörü	: 1 ppm = 3,76 mg/m ³ (25°C)
Koku tanımlaması	: Ekşi ve yanık



Şekil 1.1. Toluenin kimyasal yapısı

1.1.2. Toluenin üretimi ve kullanımı

Toluenin doğadaki kaynakları ham petrol ve Tolu ağacıdır (*Myroxylon peruiferum*) (ATSDR 1994). Ham petrolden benzin ve diğer yakıtların ayrıştırılması ve kok kömürünün yanması sırasında ortaya çıkar (ATSDR 2000; ATSDR 2006).

İnsanoğlunun Toluen'e maruziyeti içme suları, yiyecekler, hava ve çeşitli tüketim ürünleri aracılığıyla olur (ATSDR 1994). Toluen maruziyetinin temel kaynağı benzindir. Benzinin ortalama %5-7 ağırlığını Toluen oluşturur. Toluen'in atmosfere salınması benzinin üretilmesi, taşınması ve yanması sırasında olur. Toluen konsantrasyonunun en fazla olduğu alanlar rafineler, benzin istasyonlarına yakın yerler ve trafiğin yoğun olduğu bölgelerdir. Toprak ve su gibi atmosfer temelli olmayan Toluen doğadaki mevcut Toluen salınımının %1'inden daha azını oluşturur (Faust 1994). Atmosfer kaynaklı Toluen'in yarılanma süresi ortalama 13 saattir ve hidroksil radikaliyle tepkimeye girmesi yoğunluğunda azalmaya neden olur. Toluen petrol ürünlerinden elde edilen atıklarından dolayı bazen içme sularına da karışabilir (ATSDR 2006). Ev ortamındaki Toluen'in kaynağı, hane halkının kullandığı ürünler ve sigaradır. Sigara kullanan bir kişi her bir sigarada 80-100 mikrogram (μg) Toluen'e maruz kalmaktadır. Toluen ihtiva eden kimyasal ürünlerin başında; boyalar, boya incelticiler, pas önleyiciler, gomalak, yapıştırıcılar, vernik, solvent tabanlı temizleyiciler ve bazı temizlik ürünleri gelir. Ayrıca kozmetik ürünlerde de çözücü olarak kullanılır. Sanayi ortamında, daha fazla toksik etkisi olan benzenin yerine Toluen kullanımı giderek

artmaktadır. Bunlara ilaveten, derinin işlenmesi ve bazı kimyasal işlemler sırasında da Toluen kullanılmaktadır. Benzil klorür, fenol, benzoik asit, krezol, TNT, vinil Toluen, Toluen diizosiyanat yapımında da Toluen kullanımı yaygındır (Faust 1994; Jones 1997). Bütün bu bilgiler doğrultusunda birçok insanın iş hayatında Toluen'e maruz kaldığı söylenebilir (OEHHA 1999; ATSDR 2006). Meslek grupları içerisinde en çok ayakkabı işçileri, rafineri ve deri sanayisi çalışanları, benzin istasyonu, matbaacılar, boyacılar, kaportacılar, oto sanayi çalışanları risk altında bulunan ana gruplardır (ATSDR 2006).

1.1.3. Toluenin standartları, kabul edilir sınırları ve letal dozu

Toluen petrol ürünlerinin olduğu her yerde belirli oranlarda bulunur. Toluenin ortamda var olduğunu gösteren en önemli işaret kokusudur. İnsanın havadaki koku eşik değeri 8 ppm olduğu bilinmektedir. Bu oran iş ortamlarında mücadele edilen üst değerin 1/25'i kadardır. Amerikan Çevre Koruma Örgütü (Environmental Protection Agency - EPA) içme sularında litrede 1 mg Toluene izin vermiştir (ATSDR 2000). Avrupa İş Sağlığı ve Güvenliği Ajansı (The Occupational Safety and Health Administration - OSHA) iş ortamlarında 8 saatlik çalışma için 200 ppm'e kadar izin vermiştir. Üst sınır olarak 300 ppm'e mücadele edilmiştir (OEHHA 1999; ATSDR 2000). EPA içme sularından Toluen maruziyetinde 1 gün için 20 ppm, 10 günden fazlası için ise 3 ppm den fazlasına maruz kalınmamasını önermektedir (EPA 2005). Havadaki Toluen miktarı, sanayi ve endüstri alanlarına yakın olmayan şehir merkezi ve yakın çevresinde 1 ppm'in altında bir değere sahiptir. Sigara içmeyen ve Toluen içeren ürünlerle ilgili bir işte çalışmayanların bile günde yaklaşık 300 µg Toluene maruz kaldıkları tahmin edilmektedir. Günde bir paket sigara tüketenler bu değere ilave olarak yaklaşık 1000 µg Toluene maruz kalırlar. Çalışma ortamında 50 ppm oranında Toluen bulunan bir iş yerinde çalışanlar ise yaklaşık olarak günde 1000 mg Toluene maruz kalırlar (ATSDR 1994).

Toluen maruziyetinin 10.000 ile 30.000 ppm arasındaki değerleri insanlarda koma ve ölümle sonuçlanır (Faust 1994). Yapılan hayvan deneylerinde Toluenin ortalama letal dozu (LD50) rat, fare, tavşan ve kobaylarda farklı oranlarda belirlenmiştir. Sıçanlarda, oral LD50 (günlük 3-5 saat için) değeri 2600-7530 mg/kg arasında değişmektedir. Deri

ile alınımında ise bu doz 1,5 ile 5 kat oranında artmaktadır. Solunum yoluyla alınması durumunda ise letal konsantrasyon değeri (LC50); 20,299- 153,200 mg/m³ (5.300-40.000 ppm) arasında bir değere sahiptir. Bu konsantrasyon değerlerinin farklılığı maruz kalma zamanı ve tür farklılığından kaynaklanır (OEHHA 1999).

1.1.4. Toluenin vücuda alınımı

Toluenin vücut içine en çok alınma şekli havada bulunan Toluen buharının solunum yoluyla alınmasıdır. Bunun dışında sindirim ve deri yoluyla da Toluen vücuda alınabilir (Uzun vd 2001). İnsanlarda Toluen, solunum yoluyla alındıktan 10 saniye sonra arter kanında tespit edilmiştir (Faust 1994). Toluen solunum yoluyla alındığında, 15 ile 30 dakikalık bir süre içinde, sindirim yoluyla alındığında ise 1-3 saat gibi bir süre içerisinde kanda en yüksek seviyesine ulaşır. Sindirim yoluyla alınan Toluen, solunum yolu ile vücuda alınan Toluene nazaran daha yavaş bir şekilde absorbe edilir, ancak solunum yoluyla alındığında Toluenin yaklaşık yarısı absorbe olurken sindirimle alınması durumunda ise tamamına yakını absorbe olur. Vücut dinlenme durumunda iken alınan Toluenin yaklaşık %50'si akciğerler tarafından absorbe edilir (Uzun vd 2001). Toluenin deri yoluyla absorpsiyonu akciğerle olan absorpsiyonun yaklaşık olarak %1'i kadardır. Bununla birlikte sıvı haldeki Toluenin deriyle teması halinde absorpsiyon miktarı da artar (Faust 1994).

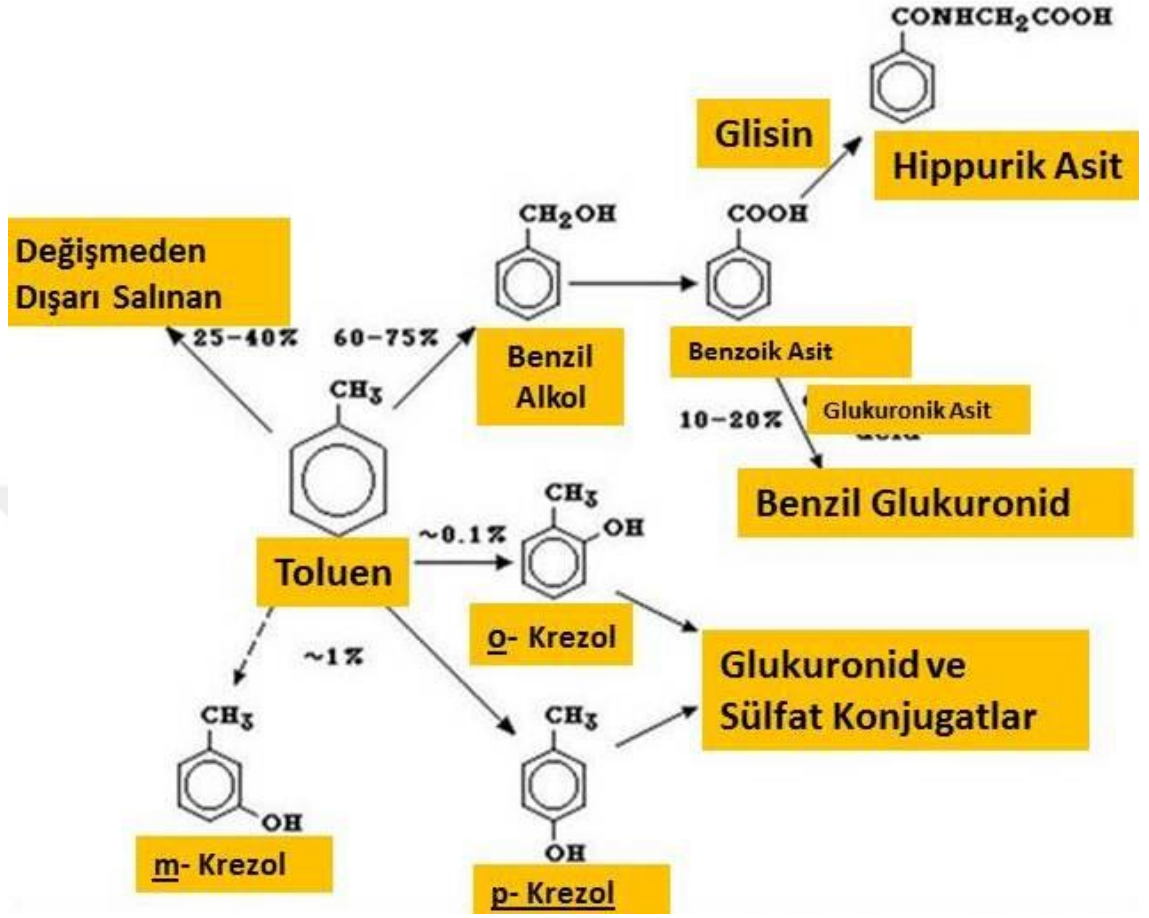
1.1.5. Toluenin vücutta dağılımı

Toluen suda çok az çözünebilen aromatik bir hidrokarbondur. Toluen absorpsiyonundan sonra tüm vücuda dağılmaktadır. Fakat yağ ve yağdan zengin dokular ile kanlanma miktarı fazla olan dokularda bu dağılım daha fazla ve hızlı gelişmektedir (Faust 1994; OEHHA 1999; ATSDR 2006). Absorbe edilen Toluen, sırasıyla azalan oranlarda yağ dokusu, mide, karaciğer, böbrekler, kemik iliği, beyin ve dalakta tespit edilebilir. Toluen alındıktan 5 saat sonra beyaz yağ dokusunda en üst seviyesine ulaşır ki, bu seviye aynı zamanda kandaki oranın yaklaşık 250 katıdır. Tutkal soluyarak ölen kişilerin karaciğer ve beyinde yüksek oranda Toluene rastlanmıştır. Yine sindirim

yoluyla Toluen aldıktan kısa bir süre sonra ölen kişilerin karaciğerinde yüksek oranda Toluen bulunmuştur . Aynı yoğunlukta Toluene maruz kalan egzersiz yapan kişilerin deri altı yağ dokularında dinlenme halindeki kişilere oranla 10 kat daha fazla Toluen birikir. Kilolu insanlarda yağ dokusu fazla olduğundan Toluen birikimi, kilosu düşük kişilere nazaran 5 kat daha fazladır (Faust 1994; OEHHA 1999).

1.1.6. Toluenin vücuttaki metabolizması

Büyük bir kısmı karaciğerde metabolize edilen Toluen, ilk önce karaciğerde bulunan sitokrom P-450 enzimi yardımı ile yan zincir hidroksilasyonu ile benzil alkole dönüştürülür. Daha sonra da alkol dehidrogenaz enzimiyle benzaldehide ve aldehit dehidrogenaz enzimi tarafından da benzoik aside dönüştürülür. Benzoik asit glisinle birleşerek, Toluenin idrardaki nihai ve başlıca metaboliti olan hippürik aside dönüşür (Faust 1994; ATSDR 2000). Buna ek olarak küçük bir miktar benzoik asit glisin yerine glukronik asit ile konjuge olarak benzoil glukronid olarak atılır. Toluen %1'den daha az bir oranda da orto krezol ya da para krezol formlarına hidroksillenip, glukronid ya da sülfat ile birleşerek, minor metabolik yolak olarak adlandırılan yol ile idrara gönderilir (Dossing *et al.* 1983a) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. İnsanda Toluen metabolizmasının şematik gösterimi

1.1.7. Toluen'in vücuttan atılması

Vücuda alınan Toluen'in ortalama %18'i akciğerlerden serbest Toluen olarak dış ortam havasına, %2'lik kısmı ise Toluen metabolitleri halinde safra ile atılır. Yaklaşık %80'i ise sitokrom P-450 oksidaz enzim sistemi yardımıyla iki ana metabolit halinde idrarla atılır (Güçlü 2004). Birincil metaboliti hippürik asit olan Toluenin ikincil metaboliti ise Orto Krezol'dür. Burada karışıklıklara meydan verilmemesi için, Orto Krezol'ün sigara içen insanların idrarında da tespit edilebileceği bilinmesi gereken bir konudur (Güçlü 2004). Hippürik asidin atılması, Toluenin vücuda alınımından yaklaşık 24 saat sonra tamamlanır (Faust 1994).

1.1.8. Toluen'in toksik etkileri ve klinik belirtileri

Toluene maruziyetin oluşturduğu klinik tablo madde miktarı ve süreyle ilişkili olarak değişir. Toluenin bağımlılığına sebep olan keyif verici etkisinin yanısıra, uzun süreli ve orta düzeyde Toluene maruz kalındığında baş ağrısı, konfüzyon, yorgunluk, hafıza zayıflığı, halsizlik, dengesiz hareketler, mide bulantısı ve iştahsızlık görülebilir. Çok kısa sürede yüksek miktarda Toluene maruz kalınması durumunda baş dönmesi hissedilir. Maruziyet süresi uzarsa, sersemlik, uyuklama hissi ve hatta ölüm meydana gelebilir. Toluenin düzenli aralıklarla inhalasyonu, kalıcı beyin hasarı oluşturabilir. Aynı zamanda konuşma, duyma, görme ve işitme problemleriyle birlikte kas hareketlerinde kontrol kaybı ve mental kabiliyette azalma meydana gelebilir (OEHHA 1999; ATSDR 1994, 2006). Kronik maruziyetin sonucu olarak karaciğer, böbrek ve sinir sisteminde hasar oluşabileceği gibi deride de kontak dermatit meydana gelebilir (HPA 2007). Uçucu madde kullanımına bağlı gelişen ani ölüm nedenleri araştırıldığında, otopsi sonuçlarında ani ölümü açıklayacak herhangi bir anatomik bozukluk saptanamamıştır. Bu nedenle ölümlerin ventrikül kökenli ritim bozukluklarına bağlı geliştiği düşünülmüştür (Vural ve Ögel 2005).

1.1.8.a. Karaciğer üzerine toksik etkileri

Toluenin karaciğer üzerine toksik etkilerini gösterir birçok çalışma bulunmaktadır. Toluen içeren maddelere maruziyet sonrasında olumsuz yönde değişen karaciğer fonksiyon testlerinin yanı sıra (Sotaniemi *et al.* 1982; Tomei *et al.* 1999; Bae and Yoon 2001), antioksidan enzimlerde azalma (Ulakoğlu vd 1998), karaciğerde büyüme, hepatik parankimde ekojenite artışı tespit edilmiş, makroveziküler ve mikroveziküler dejenerasyonun yanı sıra hepatosit nekrozu ve balon dejenerasyonu gözlenmiştir (Park *et al.* 2003). Toluen karaciğerde yıkıldığı için karaciğer hastalığı olan kişiler Toluene karşı daha duyarlıdır. Özellikle salisilat ve alkol gibi maddeler Toluen metabolizmasını kompetitif olarak inhibe ettiklerinden dolayı alkol ya da karaciğerde metabolize olan ilaçları kullanan kişiler Toluen'den daha fazla zarar görürler. Yine yüksek miktarda Toluene maruz kalan madde bağımlılarında, şiddetli karaciğer hasarı

olduğunu gösterir çalışmalar mevcuttur. Organik solventlere düşük dozda ve kronik maruziyetin siroza yol açabileceğini gösterir çalışmalar da bulunmaktadır (OEHHA 1999; ATSDR 2006).

1.1.8.b. Sinir sistemi üzerine toksik etkileri

Toluen lipofilik özelliğinden dolayı hücre duvarındaki lipit yapısını değiştirir ve proteinlerle etkileşime girer. Akut dozlarda Na/K-ATPaz aktivitesini önemli oranda artırarak membran akışkanlığını artırır (Calderon-Guzman *et al.* 2005a). Oluşturduğu bozuklukların oranıyla doz cevap ilişkisi tam olarak belirlenememiştir. Toluene maruz kalan insan ve hayvanlarda ilk etki santral sinir sistemi depresyonudur. Yüksek konsantrasyonlarda diğer uçucu maddelerle benzer olarak psikomotor hasarlanma, lokomotor aktivitelerde eksitasyon ve daha sonrada inhibisyon, ayakta durma refleksinin kaybolması ve sedasyon gibi etkileri vardır (Uzun *et al.* 2001; Baydas *et al.* 2003; Coskun *et al.* 2006). Toluen bu etkileri gabaerjik, glutamaterjik, serotonerjik, dopaminerjik yolları etkileyerek yapar (Balster 1998; Bowen *et al.* 2005). Toluen, serebellum ve hippokampus'da apoptotik nörodejenerasyona yol açar (Ladefoged *et al.* 2004). Ayrıca serebellar, piramidal bozukluklar, periferik nöropati, optik atrofi, sinirsel işitme kaybı, bilişsel fonksiyonları da içeren geçici ve kalıcı hasarlara da yol açar (Uzun *et al.* 2001; Coskun *et al.* 2006). Kronik Toluen bağımlılarının MRI görüntülemelerinde beyaz cevher atrofi ve bununla ilişkili olarak klinik bulgular vardır (EPHC 2003). Ayrıca Toluen periferik sinirlerde de hasara yol açar (Coskun *et al.* 2005, 2006).

1.1.8.c. Göz ve deri üzerine toksik etkileri

Toluen yağda çözünabilir olduğundan, deride irritasyona ve hasara sebep olabilir. Toluen bazlı maddelere maruz kalan insanlarda bu hasarlar görülür. 750 mg/m³ ve üzeri konsantrasyonda Toluene maruz kalan insanlarda gözde irritasyon oluşurken, 1500 mg/m³ ve üzeri bir oranda ise lakrimasyona sebep olur. Direk kornea ile temas ettiğinde ise korneada hasar meydana gelir (HPA 2007).

1.1.8.d. Teratojenik etkileri

Toluen bağımlısı annelerin değerlendirilmesiyle Toluen embriyo-patolojisi literatürde tanımlanmıştır. Toluen bağımlısı annelerin çocuklarında; embriyolojik dönemde intrauterin gelişme geriliği, mikrosefalik ve dismorfik özellikler (kısa palpebral yarık, derin yerleşimli göz, küçük yüz, düşük kulak, mikrognati, spatula şeklinde parmaklar ve kısa tırnak) tespit edilmiştir. Yaşla birlikte; gelişme geriliği, konuşma problemi ve serebellar disfonksiyon gibi gelişimsel gerilikler görülür (Jones 1997). Prenatal Toluen maruziyetini gösteren birçok hayvansal çalışma yapılmıştır. Bunların birçoğunda gelişme geriliği ve iskelet anormallikleri saptanmıştır (Bowen *et al.* 2005).

1.1.8.e. Karsinojenik etkileri

Toluene maruz kalmış insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda Toluenin kansere neden olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (The International Agency for Research on Cancer-IARC) ve Amerika Birleşik Devletleri Halk Sağlığı Merkezi (U.S. Department of Health and Human Services-DHHS) Tolueni kanserojenik maddeler arasında saymamaktadır. Ayrıca Toluenin karsinojenik etkilerini değerlendirecek yeterli çalışma bulunmamaktadır (IARC 1985).

1.1.9. Toluen'in toksik etkilerini arttıran faktörler

Toluen karaciğerde metabolize edildiği için karaciğer hastalığı olan kişiler Toluen'in akut etkilerine daha duyarlıdır. Daha önceden nörolojik ve kalp rahatsızlığı olanlarda daha fazla risk altındadırlar. Salisilat ve alkol, kompetitif olarak Toluenin yıkımını durdurdıkları için Toluenin toksik etkilerini artırır (OEHHA 1999).

1.1.10. Toluen'in kötüye kullanımı

Atmosferde belli bir oranda Toluen'in bulunması herkesin Toluene maruz kaldığının bir

göstergesi olmakla birlikte, mesleği gereği bu toksik maddeye daha yoğun bir şekilde maruz kalanların sayısı azımsanmayacak kadar çoktur. Bunla birlikte kötüye kullanım da Toluen'in yeri oldukça önemlidir. Toluen ve benzeri uçucuların kötüye kullanımı Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerin yanı sıra daha az gelişmiş ülkelerde de önemli bir problemdir (Balster 1998; Beyer *et al.* 2001). Uçucu madde bağımlılığı en çok 14-15 yaşları arasındaki çocuklarda görülür. 17-19 yaş düzeylerinde bazıları bağımlılıktan kurtuldukları için bu yaşlarda bağımlılık oranı düşer. İngiltere'de 15 yaşına ulaşmış çocukların %3-5 kadarının hayatının herhangi bir döneminde uçucu madde kokladığı belirlenmiş ve bu yaş grubundaki 250 çocuktan bir tanesinin yapıştırıcı madde bağımlılığı nedeniyle ülke genelinde çeşitli ihtisas hastanelerinde tedavi gördüğü anlaşılmıştır (Vural and Ögel 2005). Bazı kullanıcıların erişkin dönemlerinde de uçucu madde kullanmaya devam ettikleri görülmüştür (CPS 1998). Toluen bağımlılarında paranoid psikoz, parkinsonizm, bilişsel bozukluklar (kognitif hasarlanma) ve serebellar bozukluklar gibi nörolojik ve psikiyatrik birçok rahatsızlıklar ortaya çıkar (Jones 1997).

Yapılan araştırmalar uçucu madde bağımlılarının %90 oranında Toluen, %5 oranında klorlu hidrokarbonlar, %3 oranında bütan ve %2 oranında diğer uçucu maddeleri kullandıklarını göstermiştir (Uzun *et al.* 2001). Ucuz ve kolay bulunabilir olduğundan dolayı Toluen bağımlılarının tercihi sıklıkla tutkal (Park *et al.* 2003) ve tinerdir (Zengin Ulakoğlu *et al.* 1998). İstem dışı maruziyet ise iş dolayısıyla olmaktadır ki en fazla kaporta işçileri, boyacılar (Tsatsakis *et al.* 1997), ayakkabı işçileri (Dossing *et al.* 1983b; Tomei *et al.* 1999), matbaa işçilerinde (Guzelian *et al.* 1988) görülür.

1.2. Beyin (Telencephalon, Cerebrum)

Beyin, düşünme ve hafıza gibi fonksiyonların yanısıra çevresel uyarıları almak ve bunları değerlendirmek, motor aktivite sağlamak, somatik ve endokrin fonksiyonlar ve organların düzenli çalışmasını kontrol etme gibi görevleri yerine getirmektedir (Arıncı ve Elhan 2001).

Beyin; Telensefalon, Diensefalon, Mezensefalon, Pons, Bulbus (medulla oblongata),

Serebellum bölümlerinden oluşmaktadır (James 1995; Arıncı ve Elhan 2001; Taner 2002; Gökmen 2003).

Telensefalon; iki hemisferden meydana gelmektedir ve beynin hacimsel olarak en geniş kısmını oluşturur. Fissura longitudinalis cerebri ile cerebral hemisferler birbirinden, fissura transversa cerebri ile de cerebellumdan ayrılmaktayken orta hattan corpus callosum ile bağlanmaktadır. Cerebral hemisferde cerebral cortex adı verilen milyarlarca aktif nöron içeren substantia grisea, nöron uzantılarının bulunduğu substantia alba ve substantia alba'ya yerleşmiş olan bazal ganglionlardan oluşmaktadır (Kurt 2003). Cerebral hemisferlerin yüzeyinde ki çıkıntılı kıvrımlara gyrus ve bunların arasındaki yarıklara sulcus denir. Bu yarıklara göre hemisferleri frontal, parietal, occipital, temporal, insular ve limbik lob olarak isimlendirilen bölümlere ayrılmaktadır (Taner 2002).

Diensefalon; beyin hemisferleri tarafından sarılmıştır ve epitalamus, metatalamus, hipotalamus, talamus ve subthalmus adında beş ayrı bölümden meydana gelmektedir (Dere 2000). Diensefalonun üstünün arkasında ve talamusun arka-üst tarafında bulunan kısmı olan epitalamus trigonum habenulae, glandula pinealis, commissura posterior ve stria medullaris thalami'den oluşmaktadır (Taner 2002). Talamus; birçok nukleus bulunduran ve diensefalonun en büyük kısmını oluşturmaktadır. Koku duyusu impulsları dışında bütün duyu impulslarının cortex'e gitmeden önce toplandığı önemli bir merkezdir (Arıncı ve Elhan 2001). Diensefalonun ventralinde hipotalamus yer almaktadır (Arı 2003). Otonom sinir sistemi ile endokrin sistemi kontrol ederek entegrasyonunu sağlamaktadır (Arıncı ve Elhan 2001). Mezensefalon'un tegmentumu ile talamus arasında uzanan geçiş bölgesi subthalmus olarak isimlendirilmektedir (Taner 2002). Motor yolların ara istasyonu olup ekstrapiramidal sistemde görev yapmaktadır. Talamus'un arka tarafında bulunan corpus geniculatum medial ve corpus geniculatum lateralenin oluşturduğu alana metatalamus denilmektedir. Corpus geniculatum mediale işitme, corpus geniculatum laterale de görme ile ilgili impuls ileten lifler taşımaktadır (Arıncı ve Elhan 2001).

Mezensefalon; beynin en küçük parçası olan mezensefalon pons ile diensefalon

arasında yer almaktadır. Üçüncü ve dördüncü ventrikülleri birbirine bağlayan aquaeductus cerebri mezensefalon'un ortasından geçmektedir (Arı 2003). Mesencephalon'un ventralinde sağda ve solda pedunculus cerebri yerleşmiştir (Taner 2002). Mezensefalonda dopaminerjik nöronlara sahip olan **substantia nigra** olarak isimlendirilen gri cevher kitlesi mezensefalonun transvers kesitlerinde görülmektedir. Efferent lifler içeren crus cerebri'ler ve tegmentum mesencephali diğer kısımlarını oluşturmaktadır. Tegmentum mesencephali talamusa giden çeşitli afferent lifleri ve III., IV. ve V. kranial sinirlerin nukleusları ile nucleus ruber'i içermektedir (Arı 2003). Mezensefalonun arka tarafında dört tane yuvarlak çıkıntıdan superiorda bulunanlarına colliculus superior, inferiordankilere ise colliculus inferior denir. Colliculus superiorlar daha büyüktür ve görme refleksi merkezi, colliculus inferiorlar ise daha küçük olup işitme refleksi merkezlerini oluşturmaktadırlar (Arıncı ve Elhan 2001; Arı 2003).

Pons; medulla oblongata ve mezensefalon arasında kalan kısımda yer almaktadır. Pons, V, VI, VII, VIII. kranial sinirlerin çekirdekleri, formatio reticularis'in bir bölümünü ve inen-çıkan yolları içeren tegmentum pontisten oluşan bir alan ve nuclei pontis, fibrae pontis transversae ve fibrae pontis longitudinales'i içeren pars basilaris pontisten oluşan iki bölümden meydana gelmektedir (Taner 2002).

Medulla Oblongata; beyin sapının en alt kısmında olup, medulla spinalis ve pons arasında yer almaktadır (Taner 2002). Medulla oblongata'nın ventral yüzeyinde corticospinal yolları içeren pyramis, nucleus olivaris inferior'u içeren oliva ile IX., X., XI. ve XII. kranial sinirler bulunur. Dorsal yüzeyinde ise tuberculum gracile, tuberculum cuneatum ve fossa rhomboidea bulunmaktadır (James 1995).

Serebellum; fossa cranii posterior'da, pons ve medulla oblongata'nın superior-posterior kısmında bulunur. Cerebellum beynin ikinci büyük kısmıdır. Pons ve medulla oblongata ile birlikte 4. ventrikül'ü çevreler. Lobus occipitalis ile aralarında tentorium cerebelli bulunur. Hemisferium cerebelli denen iki tane yan lob ile bunları ortada birbirlerine bağlayan vermis cerebelli'den oluşur. Cerebellum, isteğimiz dışında iskelet kaslarının tonusunu kontrol ve sinerjik hareketlerini koordine eder. Böylece kasların işbirliği

içinde çalışmasını sağlayarak dengenin korunmasında önemli bir rol oynar (Arıncı ve Elhan 2001).

Merkezi sinir sisteminde substantia griseada çoğunlukla nöron gövdeleri, substantia albada aksonlar yer almaktadır. Aksonlar miyelin kılıfı nedeniyle substantia alba açık renkli görülmektedir. Serebral hemisferler öğrenme bellek, bilginin analizi, motor yanıtların başlatılması ve duyuşsal impulsların entegrasyonunu oluşturmaktadır. Nöronların yoğun yayılım gösterdiği yüzeyel bölgesi serebral korteks olarak isimlendirilmektedir. Serebral kortekste farklı tabakalarda yerleşik beş morfolojik nöron tipi vardır. Serebral kortekste ki nöron tipleri şunlardır;

- a-** Piramidal nöronlar; hücre gövdeleri piramidal şekillidir, apeksleri korteks yüzeyine doğrudur. Hücrenin tabanından çıkan akson alttaki beyaz cevhere doğru ilerler ve derin tabakalarında sinaps yapar. Apekten ayrılan dendrit yüzeye doğru ilerler ve orada ince dallara ayrılır. Ayrıca hücre tabanının köşelerinden çıkan ve lateral olarak uzanan kısa dendritleri de bulunmaktadır. Piramidal nöronların büyüklükleri değişkendir. Motor kortekste ki Betz hücreleri olarak isimlendirilen nöronlar kortekste ki en büyük çaplı piramidal hücrelerdir (Taner 2002; Young *et al.* 2007; Gartner and Hiatt 2007).
- b-** Stellat (granüler) nöronlar; kısa bir aksonu ve kısa, dallanan dendritleri nedeniyle yıldız şeklinde görünen küçük nöronlardır. Rutin histolojik metotlarla küçük granüller şeklinde görülebilmesi nedeniyle granüler nöron olarak da isimlendirilmektedir (Taner 2002; Young *et al.* 2007; Gartner and Hiatt 2007).
- c-** Martinotti nöronları; birkaç kısa dendriti bulunan küçük poligonal şekilli nöronlardır. Aksonu yüzeye doğru uzanır ve korteksin en üst tabakasında horizontal olarak ikiye ayrılır (Taner 2002; Young *et al.* 2007; Gartner and Hiatt 2007).
- d-** Fuziform nöronlar; iğ şeklindeki nöronlardır. Aksonu yüzeye doğru ilerler, dendritleri derin tabakalara doğru dallanarak ilerler (Taner 2002; Young *et al.* 2007; Gartner and Hiatt 2007).
- e-** Cajal'ın horizontal nöronları; küçük ve iğ şekilli hücrelerdir, yüzeye paralel olarak uzanırlar. Kortekste en az görülen hücrelerdir ve sadece en yüzeyel tabakada bulunurlar. Aksonu piramidal nöronların dendritleri ile sinaps yapar (Young *et al.* 2007; Gartner

and Hiatt 2007).

1.2.1. Prefrontal korteks

Gelişimin erken evrelerinde meydana gelen olumsuz koşulların, nöronal işlevlerde ve adaptif yanıtların oluşturulmasında bozukluklara sebep olduğuna işaret edilmektedir. Bu çalışmaların çoğunluğu, erişkin dönemdeki nöroenezisi, sinaptik plastisite kapasitesi çok yüksek olan, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında kritik rol oynayan hippokampusta incelenmeye çalışılmıştır (Charil *et al.* 2010). Halbuki beynin yürütücü ya da yönetsel işlevlerinden sorumlu bölümü kortekstir. Korteksin yaklaşık %30'unu, prefrontal korteks (PFK) oluşturmaktadır. PFK'de olfaktor bölümler ile ortak kökenden gelen basoventral kısımlar ve corpus callosumdan başlayıp medial frontal lob çevresine yayılan mediodorsal kısımlar filogenetik açıdan oluşan iki farklı bölgedir (Yeterian and Pandya 1991; Ray and Zald 2012). PFK'deki nöron öncül hücreleri, diğer kortikal hücreler gibi, embriyonun erken evresinde oluşur ve postnatal evrelerde ve hatta yetişkin dönemde bile gelişimlerini sürdürebilmektedirler. Yaşamın erken evresinde gereğinden daha çok nöron ve nöronal bağlantı görülmektedir. Bunlar, nöral aktivite sayesinde yeniden şekillendirilebilmektedir. Çocukluk evresinde sinaps sayısı ile orantılı bir şekilde dendrit üzerindeki çıkıntıların konsantrasyonu erişkin evreye oranla 2 veya 3 kat fazla olmaktadır (Kolb *et al.* 2012). PFK'deki bu çıkıntılar ergenlik ve genç erişkinlik evrelerine kadar aşırı miktarda üretilmeye ve eş zamanlı bir şekilde ortadan kaldırılmaya devam etmektedir (Petanjek *et al.* 2011).

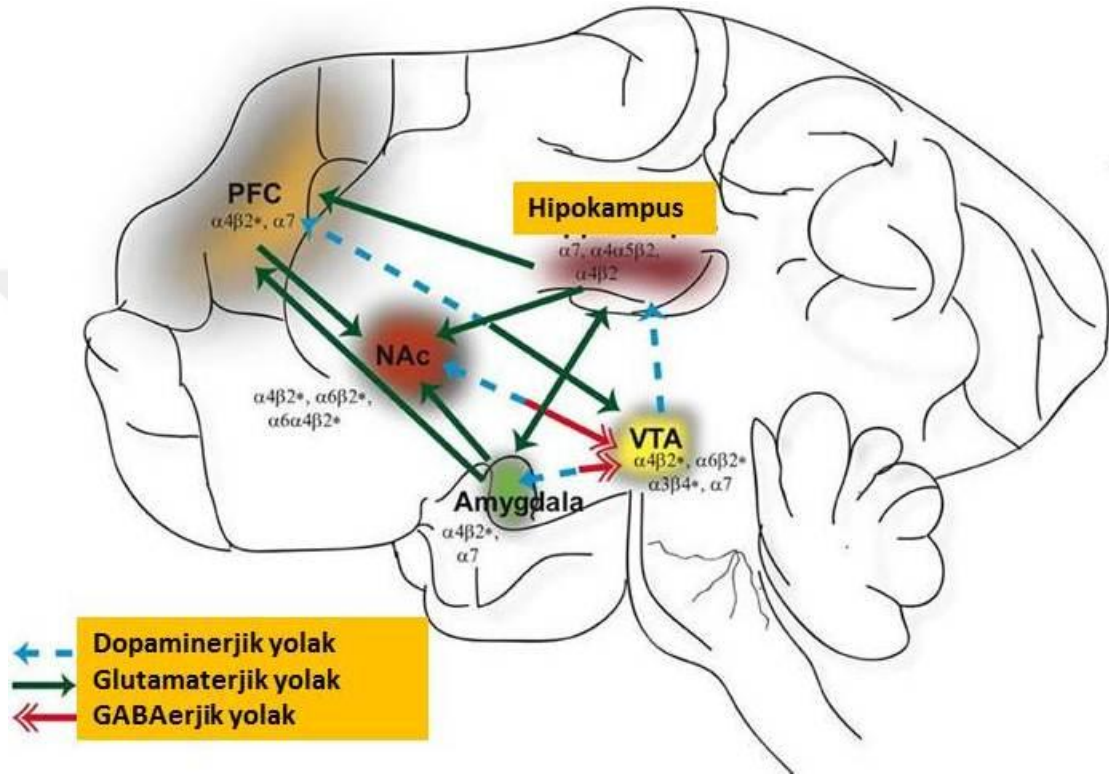
Bebeklik ve çocukluk çağlarında PFK'deki temel nöral devrelerin oluşumu büyük oranda tamamlanmakta ve nihai bilişsel işlevler oluşmaya başlamaktadır (Tsujimoto 2008). PFK'deki sinaptik bağlantıların stabilizasyonu, beynin diğer kortikal bölgelerinin aksine daha geç dönemlerde görülmektedir. Buda yaşamın erken evrelerinde PFK üzerindeki etkileri, yaşam boyu devam edecek davranış yansımalarına neden olabilmektedir. PFK, frontal lobların anteriorunda bulunan ve bir çok kortikal alanın işlevsel olarak birleşmesiyle meydana gelmiştir (Yeterian *et al.* 2012). PFK medial, lateral ve ventral olmak üzere üç bölümde incelenmektedir. Medial PFK; precentral,

anterior cingulate, prelimbik, infralimbik ve medial orbital korteks kısımlarından oluşmaktadır. Limbic sistemden gelen uyarıları baskılamaktadır. Lateral PFK; dorsal ve ventral agranular insular ile lateral orbital alanlardan oluşmaktadır. Bu kısım sürdürülebilir dikkat, biliş ve eylem üreten bölgeler ile yoğun bir şekilde bağlantılıdır. Ventral PFK; ventral orbital ile ventral lateral orbital alanlardan oluşmaktadır ve duyular ile ilgili girdileri almaktadır (Usami *et al.* 2011; Uylings *et al.* 2003). Yapılan spesifik boyama teknikleri sayesinde PFK'in ventral kısımlarının görmenin, somatik duyuların ve işitmenin assosiasyon alanları ve premotor alanlar ile, medial kısımlarının görmenin, somatik duyuların, işitmenin assosiasyon alanları, temporal lob medial kısımları, talamus ve limbik alanlar ile karşılıklı lif alışverişinde bulunduğu gösterilmiştir (Miller and Cohen 2001; Hoover and Vertes 2007; Yeterian *et al.* 2012; Thiebaut de Schotten *et al.* 2012).

PFK'in medial bölümleri neostriatum'a, temporal neokortikal alanlara ve hipotalamusa göndermiş olduğu efferentleri aracılığıyla; motor davranışları, vücudun duyusal, nörokimyasal ve hormonal dengesini etkileyebildiği izlenmiştir (Heidbreder and Groenwegen 2003). PFK en önemli girdilerini talamusta bulunan nukleus mediodorsalisden aldığı bilinmektedir (Uylings *et al.* 2003; Kolb *et al.* 2012). PFK kompleks bilişsel ve sosyal davranışları oluşturabilmek için; beynin diğer alanlarından gelen verileri toplamakta, denetlemekte, yargılamakta, bütünleştirmekte, gerekli değişiklik, düzenleme ve sıralamaları yaptıktan sonra, ortaya çıkarılacak davranışa karar verdiği bilinmektedir. Prefrontal kortekste ki piramidal nöronlar bazal ganglionlara projeksiyon lifleri gönderirken, ipsilateral ve kontralateral kortikal bağlantılardan da sorumludurlar (Petanjek *et al.* 2008).

Stresli ortamlar gibi davranış değişikliği gerektiren uyarılar karşısında, ventral tegmental bölgeden PFK'ye uzanan dopaminerjik nöronların aktive olduğu bu bölgeden asetilkolin salınımı olduğu da gösterilmiştir (Laplane *et al.* 2004; Del Arco *et al.* 2007). PFK gelişimi altı aşamada oluşmaktadır. Birinci ve ikinci aşamada nörogenezis ile ilgili gelişmeler prenatal döneme karşılık gelirken; üçüncü aşamadan itibaren gelişim postnatal dönemde devam etmektedir. Doğumdan sonraki ilk yıl içinde gerçekleşen bu

dönemde, piramidal nöronların dendritik uzantıları büyüyerek olgunlaşmakta, sonuncu aşama ise; yetişkin dönemin sonunda gerçekleşmekte ve erişkindekine benzer yapısal organizasyon bu dönemde kazanılmaktadır (Donkelaar *et al.* 2006) (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Prefrontal korteks ve hipokampus iletim yolağı (Anonim 2016a)

1.2.2. Hipotalamus

Hipotalamus limbik sistemin subkortikal yapıları tarafından çevrelenmiştir. Bu yapılar: septum, paraolfaktör bölge, epitalamus, talamusun ön nükleusları, bazal gangliyanın bir kısmı ve amigdaladır. Hipotalamusun limbik sistemin tüm seviyeleriyle bağlantısı vardır. Hipotalamus beyin kitlesinin %1'inden daha azını içermesine rağmen limbik sistemin tüm motor çıkış yollarından en önemlisidir. Vejetatif, nöroendokrin fonksiyonlarının yanında, duyuşal durumun düzenlenmesinde de rol alır. Hipotalamus ön ve arka olmak üzere iki bölgeye ayrılır. Anterior bölümde paraventriküler nükleus (PVN), medial preoptik bölge, supraoptik nükleus, infundibulum, posterior preoptik ve anterior hipotalamik bölge bulunur. Posterior bölgede, PH, dorsomedial nükleus

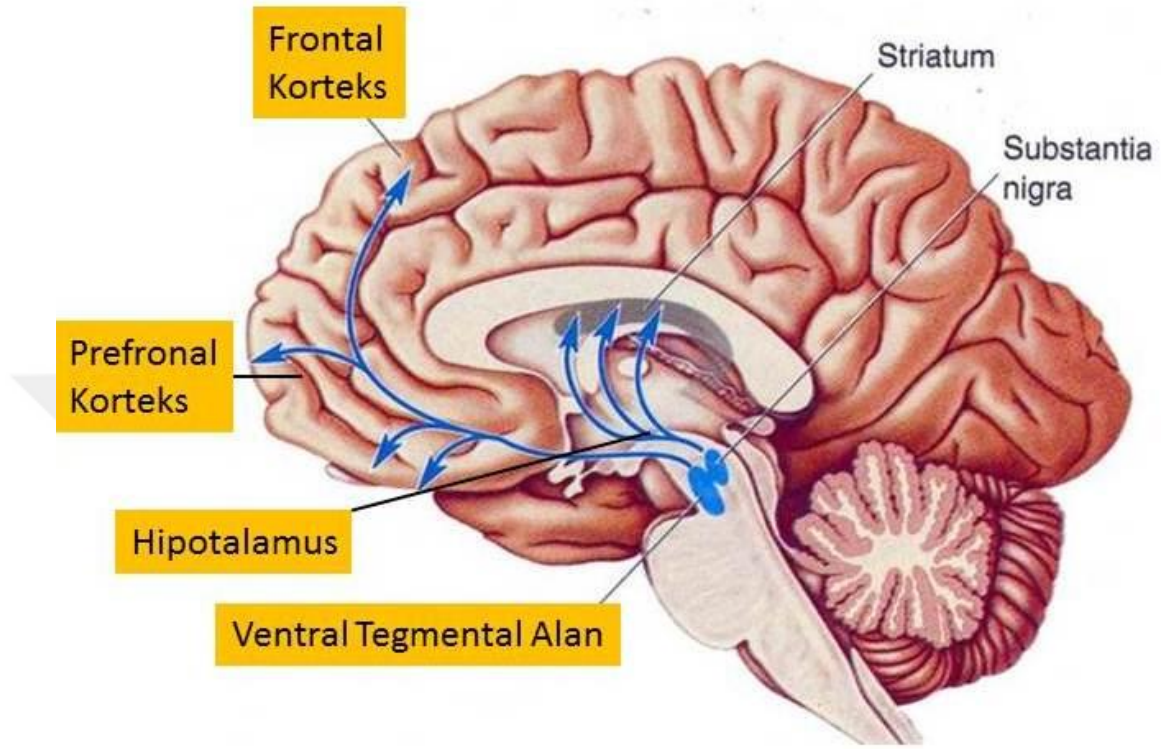
(DMH), perifornikal nükleus, ventromedial nükleus, mamillar cisim, arkuat nükleus, periventriküler alan ve lateral hipotalamik bölge yer alır. Hipotalamusun İşlevleri: 1- Kardiyovasküler düzenleme: Genellikle posterior ve lateral hipotalamusun uyarılmasıyla kalp hızı artar, kan basıncı yükselir. Preoptik çekirdeğin uyarılması kalp hızı ve kan basıncını düşürür. 2- Anterior hipotalamus, özellikle preoptik nükleus aracılığıyla vücut ısısının; lateral hipotalamusa yerleşmiş susama merkezi ve suyun renal yoldan atılımını kontrol eden supraoptik nükleus aracılığıyla vücut suyunun düzenlenmesi gerçekleştirilir. 3- Paraventriküler nöronlar ile uterus kasılmasının ve süt salınımının düzenlenmesi. 4- Lateral hipotalamusda bulunan açlık merkezi ve ventromedial nükleuste yerleşmiş bulunan doyma merkeziyle gastrointestinal ve beslenme fonksiyonlarının düzenlenmesi. 5- Ön hipofiz bezinin fonksiyonlarının düzenlenmesi (Olmos Jose 2004) (Şekil 1.4 ve 1.5).

1.2.3. Substantia nigra

Substantia nigra; mezensefalon'da crus cerebri ile tegmentum arasında yer alır ve kendisini oluşturan nöronlarda bulunan melanin pigmenti nedeniyle çevresindeki yapılara göre daha koyu renkte görülür. Mezensefalon'un tüm kesitlerinde yarım ay şeklinde görülür. Ventral yerleşimli, daha açık renkli, sitolojik olarak globus pallidus'a benzeyen bölümüne pars reticulata; dorsal yerleşimli, daha koyu renkli bölümüne ise pars compacta adı verilmektedir (Taner 2002; Gökmen 2003). Substantia nigra pars kompakta'dan striyatuma gelen dopamin, normalde direkt yolun aktivitesini D1 reseptörleri üzerinden artırırken, indirekt yolun aktivitesini D2 reseptörleri üzerinden azaltır.

Nigrostriatal yol dejenerasyona bağlı olarak striyatuma dopamin azalması striatal internöronlar arasında kolinerjik aktivitede artışa neden olur. Dopamin eksikliği direkt/indirekt yol arasındaki dengeyi, indirekt yolda aktivite artışı lehine çevirir. Böylece talamokortikal yolun inhibisyonu artar ve kortekse uyarıcı bilgi gitmesi engellenir. Bu da korteksten kortikospinal projeksiyonların uyarılmasını engeller ki Parkinson hastalığının temel bulgularından hareket ve tonus bozukluklarının ortaya

çıkmasına neden olur (Albin *et al.* 1989; Smith *et al.* 1998) (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Substantia nigra ve Dopamine metabolizması (Anonymous 2016a)

1.2.4. Entorinal korteks

Parahipokampal girusun ön kısmında ve Broadman'ın 28. alanında bulunmaktadır. Bu bölgenin neokortikal sensorial ve multimodal asosiasyon bölgeleriyle ve subkortikal yapılarla da bağlantısı vardır (Amaral *et al.* 1987). Hipokampusun en güçlü kortikal afferentlerinin kaynağı entorinal kortekstir ve amigdaladan önemli bağlantılar almaktadır (Insausti *et al.* 1987). Anatomik olarak neokorteksin geniş bir kısmı, entorinal korteks ve bu yapının arka komşuluğundaki peririnal kortekse doğrudan projekte olur. Hipokampus kortikal bilgilerin önemli bir kısmını bu iki yapıdan alır. Entorinal kortekse gelen ön projeksiyonlar özellikle orbitofrontal ve infralimbik korteksten gelmektedirler ve fonksiyonları ödül, ceza ve diğer hedefle ilişkili yanıtların oluşturulmasıdır (Carmichael *et al.* 1994). Posterior projeksiyonlar önce orbitofrontal

korteksten insuler kortekse gelir ve burada tat duyusu ile ilgili bilgi ile işlemlendikten sonra peririnal kortekse aktarılır. Bu iki alan entorinal korteksi yoğun şekilde innerve eder. Singulat korteks te entorinal korteksi yoğun şekilde innerve eder ve bu innervasyonun kaybı hafızayı, özellikle gecikmiş yanıtı görevleri etkiler (Zola-Morgan *et al.* 1993).

Entorhinal kortekse çok sayıda subkortikal input ulaşmaktadır. Birçok olfaktor yapı özellikle de olfaktor bulbdan gelenler olfaktor ve piriform korteksten gelen yoğun projeksiyonlarla birlikte entorinal korteksin yüzeysel tabakasını innerve eder (Haberly 1985). Entorinal korteksin olfaktor bilgilerle olan ilişkisi nettir. Medial septumun kolinerjik liflerinin de entorinal kortekse güçlü projeksiyonları mevcuttur. Bu kolinerjik hücrelerin hipokampustaki bellek depolanması ile ilişkili ritmik teta aktivitesini düzenlemesi nedeniyle entorinal aktivitenin bu işlemde önemli fonksiyonunun olduğu düşünülmektedir (Alonso and Llinas 1989). Kortikal nukleuslardan kaynaklanan ve amigdalada duyuşal olarak renklendirilmiş bilgiler, medial, lateral entorinal kortekse ve bazolateral ve lateral amigdalar nukleuslara projekte olur (Beckstead 1978). Beyin sapındaki rafe nukleusundan serotoninerjik, lokus seroleus ve retiküler tegmental alandan noradrenerjik inputlar gelmektedir. Ayrıca anterior talamik nukleuslardan kaynaklanan afferentler de entorinal kortekte sonlanır (Bayer 1985). Entorinal bölge hem kortikal hem de subkortikal yapılar tarafından yaygın şekilde innerve edilmesine rağmen özellikle öğrenme ve hafıza ile ilişkili davranışlardaki rolü açıktır (Şekil 1.5).

1.2.5. Hipokampus

Hipokampus, çift taraflı, temporal korteksin medialinde lateral ventrikülün cornu inferius'unun tabanı boyunca uzanmış, C harfi şeklinde, anteriordan posteriore yerleşim göstermiş, gri cevher kabartısıdır. C harfinin konveks yüzü ventrikül boşluğuna, konkav yüzü ise hemisferin alt yüzüne doğru yönelim göstermiştir. Alttı mediale doğru subiculum ve gyrus parahippocampalis ile devam eder. Parahippocampalis'in öne doğru uzanan kısmına uncus adı verilir (Blaskstad 1956). Hippocampus'un arterial kanlanması

arteria cerebialis posterior tarafından sağlanır. Anteriordaki küçük bir bölümü ise arteria corioidea anterior tarafından kanlanır (Duvernoy 2005) (Şekil 1.5).

Cornu ammonis (CA); Korteks bandı; Hipokampus'un genişliğine, hücre yoğunluğuna ve hücre büyüklüğüne göre dört bölgeye ayrılır.

Kuyruk kısmı, CA1,

Kuyruğa yakın gövde kısmı, CA2,

Baş bölgesine yakın olan gövde kısmı, CA3,

Baş bölgesi CA4 olarak isimlendirilir.

CA1: İnsanda en büyük olan kısımdır. En fazla oksijen bu kısımda kullanılır ve hipoksiye duyarlı piramidal nöronlarca zengin olduğundan hipoksiye karşı oldukça hassastır.

CA2: Büyük piramidal nöronları sayesinde hipoksiye karşı en dirençli kısımdır. Gyrus dentatus'ta bulunan granüler hücrelerin aksonlarından olan mossy liflerinden uyarı almazlar.

CA3: Hipoksiye karşı hafif duyarlıdır. Ammon boynuzunda bulunan en büyük piramidal nöronlar burada yerleşim göstermektedir. Piramidal hücrelerin dendritleri ile mossy lifleri arasında oluşan ve stratum lucidum tabakasında bulunan sinapslar en belirgin özelliğidir. CA3'ün bir kısmı gyrus dentatus'taki granüler hücreleri tarafından sarılmıştır.

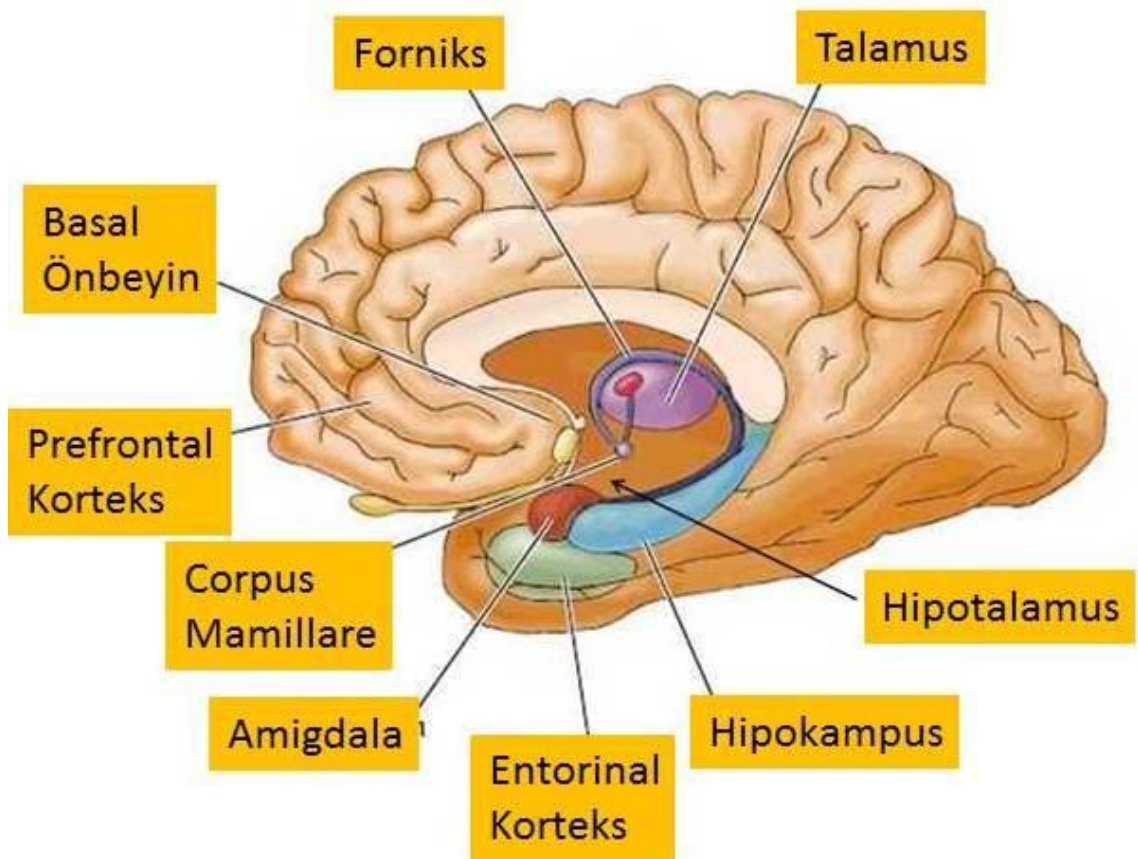
CA4: Piramidal hücreleri olmadığından hipoksiye karşı orta seviyede bir duyarlılık gösterir. Bu bölgeye hilus bölgesi de denir (Blaskstad 1956; Duvernoy 2005).

Gyrus Dentatus; Gyrus parahippocampalis ve fimbria hippocampi arasında dişli ve dar substantia grisea tabakasıdır. Hippocampus formasyonu'nu oluşturan yapılardan gyrus dentatus, üzerinde corpus callosum'un splenium'una kadar fimbria hippocampi ile seyreder ve indusium griseum ile devam eder. Gyrus dentatus önce uncus'a karışır (Brodal 1981; Duplus *et al.* 2000). CA1, CA3'ten sulcus hippocampalis ile ayrılır. Gyrus dentatus'taki temel hücre tipi olan granül hücrelerinin unipolar dendritleri

afferent projeksiyonlar şeklinde stratum moleculare'ye uzanmış hücrelerdir. Gyrus dentatus'un hilusu, granüler hücre tabakasının kolları arasında, polimorfik hücrelerden oluşan bölgedir.

Subiculum; Subiculum, gyrus parahippocampalis'in superior parçasını oluşturur. Subiculum'un bir ucu hippocampus ile diğer ucu ise gyrus parahippocampalis'in korteksiyle seyredir. Subiculum'un ön tarafında area entorhinalis vardır (Brodal 1981).

Alveus; Hippocampus'un superior veya ventriküler yüzünde uzanan ince bir tabaka substantia alba ihtiva eder. Hippocampus'ta myelin lifler içeren nöronların aksonları alveus'u oluşturmaktadır. Bu lifler, hippocampus'un medial kenarına doğru uzanarak fimbria hippocampi'yi oluştururlar. Fimbria hippocampi arkada crus fornix olarak devam eder (Brodal 1981).



Şekil 1.5. Beyin yapılarının gösterimi (Anonim 2016b)

1.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimine sahip atom veya moleküllere serbest radikal adı verilir (Uzun *et al.* 2001; Akyol 2004). Moleküler oksijen insan vücudunda bütün hücrelere girerek dokularda çok fazla tüketilme özelliğine sahiptir. Yapısı gereği de radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri, ya da reaktif oksijen türleri (ROS) akla gelmektedir (Akyol 2004). Serbest oksijen radikalleri hidroksil, süperoksit, nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Başta mitokondriyal elektron taşınımı olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonları gibi oksijen gerektiren durumlarda ROS oluşmaktadır (Mates 2000; Burçak and Andican 2004). Ayrıca kişilerin maruz kaldığı; stres, radyasyon, antineoplastik ajanlar, bağışıklığı artırıcı bazı maddeler, pestisitler, anestetik maddeler, sigara dumanı ve aromatik hidrokarbonlar gibi bazı eksojen ajanlar da vücutta ROS oluşumuna neden olmaktadır (Akyol 2004). Toluen de bir aromatik hidrokarbondur ve oksidatif stres oluşturduğunu kanıtlayan çok sayıda çalışma mevcuttur (Dossing *et al.* 1983a; Guzelian *et al.* 1988; Mattia *et al.* 1993a; Park *et al.* 2003; Coşkun *et al.* 2005, 2006).

Serbest radikallerin artması veya antioksidan enzimlerin azalmasıyla, serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucu oksidatif stres ve oksidatif hasar oluşur. Oksijen, süperoksit radikali ve bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece toksik olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit radikali, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) vasıtasıyla hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülür. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan hidrojen peroksit, dokularda bulunan katalaz (CAT), peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (Halliwell 1984; Mates 2000).

Glutasyon (GSH), hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (0,1 – 10 mM). Organizmanın birçok hücresinde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptittir (Champe ve ark., 1997). Glutasyon disülfid (GSSG), GSH'daki sisteinin tiol grubunun oksidasyonu ile oluşmaktadır. Hücrede bulunan GSH' un 1/3' ü disülfid şeklinde ve tiol grubu içeren sistein, koenzim A gibi bileşikler ile beraber bulunmaktadır (Luberda 2005). DNA sentezinde, hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Chavan ve ark., 2005). İçeriğindeki en aktif grup tiol grubudur. GSH'daki tiol grubunun oksitlenmesi ile oluşan GSSG, antioksidan özelliğini kaybetmektedir. GSH, glutasyon peroksidazın ve dehidroaskorbat redüktazın ön maddesi ve glutasyon redüktaz tarafından katalizlenen reaksiyonun da ürününü oluşturmaktadır (Luberda, 2005).

Memeli organizmalarında NO'nın varlığı 1916 yılında gösterilmiştir. Aktifleşmiş makrofajların NO salgıladığı 1985 yılında keşfedilmiştir. NO'nın öncü maddesi L-arginindir. Ayrıca endotel kaynaklı vazodilatör faktörün NO olduğu tespit edilmiş ve bu molekülün beyin hücre ve dokusu ile bir çok organ sisteminde üretildiği rapor edilmiştir (Bicker, 2001). NO molekülü, moleküler oksijen varlığında L-argininin L-sitrüline dönüşümünde ürün olarak oluşur. Nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi bu reaksiyonu katalize etmekte ve ko-substrat olarak NADPH ve oksijen kullanılmaktadır (Sarkar, 2001). NO, fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda vazoregülasyon ve hücrel toksiteyi gösteren bir biyoregülatör molekül olarak görev yapmakta, aynı zamanda damar basıncının ayarlanmasından ve kan hücreleriyle endotel arasındaki etkileşimin düzenlenmesinden sorumlu olmaktadır (Kuyumcu ve ark., 2004). NO üretildikten hemen sonra nöron dışına salıverilmekte ve lipofilik özelliği nedeniyle salıverildiği hücrenin çevresinde geniş bir alana yayılmaktadır. Hücre ve sinir uçlarının içine kolaylıkla girebilmektedir. Hedef hücrelerde suda eriyen guanilat siklaz/cGMP sistemini aktive ederek hücrel bir etki oluşturmaktadır (Kennedy, 1994; Rand ve Li, 1995). NO'nın insan vücudunda koruyucu ve düzenleme etkilerinin yanı sıra zararlı etkileri de bulunmaktadır. Bunlar enzim fonksiyonlarını bozmak, DNA hasarı

oluşturmak, lipid peroksidasyonu ve antioksidan tüketimi olarak sayılabilmektedir (Matthew, 1999).

Lipid peroksidasyonu, hücre zarındaki fosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece hücre zarı lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozmaktadır (Thomas, 1999). Serbest radikallerin hücre zarındaki doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile başlamaktadır. Bir zincir tepkimesi şeklinde başlayıp, daha ileri peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturmaktadır. Kendi kendini devam ettiren bu zincir reaksiyonlarının hücre membranına hasarı geri dönüşümsüz olmaktadır (Canoruç ve ark., 2000).

Lipit peroksidasyonun en önemli ürünü olan malondialdehit (MDA), 3 ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelir. MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girdiğinden mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Mercan 2004). MDA, hücre zarı akışkanlığının azalmasına, hücre zarı fonksiyonlarının yavaşlamasına, hücre zarı reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına ve Ca ⁺² iyonlarının hücre zarından geçişlerinin artmasına neden olmaktadır (Canoruç ve ark., 2000; Rio ve ark., 2005).

Günümüzde yapılan bir çok çalışma sonrasında oksidatif stresin apoptozisin başlamasını tetikleyen en önemli faktörlerden biri olduğu kabul edilmektedir. Oksidatif stres kalsiyum dengelerini ve mitokondri membran potansiyelini değiştirerek mitokondride hasara yol açar. Hem mitokondri hemde DNA hasarına yol açan oksidatif stres, hücreyi apoptozise sürükler (Edelfors *et al.* 2002; Burçak and Andican 2004).

1.4. Apoptozis

Hücre popülasyonunun geri kalanının sağlığının bozulmasını gerektiren durumlarda,

hücrelerin genetik olarak bünyelerinde mevcut bulunan intihar programı devreye sokularak, hücrenin programlı bir şekilde ve çevresine hiç bir zarar vermeden ölmesine apoptozis denir (Woo *et al.* 1999; Ergin and Alkan 2002). Apoptozisin morfolojik değişiklikleri kaspaz aktivasyonu sonucu meydana geldiği kabul edilmektedir (Erdoğan and Uzaslan 2003). Kaspazlar ekstrensek (reseptör aracılı) yol, ya da intrinsek (mitokondri aracılı) yolların tetiklenmesi sonucunda aktif olmaktadır. Ekstrensek apoptozisin tetiklenmesinde sorumlu iki esas faktör; Fas ligant ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) olduğu bilinmektedir. Fas ligant'ın reseptörü olan Fas tip-I, membran proteini ve TNF reseptör ailesinin bir üyesi sayılmaktadır. Fas ligant, sitotoksik T lenfositlerde, Natural Killer (NK) hücrelerinde bulunmakta ve hedef hücrede bulunan fas reseptörü ile bağlandığı zaman apoptozisi aktive etmektedir. TNF ise hedef hücredeki TNF reseptör ailesinin üyeleri olan TNF-alfa ve TNF-beta reseptörleri ile bağlandığında apoptozisi başlatmaktadır (Erdoğan and Uzaslan, 2003). Bu reseptörlerin uyarılması ile başlatıcı kaspaz olan kaspaz-8 aktive olarak aktivasyon sinyalini kaspaz-3 gibi efektör kaspazlara iletmektedir. Aktifleşmiş kaspazlar (kaspaz-3) DNA'nın parçalanması ve membran proteinlerinin yıkılması gibi morfolojik değişikliklerin ortaya çıkmasıyla kesin ölümü meydana getirmektedirler (Ramachandran *et al.* 2000). Ciddi DNA hasarına cevap olarak aktive olan p53 geni ve reaktif oksijen radikalleri apoptozisi başlatabilmektedir (Erdoğan and Uzaslan 2003). Kaspaz ailesinin ise şu ana kadar 14 üyesinden 11 tanesi insanda bulunmaktadır. Kaspazlar içerisinde çeşitli hücresel proteinleri parçalayan ve küçük bir bağlanma bölgeleri olanlarına sonuçlandırıcı (effektör) kaspazlar da denilmektedir. Bunlar; Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7 dir (Eastman 1995). Nerve Growth Factor (NGF) hücre membranında yerleşim gösteren reseptör tirozin kinaz ailesinin üyeleri arasında yer almaktadır. Ayrıca hücreler çevre hücrelerden ve hücre dışı matriksden gelen yaşam sinyallerine ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptoza gitmektedirler. Nöronlar aksonlarını hedef hücreye kadar uzatmakta, hedef hücreler ise sınırlı miktarda nörotrofik faktör salgılamaktadırlar. Nörotrofik faktörler özel hücre reseptörlerine bağlanmakta ve yeterli miktarda nörotrofik faktör alamayan nöronlar apoptoza uğramaktadır. (Luberda 2005). NGF'nin, reseptörü olan tirozin kinaz A'ya bağlanması Bcl-2 adı verilen bir molekülü aktif hale geçirmektedir. Bu şekilde apoptotik yolda bir sonraki molekül olan Apaf 1 baskılanmakta ve apoptoza yol

açacak olan kaspazlar inaktif halde kalmaktadır. Ancak yeterli NGF'nin olmadığı durumlarda bu sinyal alınmayacağından Bcl-2 aktif hale geçemez ve Apaf 1 baskılanamamaktadır. Böylece aktif kalan Apaf 1 tarafından kesilen kaspazlar aktif hale geçerek apoptoz gerçekleşmektedir (Jessel ve Sanes, 2000).

1.4.1. Apoptozis düzenleyicileri

Apoptozisin düzenlenmesinin merkezinde mitokondri bulunmaktadır. Apoptozis sırasında mitokondri membran potansiyelinin azalması ve membran geçirgenliğinin artması gibi değişiklikler meydana gelmektedir. Oksidatif stresin eşlik ettiği bu değişiklikler neticesinde mitokondrinin membranlar arası boşlukta yer alan ve solunum zincirinin bir parçası olan sitokrom c, sitozolün içine salınmaktadır. Bu salınım Bcl-2 ailesinin mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında bulunan anti-apoptotik üyeleri tarafından durdurulmaktadır. Apoptozis esnasında mitokondriye geçen Bax mitokondride delikler açmakta ve sitokrom c salınımını artırmaya çalışmaktadırlar. Özetle Bcl-2 ailesinin pro- apoptotik üyeleri (Bax) baskın olduğunda apoptozis artarken, anti-apoptotik üyeleri baskın olduğunda apoptozis azalmaktadır (Nagata 1997; Ramachandran *et al.* 2000; Wang 2001; Hoijman *et al.* 2004). Bcl-2 anti-apoptotikken Bax pro-apoptotiktir. Bcl-2/Bax oranındaki değişiklikler bazı malign hastalıkların teşhisinde önem taşımaktadır (Ramachandran *et al.* 2000; Ergin and Alkan 2002).

1.4.2. Apoptozis morfolojisi

Apoptozisin aşamalarının bir kısmı çeşitli görüntüleme yöntemleriyle tespit edilebilmektedir. Hücrede yapısal olarak şu değişiklikler meydana gelmektedir;

İçeriden veya dışarıdan indükleyici bir faktörle apoptozis başlatılmaktadır.

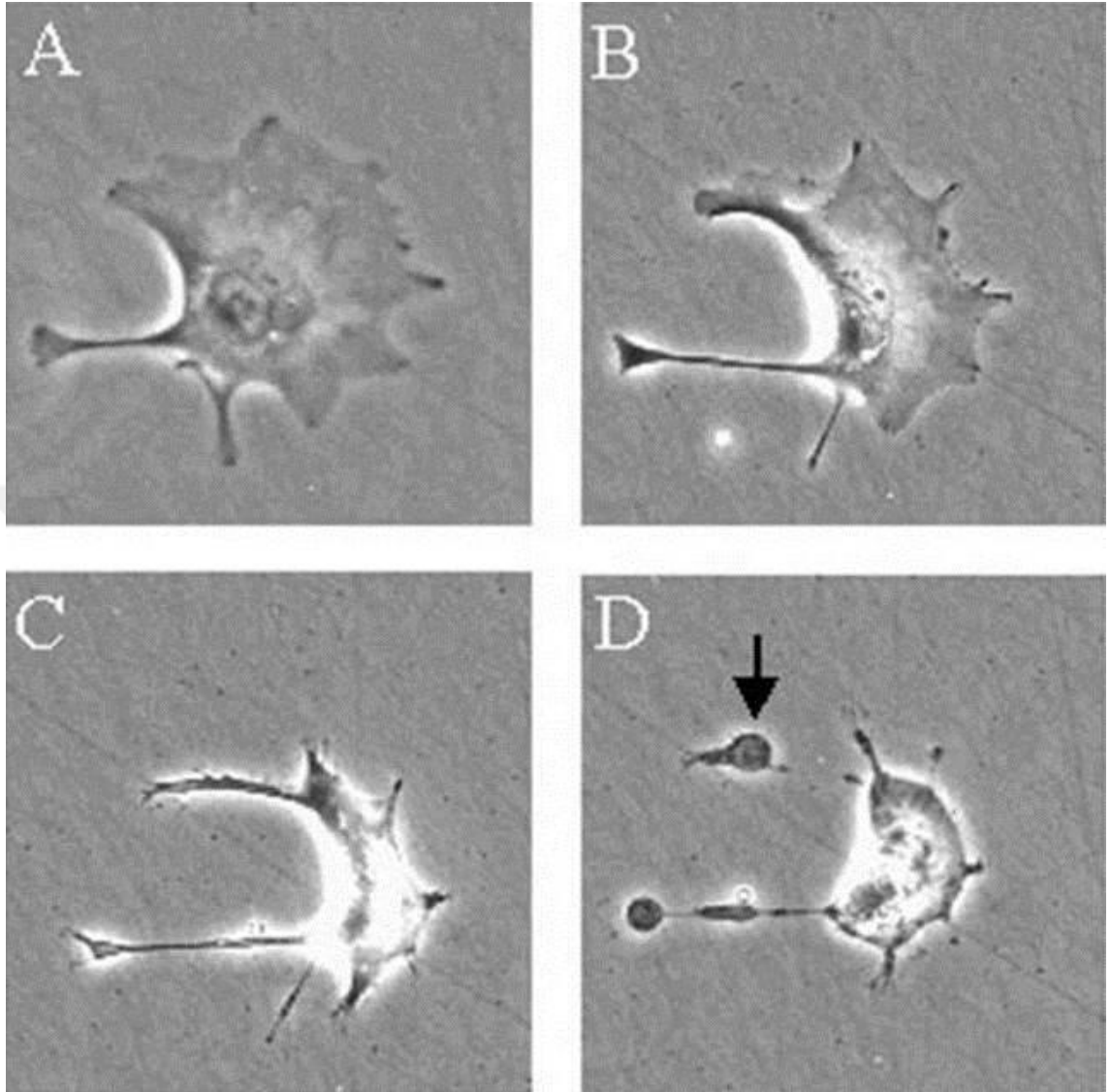
Hücre içerisinde bulunan proteazlar aktiveleşmektedir.

Hücre büzüşerek, mikrovillus ve bağlantı yerlerini kaybederek komşu hücrelerden ayrılmaktadır.

Çekirdek kromatini yoğunlaşarak çekirdek zarı altında toplanır. Endonükleaz DNA'yı parçalara böler. Endoplazmik retikulumda dilatasyon ve mitokondride ise şişme meydana gelmektedir.

Plazma zarında tomurcuklanmalar meydana gelir ve hücre sitoplazması ile çevrelenmiş DNA parçalanır ve hücre organellerden meydana gelen apoptotik cisimciklere kadar parçalmaktadır (Abbasoğlu and Hoşal 2001).

Hücre yüzeyindeki birçok molekülün değişiminden dolayı apoptotik yapılar komşu hücreler veya fagositler tarafından kolaylıkla tanınarak inflamasyona neden olmadan imha edilmektedirler (Öktem *et al.* 2001; Ergin and Alkan 2002; Kültürsay and Kayıkçıoğlu 2002; Bjelakovic *et al.* 2005) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Aşama aşama apoptozis ve morfolojisi

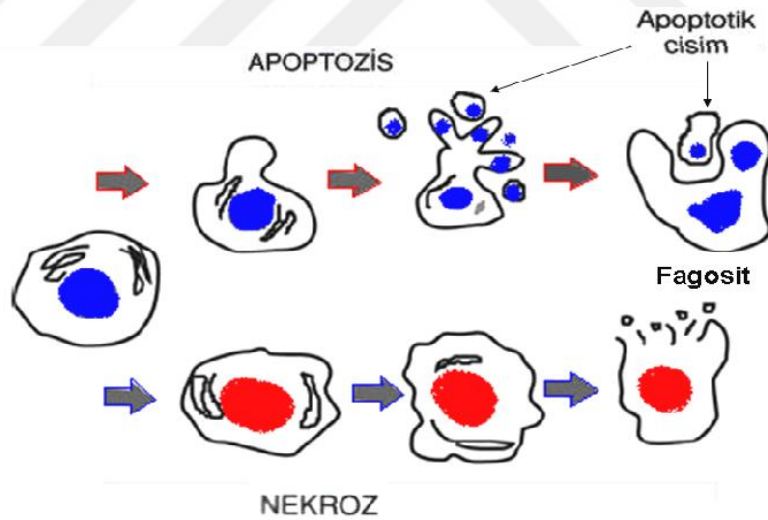
A) Hücrenin iskeletini meydana getiren proteinler bölünür ve hücre küçülür. B) Daha sonra hücre nükleusunda ki kromatin bozulur ve nucleus yoğunlaşır ve at nalı şeklini alır. C) Bu sayede düzenli ve temiz bir şekilde paketlenen hücre atıkları makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır. D) Son aşamada ise zar kabarcıkları ve bazen ufak veziküller görülür (Anonymous 2016b)

1.5. Nekroz

Hücre ölümünün bir başka çeşidi ise nekrozdur. Hipertermi, fiziksel hasar, hipoksi, kompleman aktivasyonu, oksijen radikalleri ve UV ışık gibi zararlı uyarıcılar nedeni ile meydana gelen ölüm şeklidir (Öktem *et al.* 2001). Organellerin şişmesi, hücre sınırlarının düzensiz bir hale gelmesi ve bunların sonucunda hücrenin bütünlüğünün

kimyasal ve fiziksel olarak bozulduğu görülmektedir. Şişme ve plazma zarının yırtılması sonucunda sitoplazma içeriğini dışarıdaki doku aralığına bırakarak bazı hücrelerin oraya akın etmesine ve dolayısıyla da inflamasyona neden olmaktadır. Meydana gelen bu inflamatuvar cevap komşu hücreleri de etkilemektedir (Öktem *et al.* 2001; Friedlander 2003).

Koagulasyon nekrozun en sık görülen şeklidir. Bu tip nekrozda hücre şişmesi, sitoplazmik proteinlerin niteliklerinin değişmesi ve hücre organellerinin yıkımıyla karakterize olmaktadır. Nekroz sonucunda hücrenin morfolojik görünümü takiben meydana gelen hücrenin enzimatik sindirimi ve proteinlerin niteliklerinin değişmesi olmak üzere bu olayların sonucudur. Histolojik kesitlerde nekrozlu alanlarda Eozinle boyanan ölü hücre sayısında bir artış, hematoksilinle boyanan hücre sayısında ise azalma görülmektedir (Wanda *et al.* 2002) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Apotozis ve nekrozun morfolojik farklılığı (Taş 2011)

1.6. İmmunohistokimya

Organizmaya yabancı olarak tanınan her maddeye antijen, antijenin antikör tarafından tanınmasını sağlayan özgün diziye ise antijenik belirleyici veya epitop denilmektedir. İmmunohistokimyasal yöntemlerin temel prensibi, işaretlenmiş antikörler ile doku veya

hücredeki spesifik antijenler arasında antijen-antikor kompleksi oluşturmaktır. Antijen-antikor kompleksi oluştuktan sonra bu kompleks bir renklendiriciyle görünür hale getirilerek mikroskop altında incelenebilir. Bu işlem esnasında antijeni bağlamak için en fazla kullanılan antikor IgG'dir. IgM ise daha az oranda kullanılır (Ramos-Vara 2005).

1.6.1. İmmunoglobulinlerin yapısı

İmmunoglobulinler Y harfi şeklinde, iki hafif (L) ve iki ağır (H) polipeptid zincirinden yapılmış glikoproteinlerdir. Hafif ve ağır terimleri molekül ağırlığını ifade etmek için kullanılır. Hem hafif hem de ağır zincirleri değişebilen amino uçlara (N-terminallere) ve sabit karboksil uçlara (C-terminallere) sahiptir. Ağır zincirlerdeki antijenik ve yapısal özelliklerine göre farklılık gösterir, molekülün sınıfını ve alt sınıfını belirlemektedir (Abbas and Lichtman 2007).

1.6.2. Monoklonal ve Poliklonal Antikorlar

Poliklonal antikorlar tavşan, at, keçi, tavuk gibi birçok hayvan cinsinden elde edilmektedir. Bunlar farklı hücreler tarafından üretildiklerinden immunohistokimyasal olarak da farklı antikorlardır. Onları oluşturan antikorum üzerindeki çeşitli epitoplara reaksiyon vermektedirler. Poliklonal antikorlar monoklonal olanlara kıyasla daha fazla reaksiyona girme istek ve yeteneğindedirler. Ayrıca poliklonal olan bir anti serumun kros-reaktifliği absorbe edilebilmekteyken, monoklonal antikorların reaktifliği absorbe edilememektedir. Monoklonal antikorlar ise daha spesifiktirler ve poliklonal antikorlar ile kıyaslandığında yüksek homojenlik, nonspesifik antikorların olmayışı, tanımlanmanın kolay olması gibi avantajlara sahiptirler (Ramos-Vara 2005).

Yaptığımız bu çalışmada genelde kronik olarak maruz kalınan Toluen'in prefrontal korteks, entorinal korteks, hipotalamus, hippokampus ve substansiya nigra üzerine akut etkilerini histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal metotlarla araştırmayı

amaçladık. Tavşanlar üzerinde ve akut yüksek dozlarda bu konularda sınırlı sayıda çalışma bulunması bizim çalışmamızın önemini artırmaktadır. Toluen'in hem sanayide yoğun kullanılan bir madde olması hem de özellikle çocuk ve gençlerde olmak üzere kasıtlı ve özellikle intihar vakalarında sık kullanımı nedeniyle sağlık üzerine etkisi son derece önemlidir. Bu prensip doğrultusunda yapılan çalışmada Toluen kullanımına bağlı biyokimyasal dejenerasyonun, immunohistokimyasal değişikliklerin ve histopatolojinin organizma sağlığı açısından önemli ve ciddi derecede değişiklikler gösterdiği belirtilmiştir.

Çalışmamız için literatür taraması yapıldığı zaman düşük dozlarda kronik maruziyetin etkilerini inceleyen çok sayıda rat çalışması olmasına rağmen akut ve yüksek dozlarda ve daha kompleks bir organizma özelliği taşıyan bir deney hayvanı olan tavşan üzerinde Toluen hasarını inceleyen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu amaçla biz bu çalışmamızda New Zeland cinsi tavşanların prefrontal korteks, hippocampus, entorinal korteks, hipotalamus ve substantia nigra bölgeleri üzerinde yüksek doz tolüenin akut toksik etkilerini apoptotik, histopatolojik ve biyokimyasal parametreler açısından organizmada meydana gelebilecek anormallikleri incelemeyi amaçladık.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kulling and Pronczuk 1985'te Swensson ve Andersson'un yaptığı araştırmayı baz alarak, 3.6 mg/m³ (miligram/metreküp) ya da 0.5 ppm Toluen-2,4-diisosiyanat'ın insanların tamamında göz ve burunda tahrişler oluşturduğunu, 0.2-0.5 mg/m³ ya da 0.03-0.07 ppm düzeylerinde ise bütün insanlarda orta derecede solunum sorununa neden olduğunu, 5 ppm'de ise hayati öneme haiz toksisitenin meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Guzelian *et al.* (1988) bir Toluen rat çalışmasında, karaciğerin ilaçlar ve diğer maddelerin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda önemli bir rol aldığını aynı zamanda karaciğerin kendisinin de toksik etkilere karşı risk altında bulunan bir doku olduğunu söylemişlerdir. Bu çalışmalarında Toluen ve bazı metabolitlerinin karaciğer dokusunda oksidatif hasar yoluyla karaciğer hepatositleri üzerine sitotoksik etki yaptığını, bu durumun da karaciğer hasarı oluşturup karaciğerdeki enzimlerinin seviyelerini artırdığını görmüşlerdir.

Mattia *et al.* (1993b) intraperitoneal yolla Toluen verdikleri ratlarda, Tolueni parçalayan aldehit dehidrojenaz enziminin aktivasyonu sırasında, süperoksit anyonlarında ki artıştan kaynaklanan, karaciğer ve beyin dokusunda reaktif oksijen radikallerinin oluşumunda artış meydana geldiğini göstermişlerdir. Toluen maruziyeti sonucu karaciğer hasarının araştırıldığı başka bir çalışmada Toluenin, oluşturduğu oksidatif stres etkisiyle dokuda antioksidanların seviyelerini ve etkinliklerini azalttığı ve bu nedenle lipid peroksidasyon ürünlerinin dokudaki seviyelerinin arttığını tespit etmişlerdir.

Flanagan *et al.* (1994)'te elde ettikleri değerlere göre, hastaların %50'sinde 5-10 mg/lt arasındaki kanda ki Toluen konsantrasyonlarının belirgin şekilde toksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Hemen hemen bütün hastalarda Toluen'in kanda 10 mg/lt üzerindeki konsantrasyonlarında ise koma ya da ölüme sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Lee *et al.* (1999) çinko gibi endojen metallerin b-amiloid (Ab) agregasyonuna ve dolayısıyla plak oluşumuna katkıda bulunabildiklerini transgenik farelere verilen reaktif çinko çalışmasında göstermişlerdir. Bu çalışmada transgenik farelerin plaklarındaki reaktif çinko, ancak preamiloid Ab çöktürücüleri değil, preamiloid Ab birikimlerinin, kongofilik olarak gelişmemesi nedeniyle sinaptik vezikül çinko eksikliği bulunan serebellum plakaları, sinaptik çinko plak oluşumunda gerekli bir element olabileceğini rapor etmişlerdir.

Son zamanlarda petrokimya ve bağlantılı endüstrilerdeki gelişmeler sonucu, kullanım alanları oldukça yaygın olan organik uçucu maddelerin kötüye kullanımı tüm dünya gençlerinde artan bir toplum ve halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Yapıştırıcılar, incelticiler, boya çözücüler, aerosoller, oda ve saç spreyleri, yağ ve leke çıkarıcıları, deodorantlar, kozmetik ürünlerde kullanılan organik uçucu maddeler geniş bir kimyasal kullanım alanına sahiptir (Uzun vd 2001). Organik uçucu maddeler kendi içinde bir çok gruba ayrılırlar. Alifatikler içinde bütan, asetilen, heksan; alisiklik grupta toluen, ksilen; miks grupta petrol, halojenizelerden halotan, karbon tetraklorür, kloroform, trikloretilen sayılabilir (Flanagan and Ives 1994; VSAGO 1999).

Toluen-2,4-diisosiyanat, toluen-2, 6-diisosiyanat isomerik maddelerinden oluşan, isosiyanat madde grubuna giren, moleküler yapısı $C_9H_6N_2O_2$ olan bir kimyasal bileşendir. Toluen aromatik bir hidrokarbondur ve toplumda kötüye kullanım potansiyeli çok yüksektir. Yapılan araştırmalarda, uçucu madde bağımlılarının %90 toluen, %5 klorlu hidrokarbonlar, %3 bütan ve %2 diğer uçucu maddeleri kullandıkları gösterilmiştir. İncelticiler, %40-60 oranında toluen ve farklı markalarda ve değişik oranlarda n-heksan, metanol, benzen ve ksilen içermektedir. Ülkemizde tiner için standardize edilmiş oranlar %90 toluen, %9 etil asetat, %1'den az benzol karışımıdır (Uzun *et al.* 2001). Toluen, benzene oranla daha narkotik ve toksik bir maddedir (Dökmeci 1999).

Akut entoksikasyonda öncelikli olarak santral sinir sistemi (SSS) belirtileri meydana gelmektedir. Öfori, konfüzyon, baş dönmesi, santral sinir sistemi depresyonu, baş ağrısı,

halusinasyonlar, vertigo, konvülsiyon, optik nöropati, ataksi, kulak çınlaması, stupor, periferik nöropati, koma gibi belirtilere rastlanabilir (Martin 2001). Halojenli hidrokarbon bileşiklerine maruziyet sonucu meydana gelen akut zehirlenmelerinde, miyokardiyal eksitabilite, periferik ödemler ve hipertansiyon görülebilen; yüksek dozda benzen buharları gözleri ve solunum yollarını tahriş edebilmektedir. Sıvı halde ki benzen, deri ve mukozalarda koroziv etki ile kostik pulmoner ödem ve digestif hemorajiler oluşturabilir. 30 dakika süreyle 7500 ppm benzene maruz kalınması tehlikelidir (Dökmeci 1999).

Halifeoğlu *et al.* (2000) sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz ile aşamalı olarak oksitlenen ve sonuçta serbest radikal üreten boya tineri ile yaptıkları çalışmada bir grup insanın eritrositlerinde antioksidan enzim glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) ve plazma malondialdehit düzeylerini ölçmüşlerdir. Boya inceltici ile çalışan insanlarda MDA ve GSH-Px aktivite düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) bir artış olduğu ve SOD plazma seviyelerinde ise tiner soluyan insanlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, boya tiner inhalasyonunun lipid peroksidasyonunu artırabileceği ve dolayısıyla antioksidan enzimlere neden olabileceği sonucuna varmışlardır.

Amerikan İşçi Sağlığı ve İş Güvenliği Dairesi (OSHA) Toluene maruziyet için kabul edilebilir düzeyleri saptamış ve buna göre 100 ppm seviyesini işyeri için güvenli görürken, 8 saatten az olmak kaydıyla 150 ppm düzeyinde bir maruziyetin kabul edilebilir olduğunu bildirmişlerdir. Ancak 2000 ppm düzeyinde bir maruziyetin yaşamsal tehlike bulundurduğunu bildirmişlerdir. Kanda ki Toluen seviyesinin 2,5 mcg/ml olması hastalık oluşumuyla ilişkili iken, 50 µg/ml düzeylerinde bulunması ölümle sonuçlanmaktadır (Martin 2001). Bu konuyla ilgili farklı oranlar bulunmaktadır (Hoffman and Mclellan 1993; Gehle 2001).

Uzun *et al.* (2001) bir çalışmalarında nörotoksik olduğu bilinen farklı organik hidrokarbon türevlerine (toluen / metil benzen ve n-heksan) kronik maruz kalma nedeniyle nöropatinin elektrofizyolojik özelliklerini sunmuşlardır. Toluene koklama

yoluyla maruz kalan 25 denek ve inhalasyon ve cilt teması yoluyla n-heksan'a maruz bırakılmış 29 denekle bir çalışma yapmışlardır. Toluen grubundaki hastaların %12'sinde hafif sensori motor polinöropati, asemptomatik n-hekzan grubundaki hastaların %60'ında tespit etmişlerdir. Nörolojik muayene sonucunda, Toluene maruz kalanlarda baskın santral sinir sistemi tutulumunu bildirmişlerdir. Semptomatik n-hekzan grubundaki hastaların hepsinde motor ve daha şiddetli derecede duyuşal polinöropati orta ila şiddetli derecede saptamışlardır. Sonuç olarak n-heksanın ağırlıklı olarak periferik sinir sistemi hasarına yol açtığını, bununla birlikte tolueinin merkezi sinir sistemi tutulumuna yol açtığını önermişlerdir.

Karagözler *et al.* (2002) çalışmalarında, ev boyacılarında, kan sitokin düzeyleri, antioksidan enzim aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) konsantrasyonu üzerine solventle ilişkili etkilerini incelemişlerdir. Eritrositler ve serumda iz element (Cu ve Zn) ve nitrit ve nitrat düzeyleri ile protein konsantrasyonları tespit etmişlerdir. Çalışma otuzarlı iki gruptan oluşmaktadır. Her grupta 13 sigara içen ve 17 sigara içmeyenlerden oluşmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ev boyacılarının kanında hemoglobin konsantrasyonları belirgin olarak daha fazla düşmüştür. Ev boyacılarında eritrosit protein konsantrasyonları (hemoglobin hariç) anlamlı derecede yüksek olmuş, serum protein seviyeleri arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tümör nekroz faktörü-a ve interlökin-8 gibi proinflatuvar sitokin düzeyleri, ev boyacılarının serumlarında anlamlı şekilde artmıştır. İnterlökin-1b ve sitokin reseptörü interlökin 2R konsantrasyonları önemli ölçüde etkilenmiştir. Ayrıca, ev boyacılarının serumunda nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının üç kat ila dört kat arttığı görülmüştür. Serum süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri, ev boyacılarında kontrollerden daha fazla düşmüştür. Lidit peroksidasyonunun bir ölçütü olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonunun anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Ev boyacılarında, eritrosit karbonik anhidraz ve katalaz aktiviteleri sırasıyla yaklaşık 11 kat ve 2 kat artmıştır.

Baydaş *et al.* (2003) yaptıkları deneysel rat çalışmasında %60-%70 Toluen ihtiva eden tiner inhalasyonunda melatoninin serbest radikal hasarına karşı nöroprotektif etkilerini

kapsamlı olarak incelemişlerdir. Bu ürünün merkezi sinir sisteminde işlevsel ve yapısal değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında sıçanları 45 gün boyunca Toluen buharına (3000 ppm) maruz bırakmışlardır. Western blot analizleri sonucunda kortekste, hippocampuste ve serebellumda astrositler için spesifik bir belirteç olan GFAP boyanma miktarında belirgin bir şekilde artış gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, fareler toluen buharına 45 gün maruz bırakıldıktan sonra, hipokampus, korteks ve serebellumdaki glial reaktiviteyi ve glial fibriller asidik protein (GFAP) ekspresyonu araştırılmıştır. Melatonin uygulaması, tiner inhalasyonu ile indüklenen toplam GFAP artışını engellediğini görmüşlerdir. Tüm beyin bölgelerinde lipid peroksidasyon ürünlerinde belirgin bir artış tespit etmişlerdir. Melatonin uygulanan ratlarda ise bu artışın engellendiğini izlemişlerdir.

Ilgazlı *et al.* (2004) genç kuşağın geçmiş yıllarda uyuşturucu olarak tineri kullanmasında ve tinerin sanayideki yaygın kullanımı nedeniyle de kolay ulaşılabildiği için toplumda ciddi bir sorun olan bu durumla ilgili bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında 46 rat kullanmışlardır. Akut ve subakut dönemde MDA değerlerinde bir artış gözlemlenmiştir. Kronik dönemde, lipid peroksidasyon ürünlerinin tüketilmesi ile MDA değerleri azalmış ve oksidatif stress devam ettikçe MDA değerleri tekrar artmıştır. Antioksidan özelliğe sahip GSH değerlerinin, lipid peroksidasyon ürünlerini telafi etmek için azaldığını gözlemlenmiştir. Lipid peroksidasyonunun tüketildiği dönemde değerler sabitleşmiş ve daha sonra bu değerler artmıştır. MDA ve SOD d Wilfong and Dey (2004)'e göre Toluen diizosiyanat (TDI) maruziyeti, rinit ve burun tahrişi oluşturmakta ve hava yolu duyu sinirlerinden P maddesinin sentezini ve salınımını arttırmaktadır. NGF, duyu sinir terminallerinde bulunan TrkA reseptörlerini bağlamaktadır. TrkA reseptörlerinin aktivasyonu, kinaz-sinyalleme kaskadlarını başlatmakta ve sonuçta P maddesini artırabilmektedir. Bu çalışmada, burun boşluğundaki NGF düzeyleri her iki burun boşluğuna %10 TDI damlatılarak incelenmiştir. NGF, TDI maruziyetinden 2, 6, 12 ve 24 saat sonra kontrollerle karşılaştırıldığında belirgin şekilde arttığını gözlemlenmiştir. NGF'deki artışın, P maddesindeki nöronal ve mukozal artışlardan önce geldiğini görmüşlerdir. NGF, TrkA tirozinekinaz reseptörlerine bağlandığından, TDI maruziyeti sırasında salınan NGF,

burun boşluğunu innerve eden hava yolu duyu nöronlarında P maddesi upregülasyonuna aracılık edebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Filley *et al.* (2004) son yıllarda en çok çalışılan nevrotoksinlerden biri olarak ortaya çıkan organik solvent olan Toluen çalışmalarında sprey boya ve ilgili maddeleri istismar eden insanlarda Toluen buharına uzun süreli ve yoğun şekilde maruz kalma, Toluenin, merkezi sinir sistemi miyelininde ciddi bir etkiye sahip olduğunun farkına varılmasına neden olmuştur.

Park *et al.* (2006) solunum güçlüğü ve kas güçsüzlüğü şikâyetleri ile acil servise getirilen kronik Toluen bağımlısı olan 32 yaşındaki genç bir erkek hastanın kan tetkikleri sonrasında, şiddetli hipokalemik hiperkloremik asidoz bulgularına rastlamışlardır. Araştırmacılar Toluen zehirlenmesinin renal tübüler asidozla sonuçlanabileceğini bildirmişlerdir.

Karabulut (2007) yaptığı *invivo* ve *invitro* insan çalışmasında Toluenin eritrosit zar stabilitesine etkisini incelemiştir. Toluen'in eritrositlerin zarlarına olan maruziyeti ile oksidatif stres parametrelerinin önemli ölçüde arttığı ve antioksidan enzimlerin tüketilerek aktivitelerinin büyük ölçüde azalmasına yol açtığını izlemiştir. Sonuç itibariyle toluenin eritrositlerde lipid peroksidasyonuna ve protein hasarına neden olduğunu görmüştür.

Gordon *et al.* (2007), oral Toluen uygulanan sıçanlarda Toluen'in kalp hızı, kan basıncı, vücut sıcaklığı ve motor aktivite üzerine etkisini araştırmışlardır. Ortalama 2 aylık olan erkek sıçanlar radiotelemetry yöntemi ile monitörize edilmiş ve daha sonra 0.4, 0.8 ve 1.2 mg/kg dozlarında 45 gün boyunca 10' ar dakikalık periyotlar ile oral Toluen uygulanmıştır. Toluen'in 0,8 ve 1,2 mg. dozlarında kalp hızı ve kan basıncını artırdığı izlenmiştir.

Tumer *et al.* (2007) çalışmalarında histopatolojik, biyokimyasal ve davranış parametrelerini kullanarak sıçanlarda Toluen kaynaklı beyin hasarında reaktif oksijen

hasarına karşı E vitamininin koruyucu etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu çalışma kontrol grubu, sadece Toluene grubu, hem Toluen hem de Tolueni E vitamini ile tedavi edilen grup ve sadece E vitamini grubundan oluşmaktadır. Tüm gruplarda nöropil hücrelerinde, özellikle piamaterin altındaki ve tıkanmış kan damarlarındaki ödemleri farklı şiddetlerde olsa da görmüşlerdir. Toluen grubunda infiltrative hücrelere ilaveten piknotik nöronlar ile birlikte E vitamin verilen gruba göre azalma görülmüştür. Her gruptaki malondialdehit seviyeleri, bu histopatolojik bulguları doğrulamıştır. Açık alan testinde gruplar arasında da önemli farklılıklar bulmuşlardır. Sonuç olarak biyokimyasal, histolojik ve davranışsal incelemelerde Toluen ve vitamin E grupları arasındaki farklılıklar, Toluenin beyindeki zararlı etkisine karşı vitamin E'nin antioksidan koruyucu rolünü desteklemiştir.

Riegel *et al.* (2007) yetişkinlerde yapmış oldukları Toluen'in kötüye kullanımı ile ilgili bir çalışmada sıklıkla ergenler tarafından kullanılan ve Toluen içeren uçucu maddelerin rekreasyonel istismarının önemli bir halk sağlığı problem olduğunu vurgulamışlardır. *In vivo* mikrodializde ikili prob kullanarak Toluen'in doğrudan ventral tegmental bölgeye perfüzyonunun ventral tegmental bölgedeki dopamin konsantrasyonlarını ve nukleus akkumbensin terminal projeksiyon alanını arttırdığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar Toluene kısa süreli maruz kalmanın bile mezoakumbal ventral tegmental bölgede dopamin nöronlarının hareket potansiyelini arttırdığını ve böylece nukleus akkumbensde dopamin salımını arttırdığını ileri sürmüşlerdir. Toluen'in, ventral tegmental bölgede dopamin nöronlarını aktive ederek mezoakumbal sinir iletimini uyardığı bulgusu, Toluen'in kötüye kullanımının başlatılmasına ve patofizyolojisine katkıda bulunabilecek sinirsel substratlar hakkında doğrudan bilgi verdiğini ileri sürmüşlerdir.

Çomunoğlu *et al.* (2009) yaptıkları bir olgu çalışmasında Toluene maruz kalmış dört otopside merkezi sinir sisteminde gliosis, nöron kaybı ve demiyelinizasyonu değerlendirmek için GFAP, Neu-N ve Luksol fast blue boyamaları yapmışlardır. Yapılan değerlendirmelerde beyinde fokal abseleşmeler ve nekroz alanları, fokal alanlarda yoğun gliosis boyanmaları, Neu-N boyaması ile de nöronlarda kayıp ve

vakuolizasyon izlemişlerdir. Aynı çalışmanın serebellum bölgesinde GFAP boyaması ile astorsitlerde belirgin bir pozitif GFAP artışı ve purkinje hücreleri dışında kalan nöronlarda Neu-N pozitif boyanması saptamışlardır.

Taş *et al.* (2009) yaptıkları Toluen çalışmasında karaciğerde bulunan ve açlık hormonu olan Ghrelin üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma için 14 rat iki gruba ayrılarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda toluenin karaciğer dokusunda bulunan Ghrelin ekspresyonunu azaltmış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Can ve Demirdöğen (2010) muhteviyatında Toluen bulunan pestisitlerden kaynaklanan zehirlenmelerde serum paraoksanaz 1 seviyelerinin organofosfat metabolizmasındaki önemi üzerine yaptığı bir derleme çalışmasında organofosfatların asetilkolinesteraz enzimini baskılayarak nörotoksisiteye yol açtığını görmüştür. Yaptıkları bu çalışmada düşük serum paraoksanaz 1 aktivitesine sahip olmanın organofosfatlı bileşiklerin akut etkilerine karşı duyarlılığı arttırdığını ortaya koymuşlardır. Son zamanlarda gelişen protein mühendisliği yöntemleri ile paraoksanaz 1'in bazı amino asitlerinde değişiklikler yapıp, paraoksanaz 1 çeşitlerinin bakteri sistemlerinde yeterli miktarda ifade edilebileceğini ve bazı organofosfatlara karşı enzim aktivitesinde artışlar sağlayabileceğini ön görmüşlerdir.

Chang *et al.* (2010), yaptıkları çalışmada organik solventler (N-dimetylformamide ve Toluen) ve gürültüye maruz kalan sentetik deri fabrikası çalışanlarında bu maddelerin kan basıncı üzerine etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, hipertansiyon prevalansını en fazla olarak organik solventlerle gürültüye beraber maruz kalan işçilerde bulmuşlardır. Organik solvent maruziyeti de ikinci en fazla prevalansa sahip grup olarak bulunmuştur.

Win-shwe *et al.* (2012) yaptıkları rat çalışmasında gelişme evresinde Toluen'in toksisitesini belirlemek için gebeliklerinin 14. haftasında, doğum sonrası 2. ve 8. günde olan farelerde bir araştırma yapmışlardır. 50 ppm Toluene maruz bırakılan farelerde, sinir büyüme faktörü (NGF) ve tümör nekroz faktörü (TNF) - α mRNA düzeylerinde belirgin olarak artmış oranlar göstermiştir. Bu çalışma sonuçları, doğum sonrası geç

dönem sırasında düşük seviyedeki Toluen maruziyetinin, farelerin hipokampusunda TLR4'e bağlı NF- κ B yolu yoluyla nöroinflamatuvar mediyatörleri indükleyebileceğini göstermişlerdir.

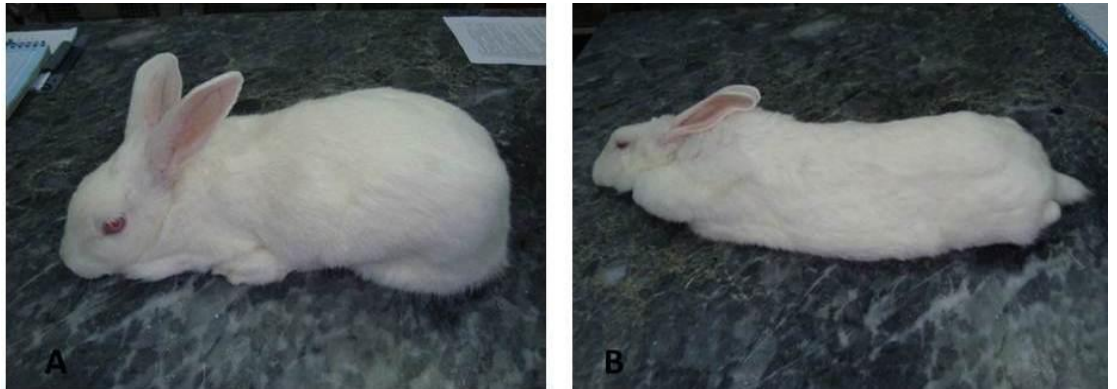
Juliana and Seth (2012) bir vaka çalışmasında Toluen inhalasyonunun, elektrolit ve asit-baz bozulmalarıyla sonuçlanabileceğini ve açıklanamayan hipokalemi ve normal anyon boşluğu metabolik asidozu olan genç hastaların ayırıcı tanılarında düşünülmesi gerektiğini söylemişlerdir. Bu vakada anormallikleri göstermek ve ekstremitte güçsüzlüğünün nedenlerini değerlendirirken laboratuvar bulguları olamayan vakalarda acil hekimleri arasında farkındalığı artırmayı amaçlamışlardır.

Yücesan *et al.* (2013) organofosfat türü Toluen içeren pestisitlerin, kronik maruziyetinin olduğu tarım ve ilaçlama şirketlerinde ki işçiler ile pestisit kaynaklı zehirlenme görülen hastaların kolinesteraz seviyeleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmalarında 1136 deneğin 367' sini ilaçlama sektöründe, 769' unu ise zehirlenme tanısı konan kişiler oluşturmuştur. Zehirlenenlerin 222'sinde serum kolinesteraz enzim seviyesinin düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Bu kişilerin 119'unun kadın olduğu görülürken en sık görülen gruptakilerin 56'sını ve 10-19 yaş grubunu oluşturmuştur. İlaçlama sektöründen gelen deneklerin 347'sinin değerlerinin normal sınırlarda olduğu tespit edilmiştir. İlaçlama işçilerinin sadece 20'sinde kolinesteraz enzim seviyeleri zehirlenme sınırında saptamışlardır. Kolinesteraz enzim düzeyi düşük olan işçilerin çoğunun 30-39 yaş grubunda bulunduğunu görmüşlerdir.

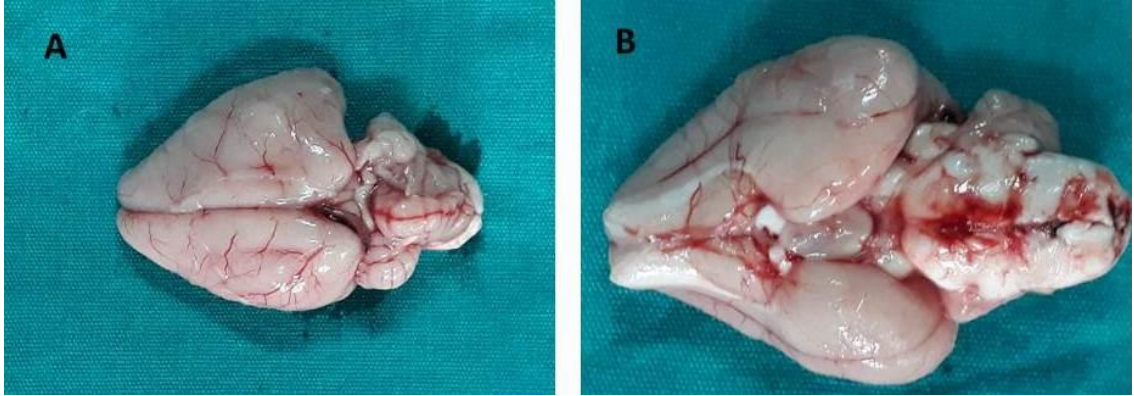
3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Deneysel Tıp hayvan deneyleri yerel etik kurulu tarafında alınan (HADYEK-51) karar ile çalışmaya başlanmıştır. Bu çalışmada Gaziosmanpaşa Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırmaları Laboratuvarlarından temin edilen bir tanesi yaklaşık 4-6 kg ağırlığında toplam 17 erkek New Zeland cinsi tavşan (*Oryctolagus cuniculus*) kullanılmıştır. Deney hayvanları Gaziosmanpaşa üniversitesi DETAB laboratuvarlarında steril ameliyathanelerinden birinde bulundukları kafeslerden alınarak tüm hayvanlara aynı şartları sağlayacak şekilde deney protokolü başlatılmıştır. Deney hayvanları iki ana gruba ayrıldı. Birinci gruptaki 10 adet deney hayvanına Toluen (Sigma-Aldrich Toluen %99,9 solution ırma) verilip deney grubu olarak adlandırılmıştır. İkinci gruptaki hayvanlar ise her hangi bir işleme maruz bırakılmayan sayıları 7 adet olan kontrol grubu olarak adlandırılmıştır. Toluen grubundaki deneklere tek doz 876 mg/kg intraperitoneal (ip) Toluen verilmiştir. Bu doz miktarı belirlenirken OEHHA (1999) verileri kullanılmıştır. Deney hayvanları doz verildikten 3 saat sonra ketamin ve xylazin (Rompunenj; Bayer Turk Chemistry Industry. Ltd. Corp., Istanbul, Turkey) anestezisi altında bazal kan alınarak eksanguinasyon ile öldürüldü. Alınan kanlar santrifüj edildikten sonra serumları ayrılarak -80°C’de saklandı. Beyin dokuları çıkarılarak bir kısmı bovin solüsyonu içerisine alındı (Şekil 3.1. ve 3.2).



Şekil 3.1. Deney protokolünde kullanılan deneklerin örnek gösterimi



Şekil 3.2. Deney hayvanlarından çıkarılan beyin dokusunun örnek gösterimi

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Periyodik asit (Merck, Deutsch)

Sodyum tiyosülfat pentahidrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

Tiyobarbütirik asit (Merck, Deutsch)

Bütan-1-ol (Carlo Erba)

Hidroklorik asit (Carlo Erba)

N-asetilnöraminik asit (Sigma, USA)

Sodyum hidroksit (Merck, Deutsch)

Trikloroasetik asit (Sigma, USA)

Kadmiyum granülleri (Merck, Deutsch)

Glisin (Sigma, USA)

Çinko sülfat (Sigma, USA)

Sülfanilamid (Sigma, USA)

Sodyum nitrit (Sigma, USA)

Sodyum klorür (Sigma, USA)

Etilendiamin tetra asetik asit

Monosodyum fosfat dihidrat (Merck, Deutsch)

Disodyum fosfat dihidrat (Merck, Deutsch)

Sodyum sitrat (Merck, Deutsch)

5,5-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit (Sigma, USA)

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Spektrofotometre (UV-160-A, Shimadzu, China)

Elektronik terazi (HR120, AND)

Vorteks (NM 110, Nüve, Türkiye)

Santrifüj (CN 180, Nüve, Türkiye)

Santrifüj (Nüve, Türkiye)

Derin dondurucu (Vestel, Türkiye)

Otomatik pipetler

3.2. Yöntem

3.2.1. Doku takip işlemleri ve dokuların bloklanması

Deney protokolü gerçekleştirildikten sonra bovin solusyonuna alınan beyin dokuları (ortalama 19-21 gram arası) histolojik işlemlerin gerçekleştirilmesi için 7 gün boyunca bu solusyonda bekletilmiş ve 7. gün sonunda tüm dokular 24 saat boyunca akansuda bekletilmiştir. Böylece dokularda bulunan bovin solusyonu dokulardan uzaklaştırıldı. Akansuda bekleme süresi bittikten sonra dokular sırasıyla 12 saat %70, 12 saat %80, 6 saat %90 ve 6 saat %100'lük alkol serisine alınmış ve dokularda bulunan su dokulardan uzaklaştırılmıştır. Alkol serilerinden sonra 15'er dakikalık üç ayrı xylene serisi uygulaması yapılarak dokulardan alkol tamamen uzaklaştırılmıştır. Daha sonrasında ise birer saatlik üç ayrı sıcak parafin serisinden geçirilen dokulardan bu işlem sayesinde xylene uzaklaştırılmıştır. Son olarak 60 derece sabit sıcaklıkta temiz parafin kullanılarak dokular L blok demirler kullanılarak parafin bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir (Kanter 2011a).

3.2.2. Histopatolojik yöntemler

Deney hayvanlarından alınan beyin dokularının rutin doku takipleri yapılarak parafin bloklara gömülmesi sağlandıktan sonra bloklardan mikrotom yardımı ile 5µm

kalınlığında kesitler alındı ve aşağıda özetlenen yöntem ile boyamaları gerçekleştirildi. Boyanan preperatlar Olympus BX-50 araştırma mikroskobunda incelendi ve Leica DM750 dijital kamera destekli araştırma mikroskobunda (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi ve Histolojisi Araştırma Laboratuvarı) preperatların fotoğrafları çekildi

3.2.2.a. Hematoksilen-eozin metodu

1. Ksilol I'de (20 dak.) bekletildi.
2. Ksilol II ve Ksilol III' de (10 dak.) bekletildi.
3. %80'lik Alkolde (10 dak.) bekletildi.
4. İki ayrı %96'lık Alkol serisinde (5 dak.) bekletildi.
5. Kesitler çeşme suyunda yıkandı.
6. Hematoksilen boyasında 1 dak. bekletildi.
7. Asit-Alkol karışımına batırılıp çıkarıldı.
8. Eozin solüsyonunda (1 dak.) bekletildi.
9. Suda (1 dak.) yıkandı.
10. %80'lik Alkolde (10 dak.) bekletildi.
11. İki ayrı %96'lık Alkol serisinde (10 dak.) bekletildi.
12. Ksilol I, Ksilol II ve Ksilol III serilerinde (20 dak.) bekletildi.
13. Entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.2.b. Bax ve Kaspaz-3 için boyama metodu

Doku takipleri yapıp parafin bloklara gömülen doku örneklerinden 5 µm kalınlığında histopatolojik kesitler alınmış ve immunohistokimyasal boyama için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Bax ve Kaspaz-3 için immun boyama tekniği

Alınan kesitler, bir gece 60°C bekletilir.
Alınan kesitler soğuduktan sonra iki kere 30 dk ksilende tutulur.
Alınan kesitler sırasıyla; %96, %80, %70 ve %60'lık etil alkolde ikişer dk tutulur.
Kesitler saf suda 10 dk yıkanır.
Kesitlerin çevreleri pabpen ile çizilir.
PBS solüsyonu ile üç kez beş dk yıkanır.
Kullanılacak antikora has antijen ile “retrival” yöntemi uygulanır.
PBS solüsyonu ile üç kez beş dk yıkanır
Kesitlere beş dakika endojen peroksit blokajı yapılır (%3 H ₂ O ₂).
PBS solüsyonu ile üç kez beş dk yıkanır
Kesitler üzerine Blok solüsyonu damlatılarak 60 dakika beklenir.
Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırılarak dilüsyonu yapılmış 50 µl primer antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 60 dakika 20 derecede bekletilir.
PBS solüsyonu ile üç kez beş dk yıkanır
Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda yarım saat oda ısısında bekletilir.
PBS solüsyonu ile üç kez beş dk yıkanır
Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda yarım saat 20 derecede bekletilir.
PBS solüsyonu ile üç kez beş dk yıkanır
DAB solüsyonu damlatılır, on- onbeş dakika kapalı nemli kutuda bekletilir.
PBS solüsyonu ile üç kez beş dk yıkanır
Saf su ile yıkanır.
Hematoksilen ile çekirdek boyanması kontrol edilerek bir-beş dakika boyama yapılır.
Saf su ile yıkanır.
Kesitler %70, %80, %96 ve %100'lük etil alkolde birer dakika bekletilir.
Kesitler kuruduktan sonra iki kez beşer dk. ksilende şeffaflştırılır.
Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kesitler kapatılır.

Proapoptotik Bax proteini;

Bcl-2 yani antiapoptotik protein ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli grup olmakta ve bunlardan Bax proteininin apoptotik aktivitenin öncüleri olduğu görülmektedir (Lu *et al.* 2000). Sağlıklı hücrelerde Bax proteini sitozolde bulunmaktadır. Apoptotik uyarım ile sitozolik Bax proteini hücre mitokondrisine yönelmektedir. Bazı değişimler sonucunda Bax proteininin hidrofobik olan C terminal ucu açığı çıkmakta ve sitokrom-c salınımına neden olmaktadır. Kalpain tarafından Bax proteininin salınımı ile uyarılmasıyla sitokrom-c açığı çıkmaktadır. Apoptozis sırasında Bax proteini değişime uğramakta ve N terminal ucu açığa çıkmaktadır (Miyashita *et al.* 1994). Bax proteininin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar vermektedir. Bax proteini etkisini diğer bir protein ailesi olan kaspazlar üzerinden gerçekleştirmektedir (Newton and Starsser 1998).

Kaspaz-3 proteini;

Hücre organellerinden mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c' yi muhteviyatında bulundurmaktadır. Mitokondrilerdeki stres durumlarında serbestleşen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde Kaspaz-3 aktivasyonu için büyük bir önem arz etmektedir (Crowe *et al.* 1997; Li *et al.* 2000). Bu yolla mitokondrinin kontrol ettiği apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır. Ko-faktör nükleotid olarak ATP ile aktifleştirilen Sitokrom-c ve Apaf-1 birleşerek prokaspaz-9' u aktive etmektedir. Aktif Kaspaz-9 da Kaspaz-3' ü aktifleştirmek suretiyle diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlamaktadır (Hu *et al.* 1999; Liu *et al.* 1997; Krajewski *et al.* 1999; Keane *et al.* 2001). Normal bir hücrenin mitokondrisinin dış membranında Bcl-2 proteini yer almaktadır. Bcl-2, Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlamaktadır. Bcl-2' nin sebep olduğu internal hasarla mitokondride çatlaklar oluşturmak suretiyle Apaf-1 ve Sitokrom-c salınımına neden olmaktadır (Newton and Strasser 1998; Choi *et al.* 2001). Bu iki protein Kaspaz-9 molekülüne bağlanmaktadır. Proteolitik bu aktivitenin kaskadı kan pıhtılaşması ve

kompleman aktivasyonuna benzemektedir. Burada terminal uç Kaspaz-3 olmaktadır. Bu proteolitik aktivite sayesinde sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA' nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanmaktadır (Kerr 1992; Choi *et al.* 2001),

3.2.2.c. Histopatolojik, immunohistokimyasal analiz ve değerlendirme

Preperatların boyama işlemleri bittikten sonra kontrol (n=7) ve Toluen (n=10) grubunda bulunan deney hayvanlarından hematoxilen eosin, Kristal viyole, BAX immunreaktivitesi ve Kaspaz-3 immunreaktivitesini göstermek için her bir parametre ve her bir deney hayvanı için ikişer adet preperat boyaması yapıldı. Her preperatta prefrontal korteks, entorinal korteks, hipotalamus, hipokampus ve substantia nigra bölümleri ışık mikroskobu altında incelenip değişiklikler gözlemlendikten sonra uygun alanlar fotograflanmıştır. Bu durum histopatolojik parametreler ve immunohistokimyasal parametreler için ayrı ayrı yapıldı.

Semikantitatif Histopatolojik analizlerin skorlamasının yapılması için tabloda gösterilen değerlendirme parametreleri kullanılmıştır. Kontrol ve Toluen gruplarında; Prefrontal Korteks, Entorinal Korteks, Hipotalamus, Hipokampus ve Substantia Nigra bölgelerinde her hayvan ayrı ayrı değerlendirilip skorlanmıştır (Çizelge 3.2). Tüm hayvanlar ayrı ayrı değerlendirildikten sonra (bölgesel olarak) grubun ortalama skoru bulunmuştur (Kanter 2011b).

Çizelge 3.2. Hematoksilen-Eozin boyama ile histopatolojik semikantitatif analiz değerlendirme parametreleri

Skor	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	Inflamatuvar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre
0	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
1	az	az	az	az	3 ten az damar	az
2	Orta derecede	Orta derecede	Orta derece	Orta derece	4-8 damar	Orta derece
3	Bol miktarda	Bol miktarda	Bol miktarda	Bol miktarda	8 den fazla damar	Bol miktarda

Bax ve Kaspaz-3 proteini imminohistokimyasal boyamaları immunreaktivite ve Senil plak (Amiloid plak) oluşumunu göstermek için yapılan semikantitatif analizlerinin değerlendirilmesi tablodaki parametrelere göre yapılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Bax, Kaspaz-3 ve Kristal Viyolet boyamaları semikantitatif analiz değerlendirme parametreleri

Skor Bölgeler	0 +	1 +	2 +	3 +
Prefrontal Korteks	Boyama Olmayan	Zayıf ama saptanabilir boyama	Orta veya belirgin boyama	Yoğun boyama
Entorinal Korteks	Boyama Olmayan	Zayıf ama saptanabilir boyama	Orta veya belirgin boyama	Yoğun boyama
Hipotalamus	Boyama Olmayan	Zayıf ama saptanabilir boyama	Orta veya belirgin boyama	Yoğun boyama
Hipokampus	Boyama Olmayan	Zayıf ama saptanabilir boyama	Orta veya belirgin boyama	Yoğun boyama
Substantia Nigra	Boyama Olmayan	Zayıf ama saptanabilir boyama	Orta veya belirgin boyama	Yoğun boyama

3.2.4. Biyokimyasal yöntemler

Deney hayvanlarından alınan serum ve plazmalardan NGF, TNF alfa, Dopamin ve GFAP seviyelerinin tespiti için ELISA yöntemi ile (enzym-linked immunosorbant

assay) (ELISA), (Abbott AXSYM system, USA), Na ve K serumdan kemoluminisans yöntemi ile otoanalizörde (MINDRAY Perfect Plus 400, CHINA) ve MDA, GSH ve NO serbest radikallerinin seviyelerinin tayini için spektrofotometrik yöntem (UV-160-A, Shimadzu) kullanılmıştır.

3.2.4.a. ELISA

ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay testinin İngilizce kısaltmasıdır. Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemidir. Antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aramak mümkündür.

Tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiş ölçümler oda sıcaklığında yapılmıştır. Uygun kuyucuklara 50 µL standard veya numune eklenmiş, kuyucuklar kaplanmış ve 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 200 µL Wash Buffer ile 5 kez yıkanmış, plate ters çevrilmiş ve sıvı kısmı dökmek için kağıt bir havluya 4-5 kez vurulmuştur.

Bu itibarla her bir kuyucuğa 50 µL NGF, TNF-alpha, Dopamine ve GFAP Antikoru eklenmiş ve 1 saat inkübasyona bırakılmıştır (Bu işlemler tüm parametreler için ayrı ayrı yapılmıştır).

200 µL Wash Buffer ile 5 kez yıkanmış, her bir kuyucuğa 50 µL Streptavidin-Peroksidaz Conjugate eklenmiş ve 30 dakika inkübe edilmiştir.

200 µL Wash Buffer ile 5 kez yıkanmıştır.

Her bir kuyucuğa 50 µL Kromojen substrat eklenmiş ve 8 dakika inkübe edilmiştir.

Her bir kuyucuğa 50 µL Stop Solüsyon eklenmiş ve renk maviden sarıya dönüşmüştür.

450 nm dalga boyunda bir mikropate okuyucu üzerinde absorbanlar okunmuştur.

3.2.4.b. Serum örneklerinde MDA tayini

Lipit peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metoduna göre yapılmıştır (Esterbauer 1990) ve sonuçlar nmol/gr doku proteini olarak ifade edilmiştir. Numune ve kör tüpleri hazırlanıp vortex ile karıştırıldıktan sonra yarım saat kaynar su banyosunda kapatılıp bekletilmiştir. Sonrasında akan su altında soğutulmasının ardından 2mL n-bütanol eklenir ve karıştırılmıştır. 3000 rpm devirde on dakika santrifüj edildikten sonra 532 nm’de n-bütanola karşı okunmuştur (Yagi 1984).

3.2.4.c. Serum örneklerinde nitrik oksit tayini

Vücudumuzda endojen olarak ortaya çıkan nitrik oksit yoğunluğu toplam nitrit ve nitrat türünden hesaplanmıştır. Üretilen nitrik oksit önce nitrite sonra nitrate dönüştürülmüştür. Ortamdaki proteinler deproteinizasyon işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonrasında nitrit ve nitrat ölçümleri yapılmıştır (Somogy 1930). Deproteinizasyon için 500 mL numunenin üzerine 2 mL çinko sülfat eklenip vortex yardımıyla karıştırılmıştır. Karışıma 2,5 mL sodium hidroksit çözeltisi ilave edilmiş ve tekrar vortex ile karıştırılmıştır. 3500 rpm’de on dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen numune supernatant olarak kullanılmıştır. Bakır ile kaplanmış kadmiyum granülleri üzerine 1mL glisin tamponu eklendikten sonra süpernatanttan 1mL ve 2mL de distile su ilave edilmiştir. 90 dakika inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda 2mL alınmış ve üzerine 2,5mL distile su ve 2mL renklendirici ilave edildikten sonra oda ısısında 60 dakika inkübasyona bırakılmış ve 545 nm’de köre karşı okutulmuştur (Fairbanks *et al.* 1999).

3.2.4.d. Serum örneklerinde GSH tayini

Eritrositlerin hemen hemen hepsinde non-protein sülfidril gruplarında indirgenmiş GSH bulunmaktadır. Sarı renkli anyon oluşturan 5,5’ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit redükte

edilmiş disülfid bileşimini oluşturmaktadır. Glutasyon madde miktarı bu sarı bileşimin 412 nm’de okutulması ile değerlendirilmektedir. Numune tüpüne 0,45 mL deiyonize su, eritrositlerin hemolizi için 0,05 mL anti-koagulanlı tam kan ve 0,75 mL reaktif I konulurken kör tüpüne de 0,2 mL deiyonize su ve 0,3 mL reaktif I konularak vortekslenmektedir. Oda ısısında 5 dakika beklenip numune tüpünü 3000 rpm devirde on dakika santrifüj edilmektedir. Süpernatanttan 0,5 mL alınıp ve kör ve süpernatantın bulunduğu tüpe 2 mL reaktif II ilave edilip vortekslenmektedir. Kör ve numne tüplerine 0,25 mL reaktif III eklenip beklemeden distile suya karşı 412 nm dalga boyunda ölçülmektedir (Beutler *et al.* 1963).

3.2.5. İstatistiksel analiz

Normallik denetimi Shapiro-Wilk testi ile gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Sayısal veriler, aritmetik ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 20.0 bilgisayar paket programı (SPSS Inc. Software Chicago, IL, USA) kullanıldı. Gruplar arası fark Kruskal Wallis testi ile gruplar arası farkın anlamlılığı ise Mann Whitney *U* testi ile değerlendirildi. Grupların karşılaştırılmasında bağımsız iki örnek T testi kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Makroskopik Bulgular

Deneyisel araştırmamızda Toluen verdiğimiz tavşanlarda kontrol grubundan farklı bir şekilde makroskopik olarak pupillerde büyüme, kusma, bazı hayvanların ağız ve burun bölgelerinde kanama ve ayakta dengede duramama gibi postür bozuklukları gözlemlenmiştir.

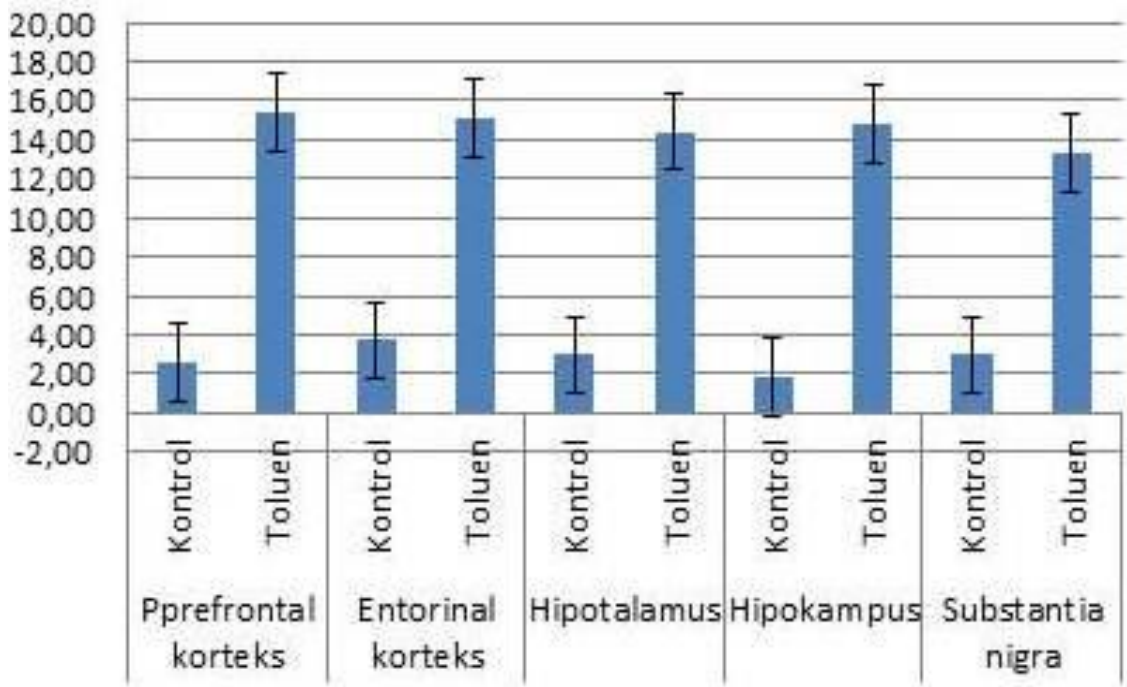
4.2. Histopatolojik Bulgular

Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar incelendiğinde (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1), kontrol grubunda beyin dokularının korteks morfolojisi ve nöronal yapısının normal olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunun yüksek büyütmesinde nöropil bozulmamış damarlarla normal ve homojen görüldü. Çekirdekli nöron cisimleri normaldi. Toluen verilen tavşanlarda prefrontal ve entorinal beyin korteksinde fokal vakuoler dejenerasyon (abseleşmeler), gliosis, perivasküler demiyelinizasyon, çok sayıda piknotik hücre ve nekroz alanları izlendi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5). Toluen grubunda kontrol grubuna oranla prefrontal korteks, entorinal korteks ve hippocampus alanlarında belirgin derecede kan damarlarında aşırı genişlemeler ve hücreler arasında kompenzasyonun ciddi ölçüde dejenerasyona uğradığı hücre sınırlarının neredeyse dağıldığı görülmektedir (Şekil 4.6 ve 4.7). Toluen grubunda piamater de ayrılmalar ve kanamalar gözlemlendi. Nöron cisimciklerinde küçülme ve dejenerasyon ve nöropilin vakuolizasyonu belirlendi. Oligodendrosit hücrelerinde Toluen grubunda hücre çekirdeklerinde anormal şekil bozuklukları görülmektedir. Hippokampus bölgesindeki sıralı nöronların gövdelerinde Toluene maruz kalan grupta nöron gövdeleri kontrol grubuna kıyasla yapısal olarak daha belirgin bozunmalara uğramıştır (Şekil 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11).

Çizelge 4.1. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının bakılan tüm beyin bölgelerinde ki ortalama skorların toplamı ve istatistiki analiz

Beyinde Bakılan Bölge	Grup	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	İnflamatuvar hücre	Kan Daman Hasan	Piknotik Hücre	Toplam	İstatistik
Pprefrontal korteks	Kontrol	0,43	0,29	0,43	0,57	0,43	0,43	2,57	p<0,01
	Toluen	2,60	2,70	2,20	2,60	2,30	3,00	15,40	
Entorinal korteks	Kontrol	0,57	0,43	0,71	0,71	0,57	0,71	3,71	p<0,01
	Toluen	2,50	2,70	2,20	2,60	2,40	2,70	15,10	
Hipotalamus	Kontrol	0,71	0,57	0,57	0,57	0,29	0,29	3,00	p<0,01
	Toluen	2,50	2,50	2,10	2,40	2,20	2,70	14,40	
Hipokampus	Kontrol	0,29	0,14	0,57	0,29	0,29	0,29	1,86	p<0,01
	Toluen	2,40	2,50	2,50	2,60	2,10	2,70	14,80	
Substantia nigra	Kontrol	0,57	0,57	0,43	0,29	0,29	0,86	3,00	p<0,01
	Toluen	2,50	2,10	1,90	2,60	1,90	2,30	13,30	

Histopatolojik Doku Hasarı



Şekil 4.1. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının bakılan tüm beyin bölgelerinde ki skorların grafik gösterimi

Çizelge 4.2. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının prefrontal korteks ve entorinal kortekste ki gösterimi

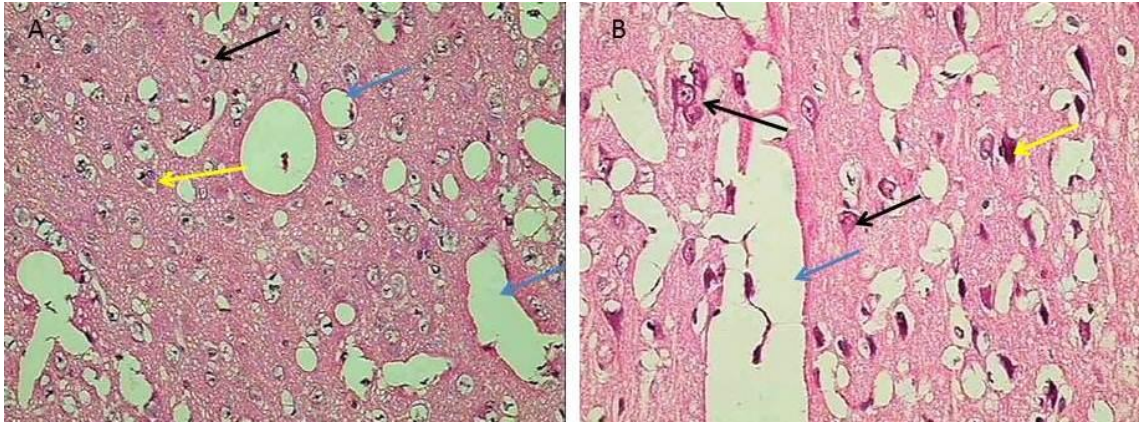
Prefrontal Korteks Kontrol Grubu							Entorinal Korteks Kontrol Grubu						
Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	Inflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre	Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	Inflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre
1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
2	1	0	0	1	0	0	2	0	0	1	1	0	1
3	0	0	0	0	1	0	3	1	1	1	0	1	1
4	0	1	0	0	1	1	4	1	0	0	1	1	1
5	1	1	1	1	0	1	5	0	1	1	0	0	1
6	1	0	1	1	1	1	6	1	0	1	1	1	1
7	0	0	1	0	0	0	7	0	1	1	1	1	0
8							8						
9							9						
10							10						
Toplam Skor	3	2	3	4	3	3	Toplam Skor	4	3	5	5	4	5
Ortalama	0,43	0,29	0,43	0,57	0,43	0,43	Ortalama	0,57	0,43	0,71	0,71	0,57	0,71
Prefrontal Korteks Toluen Grubu							Entorinal Korteks Toluen Grubu						
Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	Inflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre	Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	Inflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre
1	2	3	2	3	2	3	1	2	3	3	3	3	3
2	3	3	2	3	2	3	2	3	3	2	2	2	3
3	3	3	1	3	2	3	3	2	3	2	3	3	3
4	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	2	2	2
5	2	2	3	2	3	3	5	2	3	1	2	3	3
6	2	3	2	2	2	3	6	3	2	2	3	2	3
7	2	3	2	2	1	3	7	2	2	3	3	2	2
8	3	3	1	3	3	3	8	2	3	2	2	3	3
9	3	2	3	2	3	3	9	3	3	3	3	2	2
10	3	2	3	3	2	3	10	3	2	1	3	2	3
Toplam Skor	26	27	22	26	23	30	Toplam Skor	25	27	22	26	24	27
Ortalama	2,6	2,7	2,2	2,6	2,3	3	Ortalama	2,5	2,7	2,2	2,6	2,4	2,7

Çizelge 4.3. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının hipotalamus ve hipokampusu ki gösterimi

Hipotalamus Kontrol Grubu							Hipokampus Kontrol Grubu						
Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	Inflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre	Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	Inflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre
1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
2	1	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0	3	1	0	0	0	1	0
4	0	1	0	1	1	1	4	0	0	0	0	0	1
5	1	1	1	1	0	0	5	0	1	1	1	0	0
6	1	0	0	0	1	1	6	0	0	1	1	0	1
7	1	1	1	1	0	0	7	0	0	1	0	0	0
8							8						
9							9						
10							10						
Toplam Skor	5	4	4	4	2	2	Toplam Skor	2	1	4	2	2	2
Ortalama	0,71	0,57	0,57	0,57	0,29	0,29	Ortalama	0,29	0,14	0,57	0,29	0,29	0,29
Hipotalamus Toluen Grubu							Hipokampus Toluen Grubu						
Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	Inflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre	Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	Inflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre
1	2	2	2	3	2	3	1	3	3	2	3	2	2
2	2	3	1	3	3	3	2	3	2	3	3	2	3
3	3	3	3	3	2	2	3	2	3	2	2	2	3
4	3	2	2	3	1	3	4	2	2	3	3	3	2
5	3	2	3	1	3	3	5	2	2	3	2	2	3
6	2	3	2	2	2	2	6	2	2	3	3	2	3
7	2	2	1	2	1	3	7	3	3	2	2	2	3
8	3	3	2	2	2	3	8	2	3	2	2	2	3
9	2	3	3	2	3	2	9	2	3	3	3	2	3
10	3	2	2	3	3	3	10	3	2	2	3	2	2
Toplam Skor	25	25	21	24	22	27	Toplam Skor	24	25	25	26	21	27
Ortalama	2,5	2,5	2,1	2,4	2,2	2,7	Ortalama	2,4	2,5	2,5	2,6	2,1	2,7

Çizelge 4.4. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin skorlarının substantia nigra'da ki gösterimi

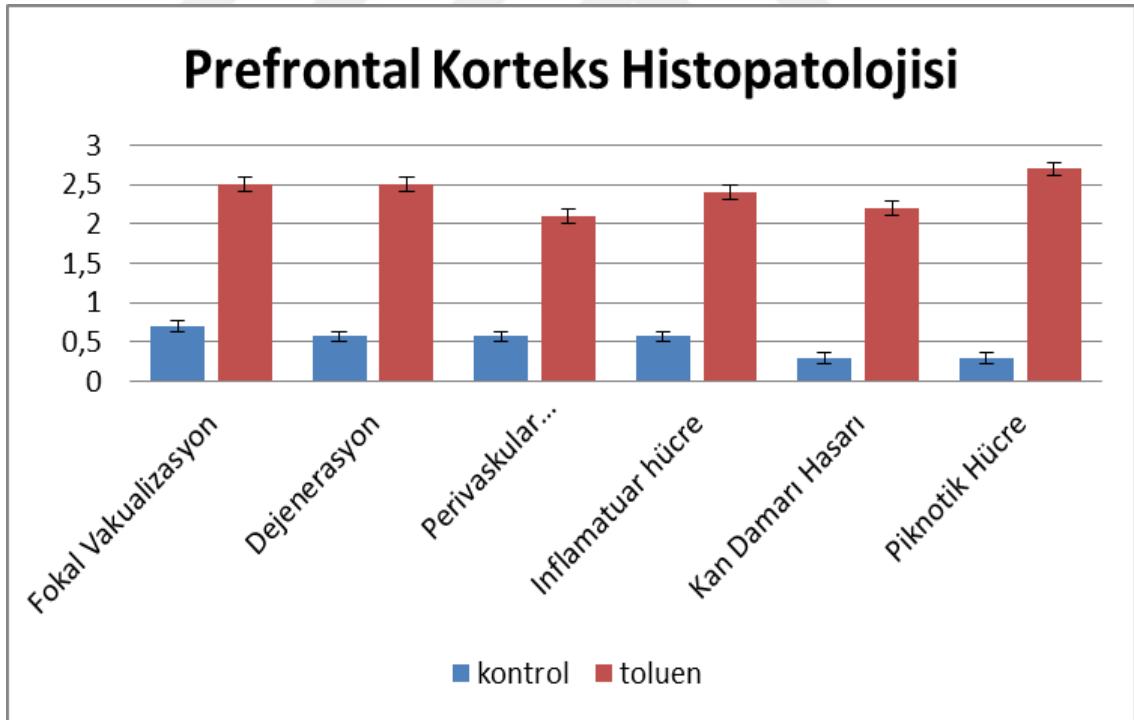
Substantia Nigra Kontrol Grubu						
Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	İnflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre
1	0	0	1	0	0	1
2	0	1	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0	1
4	1	1	1	0	1	1
5	1	1	0	1	0	0
6	1	0	1	1	1	1
7	1	1	0	0	0	1
8						
9						
10						
Toplam Skor	4	4	3	2	2	6
Ortalama	0,57	0,57	0,43	0,29	0,29	0,86
Substantia Nigra Toluen Grubu						
Denek No	Fokal Vakualizasyon	Dejenerasyon	Perivaskular Demiyelinizasyon	İnflamatuar hücre	Kan Damarı Hasarı	Piknotik Hücre
1	3	2	2	3	2	3
2	3	1	2	2	2	3
3	3	2	1	3	2	1
4	2	3	3	2	2	2
5	2	2	1	3	2	3
6	2	2	2	3	2	3
7	2	2	3	2	2	2
8	3	1	2	2	1	3
9	3	3	2	3	2	2
10	2	3	1	3	2	1
Toplam Skor	25	21	19	26	19	23
Ortalama	2,5	2,1	1,9	2,6	1,9	2,3



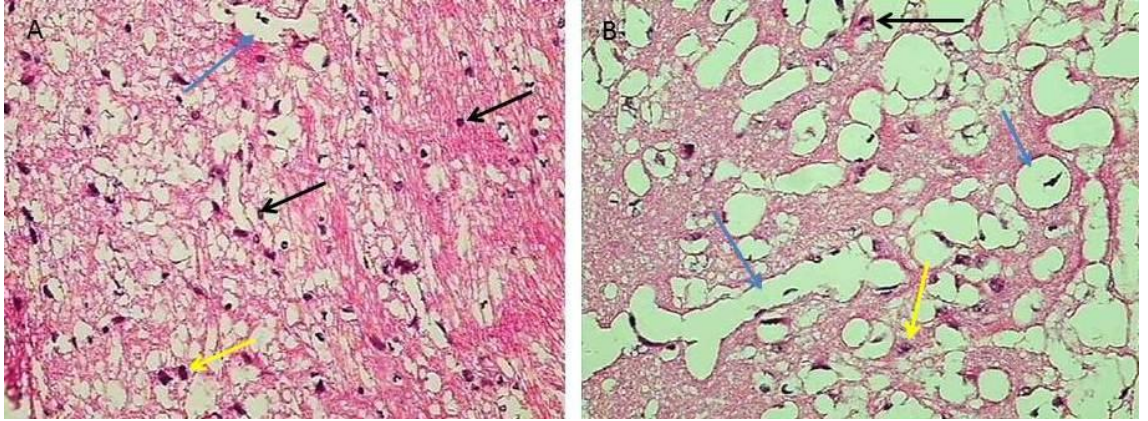
Şekil 4.2. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyama

*E) Kontrol grubu, prefrontal kortek, H&E (x40) F) Toluen grubu, prefrontal kortek, H&E (x40)

(Oklarda gösterilen histomorfolojik değişiklikler; abseleşme(siyah ok), kan damarlarında hasar(mavi ok), hücre sınırlarında belirgin kayıplar ve gliosis(sarı ok))



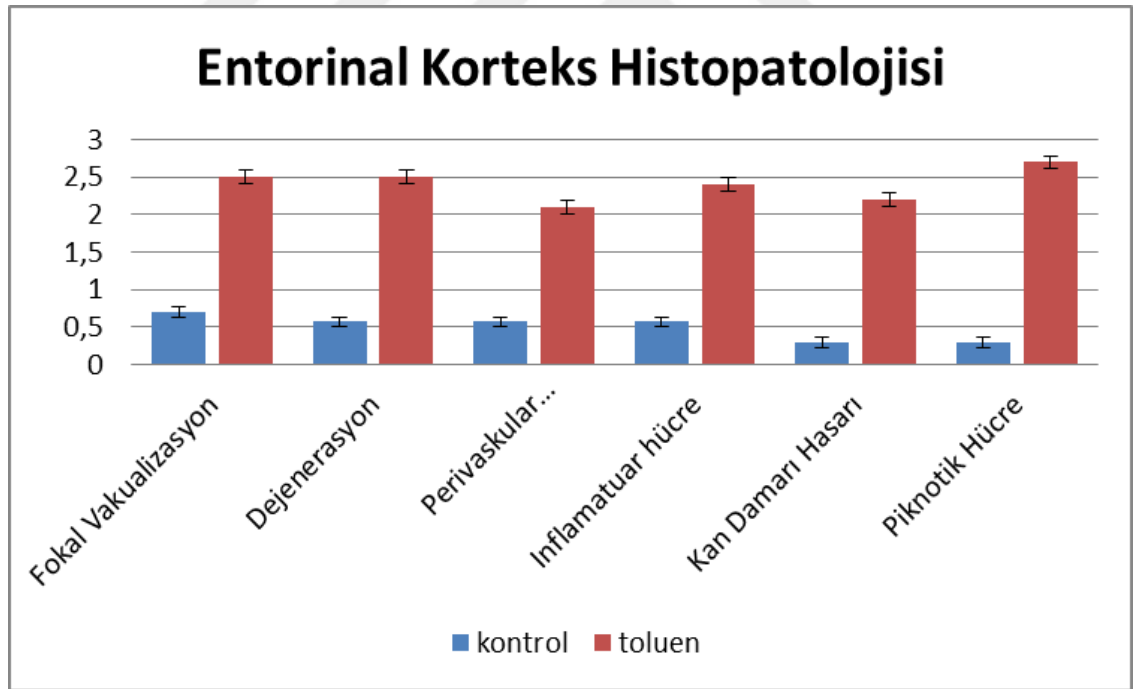
Şekil 4.3. Prefrontal Kortekste ki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi



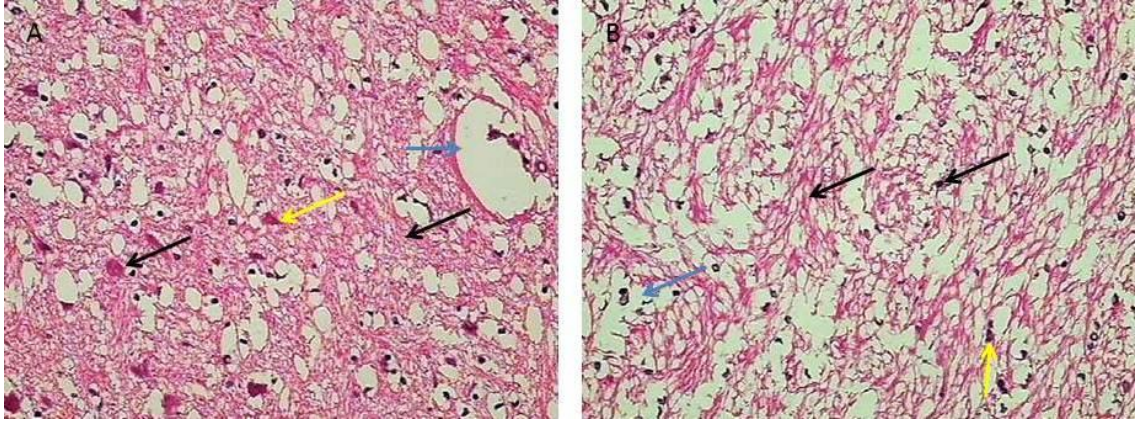
Şekil 4.4. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyama

*A) Kontrol grubu, entorhinal cortex, H&E (x40) B) Toluen grubu, entorhinal cortex, H&E (x40)

(Oklarda gösterilen histomorfolojik değişiklikler; abseleşme(siyah ok), kan damarlarında hasar(mavi ok), gliozis ve hücre sınırlarında belirgin kayıplar(sarı ok))

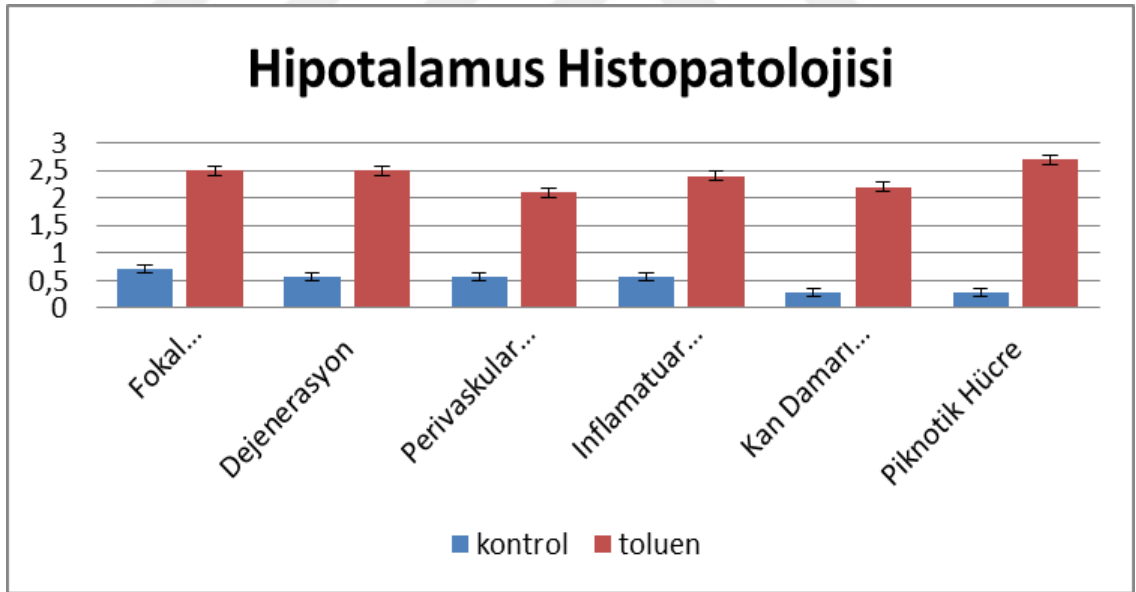


Şekil 4.5. Entorinal Kortekste ki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi

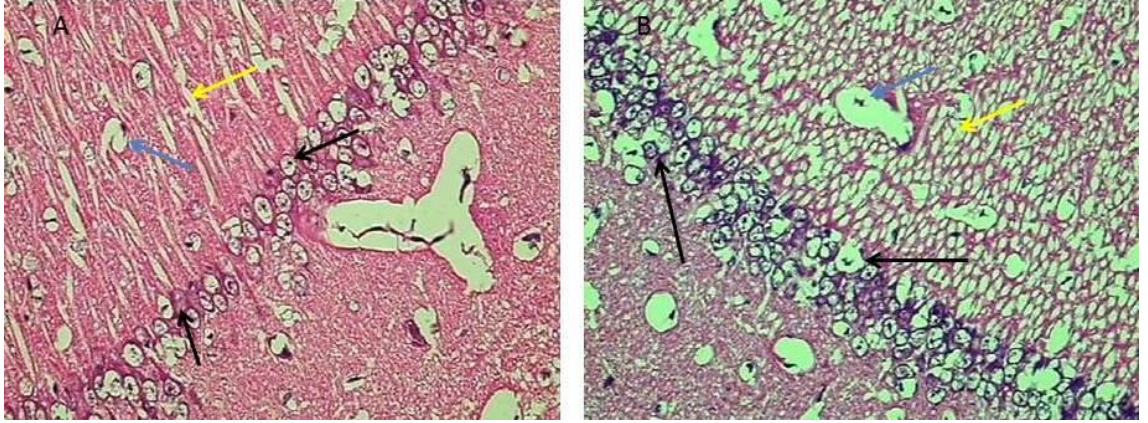


Şekil 4.6. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyanma 40X büyütme

*A) Kontrol Grubu hipotalamus B) Toluen Grubu hipotalamus (Oklarda gösterilen histomorfolojik değişiklikler; abseleşme(sarı ok), kan damarlarında hasar(mavi ok), piknotik hücreler ve hücre sınırlarında belirgin kayıplar(siyah ok))

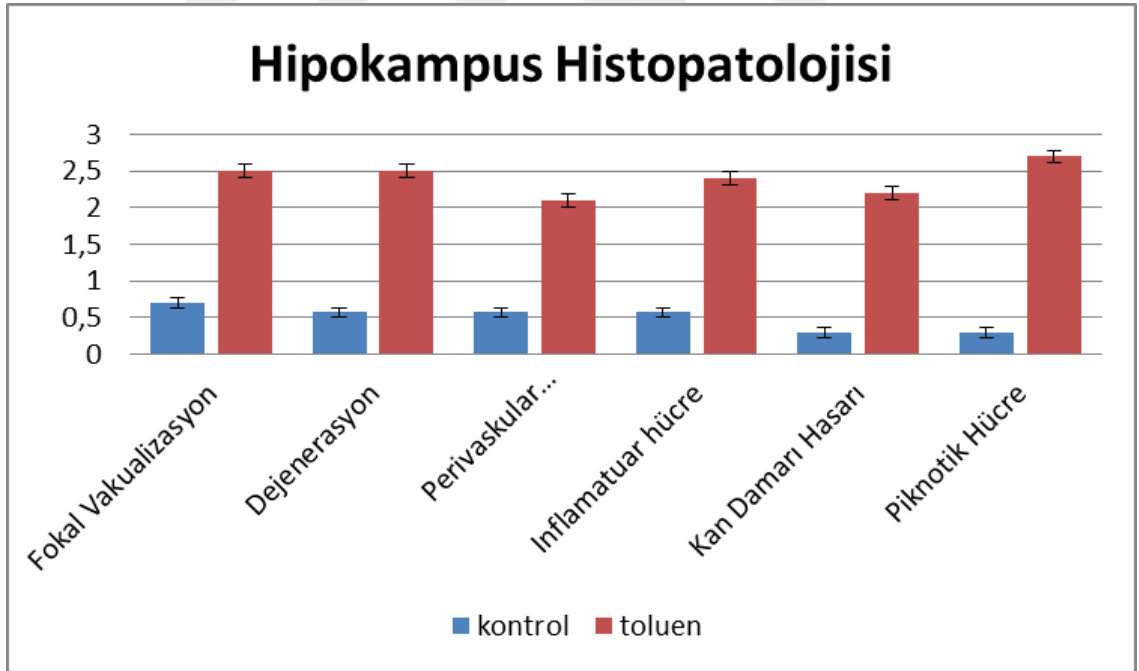


Şekil 4.7. Hipotalamusta ki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi

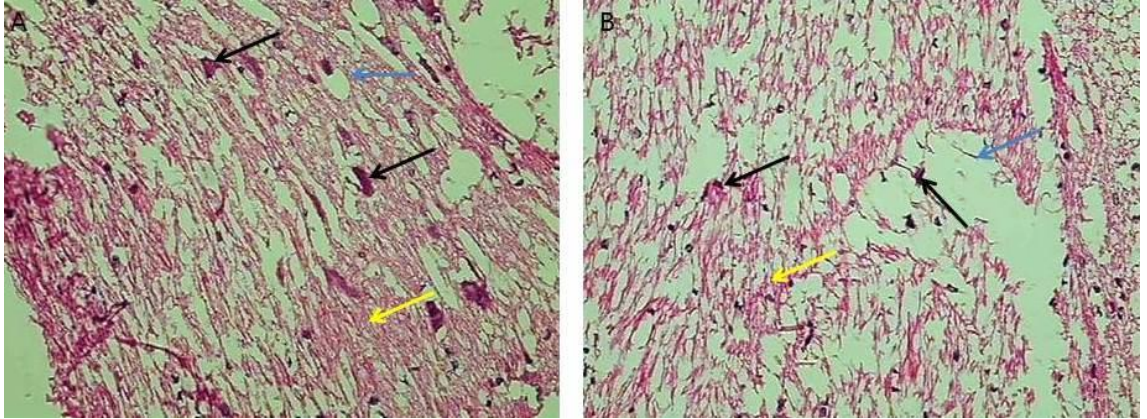


Şekil 4.8. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyama

*C) Kontrol grubu, hippocampal alan, H&E (x40) D) Toluen grubu, hippocampal alan, H&E (x40)
(Oklarda gösterilen histomorfolojik değişiklikler; abseleşme(siyah ok), kan damarlarında hasar(mavi ok), piknotik hücreler(siyah ok), demiyelinizasyon ve hücre sınırlarında belirgin kayıplar(sarı ok))

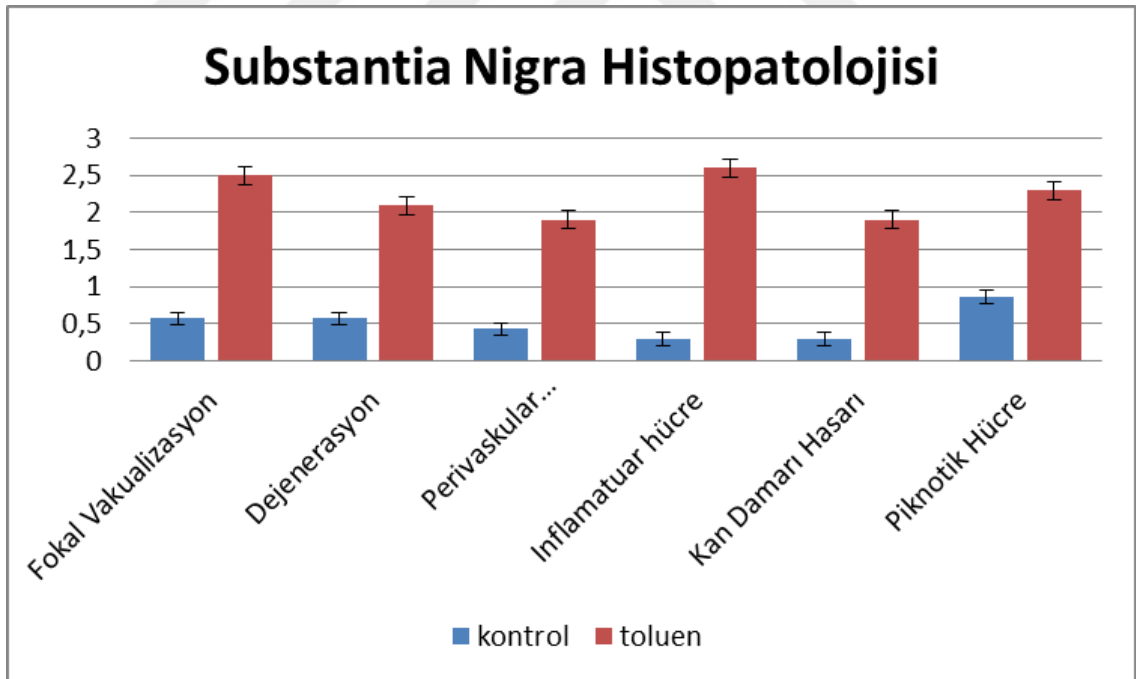


Şekil 4.9. Hipokampusta ki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi



Şekil 4.10. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin gösterimi H&E boyama

*C) Kontrol grubu, substantia nigra, H&E (x40) D) Toluen grubu, substantia nigra, H&E (x40) (Oklarda gösterilen histomorfolojik değişiklikler; abseleşme(siyah ok), kan damarlarında hasar(mavi ok), astrositlerde gliozis(siyah ok), piknotik hücreler(siyah ok), demiyelinizasyon ve hücre sınırlarında belirgin kayıplar(sarı ok))

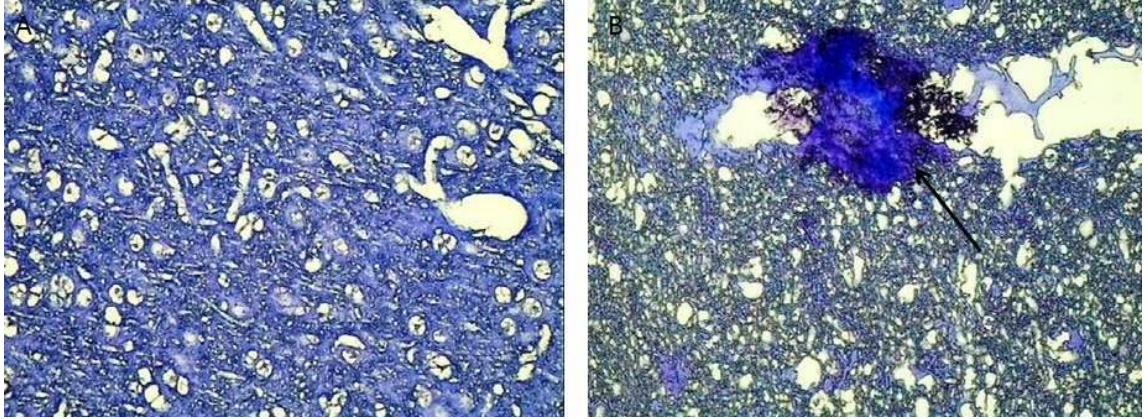


Şekil 4.11. Substantia nigra daki yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı histopatolojik değişimlerin grafiksel gösterimi

Kristal viyole boyama yapılmış kesitler incelendiğinde (Çizelge 4.5) kontrol grubunda spesifik bir boyanma gözlenmedi (Şekil 4.12 ve 4.13). Ancak Toluen grubunda ki kesitler incelendiğinde ise boyanma yoğunluğunda belirgin bir artış olduğu ve Senil plakların büyüklüklerinin ve sayısının arttığı fark edildi. Nöronların hücre gövdelerinin ve uzantılarının etrafında amiloid plakların depolandığı ve bu alanların genişleyerek senil plakları oluşturduğu gözlemlendi. Beyin korteksinin üst tabakasında daha az, alt tabakasında ve substantia nigra alanlarında ise daha yoğun diffüz amiloid plak izlendi (Şekil 4.14 ve 4.15).

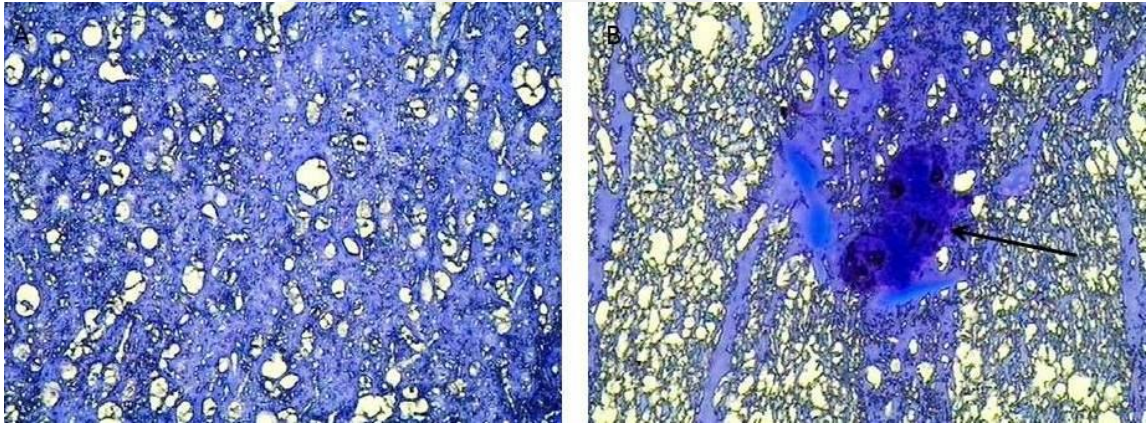
Çizelge 4.5. Kristal Viyolet boyama ile senil plak (amiloid plak) yoğunluk bulguları

Senil Plak Histopatolojisi	Grup						Toplam	
	Kontrol			Toluen				
	Yoğunluk	n	%	n	%	n	%	P
Prefrontal Korteks	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Entorinal Korteks	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Hipotalamus	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Hipokampus	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Substantia Nigra	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	



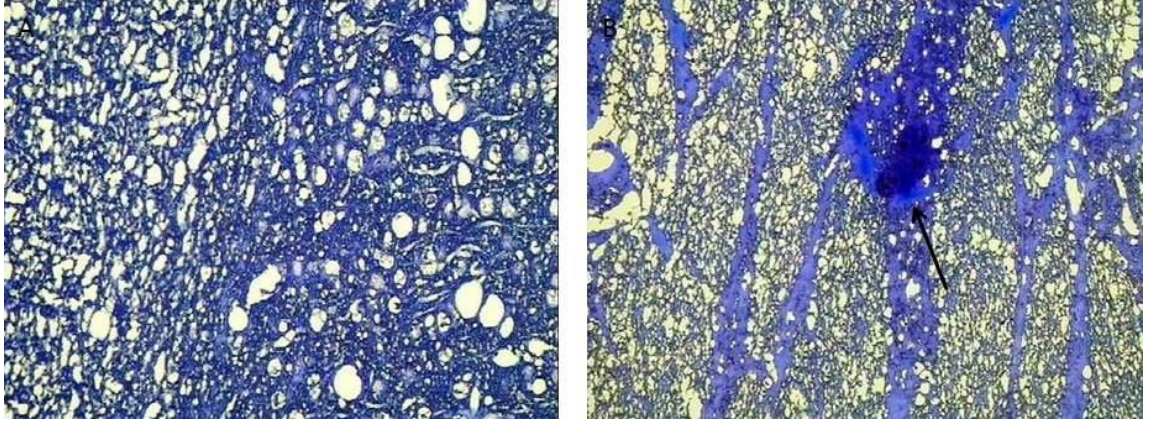
Şekil 4.12. Toluen maruziyeninin Kristal Viyoleto boyanmasında senil ve amiloid plakların oluşumu 40X büyütme

*A) Kontrol Grubu Prefrontal Korteks B) Toluen Grubu Prefrontal Korteks



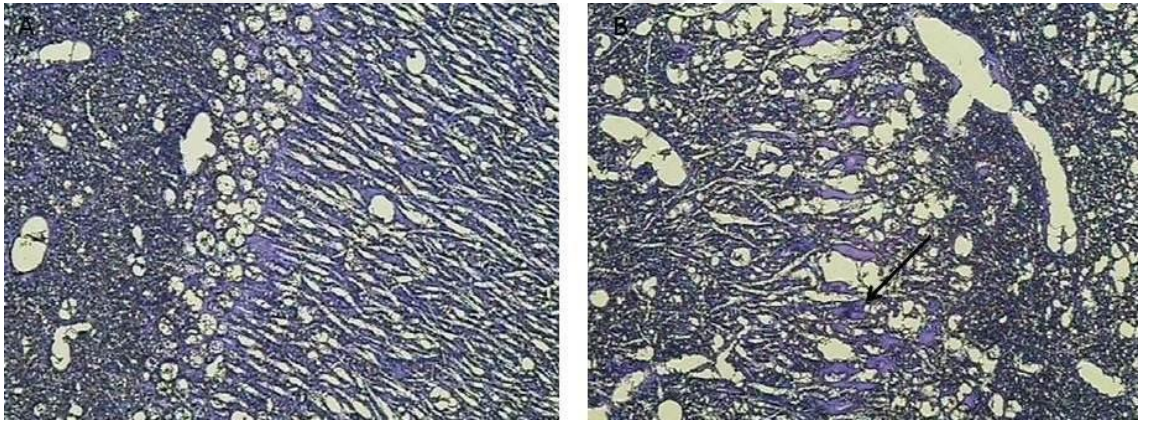
Şekil 4.13. Toluen maruziyeninin Kristal Viyoleto boyanmasında senil ve amiloid plakların oluşumu 40X büyütme

*A) Kontrol Grubu Entorinal Korteks B) Toluen Grubu Entorinal Korteks



Şekil 4.14. Toluene maruziyeninin Kristal Viyolet boyanmasında senil ve amiloid plakların oluşumu 40X büyütme

*A) Kontrol Grubu Hipotalamus B) Toluene Grubu Hipotalamus



Şekil 4.15. Toluene maruziyeninin Kristal Viyolet boyanmasında senil ve amiloid plakların oluşumu 40X büyütme

*A) Kontrol Grubu Hipokampus B) Toluene Grubu Hipokampus

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

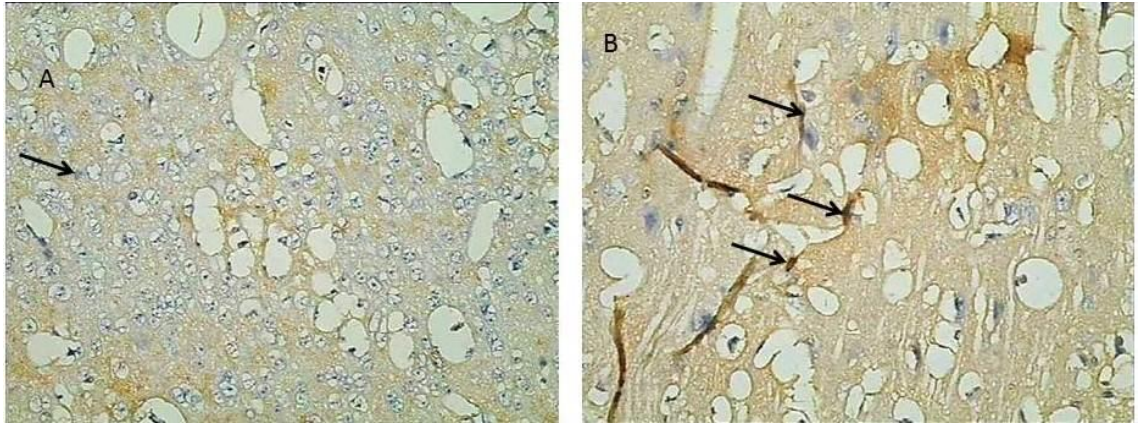
Çalışmamızda, apoptozisin varlığını ortaya koymak için her iki gruba ait beyin doku kesitlerinde yapılan immünohistokimyasal boyamada Bax Kaspaz-3 immün reaktivitesi gözden geçirildi (Çizelge 4.6 ve 4.7). Bax ve Kaspaz-3 proteininin beyin dokusunda görünür hale getirilerek incelenmesi için yapılan bu boyamada, saptanan reaksiyonun yoğunluğuna göre semi kantitatif değerlendirme yapıldı.

Kontrol grubuna ait beyin kesitleri incelendiğinde, beyin korteksi, hippocampal alan, entorhinal korteks ve substantia nigra bölgelerindeki hücre sitoplazmalarında, immünohistokimyasal olarak Bax (Şekil 4.16.A-20.A) ve Kaspaz-3 (Şekil 4.21.A,-25.A) immün reaktivitesinin negatif olduğu (0) görüldü.

Toluen uygulanan tavşanlarda ise, beyin korteksi hücre sitoplazmalarında şiddetli derecede (3+) Bax ve Kaspaz-3 immün reaktivitesinde önemli oranda artış meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.16.B-20.B) (Şekil 4.21.B-25.B).

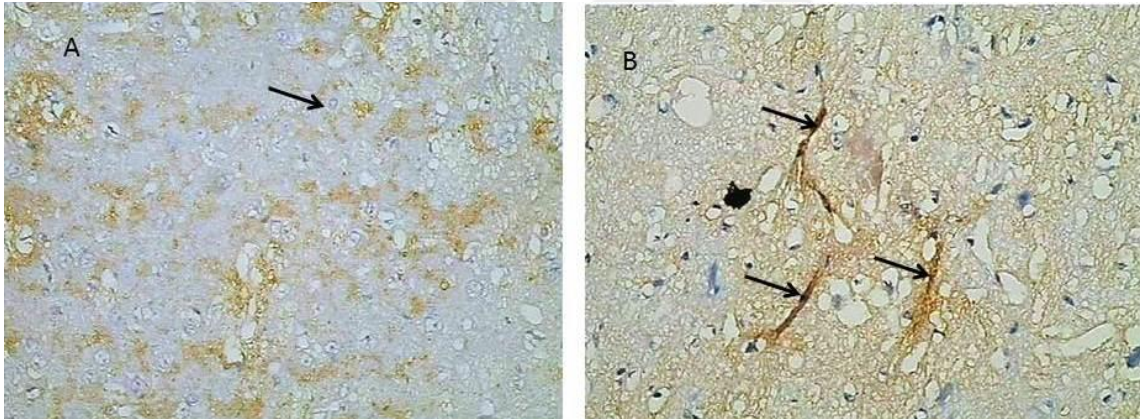
Çizelge 4.6. Bax boyama ile immunreaktivite yoğunluk bulguları

Bax İmmünreaktivitesi	Grup						Toplam	
	Yoğunluk	Kontrol		Toluen				P
		n	%	n	%	n	%	
Prefrontal Korteks	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Entorinal Korteks	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Hipotalamus	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Hipokampus	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Substantia Nigra	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	



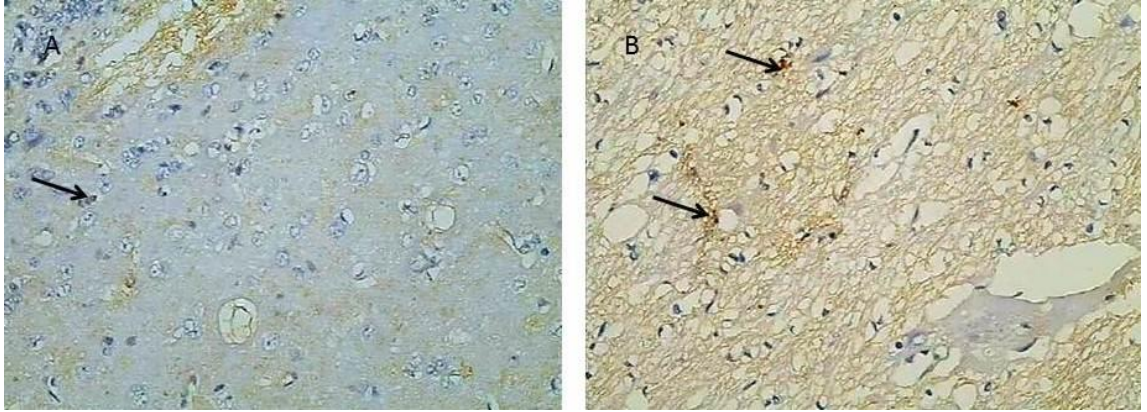
Şekil 4.16. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apoptozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*A) Kontrol grubu, Bax immunreaktivitesi Prefrontal Korteks (x40) B) Toluen grubu, Bax immunreaktivitesi Prefrontal Korteks (x40)



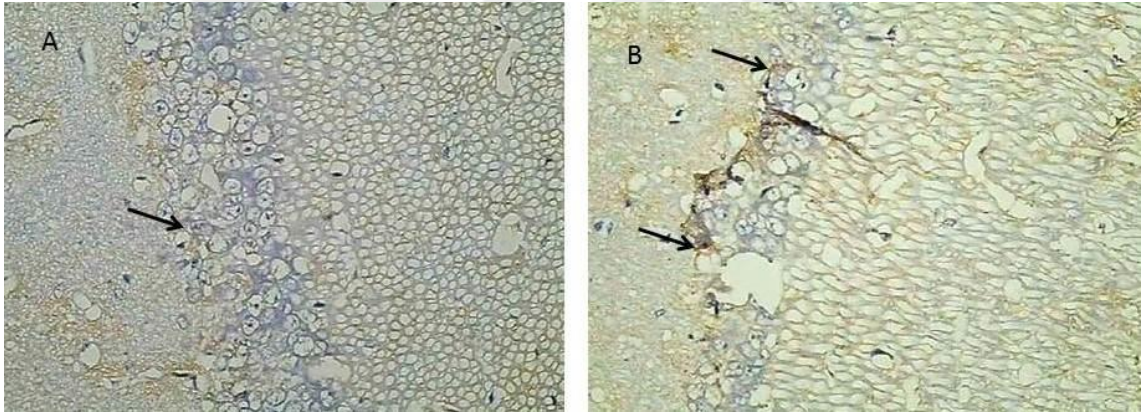
Şekil 4.17. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apoptozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*A) Kontrol grubu, Bax immunreaktivitesi Entorinal Korteks (x40) B) Toluen grubu, Bax immunreaktivitesi Entorinal Korteks (x40)



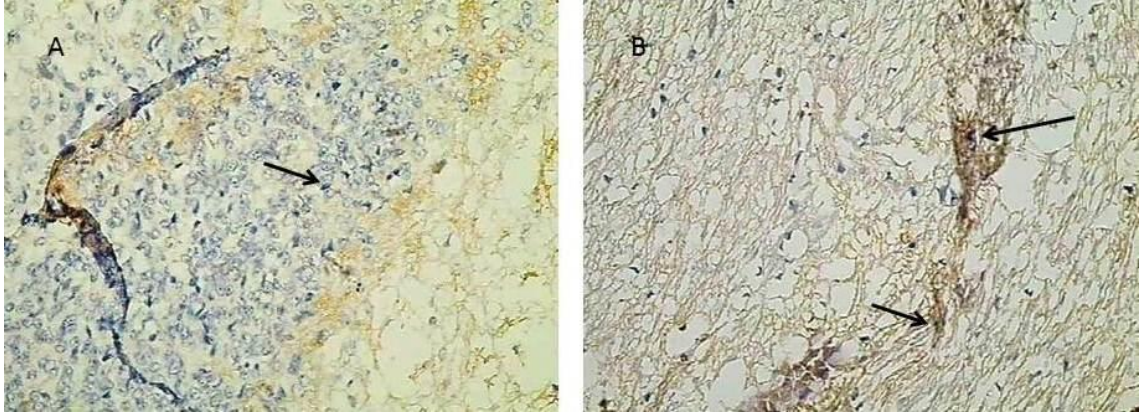
Şekil 4.18. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apoptozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*A) Kontrol grubu, Bax immunreaktivitesi Hipotalamus (x40) B) Toluen grubu, Bax immunreaktivitesi Hipotalamus (x40)



Şekil 4.19. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apoptozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*A) Kontrol grubu, Bax immunreaktivitesi Hipokampus (x40) B) Toluen grubu, Bax immunreaktivitesi Hipokampus (x40)

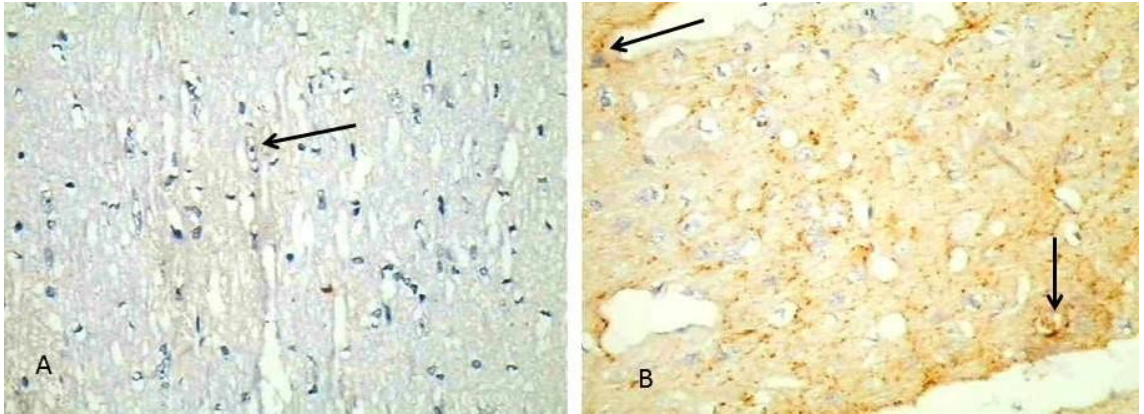


Şekil 4.20. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apoptozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*A) Kontrol grubu, Bax immunreaktivitesi Substantia Nigra (x40) B) Toluen grubu, Bax immunreaktivitesi Substantia Nigra (x40)

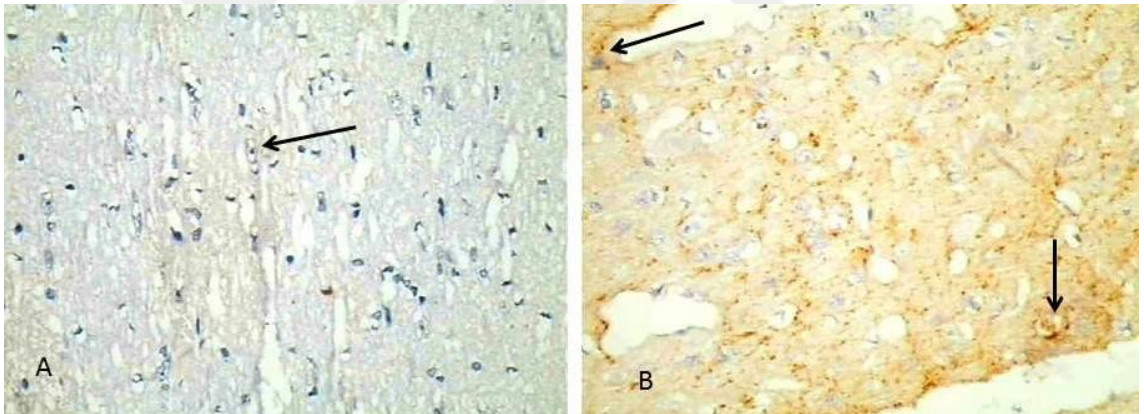
Çizelge 4.7. Kaspaz-3 boyama ile immunreaktivite yoğunluk bulguları

Kaspaz-3 İmmunreaktivitesi	Grup						Toplam	
	Kontrol			Toluen				
	Yoğunluk	n	%	n	%	n	%	P
Prefrontal Korteks	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Entorinal Korteks	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Hipotalamus	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Hipokampus	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	
Substantia Nigra	+++	0	0	10	100	7	100	0,001*
	+	7	100	0	0	7	100	



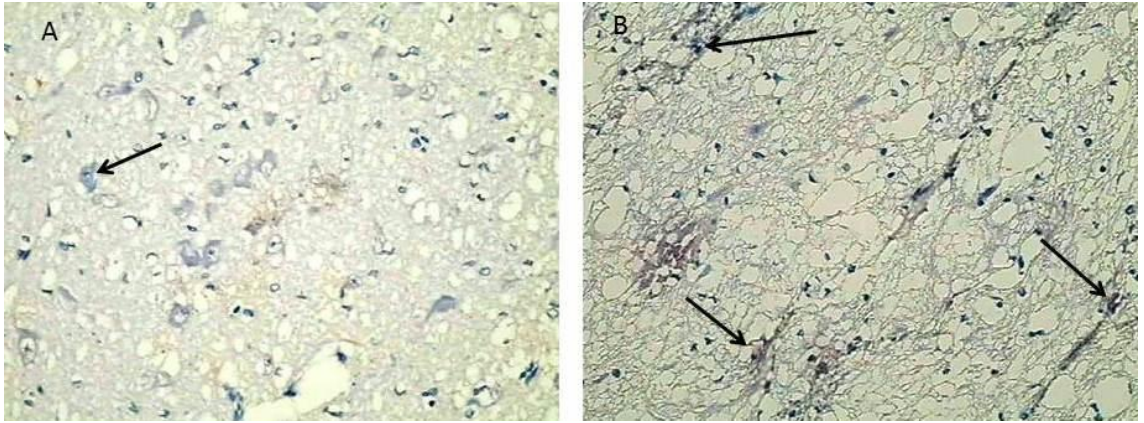
Şekil 4.21. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apoptozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*C) Kontrol grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Prefrontal Korteks (x40) D) Toluen grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Prefrontal Korteks (x40)



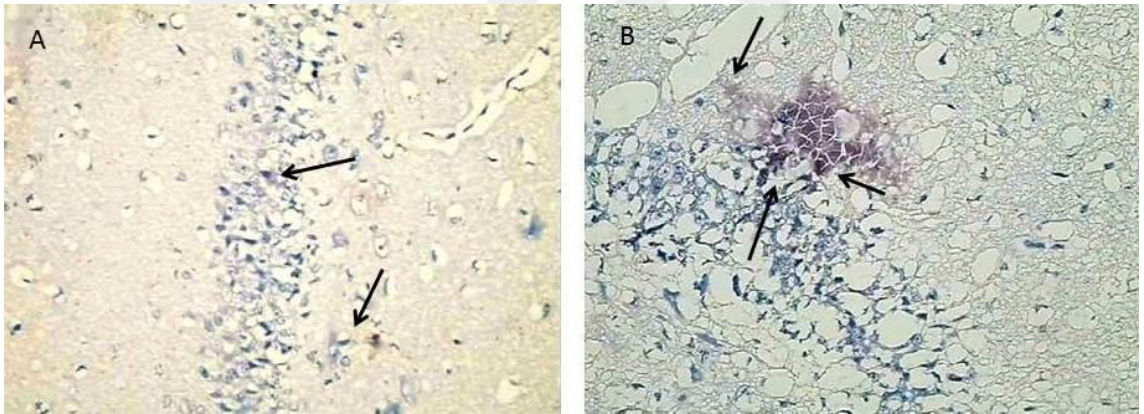
Şekil 4.22. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apoptozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*C) Kontrol grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Entorinal Korteks (x40) D) Toluen grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Entorinal Korteks (x40)



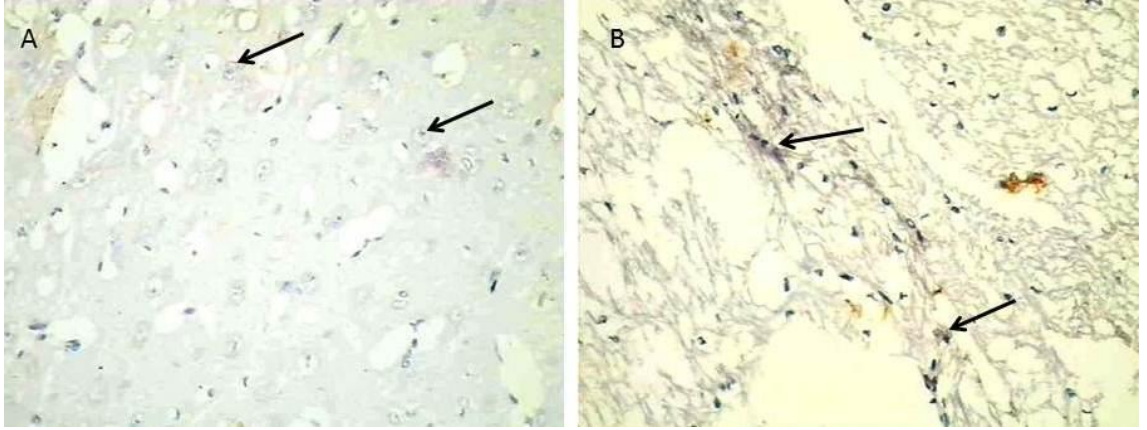
Şekil 4.23. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*C) Kontrol grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Hipotalamus (x40) D) Toluen grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Hipotalamus (x40)



Şekil 4.24. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apopitozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*C) Kontrol grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Hipokampus (x40) D) Toluen grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Hipokampus (x40)



Şekil 4.25. Yüksek doz akuz Toluen maruziyetinin neden olduğu apoptozisin İmmunohistokimyasal boyama ile gösterimi

*C) Kontrol grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Substantia Nigra (x40) D) Toluen grubu, Kaspaz-3 immunreaktivitesi Substantia Nigra (x40)

4.4. Biyokimyasal Bulgular

Kan serumunda yapılan ELISA ölçümleri sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiği zaman Toluen uygulanan gruplarda ki TNF alpha seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmış olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.8) (Şekil 4.26) ($p<0,001$).

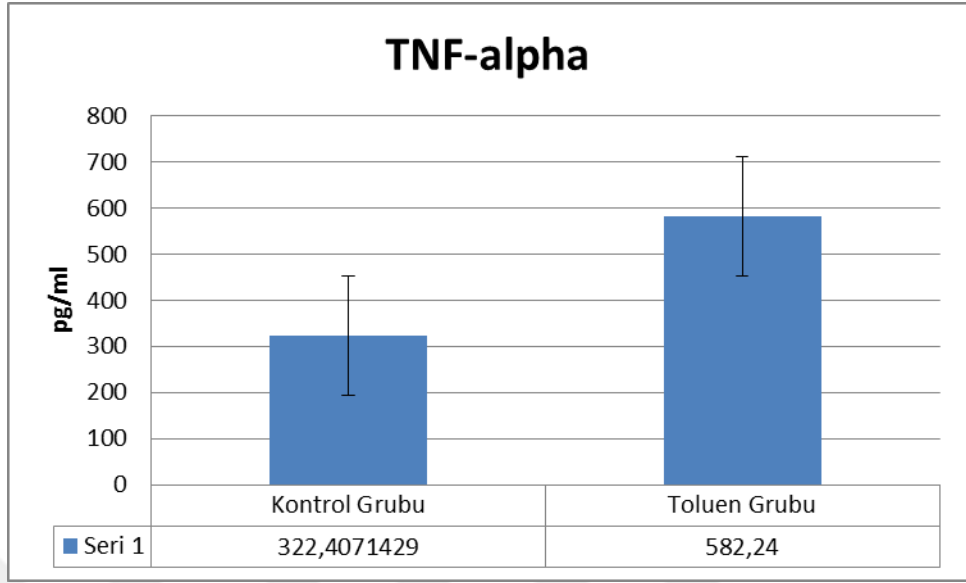
Çizelge 4.8. TNF-alpha, Dopamine, NGF ve GFAP serum seviyeleri

	Group		t	p
	Control	Toluene		
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		
TNF-alpha	323,02 $\pm$ 3,72856	582,24 $\pm$ 12,41	63,298	0,001*
Dopamin	6,94 $\pm$ 1,10099	4,42 $\pm$ 0,68	6,134	0,001*
NGF	47,12 $\pm$ 3,07560	23,09 $\pm$ 4,59	13,745	0,001*
GFAP	12,22 $\pm$ 1,26635	8,06 $\pm$ 1,89	5,766	0,001*

Çizelge 4.9. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı biyokimyasal ELISA analizlerinin skorlarının gösterimi

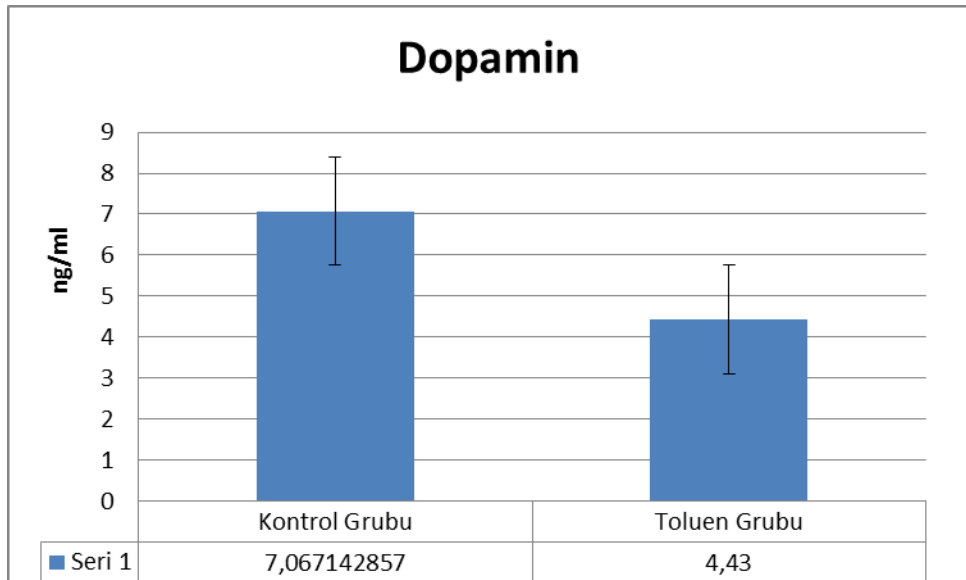
TNF-alpha				Dopamine			
Denek No	Kontrol Grubu	Toluen Grubu	Birim	Denek No	Kontrol Grubu	Toluen Grubu	Birim
1	324,89	599,91	pg/ml	1	7,31	4,56	ng/ml
2	327,56	586,41	pg/ml	2	6,38	3,89	ng/ml
3	326,45	576,92	pg/ml	3	6,17	4,23	ng/ml
4	315,47	560,23	pg/ml	4	5,14	3,47	ng/ml
5	319,58	587,31	pg/ml	5	8,52	3,69	ng/ml
6	320,78	597,49	pg/ml	6	8,68	5,78	ng/ml
7	322,12	565,78	pg/ml	7	7,27	5,14	ng/ml
8		579,81	pg/ml	8		4,36	ng/ml
9		583,18	pg/ml	9		4,47	ng/ml
10		585,36	pg/ml	10		4,67	ng/ml
Ortalama	322,40714	582,24	pg/ml	Ortalama	7,067143	4,43	ng/ml

GFAP				NGF			
Denek No	Kontrol Grubu	Toluen Grubu	Birim	Denek No	Kontrol Grubu	Toluen Grubu	Birim
1	12,62	7,54	ng/ml	1	48,65	17,68	ng/ml
2	11,56	6,98	ng/ml	2	43,67	23,87	ng/ml
3	13,47	10,52	ng/ml	3	51,36	29,54	ng/ml
4	9,87	6,13	ng/ml	4	52,79	31,17	ng/ml
5	10,17	8,17	ng/ml	5	47,93	25,58	ng/ml
6	12,87	9,14	ng/ml	6	45,16	20,21	ng/ml
7	13,18	11,58	ng/ml	7	44,89	20,68	ng/ml
8		8,36	ng/ml	8		23,87	ng/ml
9		6,28	ng/ml	9		19,98	ng/ml
10		5,99	ng/ml	10		18,32	ng/ml
Ortalama	11,962857	8,07	ng/ml	Ortalama	47,77857	23,09	ng/ml



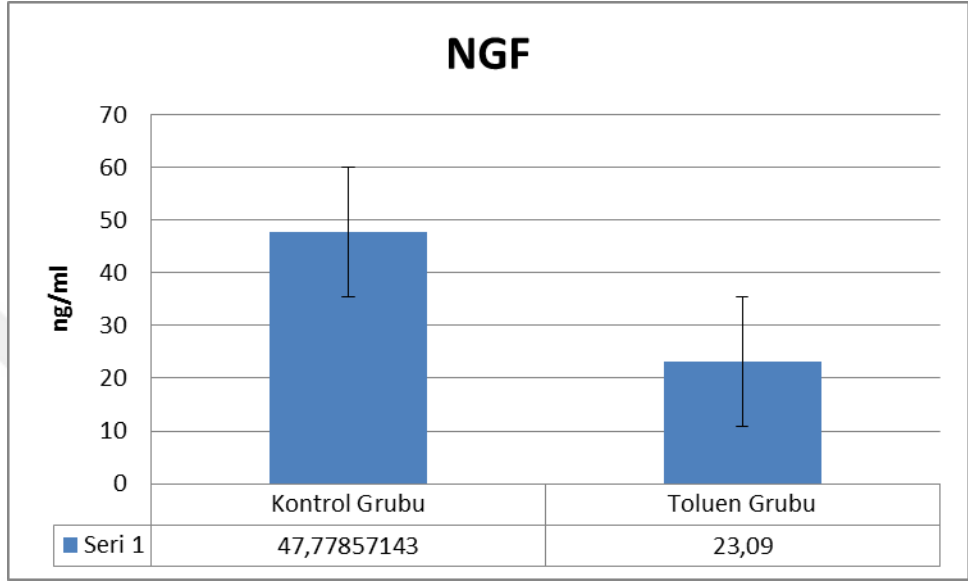
Şekil 4.26. TNF-alpha serum seviyeleri grafiği

Substantia nigra bölgelerinden salgılanan dopamine (DA) serum seviyeleri toluene grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (Şekil 4.27) ($p < 0,001$).



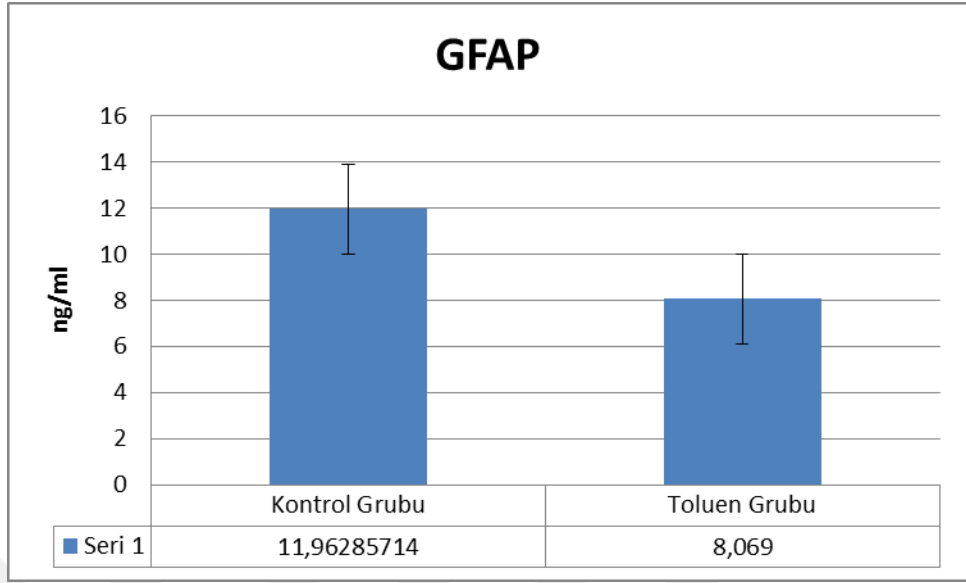
Şekil 4.27. Dopamin serum seviyeleri grafiği

Hippocampal nöronlardan salınan sinir büyüme faktörü (NGF) toluen maruziyeti olan grupta serum NGF seviyeleri kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmış olduğu görülmüştür (Şekil 4.28) ($p<0,001$).



Şekil 4.28. NGF serum seviyeleri grafiği

Beyindeki astrosit hücrelerinden salınan GFAP seviyelerinde de toluene grubunda azalma olduğu görülmüş ve bu azalmanın kontrol grubuna kıyaslandığı zaman anlamlı seviyede düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.29) ($p<0,001$).



Şekil 4.29. GFAP serum seviyeleri grafiği

Gruplara ait kan serum örneklerinde, spektrofotometrik olarak Na, K, NO, GSH ve MDA değerleri Çizelge 4.10'daki bulundu. Buna göre oksidatif hasarı belirlemede önemli bir parametre ve kanda lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin, Toluen uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi ($p < 0,05$). Antioksidan ve oksidatif hasarı düşürerek koruyucu ve düzenleyici etkisi olan NO ve GSH düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı bulundu ($p < 0,05$). Toluene maruz bırakılan hayvanlarda serum Na ve K düzeylerinin kontrol grubuna oranla oldukça yüksek olduğu, bu yüksekliğin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi.

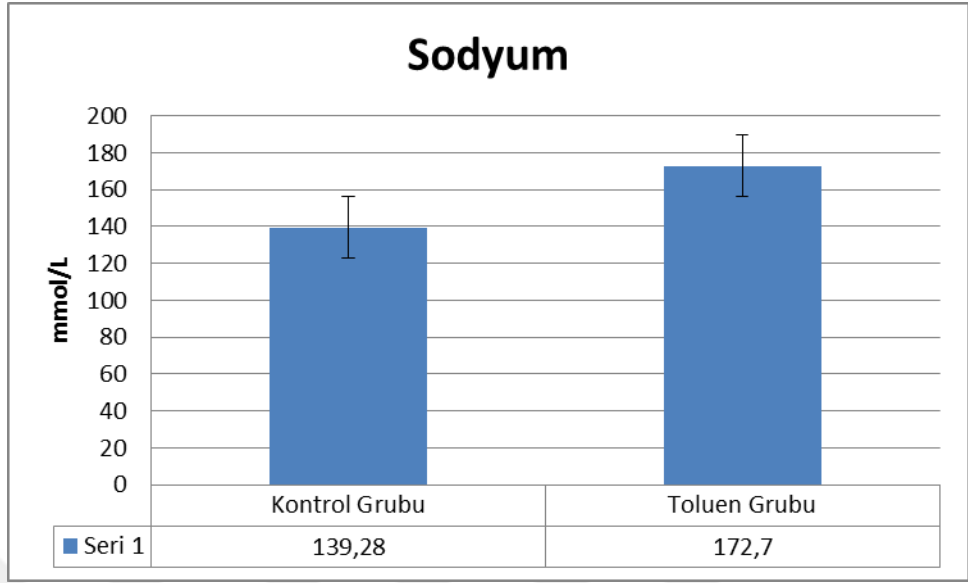
Çizelge 4.10. Deney ve kontrol grubu kan serum örneklerindeki Na, K, NO, GSH ve MDA değerleri (Değerler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde ifade edildi).

	Grup		t	p
	Deney (Toluen)	Kontrol		
	$\bar{x} \pm SH$	$\bar{x} \pm SH$		
Na	172,70 $\pm$ 13,42	139,29 $\pm$ 3,82	6,36	0,001
K	6,78 $\pm$ 0,64	5,61 $\pm$ 0,83	0,33	0,005
MDA	4,85 $\pm$ 0,56	3,46 $\pm$ 0,42	0,55	0,001
NO	40,91 $\pm$ 1,83	58,54 $\pm$ 2,23	1,79	0,001
GSH	77,91 $\pm$ 6,30	114,03 $\pm$ 8,87	9,86	0,001

Serum sodyum seviyesi Toluen grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artış göstermiştir (Şekil 4.30) ($p < 0.001$).

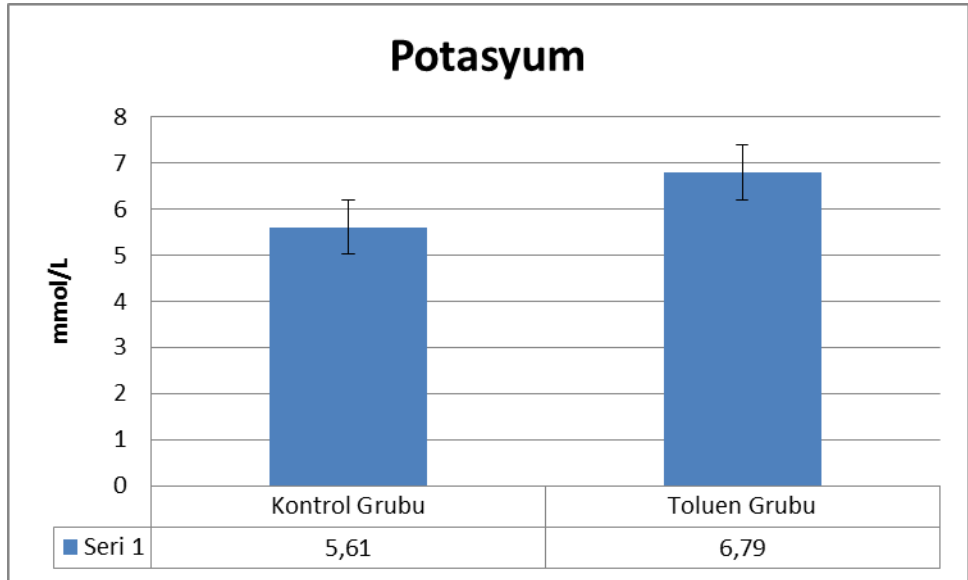
Çizelge 4.11. Yüksek doz akut Toluen maruziyetine bağlı biyokimyasal Na, K ve antioksidan analizlerinin skorlarının gösterimi

	GRUPLAR			GRUPLAR	
	Grup I (Toluen Grubu)	Grup II (Kontrol Grubu)		Grup I (Toluen Grubu)	Grup II (Kontrol Grubu)
NO (µmol/L)	41,32	58,96	Sodyum (mmol/L)	170	135
	40,35	57,64		168	138
	43,68	55,69		184	145
	39,25	59,36		157	144
	38,48	61,25		191	136
	41,87	60,97		187	138
	40,36	55,91		169	139
	44,01			180	
	40,37			148	
	39,45			173	
Ortalama	40,86888889	58,47	Ortalama	172,7	139,2857143
p	Grup I-II 0,970			GRUPLAR	
	GRUPLAR			Grup I (Toluen Grubu)	Grup II (Kontrol Grubu)
	Grup I (Toluen Grubu)	Grup II (Kontrol Grubu)			
MDA (nmol/mL)	4,75	4,07	Potasyum (mmol/L)	6,56	4,78
	5,01	3,17		5,98	4,63
	4,65	3,21		7,25	6,71
	4,32	2,98		7,39	6,39
	5,23	3,25		7,65	4,97
	4,87	3,56		6,34	6,12
	4,21	3,97		6,42	5,64
	5,45			5,87	
	4,13			6,87	
	5,87			7,54	
Ortalama	4,849	3,458571429	Ortalama	6,787	5,605714286
p	Grup I-II 0,970				
	GRUPLAR				
	Grup I (Toluen Grubu)	Grup II (Kontrol Grubu)			
GSH (nmol/mL)	78,43	113,83			
	70,28	120,67			
	71,36	119,34			
	82,64	126,01			
	79,39	99,48			
	72,69	108,35			
	85,64	110,53			
	80,98				
	70,69				
	87,02				
Ortalama	77,912	114,03			
p	Grup I-II 0,970				



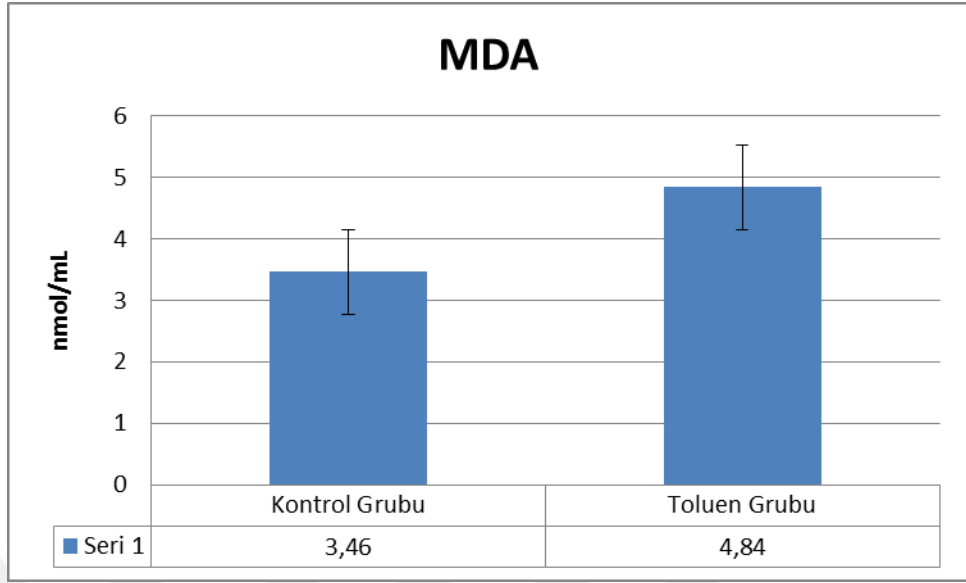
Şekil 4.30. Serum sodyum değerlerinin gösterimi

Potasyum düzeyleri incelendiğinde Toluen grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.31) ($p < 0.005$).



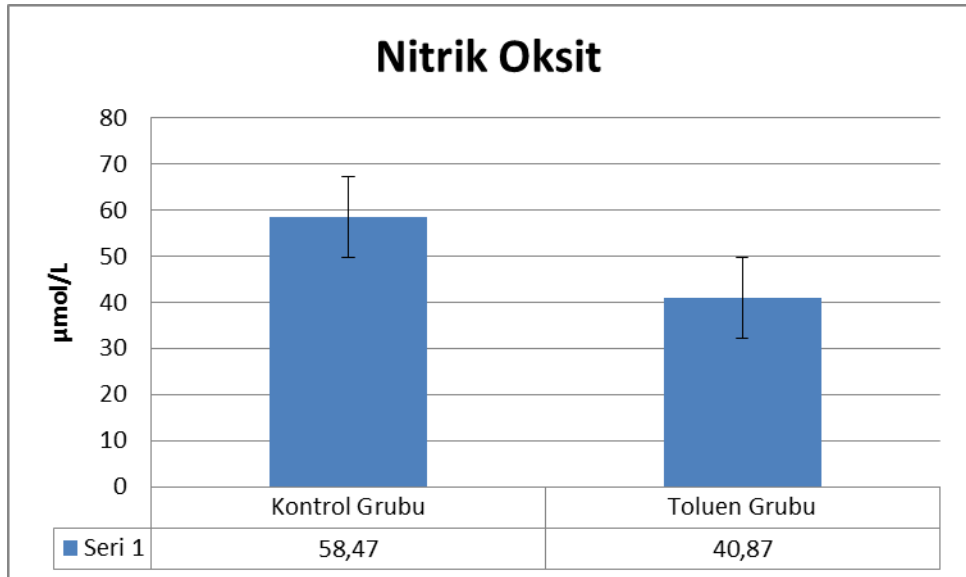
Şekil 4.31. Serum potasyum değerlerinin gösterimi

Lipid peroksidasyonunu gösteren MDA değerleri toluen verilen grupta 4,849 nmol/L ve kontrol grubunda ise 3,458 nmol/L olarak bulunmuştur (Şekil 4.32) ($p < 0,001$).



Şekil 4.32. Serum MDA değerlerinin gösterimi

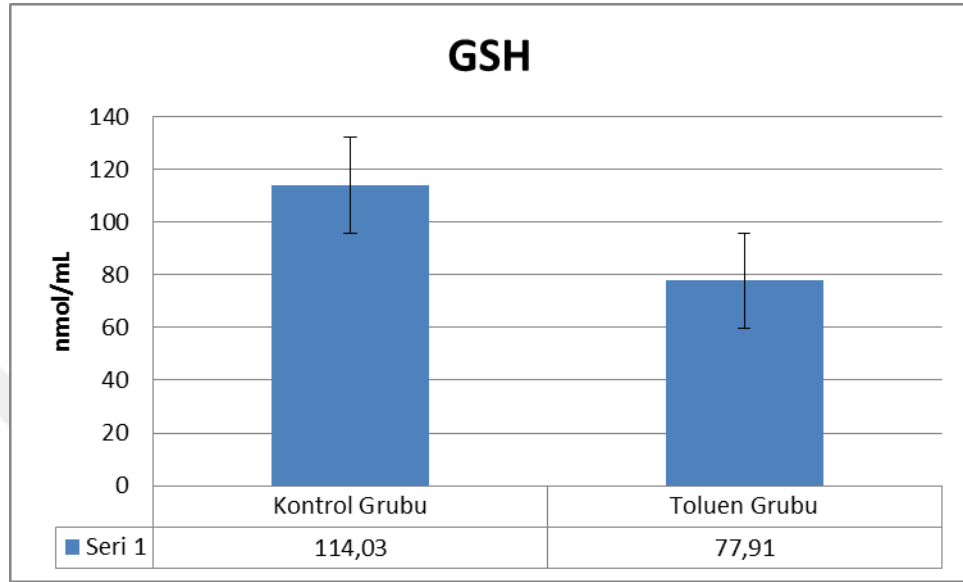
NO değerleri toluen verilen grupta 40,86 $\mu\text{mol/L}$ ve kontrol grubunda ise 58,47 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Toluen verilen grupta plazma NO değerleri kontrol grubundan istatistiki olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur (Şekil 4.33) ($p < 0,001$).



Şekil 4.33. Serum NO değerlerinin gösterimi

Glutasyon değerleri toluen verilen grupta 77,912 nmol/L ve kontrol grubunda ise 114,03

nmol/L olarak bulunmuştur. Toluen verilen grupta plazma glutatyon değerleri kontrol grubundan istatistiki olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur (Şekil 4.34) ($p<0,001$).



Şekil 4.34. Serum GSH değerlerinin gösterimi

Çalışmamızın biyokimyasal bölümünden elde ettiğimiz sonuçlara göre Toluen tavşanlarda oksidatif hasara yol açar ve vücut sıvısı elektrolit dengesini bozar.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Toluen hayatın birçok alanında kullanılan ve oldukça sık karşılaşılan bir maddedir. Evde ve endüstride sayısız yerde kullanılması bağımlılık yapıcı bir madde olması ve istenildiğinde kolaylıkla temin edilebilmesi nedeniyle toplumun önemli bir bölümünü etkilediğinden, diğer organik solventlerden farklı bir öneme sahiptir (Faust 1994; Jones 1997; OEHHA 1999). Toluenin özellikle merkezi sinir sistemi ve karaciğer başta olmak üzere birçok doku üzerinde toksik etkilerinin olduğunu kanıtlayan bilimsel araştırmalar vardır (Park *et al.* 2003). Toluene maruz kalan insan ve hayvanlarda ilk etki merkezi sinir sistemi depresyonudur. Yüksek konsantrasyonlarda diğer uçucu maddelerle benzer olarak psikomotor hasarlanma, lokomotor aktivitelerde eksitasyon ve daha sonrada inhibisyon, ayakta durma refleksinin kaybolması ve sedasyon gibi etkileri vardır (Dossing *et al.* 1983b; Tsatsakis *et al.* 1997; Tomei *et al.* 1999). Deneysel araştırmamızda Toluen verdiğimiz tavşanlarda makroskopik olarak pupillerde büyüme, kusma, bazı hayvanların ağız ve burun bölgelerinde kanama ve ayakta dengede duramama gibi postür bozuklukları gözlemlenmiştir. Toluen bu etkileri gabaerjik, glutamaterjik, serotonerjik, dopaminerjik yolları etkileyerek yapar (Bowen *et al.* 2005; Balster 1998). Toluen lipofilik özelliğinden dolayı hücre duvarındaki lipid yapısını değiştirir ve proteinlerle etkileşime girer. Akut dozlarda Na/K-ATPaz aktivitesini önemli oranda artırarak membran akışkanlığını artırır (Calderon-Guzman *et al.* 2005b). Çalışmamızda serum sodyum ve potasyum değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunun bulunmazı aynı yolla Toluen'in etkisini gösterdiğinin bir kanıtı olarak değerlendirilebilmektedir.

Tiner inhalasyonun etkisini incelemek için sıçan modelini kullanan bazı çalışmalar vardır. Bu çalışmaların çoğu tineri, özellikle tinerin ana bileşeni olan Toluen'in birçok dokuyu ve merkezi sinir sistemini etkilediğini ortaya koymaktadır. Halifeoğlu *et al.* (2000) bir çalışmalarında Toluen'in etkisini kan, bazı dokular ve vücut sıvılarına yayma yeteneği olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarında lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla, tinere maruz kalan işçilerde belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin

oksidatif serbest radikallerle reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır. Lipid peroksidasyonundan türetilen metabolik ürünler, hücrelerin birçok bileşeniyle reaksiyona girebilmekte ve hücrel ve metabolik fonksiyonlar üzerinde zehirli etkilere neden olabilmektedir (Köse and Doğan 1991). Toluen fosfolipid etkileşimlerinden dolayı, hücrel membran kompozisyonları, fonksiyonu ve akışkanlıklarını büyük ölçüde değiştirmiştir. *In vitro* olarak lipid peroksidazlarının oluşması nedeniyle serbest oksijen radikallerinin araşidonik asit metabolizmasını dolaylı olarak uyardığı ve prostaglandin, tromboksan ve lökotrien konsantrasyonlarında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu olaylar, geçirgenlik ve dolaşımda değişikliğe neden olmaktadır (Ererel *et al.* 1992). Bazı deneysel çalışmalarda, sıçanlar tiner inhalasyonuna maruz bırakıldığında, doku MDA düzeylerinin arttığı, buna karşılık SOD aktivitesi düzeylerinde bir düşüş olduğu bildirilmiştir (Taş vd 2011). Halifeoğlu *et al.* (2000) çalışma bulgularına göre uzun vadeli teneffüs sonucunda, sadece lipid peroksidasyonu değil, aynı zamanda eritrositlerdeki antioksidan SOD ve GSH'ın enzim aktivite seviyeleri de büyük oranda artmıştır. En az on yıl boya tineriyle uğraşan olgularında SOD ve GSH aktivite düzeylerinin indüksiyonu olabildiğini düşünmektedirler. Bu sonuçlar ışığında SOD ve GSH aktivite seviyelerinin azalmadığını, ancak eritrositlerde indüklendiğini açıkça göstermekte olduğunu söylemektedirler. Oksidatif stres doku hasarına neden olabilmektedir. Bu hasarın bir göstergesi olarak kullanılabilecek parametrelerden biri MDA'dır. MDA, lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan bir üründür (Kamal *et al.* 1989; Pompella 1997). Coşkun *et al.* (2006) tarafından yapılan bir rat çalışmasında periferik sinirlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman Toluen grubunda doku MDA düzeylerinde bir artış olduğu belirtilmiştir. Rat beyin dokuları üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise Toluen ihtiva eden tinerin kullanıldığı grupta ki MDA düzeyleri kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir (Baydaş *et al.* 2003). Bu sonuçlar ışığında çalışmamızdaki lipid peroksidasyonu metabolizması ürünü olan MDA bulguları sonucunda Toluen'in prefrontal kortekste oksidatif hasara neden olduğunu düşünebiliriz.

Lipid peroksidasyonu, hücre zarındaki fosfolipidlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ve bu nedenle hücre zarındaki lipid yapısında meydana gelen

değişiklikler ile hücrenin yapısını ve fonksiyonlarının bozulmasıdır (Thomas 1999). Serbest radikallerin zardaki doymamış yağ asitlerini etkileyerek bir kimyasal zincir tepkimesi ile başlayıp radikaller için devamlı bir kaynak oluşturarak hücre zarına geri dönüşümü olmayan bir hasar oluşturur (Murray *et al.* 1996; Canoruç *et al.* 2001). Bir çok çalışmada Toluen maruziyetin doku, eritrosit ve plazma MDA seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Ulakoğlu *et al.* 1998; Karagözler *et al.* 2002; Dünderöz *et al.* 2003; Ilgazlı *et al.* 2004). Çalışmamızda Toluen grubunun MDA seviyeleri kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar reaktif oksijen türleri oluşumunun çok fazla olduğunu, serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozularak oksidatif strese ve oksidatif hasara yol açtığını göstermektedir. Bu nedenle lipid peroksidasyonun en önemli ürünü olan MDA düzeylerinde artışa neden olduğunu düşünmekteyiz.

Toluen, maruziyeti ile ilgili yapılan toksikolojik çalışmalar bu kimyasalın oldukça zararlı olduğunu göstermektedir. Tumer *et al.* (2007) yaptıkları bir rat çalışmasında piknotik hücrelerle ilgili histopatolojik gözlemleri, yani hücre ölümü ve özellikle Toluen grubundaki beyin parankimindeki TUNEL pozitif apoptotik hücrelerin önemli oranda artması reaktif oksijen türleri (ROS) ile ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir. Toluen nörotoksitesinin önemli yollarından birinin, normal hücre fizyolojisini etkileyen nihai olarak nöronal yok oluşa yol açan lipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere oksidatif zarar veren ROS oluşumunu içerdiği düşünülmektedir. ROS, hücre ölümüne ve hayatta kalmaya yol açan sinyal yollarında yer alan anahtar protein kinazları modüle eder. Nöronların nitrik oksit (NO) için çok hassas oldukları ve sürekli NO ürettiklerinde hücre ölümü meydana getirdikleri gösterilmiştir (Heneka *et al.* 1998). Yapılan bir çalışmada, NO'nun, pro ve anti apoptotik protein düzeylerini düzenleyerek apoptosise neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ki infiltratif glial hücrelerin artışı ile ilgili histopatolojik bulgu dikkate alınması gereken önemli bir değişiktir. ROS'un, beyin parankimasındaki artmış iltihap hücresi ve glial hücrelerin sayısını açıklayabilen pro-inflamatuar mediatörler olarak hareket ettiği bildirilmektedir. ROS ile uyarılan sitokin salınımı potansiyel olarak inflamatuvar koşulları hızlandırır (Carbonell *et al.* 2005).

Bir çalışmada, Toluen grubundaki beyin dokusunda gözlenen nöropil ödemi yaygın bir değişim olarak raporlanmıştır (Tumer *et al.* 2007). Beyin ödemi, sinir dokusunda doku sıvısının birikmesine neden olan kan-beyin bariyerinin bozulma durumuna bağlı olabilir. Kan-beyin bariyerinin çöküşünün, sadece kılcal endotelyal astarla değil, aynı zamanda, vasküler bazal laminanın dışında bulunan astrositlerin uç ayaklarıyla da ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Dolayısıyla ödem, aynı zamanda sıvı nakilinin ve iyonların perineural hücre dışı alanından kan damarlarına kadar bozulmasının bir sonucu olmaktadır (Tumer *et al.* 2007). Ödemle ilgili histopatolojik bulgular, Toluen'in sadece kan dolaşımını etkilemediğini, aynı zamanda Ameno *et al.* (1992) da belirttiği gibi, beyin omurilik sıvısının dolaşımı yoluyla etkili olabileceğini ima etmektedir.

Birçok oksijenli bileşik, özellikle de MDA gibi aldehitler, membran lipoproteinleri ve çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki serbest radikallerin saldırıları sırasında üretilir. MDA testi, lipid peroksidasyonunun ölçümü için en yaygın kullanılan testtir (Floyd 1990). Toluene hem *in vivo* hem de *in vitro* maruz kalma, beyin dokusu da dahil olmak üzere birçok dokuda ROS oluşumuna neden olur (Mattia *et al.* 1993c). Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu beyin hasarının patogenezindeki en önemli yollardan biridir. Biyokimyasal değişiklikler yanında, beyindeki histopatolojik değişiklikler de davranışsal değişikliklerle belirginleşebilir (Tillar *et al.* 2002). Çalışmamızda elde ettiğimiz MDA düzeyleri ile histopatolojik değişiklikleri ifade ettiğimiz bulguların kombinasyonu hücreler için önemli oksidatif değişiklikler ortaya koymaktadır.

Nitrik oksit (NO) suda ve yağda çözünebilen, organizmada vazoregulasyon ve hücrel toksisiteyi gösteren, kan ve endotel hücreleri arasında oluşan etkileşimin düzenlenmesinden sorumlu, antioksidan ve oksidatif hasarı azaltan biyolojik koruyucu ve düzenleyici bir moleküldür (Palmer *et al.* 1993; Matthew *et al.* 1999; Kuyumcu vd. 2004). Çeşitli çalışmalarda, Toluen'in kan yoluyla tüm vücuda yayıldığı ve dokularda birikerek serbest radikal oluşumunu arttırdığı antioksidan seviyelerini ise azalttığı bildirilmiştir (Mohan and Dsa 1997; Altındağ vd. 2001). Bizim çalışmamızda ise paralel bir şekilde toluene maruz bırakılan deneklerin plazma NO seviyeleri kontrol grubuna

kıyasla anlamlı ölçüde azalma göstermiştir. Toluene maruz kalan insanların serumlarında NO ürünlerinin, nitritin ve nitrat düzeylerinin artması, sitokinlerin yoğunluğuna veya oksidatif stres durumuna bağlanabilir (Nussler *et al.* 1992). Çalışmamız sonucunda Toluen grubunun NO seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla düşük olarak izlenmesinin nedenini, çözücüye maruz kalma sonucunda enzimlerin inhibe edilmesine veya substrat moleküllerinin tükenmesi ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) konsantrasyonunda bir artışa neden olabileceğini düşünebilmekteyiz.

Akut dozlarda Na/K-ATPaz aktivitesini önemli oranda artırarak membran akışkanlığını artırır (Calderon-Guzman *et al.* 2005b). Çalışmamızda serum sodyum ve potasyum değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunun bulunmazı aynı yolla Toluen'in etkisini gösterdiğinin bir kanıtı olarak değerlendirilebilmektedir.

Glutasyon, tripeptit yapısında olan ve vücuttaki birçok hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan maddelere karşı koruyan bir moleküldür (Champe and Harvey 1997). Glutasyon DNA'nın sentezinde, hasarlı parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin muhtemel hasarlarının önlenmesinde görev almaktadır (Chavan *et al.* 2005). Park *et al.* (1998 ve 2006) çalışmalarında organik çözücü ve sigaraya maruz kalan bir vücutta serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin artarak kanser gibi hastalıklara sebep olduklarını, glutasyon gibi antioksidan maddelerin de vücut dokularında biriken bu serbest radikallere karşı koyarak toksik olan bu maddeleri zararsız hale getirdiklerini ve bu yüzden antioksidanların konsantrasyonlarında azalma meydana geldiğini göstermişlerdir. Toluen maruziyetiyle ilgili bir çalışmada GSH enziminin konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre azalma meydana gelmiştir (Baydaş *et al.* 2003). Meydan *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmalarda da SOD ve GSH enzim seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Çalışmalarında elde ettikleri bulguların oksidatif hasarın başlangıcını yansıttığını söylemişlerdir. Bir başka çalışmada Toluen verilen grupta GSH enzim değerlerinde düşüş görülmüştür (Ozen *et al.* 2008). Toluene ile indüklenen reaktif gliyozun Toluen ile indüklenen ROS oluşumuna bağlı olduğuna inanılmaktadır. Serbest

radikallerin reaktif gliyozu başlattığı ve antioksidanlarla tedavinin, serbest radikalleri nötralize ederek ve lipit peroksidasyonunu inhibe ederek gliozu azalttığı öngörülmüştür (Halks-Miller *et al.* 1986). Mattia *et al.* (1993a, 1993b) ratlarda intraperitoneal Toluen enjeksiyonunun ROS oluşum hızında ve beyin GSH düzeylerinde bir düşüşe neden olduğunu göstermiştir. Merkezi sinir sisteminde GSH, çoğunlukla glial hücreler içinde yoğunlaşmıştır (Raps *et al.* 1989). Glial hücrelerin, nöronal GSH'nin korunmasında ve nöronları oksidasyona dayalı nörotoksiteye karşı korumak için önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Makar *et al.* 1994). Bu nedenle, astrositlerin nöronal oksidan ve antioksidan homeostazı sürdürdüğüne inanılmaktadır. GSH'nin yüksek hücre içi konsantrasyonu, nöronları nörotoksik hasarlardan korumak için çok önemlidir (Bridges *et al.* 1991). Bir Toluen çalışmasında, melatonin uygulaması nöral toplam GSH düzeylerini ve diğer raporlarda belgelenen GSH metabolizmasına katılan enzimlerin aktivitelerini arttırmaktadır (Baydas *et al.* 2001, 2002). Bizim çalışmamızda ise Toluen grubunun serum glutatyon miktarının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalmış olması Toluen hasarını ortaya koymaktadır. Ayrıca süperoksit radikalinden daha zayıf etkili olan hidrojen peroksit, dokularda bulunan glutatyon enzimi ile su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilmesi gerekirken glutatyon konsantrasyonlarında ki bu azalmanın sonucunda oksidatif hasara neden olduğunu düşünmekteyiz.

Çeşitli hayvan deneylerinde, santral sinir sisteminin Toluene bağlı toksik hasarlarında ilk belirgin hücresel yanıtın astrositler tarafından verildiği bildirilmiştir. Eisenberg (2003) toluen nörotoksik etkisini oluştururken: dopaminin kolinerjik aktivitesini artırarak, GABA reseptörlerine bağlanıp NMDA reseptörlerine karşı nonkompetitif antagonist bir etki gösterdiğini saptamıştır. Mevcut sonuçlar Toluenin doğrudan nukleus akumbens (ACB)'de Dopamin (DA) salınımını kolaylaştırdığına işaret etmektedir. ACB'nin dopaminerjik innervasyonu diğer ilaç suistimallerinin takviye etkileri için önemli bir alt tabaka oluşturmaktadır (Wise 2002). Bununla birlikte, yoğun çalışmalara rağmen, Toluen'in merkezi sinir sistemi (MSS) eylemlerine aracılık eden sinirsel substratların anlaşılması zor olmuştur. Önceki davranışsal araştırmalar, Toluen'in lokomotor aktive edici etkilerinin bozulmamış mezoakkumbal Dopamin (DA)

transmisyonu gerektirdiğini göstermektedir (Riegel *et al.* 2003). Dahası Toluen, VTA DA nöronlarının aktivitesini *in vivo* olarak artırmıştır (Riegel and French 1999). Bununla birlikte, bugüne kadar yapılan çalışmalarda, Toluen'in Ventral Tegmental Area (VTA) içindeki nöronlar üzerinde doğrudan eylemler yoluyla bu nöronları uyarıp uyarmadığı ve bu aktivasyonu ACB'deki uzak DA terminallerinden DA salınımını arttırması için yeterli olup olmadığı belli olmamıştır. Toluen, VTA nöronlarını uyarır ve ACB'de DA salımına yol açar. Verilerimiz, Toluen içeren uçucu maddelerin akut yüksek dozlarda alınması sonucunda, VTA DA nöronlarında doğrudan eylemler yoluyla mezoakumbal nörotransmisyonunu inaktive ettiğini göstermektedir.

İlk olarak, Toluen, DA hücrelerine transinaptik girdilerin koptuğu VTA dilimindeki DA nöronlarını uyarmaktadır (Tzschentke 2001). İnkübasyon dilimlerinde de benzer etkiler gözlenmiştir (Katz and Miledi 1970). Bu bulgular Toluen'in, DA nöronal aktivitesini postsinaptik ve afferent girdiden bağımsız olarak arttırdığını düşündürmektedir. İkinci olarak, *in vivo* mikrodializ, doğrudan intraVTA tolueen perfüzyonunun DA konsantrasyonlarını VTA ve ACB'de arttırdığını göstermiştir (Adell and Artigas 2004). Uzun yıllar kronik olarak Toluene maruz kalanlarda VTA DA nöron hücre gövdeleri, bu bölgedeki DA'nın bilinen tek kaynağı olduğundan, DA nöronlarının parçalanmasını artmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan somatodendritik DA salınımında artış olması gerekmektedirken deneysel çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre akut olarak yüksek doz Toluene maruziyetin sonucunda somatodendritik hücrelerinde oluşan harabiyet ile dopamin salgılanmasında ve kan serum seviyelerinde ciddi düşüş meydana geldiğini görmekteyiz.

Toluen'in etkileri anatomik olarak spesifiktir. Ön VTA DA nöronlarının Toluen ile indüklenen stimülasyonu, prefrontal kortekste DA salınımında bildirilen Toluen ile indüklenen artış ile ilişkili olabilir (Gerasimov *et al.* 2002). Birlikte ele alındığında, bu bulgular posterior VTA DA hücrelerini uyararak Toluen'in distal ACB'deki hücre dışı DA konsantrasyonlarını arttırdığını göstermektedir (Riegel and French 1999). Dolayısıyla, daha önceki *in vivo* araştırmalarda Toluen ile indüklenen DA salınımındaki eksikliği, yüksek Toluen konsantrasyonları ile indüklenen VTA DA nöronları

inaktivasyonundan kaynaklanmaktadır (Kondo *et al.* 1995; Gerasimov *et al.* 2002). Yüksek Toluen konsantrasyonunun VTA ve ACB DA düzeyleri üzerindeki farklı etkilere aracılık eden mekanizmaları belirsizdir (Cragg and Greenfield 1997). Depolarizasyonun DA taşıyıcı fonksiyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (Sonders *et al.* 1997). Toluen tarafından oluşan devamlı depolarizasyon, VTA DA salınımını daha da önleyebilmektedir (Robinson *et al.* 2005). Dolayısıyla, Toluen'in taşıyıcı aktivite üzerindeki doğrudan etkileri göz ardı edilemez. Bununla birlikte, DA hücrelerinden farklı olarak, bu nöronlar tekrarlanan uyarıyla daha düşük bir inaktivasyon eşiği göstermektedir. Araştırma bulgularımız bize substantia nigra bölgelerinden salgılanan dopamine (DA) serum seviyelerinin Toluen grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını göstermiştir.

Hücresel hedefler ile ilgili olarak, hücre ekspresyon sistemindeki çalışmalar Toluenin birçok iyon kanalının aktivitesini bozduğunu göstermektedir (Cruz *et al.* 1998; Beckstead *et al.* 2000; Bale *et al.* 2005). Bu aktiviteler Ca^{2+} + sinyali verme (Westerink and Vijverberg 2002), Na-K ATPaz (Calderon-Guzman *et al.* 2005a) ve G-proteinleri (Tsuga *et al.* 1999; Tsuga and Honma 2000; Tsuga *et al.* 2002) gibi çeşitli proteinleri içerir. Toluen, mezoakumbal nörotransmisyonunu doğrudan uyaran dar bir konsantrasyon aralığını tanımlamaktadır. Sonuçlarımız Toluen'in DA nöronlarını seçici olarak inaktive ettiğini, Na-K sonuçlarına göre de bozulan iyon kanalları aktivitesini göstermekte ve bu mekanizmaların bir veya daha fazlasının DA nöronlarının Toluene bağlı uyarılmasına katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.

Astrositler merkezi sinir sistemine yönelik bir etki olduğunda en erken hücresel tepkileri veren makrofaj hücrelerdir. Bu yanıt GFAP (Glial Fibriler Asidik Protein)'in aşırı miktarda artışı ile karakterize olmaktadır (Janeczko 1989, 1993). Baydaş *et al.* (2003) çalışmalarında tiner inhalasyonun birkaç beyin bölgesinde GFAP ekspresyonunu ve bozunumunu arttırdığını göstermişlerdir. İlaveten bu çalışmalarında Toluen maruziyeti, özellikle de hipokampusta ki GFAP içeriğini arttırdığını bildirmişlerdir. Reaktif gliozu yansıtan gelişmiş GFAP ifadesi, Toluen inhalasyonunun yakın bir zaman sonra fare beyinde belirtilmiştir (Gotohda *et al.* 2000). Çalışma verilerimiz içinde histopatolojik

bulgular da toluene grubunda kontrol grubuna kıyasla hücresel bazda artmış gliosis görülmesine rağmen kan serum seviyelerinde ki GFAP ekspresyonunda Toluen grubunda önemli ölçüde azalma meydana gelmiştir. Bu durumun akut yüksek doz Toluenin etkilerinin sonucunda olduğunu söyleyebiliriz.

Toluen kullanımına bağlı izlenen astrosit aktivasyonu, Toluen kullananlarda saptanan nörofizyolojik değişikliklerde astrositlerin de bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Özellikle ratlarda yapılan çalışmalarda tolueinin oksidatif strese neden olarak reaktif oksijen ürünlerini artırarak nöronal hasar yapıp gliozise neden olduğu belirtilmiştir. Rat çalışmalarında da Toluenin neden olduğu gliosisin belirlenmesinde GFAP kullanılmıştır. Gliosisin özellikle hipokampus, korteks ve serebellum bölgelerinde belirgin olarak arttığı belirtilmiştir (Faust 1994; Georganopoulou *et al.* 2005). Çalışmamızın histolojik kesitlerinde özellikle prefrontal korteks kısmında Toluen grubunda gliosisin belirgin miktarda arttığını gözlemledik. Beyindeki astrosit hücrelerinden salınan GFAP seviyelerinde de Toluen grubunda azalma olduğu görülmüş ve bu azalmanın kontrol grubuna kıyaslandığı zaman anlamlı seviyede düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Bulgularımıza göre Toluen maruziyetine uğramış deney hayvanlarımızda astrosit işaretleyici GFAP miktarlarında önemli ölçüde azalmanın meydana geldiği görülmüştür.

Daha önceki bir çalışmada, Toluen maruziyetinin yetişkin farelerde nöroimmün karışıklığı etkilediği gösterilmiştir (Win-Shwe *et al.* 2007). NGF (Nerve Growth Faktör), nörotrofik bir faktör ve spesifik periferik ve beyin nöronlarının sağkalımı ve gelişiminde kritik roller oynar (Chao *et al.* 2006; Allen and Dawbarn 2006). NGF merkezi ve periferik sinir sistemlerinde lokalize olan çeşitli hücreler tarafından ve bağışıklık ve endokrin sistem hücreleri tarafından üretilir ve serbest bırakılır (Levi-Montalcini *et al.* 1990; Barde 1994). NGF, üç ana homeostatik mekanizmaya ait fizyolojik süreçlerin "regülatörü"dür: sinir, immün ve endokrin sistemler (Alleva *et al.* 1993). Normal koşullar altında, NGF kemirgenlerin ve insanların kan dolaşımında bulunur ve stresli olaylar, nöroendokrin alterasyon ve nörolojik hasarları takiben artar (Alleva *et al.* 1993; Aloe *et al.* 1994). Yüksek doz akut Toluene maruz kalan

tavşanlarımızdan alınan serum örneklerinde hippocampal nöronlardan gelişen sinir büyüme faktörünün (NGF) serum değerleri Toluen maruziyeti olan grubun kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmış olduğu görülmüştür.

Dahası, beyinde TNF- α (Tümör Nekroz Faktör Alpha)'yı eksprese eden transgenik farelerde gelişen nörolojik davranışlarında TNF- α ile düzenlenen NGF konsantrasyonunda endojen değişiklikler meydana gelebilir (Fiore *et al.* 1996). Bu gözlemler, NGF ve TNF- α sinyalleşmesi arasında yakın bir ilişki bulunduğunu ve bu faktörler arasındaki karışma bozukluklarının kanser ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıklara katkıda bulunabileceğini ortaya koymaktadır (Takei and Laskey, 2008). Karagözler *et al.* (2002) ev boyacılarının kan serumlarında yaptıkları bir çalışmada kan serumundaki TNF- α ve IL-8 konsantrasyonları önemli derecede yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Toksikolojik yanıtlarda TNF- α 'nın rolü daha önce yapılan bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Baggiolini and Clark-Lewis 1992; Luster *et al.* 1999). Bu çalışmalardan bazılarında araştırmacılar artan MDA seviyeleri, azaltılmış SOD ve GSH aktiviteleri ile birlikte ev boyacılarının serumundaki bulgularının oksidatif stres durumunu ortaya koyduğunu söylemişler ve oksidatif stres altındaki hücrelerde TNF- α için gen ekspresyonunun önemli ölçüde arttırıldığını da bildirmişlerdir (Sen and Packer 1996; Karagözler *et al.* 2002). Oluşan ROS TNF- α dahil olmak üzere çeşitli sitokinlerin ve kemokinlerin transkripsiyonunu başlatan transkripsiyon faktörü NF- κ B'yi aktive edebilir (Sen and Packer 1996). Toluen uygulanan gruplarda kan serumlarında elde ettiğimiz serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyon ürünlerinin seviyeleri ile TNF- α seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmış olması bu duruma bir paralellik göstermektedir.

Enflamatuar sinyalin transkripsiyon faktörü NF- κ B yolağı vasıtasıyla insan mikrogli hücrelerinde nörotrofin ekspresyonunu indükleyebildiği bildirilmiştir (Heese *et al.* 1998). Birlikte ele alındığında, beyin gelişimi sırasında yüksek seviyedeki Toluen maruziyetinin NF- κ B-TNF- α yoluyla nöroinflamasyonu tetikleyebileceğini ve TNF- α 'nın yukarı regülasyonunun, NGF ve BDNF gibi nörotropik faktörleri üretmek için bir NF- κ B'ye bağımlı ve / veya NF- κ B'den bağımsız mekanizmalar boyunca mikrogli da

dahil olmak üzere nöronal ve nöronal olmayan hücrelerin sinyal vereceğini önermekteyiz.

Meydan *et al.* (2012) yaptıkları bir rat çalışmasında Toluen'in prefrontal korteks üzerindeki toksik etkilerini araştırmışlardır. Sinir hücrelerinin sitoplazmasında korteks ve beyin sapı dokularının nöronlarında dejeneratif değişiklikler, küçülen sitoplazma ve aşırı karanlık piknotik çekirdeği oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bazı kronik vakalarda Toluen maruziyetine bağlı olarak merkezi sinir sisteminde kalıcı hasar gözlenmiştir (Coşkun *et al.* 2006; ATSDR 2007). Toluene akut maruziyet baş ağrısı, baş dönmesi, koma ve hatta ölümle sonuçlanabilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda Toluenin piramidal bozukluklar, periferik nöropati, optik atrofi, sinirsel ses kaybı ve bilişsel işlevlerin bozulması gibi bozukluklardan sorumlu olduğunu göstermiştir (Uzun *et al.* 2001). Yakın tarihli bir çalışmada akut Toluen maruziyetinin erişkin farelerde hippokampal nörogeneziyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Seo *et al.* 2010). Başka bir çalışmada Toluene maruziyetinin miyelinlerin, aksonların ve endoneal yapıların dejenerasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Meydan *et al.* 2012). Zararsız vd (2006) Tarafından yapılan bir çalışmada prefrontal kortekste meydana gelen formaldehit kaynaklı yaralanmalar omega-3 tedavisi ile düzeltilmiş, hücre hasarı ve kortikal hasarı da azaltmıştır. Bazı araştırmacılar tutkal dahil n-heksan veya hem merkezi hem de distal aksonal dejenerasyona neden olduğu bilinen diğer çözücüler içerebilen, çeşitli solventleri istismar eden insanlarda yapılan otopsilerde beyinde serebral ve serebellar atrofi ile korpus kallozumda ciddi bir incelmeye, mikroskopik olarak dağınık demiyelinizasyon, omuriliğin uzun yollarında serebral korteks, bazal gangliyonlar ve serebellumda ciddi nöronal kayıp, şiddetli reaktif glioz ve dev aksonal dejenerasyon gözlemlenmiştir (Schaumburg and Spencer 1976; Escobar *et al.* 1980; Griffin 1981). Otopsi yapılan bir olgunun ölüm yılına kadar uzun bir süre günlük saf Toluen koklayan bir bağımlı olduğu anlaşılmıştır. Bu vakada demiyelinizasyonun nöronal kayıp için sekonder olduğu yorumlanmış ve periferik sinirlerinde etkilendiği rapor edilmiştir (Rosenberg *et al.* 1988). Ayrıca bu vakada MRI verileri incelendiği zaman Toluenin zehirli hasarının merkezi sinir sistemindeki beyaz maddeye yöneldiği doğrulanmış, korpus kallozumda ciddi bir şekilde incelmeye gözlenmiş, mikroskopik olarak serebral ve

serebellar beyaz cevherde diffüz izlenmiş ve tanımlanmamış miyelin solgunluğu görülmüştür. Ancak belirgin bir beyaz madde renk değişikliği veya kavitasyon gözlemlenmemiştir. Yine aynı olguda, görünürde intakt olan miyelin alanlarında bile periyodik asit-schiff boyaması ile yoğun ve kaba granüler pozitif makrofajlar varken lenfosittik inflamasyon saptanmamıştır. Bu olgunun GFAP immuno boyamasında miyelin kaybının bulunmadığı serebral beyaz cevherde bile reaktif glioz sergilediği gösterilmiştir. Serebral ve serebellar nöronlar bozulmadığı için miyelin solgunluğu olan alanlardaki aksonlar korunmuş ve bu nedenle Toluenin saf bir miyelin toksini olduğu öne sürülmüştür. Bizim çalışmamızda Hematoksilen-Eozin boyamalarında, kontrol grubunda beyin dokularının korteks morfolojisi ve nöronal yapısının normal olduğu, yüksek büyütmelede nöropilin bozulmamış damarlarla normal ve homojen olduğu görülmüş ve çekirdekli nöron cisimlerinin normal olduğu saptanmıştır. Toluen verilen tavşanlarda prefrontal ve entorinal beyin kortexinde fokal vakuoler dejenerasyon (abseleşmeler), gliozis, perivasküler demiyelinizasyon, çok sayıda piknotik hücre ve nekroz alanları izlenmiş, prefrontal korteks, entorinal korteks ve hippokampus alanlarında kan damarlarında belirgin bir şekilde aşırı genişlemeler, hücreler arasında ki kompenzasyonun ciddi ölçüde dejenerasyona uğradığı ve hücre sınırlarının nerdeyse dağıldığı görülmüştür. Ayrıca Toluen grubunda piamater de ayrılmalar ve kanamalar gözlemlenmiş, nöron cisimciklerinde küçülme, dejenerasyon ve nöropilin vakuolizasyonu belirlenmiştir.

20 yıl önceki kanıtlar, bazı bireylerde Toluen metabolizmasına neden olan karaciğer enzimlerinden biri olan aldehid dehidrogenaz için gen kodlamasının yetersiz olması nedeniyle Toluen metabolizmasının bozulabileceğini göstermiştir (Greenberg 1997; Benignus 1981; Wilkins-Haug 1997). Bu eksiklik, yüksek doz Toluene maruz kalmış beyin de nörotoksisite riskinin artmasına neden olabilmektedir (Greenberg 1997; Wilkins-Haug 1997). Bazı hayvan çalışmaları, Toluen'in periferik olmayan sinir sistemini hedef aldığını doğrulamıştır. Bununla birlikte, bu genellemenin ötesinde hayvan çalışmaları, özellikle insanlarda kaydedilen miyelin hasarının spesifik mekanizmalarının aydınlatılmasında yardımcı olamamıştır. Solunum yoluyla veya oral doz ile Toluene maruz bırakılan sıçanlarda yapılan iki farklı çalışmada, Toluen

konsantrasyonlarının yüksek lipid içeriğine (Gospe and Calaban 1988; Ameno *et al.* 1992) sahip beyin sapı alanlarında (medulla, pons) en yüksek olduğunu ve serebral korteks ve hipokampusta daha düşük miyelin bulunan yerlerde en düşük olduğunu ortaya koymuştur (Ameno *et al.* 1992), ve Toluen'in lipofilik dağılım gösterdiği vurgulanmıştır (Sharp and Rosenberg 1997). Mattia *et al.* (1993b), sıçanlarda yaptıkları Toluen çalışmasında indüklenen reaktif oksijen türlerinin en yüksek seviyesinin hipokampusta olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Toluen inhalasyon maruziyeti olan sıçanlar ile yapılan çalışmada, (Korbo *et al.* 1996), hipokampusta nöronal kayıp belirlenmiştir. Daha yeni çalışmalardan birinde ise inhalasyon maruziyeti olan sıçanlarda Purkinje hücre kaybı ve hipokampal nöron kaybı olduğu raporlanmıştır (Gotohda *et al.* 2002). Sıçan beyininde, Toluen inhalasyonunun, astrositleri aktive ettiği ve GFAP immünreaktivitesinin güçlendiği görülmektedir (Gotohda *et al.* 2000). Çalışmamızda Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar histopatolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubunda beyin dokularının normal yapıda olduğu gözlemlendi. Toluen verilen tavşanlarda beyin korteksinde fokal vakuoler dejenerasyon (abseleşmeler), gliosis, perivasküler demiyelinizasyon, çok sayıda piknotik hücre ve nekroz alanları izlendi. Toluen grubunda kontrol grubuna oranla belirgin derecede kan damarlarında aşırı genişlemeler ve hücreler arasında kompenzasyonun ciddi ölçüde dejenerasyona uğradığı hücre sınırlarının nerdeyse dağıldığı görülmektedir. Oligodendrosit hücrelerinde Toluen grubunda hücre çekirdeklerinde anormal şekil bozuklukları görülmektedir. Hippokampus bölgesindeki sıralı nöronların gövdelerinde Toluene maruz kalan grupta nöron gövdeleri kontrol grubuna kıyasla yapısal olarak daha belirgin bozunmalara uğramıştır.

Senil plaklar; dejenere nöronal uzantılar, reaktif glial hücreler ve peptidlerden meydana gelen komplike lezyonlardır. Başlangıçta nöron gövdeleri ve uzantıları etrafında diffüz amiloid birikir. Ardından bu maddelerin birikimi yoğunlaşarak ve genişleyerek senil plakları oluşturur (Arends *et al.* 2000). Oksidatif stres, amiloid beta ve hiperfosforile Tau'nun çözünebilir durumdan çözünemez hale geçmesine neden olmaktadır (Yan *et al.* 1996). Bunun sonucu olarak bu maddeler agrege olur ve senil plaklar öle nörofibriler yumakları oluşturmaktadırlar. Amiloid irikimi geliştikten sonra enflamatuvar bir süreç

başlamaktadır. Aktif mikroglia hücreleri prolifer olmakta ve NO, serbest oksijen radikalleri ve TNF alfa, İnterlökin-1 gibi sitokinleri üretmektedir. Bu sitokinler hem direkt yolla hem de anormal Amiloid Prekürsör Protein oluşumuna neden olarak indirekt yolla hücre hasarına neden olmaktadır (Kalaria 1999). Çalışmamızda Toluen verilen grupta amiloid proteinlerinin senil plaklarda belirgin şekilde biriktiğini göstermektedir. Histokimyasal olarak Toluen verilen grupta amiloid proteinlerinin birikimine bağlı olarak boyanma yoğunluğu ve boyanan alanların büyüklüğünde ve sayısında artış olmaktadır.

Amiloid plak oluşumu Alzheimer hastalığının ilk patolojik olayı olup nöritik plak oluşumuyla sonuçlanabilmektedir. Amyloid plaklar serebrumda bulunan arteriollerde birikerek amyloid anjiopati oluşturmaktadır. Alzheimer hastalarında serebrumda bulunan meningeal arteriollerde amyloid plak gözlemlenmiştir (Naslund *et al.* 2000; Gong *et al.* 2003; Georganopoulou *et al.* 2005). Amiloid birikiminin Alzheimer'a neden olabileceği konusunda yapılan bir çalışma da amiloid birikimi olan nöronal uzantılarda meydana gelen morfolojik değişiklikler ile aksiyon potansiyellerinin ve bu nedenle iletimin geciktiği bildirilmiştir (Knowles *et al.* 1999). Başka bir araştırmasında korteksin üst tabakasında daha az diffüz yoğunluk ancak alt korteks tabakasında ise daha yoğun diffüz olduğu rapor edilmiştir (Dickson 1997). Yaptığımız çalışmada Toluen grubunda bu duruma paralel bir şekilde beyin korteksinin üst tabakasında daha az korteksin alt katmanlarında daha yoğun diffüz amiloid plak oluşumu görülmüştür. Kontrol grubunda ise boyanma yoğunluklarında herhangi bir değişiklik gözlemlenmiştir. Bu durumda Toluen maruziyetinin senil plakların oluşumunu arttırarak Alzheimer'a neden olma olasılığını artırabileceğini düşünmekteyiz.

Apoptozis komşu hücrelere zarar vermeden sitoplazmada küçülme, membran değişiklikleri ve DNA parçalanması ile karakterize olan programlı hücre ölümüdür (Saraste and Pulkki 2000). Apoptotik yollar genel olarak intrinsik (mitokondri aracılı) ve ekstrinsik (reseptör aracılı) olarak değerlendirilir. Mitokondri aracılı apoptozis sitokrom c, apoptozis indükleyici faktör ve Smac/DIABLO gibi apoptojenik faktörlerin mitokondri intermembranal boşluğundan sitozole salınması ile tetiklenir. Sitokrom c'nin

sitozole salınımla sitokrom c/Apaf-1/ATP/prokaspaz-9'dan oluşan apoptoz kompleksi, kaspaz-9'u ve sonrasında kaspaz-3'ü aktive eder (Friedlander 2003; Bender *et al.* 2005; Fulda and Debatin 2006). Apoptozun mediatörlerinden proapoptotik proteinlerin (Bax, Bad, Bıd) artışı apoptozu artırırken anti apoptotik proteinlerin (Bcl-2) artışı apoptozu baskılayarak azaltmaktadır. Başka çalışmalarda Toluen'in dokuda apoptotik aktiviteyi attırdığından bahsedilmektedir (Gotohda *et al.* 2009; Taş *et al.* 2011). Bizim çalışmamızda apoptozisin varlığını ortaya koymak için her iki gruba ait beyin doku kesitlerinde yapılan immünohistokimyasal boyamada Bax ve Kaspaz-3 immün reaktivitesi gözden geçirilmiştir. Bax ve Kaspaz-3 proteininin beyin dokusunda görünür hale getirilerek incelenmesi için yapılan bu boyamada, saptanan reaksiyonun yoğunluğuna göre semi kantitatif değerlendirme yapılmıştır. Kontrol grubuna ait beyin kesitleri incelendiğinde, beyin korteksi, hippocampal alan, entorhinal korteks ve substantia nigra bölgelerindeki hücre sitoplazmalarında, immünohistokimyasal olarak Bax immün reaktivitesinin negatif olduğu (0) görülmüştür. Toluen uygulanan tavşanlarda ise, beyin korteksi hücre sitoplazmalarında şiddetli derecede (+3) Bax immün reaktivitesinde önemli oranda artış meydana geldiği tespit edilmiştir.

El-Nabi Kamel and Shehata (2008) ratlarda yaptıkları bir çalışmada Toluenden en fazla etkilenen dokunun beyin dokusu olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle beyin korteksinde Kaspaz-3 aktivitesinin önemli oranda arttığını bildirmişlerdir. Toluenin frontal korteks ve beyin sapında hasara yol açarak Kaspaz-3 aktivitesinde artışa yol açtığı da başka bir çalışmada gösterilmiştir (Kanter 2008). Yapılan bir çalışmada araştırmacılar, kronik Toluene maruziyetinin Bax immunereaktivitesinde artışa yol açtığını göstermişlerdir (Tas *et al.* 2011). Toluene maruz kalan sıçanların akciğer, beyin ve testis dokularında dokularında tunel pozitif hücre sayısında anlamlı oranda artışa neden olduğu bildirilmiştir (Kanter 2011a, 2011b, 2011c). Çalışmamızda ise bu araştırmalara paralel olarak beyin korteksi, hippokampal alan, entorhinal korteks ve substantia nigra bölgelerindeki hücre sitoplazmalarında, immünohistokimyasal olarak Kaspaz-3 immün reaktivitesinin kontrol grubunda negatif olduğu (0) görülmüştür. Toluen uygulanan tavşanlarda ise, beyin korteksi hücre sitoplazmalarında Kaspaz-3 immün reaktivitesinde (3+) önemli oranda artış meydana geldiği tespit edilmiştir.

5.1. Sonuç

Sonuç olarak yüksek dozda Toluenin 3 saat gibi çok kısa bir sürede bile önemli beyin hasarı oluşturduğu, senil amiloid plak oluşumu ve serum antioksidan seviyelerinde önemli derecede azalmanın meydana getirmesi ile akut Toluen maruziyetinin vücutta kalıcı ve geri dönüşümü zor hasarlar oluşturmalarının mümkün olabileceği kanaatine varılmıştır. Yüksek doz akut Toluen maruziyeti sonucu Toluenin beyin ve beyin dokusu ile ilgili birçok alanda aşırı bir şekilde biriktiği görülmüştür. Bu durum dikkate alınırsa Toluenin kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebileceği ve hücre içinde DNA'ya kadar ulaşp ciddi hasar oluşturabileceği gözlenmiştir.

Bu sonuçlara ilave olarak; çalışmamızda Toluenin özellikle beyinde yaptığı temel hasar olan astrosit aktivasyonu ve gliozisi biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerden faydalanarak belirgin olarak gözlemiş bulunmaktayız. Bu çalışma neticesinde proapoptotik proteinler olan Bax ve Kaspaz-3'ün yüksek dozda Toluen verilen hayvanların beyin korteksi, hippocampal alan, entorhinal korteks ve substantia nigra dokularında yüksek düzeyde olması Toluenin çok kısa bir sürede bile apoptozu tetikleyebileceğini göstermektedir. Yüksek doz akut Toluen maruziyetinin oluşturduğu intoksikasyon olgularının histopatolojik incelemelerinde beyin dokusunun ve ilgili alanların erken dönemde de hasara neden olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman A. Temel İmmunoloji İmmun Sistemin İşlev ve Bozuklukları. Deniz G (Çev. Ed.) s.63-69, İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007.
- Abbasoğlu, E., and Hoşal, B.M., 2001. Apoptozis: göz hastalıklarındaki yeri. Türkiye klinikleri Oftalmoloji Dergisi 10, 115-120.
- Adell, A., and Artigas, F., 2004. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehavi Revi*, 28, 415–431.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1994. Toxicological Profile for Toluene. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts56.pdf>.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2000. Toxicological Profile for Toluene. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.pdf>.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2006. Case Studies in Enviromental Medicine; Toluene Toxicity. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/toluene/>.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2007. CSEM Toluene toxicity: environmental medicine case study. Atlanta, GA, USA: ATSDR.
- Akyol, O., 2004. Şizofrenide oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 15-25.
- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends neurosc*, 12, 366-375.
- Allen, S.J., and Dawbarn, D., 2006. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin. Sci. (Lond.)*, 110, 175-191.
- Alleva, E., Aloe, L., Bigi, S., 1993. An updated role for nerve growth factor in neurobehavioural regulation of adult vertebrates. *Rev. Neurosci*, 4, 41-62.
- Aloe, L., Skaper, S.D., Leon, A., Levi - Montalcini, R., 1994. Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 19, 141-150.
- Alonso, A., and Llinas, R., 1989. Suprathreshold Na- dependent that-like rhytmicity in stellate cells of enthorhinal cortex layer2. *Nature*, 342,175-177.
- Altındağ, A., Özkan, M., Oto, R., 2001. İnhalanla ilişkili bozukluklar. *Klinik Psikofarmokoloji Bülteni*, 11,143-148.
- Amaral, D.G., Insausti, R., Cowan, W.M., 1987. The entorhinal cortex of the monkey: cytoarchitectonic organization. *J Comp Neurol*, 264,326-355.
- Ameno, K., Kiriü, T., Fuke, C., Ameno, S., Shinohara, T., Ijiri, I., 1992. Regional brain distribution of Toluene in rats and in a human autopsy. *Arch Toxicol*. 66,153–66.
- Anonim, 2016a. www.frontiersin.org, 18.11.2016
- Anonim, 2016b. www.slideshare.net, 21.11.2016
- Anonymous, 2016a. www.cmaj.ca, 10.11.2016
- Anonymous, 2016b. www.reading.ac.uk, 08.12.2016
- Arends, Y.M., Duyckaerts, C., Rozemuller, J.M., Eikelenboom, P., Hauw, J.J., 2000. Microglia, amyloid and dementia in alzheimer disease. A correlative study. *Neurobiol Aging*, 21,39-47.
- Arıncı, K., and Elhan, A., 2001. *Anatomi*. Ankara. Güneş Kitabevi, 2.cilt, 212–352.
- Bae, S.W., and Yoon, I.S., 2001. The beneficial effects of melatonin for Toluene

- hepatotoxicity in rats. *J Biomed Lab Sci*, 7, 99-102.
- Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I., 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 307, 97-101.
- Bale, A.S., Tu, Y., Carpenter-Hyland, E.P., Chandler, L.J., Woodward, J.J., 2005. Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abused inhalant Toluene. *Neuroscience* 130, 197-206.
- Balster, R.L., 1998. Neural basis of inhalant abuse. *Drug Alcohol Depend*, 51,207-14.
- Barde, Y.A., 1994. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 390, 45-56.
- Baydaş, G., Ercel, E., Canatan, H., Donder, E., Akyol, A., 2001. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell Biochem. Funct.*, 19, 37-41.
- Baydaş, G., Gürsu, M.F., Yilmaz, S., Canpolat, S., Yasar, A., Cikim, G., Canatan, H., 2002. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neurosci. Lett.*, 3, 195-198.
- Baydaş, G., Reiter, R. J, Nedzvetskii, V. S., Yaşar, A., Tuzcu, M., Ozveren F., Canatan, H., 2003. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner şntoxication by reducing reactivegliosis. *Toxicology Letters.*, 137, 169-174.
- Bayer, S.A., 1985. Hippocampal region . In: Paxinos G, ed. *The rat nervous system: Forebrain and Midbrain*. New York: Academic Press, 353-352.
- Beckstead, D.M., 1978. Afferent connections of the enthorinal cortical area in the rat as demonstreated by retrograde labeling with horseradish peroxidase. *Brain Res*, 152,249-264.
- Beckstead, M.J., Weiner, J.L., Eger, E.I., Gong, D.H., Mihic, S.J., 2000. Glycine and gamma-aminobutyric acid(A) receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol Pharmacol*, 57, 1199-1205.
- Bender, L.M., Morgan, M.J., Thomas, L.R., Liu, Z.G., Thorburn, A., 2005. Theadaptor protein TRADD activatesdistinctmechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell DeathDiffer.*, 12, 473-81.
- Benignus, V.A., 1981. Health effects of toluene: A review. *Neurotoxicology* 2, 567-88.
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, 882-888.
- Beyer, C.E., Stafford, D., LeSage, M.G., Glowa, J.R., Steketee, J.D., 2001. Repeated exposure to inhaled Toluene induces behavioral and neurochemical cross-sensitization to cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 154, 198-204.
- Bicker, G., 2001. Nitric oxide: An unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroid insect. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 48, 100-110.
- Bjelakovic G, Nagorni A, Bjelakovic M, Stamenkovic I, Arsic R, Katic V. Apoptosis: programmed cell death and its clinical implications. *Medicine and Biology* 2005; 12: 6-11.
- Blaskstad, T.W., 1956. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol*, 105, 417-537.
- Bowen, S.E., Batis, J.C., Mohammadi, M.H., Hannigan, J.H., 2005. Abuse pattern of

- gestational Toluene exposure and early postnatal development in rats. *Neurotoxicol Teratol*, 27, 105-116.
- Bridges, R.J., Koh, J.Y., Hatalski, C.G., Cotman, C.W., 1991. Increased excitotoxic vulnerability of cortical cultures with reduced levels of glutathione. *Eur. J. Pharmacol.*, 326, 199- 200.
- Brodal, A., 1981. *Neurological Anatomy*, Oxford University Press., 3rd ed.
- Burçak, G., and Andican, G., 2004. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*, 35, 159-169.
- Calderon-Guzman, D., Espitia-Vazquez, I., Lopez-Dominguez, A., Hernandez-Garcia, E., Huerta-Gertrudis, B., Coballase-Urritia, E., Juárez-Olguín, H., García-Fernández, B., 2005a. Effect of Toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and Na^+/K^+ -ATPase in adult rat brain. *Neurochem Res.*, 30, 619-624.
- Calderon-Guzman, D., Hernandez-Islas, J.L., Espitia Vazquez, I.R., Barragan-Mejia, G., Hernandez-Garcia, E., del Angel, D.S., Juárez-Olguín, H., 2005b. Effect of toluene and cresols on Na^+,K^+ -ATPase, and serotonin in rat brain. *Regul Toxicol Pharmacol*, 41, 1-5.
- Can Demirdöğen, B., 2010. Organophosphate Pesticide Poisonings and the Role of Serum Paraoxonase 1 (PON1) Enzyme in Organophosphate Metabolism. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.*, 67 (2), 97-112.
- Canadian Paediatric Society (CPS), 1998. Inhalant abuse. First Nations and Inuit Health Committee. *Paediatrics & Child Health*, 3 (2), 123-126.
- Canoruç, N., Çiçek, R., Atamer, A., Dursun, M., Turgut, C., Güneli, E., Canoruç, F., 2001. Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stress-induced ulcer formation in rats. *Turk J med Sci.*, 31,199-203.
- Carbonell, W.S., Murase, S.I., Horwitz, A.F., Mandell, J.W., 2005. Infiltrative microgliosis: activation and long-distance migration of subependymal microglia following periventricular insults. *J Neuroinflammation.*, 28, 2(1), 5-15.
- Carmichael, S.T., Clugnet, M. C., Price, J.L., 1994. Central olfactory connections in the macaque monkey. *J Comp Neurol*, 346, 403-434.
- Champe, P.C., and Harvey, R.A., 1997. Glikozaminoglikanlar. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E,. Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. p. 147-156.
- Chang, T.Y., Wang, V.S., Lin, S.Y., Yen, H.Y., Lai, J.S., Liu, C.S., 2010. Co-exposure to noise, N,N-dimethylformamide, and toluene on 24-hour ambulatory blood pressure in synthetic leather workers. *J Occup Environ Hyg.*, 7, 14-22.
- Chao, M.V., Rajagopal, R., Lee, F.S., 2006. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci. (Lond.)* 110, 167-173.
- Charil, A., Laplante, D.P., Vaillancourt, C., King, S., 2010. Prenatal stress and brain development. *Brain research reviews.*, 65(1), 56-79.
- Chavan, S., Sava, L., Saxena, V., Pillai, S., Sontakke, A., Ingole, D., 2005. Reduced glutathione: Importance of specimen collection. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.*, 20(1), 150-152.
- Choi, W.S., Lee, E.H., Chung, C.W., 2001. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *J Neurochem*, 77, 1531-1541.
- Çomunoğlu, N., Doğan Ekici, A. I., Eren, B., Türkmen, N., Fedakar, R., Çöloğlu, A. S.,

2009. Toluen Bileşiklerinin Toksik Etkilerinin 4 Otopsi Olgusu Üzerinden Değerlendirilmesi. *Adli Tıp Dergisi.*, 23(1), 33-43.
- Coskun, O., Oter, S., Korkmaz, A., Armutcu, F., Kanter, M., 2005. The oxidative and morphological effects of high concentration chronic Toluene exposure on rat sciatic nerves. *Neurochem Res*, 30, 33-38.
- Coskun, O., Yuncu, M., Kanter, M., Buyukbas, S., 2006. Ebselen protects against oxidative and morphological effects of high concentration chronic Toluene exposure on rat sciatic nerves. *Eur J Gen Med*, 3, 64-72.
- Cragg, S.J., and Greenfield, S.A., 1997. Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurosci* 17, 5738-5746.
- Crowe, M.J., Bresnahan, J.C., Shuman, S.L., Masters, J.N., 1997. Beattie M S. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med.*, 3, 73-76.
- Cruz, S.L., Mirshahi, T., Thomas, B., Balster, R.L., Woodward, J.J., 1998. Effects of the abused solvent Toluene on recombinant N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 286, 334-340.
- Del Arco, A., Segovia, G., Garrido, P., de Blas, M., Mora, F., 2007. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behavioural brain research.*, 176(2), p. 267-73.
- Dere, F., 2000. Nöroanatomi- Fonksiyonel Nöroloji Atlası ve Ders Kitabı. Adana. Adana Nobel Tıp Kitap Evi, 101-148.
- Dickson, D.W., 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropath Exp. Neurol.*, 56, 321-339.
- Dökmeci, İ., 1999. Endüstriyel Maddeler ile Akut Zehirlenmeler. Toksikoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 2.nd.Ed., 319-361.
- Donkelaar, H.J.T., Lammens, M., Hori, A., 2006. Clinical Neuro-embryology, Development and Developmental Disorders of the Human Central Nervous System, R. Lange, Editor. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Aalmanya., p. 447-51.
- Dossing, M., Aelum, J.B., Hansen, S.H., Lundqvist, G.R., Andersen, N.T., 1983a. Urinary hippuric acid and orthocresol excretion in man during experimental exposure to Toluene. *Br J Ind Med*. 40, 470-473.
- Dossing, M., Arlien-Soborg, P., Milling Petersen, L., Ranek, L., 1983b. Liver damage associated with occupational exposure to organic solvents in house painters. *Eur J Clin Invest*, 13, 151-157.
- Dündaröz, M.R., Turkbay, T., Akay, C., Sarıcı, S.U., Aydın, A., Denli, M., Gökçay, E., 2003. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescent with inhalant abuse. *Turk J Pediatr.*, 45(1), 43-45.
- Duplus, E., Glorian, M., Forest, C., 2000. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem.*, 275, 30749 -30752.
- Duvernoy, H.M., 2005. The human hippocampus: an atlas of applied anatomy. New York: Springer Verlag; Third Edition.
- Eastman, A., 1995. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biology*, 6, 45-52.

- Edelfors, S., Hass, U., Hougaard, K.S., 2002. Changes in markers of oxidative stress and membrane properties in synaptosomes from rats exposed prenatally to toluene. *Pharmacol Toxicol*, 90, 26-31.
- Eisenberg, D.P., 2003. Neurotoxicity and mechanism of Toluene abuse. *Quart J Biol Med.*, 19, 150-159.
- El-Nabi Kamel, M.A., Shehata, M., 2008. Effect of Toluene exposure on the antioxidant status and apoptotic pathway in organs of the rat. *Br J Biomed Sci.* 65, 75-79.
- Environment Protection and Heritage Council (EPHC), 2003. Toluene health review. http://www.ephc.gov.au/pdf/Air_Toxics/Tol_Health_Review.pdf.
- Erdoğan, B.B., and Uzaslan, E.K., 2003. Apoptozis mekanizmaları: Tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4, 165-174.
- Ererel, G., Erbas, D., Aricioglu, A., 1992. Free radicals and antioxidant systems (in Turkish). *Gazi Tip Dergisi (Gazi Medical Journal)*., 3, 243-250.
- Ergin, M., and Alkan, S., 2002. Apoptozis. *Arşiv*, 11, 495.
- Escobar, A., and Aruffo, C., 1980. Chronic thinner intoxication: Clinicopathologic report of a human case. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 43, 986-994.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, 186, 407-421.
- Fairbanks, V.F., and Klee, G.G., 1999. Biochemical aspects of hematology. C.A. URTIS, E.R. ASHWOOD. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Third edition, W. B. Saunders, Philadelphia, 1652-1653.
- Faust, R.A., 1994. Toxicity Summary for Toluene. OAK Ridge Reservation Enviromental Restoration Program. Chemical Hazard Evaluation Group Biomedical and Environmental Information Analysis Section Healt Sciences Research Division. 1-15.
- Filley, C. M., Halliday, W., Kleinschmidt-Demasters, B. K., 2004. The Effects of Toluene on the Central Nervous System. *American Association of Neuropathologists*. Vol., 63, 1-12.
- Fiore, M., Probert, L., Kollias, G., Akassoglou, K., Alleva, E., Aloe, L., 1996. Neurobehavioral alterations in developing transgenic mice expressing TNF - alpha in the brain. *Brain Behav. Immunol.*, 10, 126-138.
- Flanagan, R.J., Ives, R.J., 1994. Volatil Substance Abuse. *Bulletin on Narcotics*, United Nations Office on Drug And Crime, 2, 48-78.
- Floyd, R.A., 1990. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*, 4, 2587-2597.
- Friedlander, M.R., 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *NEJM*, 348, 1365-1375.
- Fulda, S., Debatin, K.M., 2006. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev.* 30, 217-223.
- Gartner, L.P., and Hiatt, J.P., 2007. *Color textbook of histology*, 3rd ed. Saunders, Elsevier.
- Gehle, K., 2001. Toluene Toxicity. Case Studies in Environmental Medicine U.S. Department OF Health And Human Services, ATSDR Publication No.: ATSDR-HE-CS-2002-0008 Course:SS3061 Date: Original Date: August 1993, Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Health Education and Promotion ATSDR/DHEP, www.atsdr.cdc.gov/HEC/CSEM/.

- Georganopoulou, D.G., Chang, L., Nam, J.M., Thaxton, C.S., Mufson, E.J., Klein, W.L., Mirkin, C.A., 2005. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 2273.
- Gerasimov, M.R., Schiffer, W.K., Marsteller, D., Ferrieri, R., Alexoff, D., Dewey, S.L., 2002. Toluene inhalation produces regionally specific changes in extracellular dopamine. *Drug Alcohol Dependence*, 65, 243–251.
- Gökmen, F., 2003. *Sistematik Anatomi*. Güven Kitabevi, İzmir.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 2003. Alzheimer's Disease affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 10417.
- Gordon, C.J., Samsam, T.E., Oshiro, W.M., Bushnell, P.J., 2007. Cardiovascular effects of oral toluene exposure in the rat monitored by radiotelemetry. *Neurotoxicol Teratol*, 29, 228–35.
- Gospe, S.M., and Calaban, M.J., 1988. Central nervous system distribution of inhaled Toluene. *Fund Appl Toxicol*, 11, 540–45.
- Gotohda, T., Nishimura, A., Morita, K., 2009. Immunohistochemical studies on early stage of hepatic damage induced by subacute inhalation of Toluene vapor in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 29, 505–509.
- Gotohda, T., Tokonuga, I., Kubo, S., Morita, K., Kitamura, O., Eguchi, A., 2000. Effect of Toluene on astrocytes and neurotrophic factor in rat brain. *Forensic Sci Intern*, 113, 233–38.
- Gotohda, T., Tokonuga, I., Kubo, S., Kitamura, O., Ishigami, A., 2002. Toluene inhalation induces glial cell line-derived neurotrophic factor, transforming growth factor and tumor necrosis factor in rat cerebellum. *Leg Med (Tokyo)*, 4, 21–28.
- Greenberg, M.M., 1997. The central nervous system and exposure to Toluene: A risk characterization. *Environ Res*, 72, 1–7.
- Griffin, J.W., 1981. Hexacarbon neurotoxicity. *Neurobehav Toxicol Teratol*, 3, 437–444.
- Güçlü, O., 2004. Uzun süreli tiner inhalasyonunun işitme yolları üzerine etkilerinin, hayvan modeli üzerinde işitsel beyin sapı yanıtları ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, K. Maraş: Sütçü İmam Üniversitesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı.
- Guzelian, P., Mills, S., Fallon, H.J., 1988. Liver structure and function in print workers exposed to toluene. *J Occup Med*, 30, 791–796.
- Haberly, L.B., 1985. Neuronal circuitry in olfactory cortex: anatomy and functional implications. *Chem Senses*, 10, 219–238.
- Halıfoğlu, I., Canatan, H., Ustundag, B., İlhan, N., İnanc, F., 2000. Effect of Thinner Inhalation on Lipid Peroxidation and some Antioxidant Enzymes of People Working with Paint Thinner. *Cell Biochem. Funct.*, 18, 263–267.
- Halks-Miller, M., Henderson, M., Eng, L.F., 1986. Alpha tocopherol decreases lipid peroxidation, neuronal necrosis, and reactive gliosis in reaggregate cultures of fetal rat brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 4, 471–484.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol*, 62, 71–77.

- Health Protection Agency (HPA), 2007. Toluene Toxicological Overview. http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1194947395545.
- Heese, K., Hock, C., Otten, U., 1998. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J. Neurochem.*, 70, 699-707.
- Heidbreder, C.A., and Groenewegen, H.J., 2003. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and biobehavioral reviews.*, 27(6), 555- 579.
- Heneka, M.T., Loschmann, P.A., Gleichmann, M., Weller, M., Schulz, J.B., Wulner, U., Klockgether, T., 1998. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after simulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J Neurochem*, 71, 88-94.
- Hoffman, B.H., McLellan, R.K., 1993. Toluene Toxicity, Case Study 42, Case Studies in Environmental Medicine, 727-743.
- Hoover, W.B., and Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain structure & function.*, 212(2), p. 149-79.
- Hu, Y.M., Benedict, M.A., Ding, L.Y., 1999. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.*, 18, 3586- 3595.
- Ilgazlı, A., Şengül, C., Maral, H., Özden, M., Erçin, C., 2004. The effects of thinner inhalation on superoxide dismutase activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. *Clin Chim Acta.*, 343(1-2),141-144.
- Insausti, R., Amaral, D.G., Cowan, W.M., 1987. The entorhinal cortex of the monkey: cortical afferents. *J. Comp Neurol*, 264, 356-395.
- International Agency For Research On Cancer (IARC). Summaries & Evaluations, Toluene, 1985.
- James, D., 1995. Neuroanatomy. United States of America. Williams & Wilkins, 1– 20.
- Janeczko, K., 1989. Spatiotemporal patterns of the astroglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development: a combined immunocytochemical and autoradiographic study. *Brain Res.*, 485, 236-243.
- Janeczko, K., 1993. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci.*, 11 (2), 139-47.
- Jessel, T., Sanes, J.R., 2000. The generation and survival of nerve cells editor. In: Kandel E, Schwarz JH, Jessel TM, editor. *Principals of Neural Science*. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 1149-1161.
- Jones, H.E., 1997. Neurobehavioral consequences of intermittent prenatal exposure to high concentrations of toluene. *Neurotoxicology and Teratology*, 4, 305-13.
- Juliana, P., and Seth, P., 2012. When a Glue Sniffer Turns Weak. *International Journal of Clinical Medicine.*, 3, 769-771.
- Kalaria, R.N., 1999. Microglia and Alzheimer's disease. *Curr Opin Hematol*, 15-24.
- Kamal, A.A., Gomaa, A., el Khafif, M., Hammad, A.S., 1989. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dusts. *Environ Res*, 49, 173–180.
- Kanter, M., 2008. Protective effects of nigella sativa on the neuronal injury in frontal cortex and brain stem after chronic toluene exposure. *Neurochem Res.*, 33, 2241-2249.

- Kanter, M., 2011a. Thymoquinone reestablishes spermatogenesis after testicular injury caused by chronic Toluene exposure in rats. *ToxicolInd Health.*, 27, 155-66.
- Kanter, M., 2011b. Thymoquinone attenuates lung injury induced by chronic Toluene exposure in rats. *ToxicolInd Health.*, 27, 387.
- Kanter, M., 2011c. Protective effects of thymoquinone on the neuronal injury in frontal cortex after chronic Toluene exposure. *J MolHistol.*, 42, 39-46.
- Karabulut, İ., 2007. Toluenin in vivo ve in vitro olarak eritrosit zar stabilitesine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara.
- Karagözler, A.A., Mehmet, N., Batçioğlu, K., 2002. Effects of long-term exposure on blood cytokine levels and antioxidant enzyme activities in house painters. *J Toxicol Environ Health, A.* 65(17), 1237-1246.
- Katz, B., and Miledi, R., 1970. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol*, 207: 789–801.
- Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C., Dietrich, W.D., 2001. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60, 422-429.
- Kennedy, M.B., 1994. The Biochemistry of Synaptic Regulation in the Central Nervous System. *Ann Rev Biochem.*, 63, 571-600.
- Kerr, J.B., 1992. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 95, 825-830.
- Knowles, R.B., Wyart, C., Buldyrev, S.V., Cruz, L., Urbanc, B., Hasselmo, M.E., Stanley, H.E., Hyman, B.T., 1999. Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci*, 96, 5274-5279.
- Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Li, Y., Frost, D.O., Gibb, R., 2012. Experience and the developing prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 109 Suppl 2, p. 17186-17193.
- Kondo, H., Huang, J., Ichihara, G., Kamijima, M., Saito, I., Shibata, E., Ono, Y., Hisanaga, N., Takeuchi, Y., Nakahara, D., 1995. Toluene induces behavioral activation without affecting striatal dopamine metabolism in the rat: behavioral and microdialysis studies. *Pharmacol Biochem Behav*, 51, 97–101.
- Korbo, L., Ladefoged, O., Lam, H.R., Ostergaard, G., West, M.J., Arlien-Søborg, P., 1996. Neuronal loss in hippocampus in rats exposed to Toluene. *Neurotoxicology*, 17, 359–66.
- Kornfeld, M., Moser, A.B., Moser, H.W., *et al.*, Solvent vapor abuse leukoencephalopathy. Comparison to adrenoleukodystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 53, 389–398.
- Köse, K., and Doğan, P., 1991. Lipid peroxidation (in Turkish). *Erciyes Tıp Degisi (Erciyes Medical Journal)*, 1, 340-345.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L.M., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q.L., Salvesen, G.S., Bredesen, D.E., Rosenthal, R.E., Fiskum, G., Reed, J.C., 1999. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci*, 96, 5752-5757.
- Kulling, S., and Pronczuk J., 1985. Chemical Safety Information from

- Intergovernmental Organizations, International Programme on Chemical Safety (IPCS) is a collaborative venture of (IPCS INCHEM) 05-18-04, <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim534.html>.
- Kültürsay, H., and Kayıkçıoğlu, M., 2002. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 4, 323-329.
- Kurt, A., 2003. Bölüm 16. Gökmen F.G. Sistematiik Anatomi. İzmir. İzmir Güven Kitabevi, 725–743.
- Kuyumcu, A., Duzgun, A.P, Ozmen, M.M., Besler, H.T., 2004. Travma ve enfeksiyonda nitrikoksidin rolü. *Ulus Travma Dergisi.*, 10(3),149-159.
- Ladefoged, O., Hougaard, K.S., Hass, U., Sorensen, I.K., Lund, S.P., Svendsen, G.W., Lam, H.R., 2004. Effects of combined prenatal stress and toluene exposure on apoptotic neurodegeneration in cerebellum and hippocampus of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 94, 169-176.
- Laplanche, F., Stevenson, C.W., Gratton, A., Srivastava, L.K., Quirion, R., 2004. Effects of neonatal ventral hippocampal lesion in rats on stress-induced acetylcholine release in the prefrontal cortex. *Journal of neurochemistry.*, 91(6), p.1473-82.
- Lee, J.Y., Mook-Jung, I., Koh, J.Y., 1999. Histochemically Reactive Zinc in Plaques of the Swedish Mutant b-Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*. Vol., 19, RC10, 1- 5.
- Levi - Montalcini, R., Aloe, L., Alleva, E., 1990. A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune system. *Prog. Neurol. Endocrinol. Immunol.*, 3, 1-10.
- Li, M., Ona, V.O., Chen, M., Kaul, M., Tanneti, L., Zhang, X., Stieg, P.E., 2000. Lipton S A, Friedlander R M. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 9, 333-342.
- Liu, X.Z., Xu, X.M., Hu, R., Du, C., Zhang, S.X., McDonald, J.W., Dong, H.X., Wu, Y.J., Fan, G.S., Jacquin, M.F., Hsu, C.Y., Choi, D.W., 1997. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 17, 5395-5406.
- Lu, J., Ashwell, K., Ken, W.S., Waite, P., 2000. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*, 25, 1859-1866.
- Luberda, Z., 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive biology*, 5(1), 5-17.
- Luster, M. I., Simeonova, P. P., Gallucci, R., and Matheson, J., 1999. Tumor necrosis alpha and toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.*, 29, 491–511.
- Makar, T.K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A.S., Perumal, A.S., Cooper, A.J., 1994. Vitamin E, ascorbate, glutathione disulfide and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.*, 62, 45-53.
- Martin, K.A., 2001. Toluene Toxicity:Department of Emergency, The Toledo Hospital, *Medicine Specialites* , 1-13.
- Mates, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 83-104.
- Matthew, B.G., Jourdeuil, D., Wink, D.A., 1999. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol.*, 276, 315-321.

- Mattia, C.J., Adams, J.D., Bondy, S.C., 1993c. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol*, 46, 103-110.
- Mattia, C.J., Adams, J.D., Bondy, S.C., 1993b. Free radical induction in the brain and liver by products of Toluene catabolism. *Biochem Pharmacol*, 46, 103-110.
- Mattia, C.J., Ali, S.F., Bondy, S.C., 1993a. Toluene induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Mol Chem Neuropathol.*, 18, 313-328.
- Mercan, U., 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15, 91-96.
- Meydan, S., Altas, M., Nacar, A., Ozturk, O.H., Tas, U., Zararsiz, I., Sarsilmaz, M., 2012. The Protective Effects Of Omega-3 Fatty Acid Against Toluene-Induced Neurotoxicity In Prefrontal Cortex Of Rats. *Human and Experimental Toxicology.*, 31, 1179-1185.
- Miller, E.K., and Cohen, J.D., 2001. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual review of neuroscience.*, 24, p. 167-202.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewsko, M., 1994. Tumor supressor p53 is a regölator of bcl-2 bax gene expression in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- Mohan, I.K., Dsa, U.N., 1997. Oxidant stress, antioxidants and essential fatty acids in bronchial asthma. *Med. Sci. Res.*, 25,307-309.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W., 1996. Fizyolojik öneme sahip lipidler. Dikmen N, Özgönen T, Harper'ın Biyokimyası, Yirmidördüncü baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
- Nagata. S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.
- Naslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., *et al.*, 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.*, 283, 1571-1580.
- Newton, K., and Strasser, A., 1998. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev.*, 8, 68-75.
- Nussler, A. K., DiSilvio, M., Billiar, T. R., Hoffman, R. A., Geller, D. A., Selby, R., Madariaga, J., Simmons, R. L., 1992. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J. Exp. Med.* 176, 261-264.
- Office of Enviromental Health Hazard Assesment (OEHHA). Determination of Acute Reference Exposure Levels for Airborne Toxicants, 1999. http://www.oehha.ca.gov/air/acute_rels/pdf/108883A.pdf.
- Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D., 2001. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2, 91-95.
- Olmos Jose, D., Beltramino, A.C., Alheid, G., 2004. Amigdala and extended amygdala of rat: A cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. *The rat nervous system. Elsevier, USA*, s. 509-603.
- Özen, O.A., Coşar, M., Şahin, O., Fidan, H., Eser, O., Mollaoğlu, H., Alkoç, O., Yaman, M., Songur, A., 2008. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat prefrontal cortex. *Neurol Sci*, 29, 147-152.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S., 1993. Nitric oxide release accounts fort he biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.*, 327,524-6.
- Park, C.K., Kwon, K.T., Lee, D.S., Jo, C.M., Tak, W.Y., Kweon, Y.O., Kim, S.K., Choi, Y.H., 2003. A case of toxic hepatitis induced by habitual glue sniffing. *Korean J Hepatol.*, 4, 332-336.
- Park, J.J., Chang, H., Jung, J.Y., Jung, S.J., Song, K.H., Suh, W.N., Chun, S.W., Lee,

- H.Y., Yoo, T.H., 2006. A Case of Toluene-induced Renal Tubular Acidosis Presented with Hypokalemic Paralysis. *Journal of Korean Society Emergency Medicine*, 17, 656-658.
- Petanjek, Z., Judas, M., Kostovic, I., Uylings, H.B., 2008. Lifespan alterations of basal dendritic trees of pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: a layerspecific pattern. *Cerebral cortex.*, 18(4), p. 915-29.
- Petanjek, Z., Judas, M., Simic, G., Rasin, M.R., Uylings, H.B., Rakic, P., Kostovic, I., 2011. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 108(32), p. 13281-6.
- Pompella, A., 1997. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *Int J Vitam Nutr Res*, 67, 289–297.
- Ramachandran, A., Madesh, M., Balasubramanian, K.A., 2000. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol*, 15, 109-120.
- Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42: 405-426.
- Rand, Mj., Li, C.G., 1995. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: Nature of transmitter and mechanism of transmission. *Ann. Rev. Physiol.*, 57, 659-682.
- Raps, S.P., Lai, J.C., Hertz, L., Cooper, A.J., 1989. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res.*, 593, 398-401.
- Ray, R.D., and Zald, D.H., 2012. Anatomical insights into the interaction of emotion and cognition in the prefrontal cortex. *Neuroscience and biobehavioral reviews.*, 36(1), p. 479-501.
- Riegel, A. C., Zapata, A., Shippenberg, T. S., French, E. D., 2007. The Abused Inhalant Toluene Increases Dopamine Release in the Nucleus Accumbens by Directly Stimulating Ventral Tegmental Area Neurons. *Neuropsychopharmacology.*, 32, 1558–1569.
- Riegel, A.C., Ali, S.F., French, E.D., 2003. Toluene-induced locomotor activity is blocked by 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mGluR2/3 agonist LY379268. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1440–1447.
- Riegel, A.C., and French, E.D., 1999. An electrophysiological analysis of rat ventral tegmental dopamine neuronal activity during acute Toluene exposure. *Pharmacol Toxicol*, 85, 37–43.
- Rio, D.D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease*, 15, 316-328.
- Robinson, D.L., Volz, T.J., Schenk, J.O., Wightman, R.M., 2005. Acute ethanol decreases dopamine transporter velocity in rat striatum: in vivo and in vitro electrochemical measurements. *Alcohol Clin Exp Res*, 29, 746–755.
- Rosenberg, N.L., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Davis, K.A., Dreisbach, J.N., Hormes, J.T., Filley, C.M., 1988. Toluene abuse causes diffuse central nervous system white matter changes. *Ann Neurol*, 23, 611–14.
- Saraste, A., Pulkki, K., 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *CardiovascRes.*, 45, 528-537.

- Sarkar, D., Vallance, P., Harding, S.E., 2001. Nitric oxide: not just a negative inotrope. *European Journal of Heart Failure*, 3, 527-534.
- Schaumburg, H.H., and Spencer, P.S., 1976. Degeneration in central and peripheral nervous systems produced by pure n-hexane: An experimental study. *Brain*, 99, 183-92.
- Sen, C. K., and Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.*, 10, 709-720.
- Seo, H.S., Yang, M., Song, M.S., Kim, J.S., Kim, S.H., Kim, J.C., Kim, H., Shin, T., Wang, H., Moon, C., 2010. Toluene inhibits hippocampal neurogenesis in adult mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 94(4), 588-594.
- Sharp, C.W., and Rosenberg, N.L., 1997. Inhalants. In: Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG, eds. *Substance abuse. A comprehensive textbook*. Baltimore: Williams and Wilkins, 246-264.
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., *et al.*, 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia, *Neuroscience*, 86, 353-387.
- Somogyi, M., 1930. A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar. *J Biol Chem*, 86, 655-663.
- Sonders, M.S., Zhu, S.J., Zahniser, N.R., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci*, 17, 960-974.
- Sotaniemi, E.A., Sutinen, S., Sutinen, S., Arranto, A.J., Pelkonen, R.O., 1982. Liver injury in subjects occupationally exposed to chemicals in low doses. *Acta Med Scand*, 212, 207-215.
- Takei, Y., and Laskey, R., 2008. Interpreting crosstalk between TNF - alpha and NGF: potential implications for disease. *Trends Mol. Med.* 14, 381-388.
- Taner, D., 2002. *Fonksiyonel Nöroanatomi*. Ankara. Metu Pres, 33-282.
- Taş, U., Ögetürk, M., Meydan, S., Sapmaz, H. I., Dabak, D. Ö., Kuloğlu, T., Sarsılmaz, M., 2009. Toluene Solutulan Sıçanların Karaciğerinde Ghrelin Ekspresyonu. *F.Ü. Sağ. Bil. Tıp Derg.*, 23 (3), 151-154.
- Taş, U., Ogeturk, M., Meydan, S., Kus, I., Kuloglu T., İlhan, N., Kose, E., Sarsılmaz, M., 2011. Hepatotoxic activity of Toluene inhalation and protective role of melatonin. *Toxicol Ind Health.*, 27, 465-73.
- Thiebaut de Schotten, M., Dell'Acqua, F., Valabregue, R., Catani, M., 2012. Monkey to human comparative anatomy of the frontal lobe association tracts. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 48(1), p. 82-96.
- Thomas, J.A., 1999. Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 916-921.
- Tillar, R., Shafer, T.J., Woodward, J.J., 2002. Toluene inhibits voltage sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. *Neurochem Int*, 41, 391-397.
- Tomei, F., Giuntoli, P., Biagi, M., Baccolo, T.P., Tomao, E., Rosati, M.V., 1999. Liver damage among shoe repairers. *Am J Ind Med*, 36, 541-547.
- Tsatsakis, A.M., Dolapsakis, G., Troulakis, G., Christodoulou, P., Relakis, K., Trikilis, N., Michalodimitrakakis, M.N., 1997. Fatal and non-fatal outcome by accidental intoxication with paint thinner. *J Clin Forensic Med*, 4, 133-137.
- Tsuga, H., and Honma, T., 2000. Effects of short-term toluene exposure on ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors in the rat frontal cortex and hippocampus. *Neurotoxicol Teratol*, 22, 603-606.

- Tsuga, H., Haga, T., Honma, T., 2002. Effects of toluene exposure on signal transduction: toluene reduced the signaling via stimulation of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes in CHO cells. *Jpn J Pharmacol*, 89, 282–289.
- Tsuga, H., Wang, R.S., Honma, T., 1999. Effects of toluene on regulation of adenylyl cyclase by stimulation of G-protein-coupled receptors expressed in CHO cells. *Jpn J Pharmacol*, 81, 305–308.
- Tsujimoto, S., 2008. The prefrontal cortex: functional neural development during early childhood. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry.*, 14(4), p. 345-58.
- Tumer, A. R., Atilla, P., Onbasilar, I., Biberoglu, G., Muftuoglu, S., 2007. Protective role of vitamin E on the harmful effects of toluene on brain tissue. *Neurosciences. Vol.*, 12 (3), 191-197
- Tzschentke, T.M., 2001. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog Neurobiol*, 63, 241–320.
- U.S.Environmental Protection Agency (EPA). Toxicological Review of Toluene, 2005. <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0118-tr.pdf>.
- Ulakoğlu, E.Z., Saygı, A., Gümüştüş, M.K., Zor, E., Öztekin, İ., Kökoğlu, E., 1998. Alterations in superoxide dismutase, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: Relationship between histopathological properties. *Pharmacological Research.*, 38(3), 209-214.
- Usami, Y., Matsuda, K., Sugano, M., Ishimine, N., Kurihara, Y., Sumida, T., Yamauchi, K., Tozuka, M., 2011. Detection of chymase-digested C-terminally truncated apolipoprotein A-I in normal human serum. *Journal of immunological methods.*, 369(1-2), p. 51-8.
- Uylings, H.B., Groenewegen, H.J., Kolb, B., 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural brain research.*, 146(1-2), p. 3-17.
- Uzun, N., Karaali, S.F., Kızıltan, M.E., 2001. Kronik tolüen ve n-heksan intoksikasyonunda periferik sinir sistemi hasarı: elektrofizyolojik inceleme. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 32, 142-150.
- VSAGO (Volatile Solvents Abuse A Global Overviews), 1999. Social Change And Mental Health, World HealthOrganization (WHO), Substance Abuse Department (WHO/HSC/SAB/99.7), 1-47.
- Vural, M., and Ögel, K., 2005. Uçucu maddelerin kalp üzerine etkileri. *Bağımlılık Dergisi*, 6, 142-146.
- Wanda, M.H., Colin, G.R., Matthew, A.W., 2002. Handbook of toxicologic pathology. 2nd Edition, California: Academic Press, 243-249.
- Westerink, R.H.S., and Vijverberg, H.P.M., 2002. Toluene-induced, Ca²⁺-dependent vesicular catecholamine release in rat PC12 cells. *Neurosci Lett*, 326, 81–84.
- Wilfong, E. R., and Dey, R. D., 2004. Nerve Growth Factor and Substance P Regulation in Nasal Sensory Neurons after Toluene Diisocyanate Exposure. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Vol.*, 30, 793–800.
- Wilkins-Haug, L., 1997. Teratogen update: Toluene. *Teratology*, 55, 145–51.
- Win-Shwe, T. T., Kunugita, N., Yoshida, Y., Nakajima, D., Tsukahara, S., Fujimaki, H., 2012. Differential mRNA expression of neuroimmune markers in the hippocampus of infant mice following toluene exposure during brain developmental period. *Journal of applied toxicology.*, 32, 126–134.

- Win - Shwe, T.T., Tsukahara, S., Ahmed, S., Fukushima, A., Yamamoto, S., Kakeyama, M., Nakajima, D., Goto, S., Kobayashi, T., Fujimaki, H., 2007. Athymic nude mice are insensitive to low - level Toluene - induced upregulation of memory - related gene expressions in the hippocampus. *Neurotoxicology*, 28, 957-964.
- Wise, R.A., 2002. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron*, 36, 229-240.
- Woo, M., Hakem, A., Elia, A.J., Hakem, R., Duncan, G.S., Patterson, B.J., Mak, T.W., 1999. In vivo evidence that caspase-3 is required for Fas-mediated apoptosis of hepatocytes. *J Immunol*, 163, 4909-4916.
- Yagi, K., 1984. Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymology*, 105:328-337.
- Yan, S.D., Chen, X., Chen, M., 1996. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.*, 382(6593), 685-691.
- Yeterian, E.H., and Pandya, D.N., 1991. Prefrontostriatal connections in relation to cortical architectonic organization in rhesus monkeys. *The Journal of comparative neurology.*, 312(1), p. 43-67.
- Yeterian, E.H., Pandya, D.N., Tomaiuolo, F., Petrides, M., 2012. The cortical connectivity of the prefrontal cortex in the monkey brain. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior.*, 48(1), p. 58-81.
- Young, B., Lowe, J.S., Stevens, A., Heath, J.W., 2007. Wheater's functional histology, 5th ed. Elsevier.
- Yücesan, B., Kurt, M., Sezen, F., Subaşı, S. A., 2013. İlaçlama sektöründe çalışan işçiler ile zehirlenme şüphesi görülen hastaların kolinesteraz seviyelerinin belirlenmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg.*, 70(1), 7 – 14..
- Zararsız, I., Kus, I., Akpolat, N., Songur, A., Ogeturk, M., Sarsilmaz, M., 2006. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. *Cell Biochem Funct*, 24, 237-244.
- Zengin Ulakoğlu, E., Saygı, A., Gümüştas, M.K., Zor, E., Akkaya, A., Kökoğlu, E., 1998. Kronik tiner inhalasyonunun sıçan akciğer ve karaciğer dokuları lipid peroksidasyonlarına etkisi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 29, 75-78.
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Clower, R.P., Rempel, N.L., 1993. Damage to the perirhinal cortex exacerbates memory impairment following lesions of the hippocampal formation. *J Neurosci*, 13, 251-265.

ÖZGEÇMİŞ

01 Ocak 1982 tarihinde Trabzonun Of ilçesinde Fındıkoba köyünde doğdum. İlk, Orta ve Lise öğrenimimi Bursanın İnegöl ilçesinde bitirdim. 2001 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne başladım ve aynı bölümden 2005 yılında mezun oldum. Lisans üstü eğitimime 2006 yılında TUS (Tıpta Uzmanlık Sınavı) puanımla Erzurum Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Biyokimya Anabilim Dalında başladım ancak bölümü bazı engelleme ve sebeplerden dolayı 2009 yılında bırakmak zorunda kaldım. Daha sonrasında ise aynı yıl Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitimime başladım ve 2011 de mezun oldum. 2013 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Anatomi Anabilim Dalı Yüksek Lisans programına başladım ve 2015 yılında mezun oldum. 2012 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı Doktora programına başladım 2017 yılında mezun oldum. 2013 yılında Kanada Ottawa'da bulunan International Metaphysics Of Special Academy'den uzaktan eğitim yöntemi ile Akupunktur Uzmanlığı belgesi aldım. Evli ve bir kız babasıyım. 2012 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yaptım. Şu an Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında Uzman kadrosu ile akademik hayatıma devam etmekteyim.