

T. C.

757069

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK TİNER İNHALASYONUNUN RATLARDA ÖĞRENME
VE HAFIZA YETENEĞİ İLE BEYİN DOKUSU NEURAL CELL
ADHEZYON MOLEKÜLLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Mehmet Faik ÖZVEREN

ELAZIĞ-2004

Prof. Dr. Necip İLHAN

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

[Signature]

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof Dr. Al-Sayid SECRET *Page 1*

Superior
Brynn

9/11/99

James

TEŞEKKÜR

Bilimsel yaklaşımın temelini oluşturan analitik düşünme yeteneğinin kazanılmasında Ph.D. eğitimi tüm dünya üniversitelerinde araştırmacılarda aranan özelliktir. Ülkemizde tıp doktorlarının tıp fakültesini bitirdiklerinde aldıkları M.D. ünvanı üniversitelerimizde öğretim üyeliğine yükselmede yeterli bir derece olarak görülmektedir. Tıpta uzmanlık eğitiminin içerisinde gelen bir tıp doktoru olarak iyi bir araştırmacı niteliğinin kazanılmasında Ph.D. eğitiminin kesinlikle alınması gerektiğine inanıyorum. Doktora eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen, deneyim ve engin bilgilerinden faydalandığım tez danışmanım Prof. Dr. Gıyasettin Baydaş'a, tezimin deneysel aşamasındaki yardımlarından dolayı Op. Dr. İsmail Akdemir'e ve Araştırma Görevlisi Abdullah Yaşar'a, bu eğitim programı döneminde yardımlarını gördüğüm Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Haluk Keleştimur, Prof. Dr. Abdülbaki Türkoğlu ve Y. Doç. Dr. Selim Kutlu'ya teşekkür ediyorum. Ayrıca projeye mali destek sağlayan FÜBAP'a teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3. 1. Genel Bilgiler	4
3. 1. 1.Tiner Kullanımı	4
3. 1. 2. Tinerin İnsan Vücuduna Etkileri	4
3. 1. 3. Uçucu İnhalanların Etki Mekanizması	5
3. 1. 4. Tiner ile Reaktif Oksijen Ürünlerinin Oluşumu	6
3. 1. 5. Tinere Bağlı Oluşan Sinir Sistemi Klinik Bulguları	7
3. 1. 6. Tiner Öğrenme ve Hafıza Fonksiyonu	7
3. 1. 7. Sinaptik Plastisite	8
3. 1. 8. Öğrenme ve Hafıza Fonksiyonunda Hipokampus	8
3. 1. 9. Sinaptik Plastisite ve PSA-NCAM	9
3. 1. 10. Uzun Dönem Hafızanın (Longterm-memory) Oluşması	10
3. 1. 11. Sinaptik Plastisite ve LTP	11

3. 1. 12. Öğrenme ve Hafıza	12
3. 1. 13. Hücre Adhezyon Molekülleri	14
3. 1. 14. İmmünglobulin Süper-ailesi ile NCAM İlişkisi	14
3. 1. 15. NCAM Moleküllerinin Yapısı ve Özellikleri	16
3. 1. 16. NCAM'in Polisializasyonu	18
3. 1. 17. Öğrenme ve Hafızanın Şekillenmesinde NCAM'in Rolü	19
3. 1. 18. Sinir Sistemi Hastalıkları ile NCAM İlişkisi	21
3. 2. Amaç	22
4. GEREÇ VE YÖNTEM	23
4. 1. Deney Hayvanları ve Beslenmesi	23
4. 2. Deneysel Uygulamalar	24
4. 3. Morris Water Maze Öğrenme Testinin Yapılması	26
4. 4. Glutasyon, Malondialdehit ve NCAM Düzeylerinin Ölçülmesi	26
4. 5. İstatistik	27
5. BULGULAR	28
Glutasyon Sonucu	29
MDA Sonucu	30

NCAM 120 Sonucu	31
NCAM 140 Sonucu	32
NCAM 180 Sonucu	33
Elektroforez Bant Sonuçları	34
Morris Water Maze Testi Sonucu	35
6. TARTIŞMA	36
7. KAYNAKLAR	42
8. ÖZGEÇMİŞ	50

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Rat yemlerinin kalori değerleri ve karışım oranları	23
Tablo 2. Yemdeki ham maddelerin terkipdeki oranı	24
Tablo 3. Morris water maze test sonuçları	35



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Üç major NCAM izotipinin genel yapıları	16
Şekil 2. Homofilik NCAM moleküllerinin polisializasyonu	18
Şekil 3. Glutasyon sonucu	29
Şekil 4. MDA sonucu	30
Şekil 5. NCAM 120'nin relative densitometrik analizi	31
Şekil 6. NCAM 140'ın relative densitometrik analizi	32
Şekil 7. NCAM 180'in relative densitometrik analizi	33
Şekil 8. Western blot ile saptanan değerler	34

KISALTMA LİSTESİ

CAM	Hücre adezyon molekülleri
GSH	Redükte glutatyon
Ig	İmmünoglobulin
LTP	Long term potentiation
MDA	Malondialdehid
MSS	Merkezi sinir sistemi
NCAM	Nöral cell adezyon molekülü
PSA	Polisialik asit
ROÜ	Reaktif oksijen ürünleri

1. ÖZET

Tiner endüstride bol kullanılmasının yanı sıra özellikle gençlerde bağımlılık alışkanlığı yapmasıyla da gündeme gelen bir uçucu maddedir. Canlılar toksik düzeyde tinere maruz bırakıldığında nöral dokuya kolay geçmesi nedeniyle öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında hasar ortaya çıkmaktadır. Diğer taraftan nöral cell adezyon moleküllerinin (NCAM) öğrenme ve uzun dönem hafızanın kurulmasında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda 3000 ppm/gün uzun dönem toluen verilen ratlarda öğrenme ve hafıza yeteneğinin nasıl etkilendiği incelendi. Bu amaçla kontrol, tiner ve tiner sonrası iyileşme grupları oluşturuldu. Ratların korteks, serebellum ve hippocampusları ayrılarak sodyum dodesil sülfat elektroforez yöntemi ile NCAM proteinleri ayrıştırıldı ve immunblotting yöntemi ile bunların seviyeleri ölçüldü. Doku harabiyetinin saptanması için glutatyon peroksidaz ve malondialdehit ölçümleri yapıldı. Ratların öğrenme ve hafıza fonksiyonları Morris water maze testi ile ölçüldü. NCAM protein düzeyinin beynin belli bölgelerinde, özellikle hipokampusta yoğunlaştığı gözlemlendi. Bu çalışma, tinerin olumsuz etkilerinin ortadan kalkmasının hem biyokimyasal hem de fonksiyonel olarak öğrenme ve hafıza üzerindeki olumsuz etkilerinin geri dönüşümlü olabileceğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: bağımlılık, nöral cell adezyon molekülü, öğrenme ve hafıza, tiner

2. ABSTRACT

Tiner is a volatile material used extensively in the industry and also caused abuse especially among the young population. The exposure of the living organisms to the toxic amount of thinner lead to destruction of the learning and memory function due to its easy penetration to the neural tissue. On the other hand, it is well known that the Neural Cell Adhesion Molecules (NCAM) have significant role on the learning and long term memory functions. The changes of ability of the learning and long term memory has been investigated on the 3000 ppm/day long term toluen applicated rats in our study. Therefore, control, thinner and recovery following thinner inhalation groups were prepared for the study. NCAM proteins has been searched in the cortical, cerebellar, and hippocampal regions through the sodium dodecyl sulphate electrophoresis method, then the levels of the NCAM proteins were measured by the immune-blotting technique. Glutation peroxidase and MDA levels were measured to determine the amount of tissue destruction. The functional results of the rats were evaluted through Morris water maze test. The NCAM proteins were densly accumulated in the hippocampal region. This study revealed that the adverse effects of the thinner on the learning and memory functions were reversible both the biochemically and functionally.

Key words: abuse, neural cell adhesion molecule, learning and memory, thinner

3.GİRİŞ

Sinir sistemine bir uyarının gelmesi iki tip değişiklik ortaya çıkarır. Birincisi, hücrelerin cevabıyla karakterize olan uyarılabilirliktir. İkincisi ise, uygun uyarın veya uyarınlar kompleksi sonucunda nöronların özel sistemlerinde bazı kalıcı işlevsel değişimlerin ortaya çıkmasıdır. Bu ikinci özelliğe plastisite, buna karşı gelen değişikliklere de plastik değişiklikler denilmektedir (27).

Muhtemelen yapısal değişikliklere bağlı olduğu sanılan geçici nöral aktiviteler hangi mekanizma ile sinaptik bağlantıda uzun süreli değişikliklere yol açmaktadır? Sinaptik plastisitenin anlaşılması, nörolojik bilimlerde çok önemli bir yer tutar (50). Hücre adezyon molekülleri (CAM) bu bağlamda sinaptik plastisitede yer alan önemli aday moleküllerdir (50). Çünkü CAM'leri hücrelerin hem matriks ile hem de diğer hücreler ile adezyonunu sağlar ve böylece sinaptik bağlantıdaki değişiklikleri etkileyecek bir yapıyı oluşturur (50). Bunlara ek olarak, CAM'lerinin bağlanması intraselüler sinyal geçiş zincirini aktive ettiği ve bunun da nöritin dışarı büyümesi dahil olmak üzere hücre cevaplarını başlattığı gösterilmiştir (51). Böylece CAM'leri hücrenin hem içeriden dışarıya hem de dışarıdan içeriye sinyal geçişini sağlamak suretiyle, hızlı sinyal etkileşimlerini yapısal değişikliklere çevirebilir (51). CAM'lerinin merkezi sinir sisteminin (MSS) gelişimi sırasında nöral bağlantıların oluşumunda ve sinaptik plastisitede önemli oldukları gösterilmiştir (51).

3. 1. Genel Bilgiler

3. 1. 1. Tiner Kullanımı

Sanayide yaygın kullanım alanı olan organik uçucu maddelerin, özellikle sellülozik tinerin son yıllarda ülkemizde adolesan çağıdaki çocuklar arasında giderek artan kötüye kullanımı, ciddi bir sağlık ve sosyal sorun haline gelmeye başlamıştır (2). Tinerin ana maddesi olan toluen (metil benzen) endüstride sık kullanılan uçucu bir aromatik hidrokarbondur (4). Karaciğer, kemik iliği ve sinir sistemi üzerine olan toksisitesi nedeniyle organik uçucu maddelerin içeriğinden çıkarılan benzenin yerini alan toluen nörotoksik bir maddedir. Yapıştırıcılar, boya çözücüler, incelticiler, aeresoller, yağ ve leke çıkarıcılar, oda ve saç spreyleri, deodorantlar, kozmetik ürünlerde kullanılan organik uçucu maddeler geniş bir kimyasal kullanım alanına sahiptir (4). Bunlar n-heksan, toluen, ksilen, izobütan gibi alifatik ve aromatik hidrokarbonlar; kloroform, halotan, trikloretilen gibi halojenize hidrokarbonlar; amilnitrit ve izobütil nitrit gibi alifatik nitritler, aseton ve metil etil keton gibi ketonlar, etil asetat, bütül asetat gibi esterler, metil alkol gibi alkoller, etilen glikol gibi glikoller, dietil eter gibi eterler olarak sayılabilir (38, 60).

3. 1. 2. Tinerin İnsan Vücuduna Etkileri

Literatürde uçucu maddelerin kullanımına bağlı çok sayıda sistemik ve sinir sistemi patolojileri bildirilmiştir (2, 4, 26, 38, 60, 62). Bu maddeler içinde toluen, kötüye kullanım potansiyeli en yüksek olan ajandır. Araştırmalar uçucu madde bağımlılarının %90 oranında toluen, %5 oranında klorlu hidrokarbonlar,

%3 oranında bütan ve %2 oranında diğer uçucu maddeleri kullandıklarını göstermektedir (26).

Toluen en kolay inhalasyon yoluyla vücut sıvılarına girer. Toluen intoksikasyonunda klinik bulguların ağırlığı kan konsantrasyonu ile orantılıdır. Kanda %1-2,5 mg düzeyleri belirgin intoksikasyon, %2,5-10 mg düzeyleri bilinç bozuklukları ve komaya neden olur (49). Toluen, alkol ve diğer uçucu maddeler gibi merkezi sinir sistemi üzerinde önce uyarıcı, sonra depresan etki yapar (3). Doz 200 ppm'e ulaştığında nörotoksik etkiler oluşmaya başlar (62). Uçucu madde karışımı içindeki bileşenler, toluen'in toksitesini arttırıcı etki yaparlar (14).

3.1. 3. Uçucu İnhalanların Etki Mekanizması

Yağda çözünen uçucu maddelerin tümü kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçerek canlılarda bilinç düzeyini etkilerler (2). İnhalanların merkezi sinir sistemindeki farmakolojik etki mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, nöronal hücre membranının akışkanlığını ve beyin gamaaminobutirik asit (GABA) fonksiyonlarını artırarak etki gösterirler. Bu maddeler karaciğer ve böbrekten metabolize edilirler (2, 60, 62).

Toluen de aynı mekanizmalar üzerinden etki ederek karaciğerde hippürik aside metabolize olur ve idrarla atılır. İdrarda hippurat/kreatinin oranı 1 gr/gr.'ın üstünde olması toluen kullanımını düşündürür. Ancak benzoik asit gibi gıda koruyucular yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (2).

Toluen gibi nörotoksik olan n-heksan, ucuz bir çözücü olması nedeniyle sanayide yaygın kullanılır (62). n-heksan aksonal nörofilament proteinleri ile agregat oluşturur. Bu nörofilament kümeleri ranvier düğümlerinde birikip,

aksoplazmik akımı engellemesi ile daha proksimal akson segmentlerinde internodal akson şişmeleri oluşturduğu ve bu segmentte miyelin kılıfının, genişleyen aksonun etrafından sıyrılarak hasarlandığı şeklindedir (23, 55, 62).

3. 1. 4. Tiner ile Reaktif Oksijen Ürünlerinin Oluşumu

Organik solventlerin hücre hasarındaki toksik etkilerini reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) oluşumu yolu ile gösterdikleri de bildirilmiştir (4, 5). Süperoksit anyonu, ferril ve hidroksil iyonları gibi reaktif oksijen ürünleri lipid peroksidasyonunu başlatır. Geleneksel olarak dokularda ROÜ'nin yaptığı hasar lipid peroksidasyon son ürünlerinin ölçümleri ile belirlenmektedir.

Biyolojik membranlarda ROÜ'nin membran fonksiyonlarının bozulmasına neden olması, lipid peroksidasyonuna yol açar (32). Bazı organik solventlerin ve toluenin, pulmoner alveoler makrofajlarda ve akciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır (58, 59). Deneysel çalışmalarda tinerin karaciğerde ileri derece ROÜ oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir (33, 34). Uçucu bileşikler etkisiyle biyolojik membranların yapısında ilerleyen dejenerasyon ve aktivite kayıpları meydana gelmektedir (35).

Membranlarda lipid peroksidasyonuna yol açan ROÜ oluşması, membran fonksiyonlarının bozulmasına, akışkanlık azalmasına, membrana bağlı proteinlerin inaktivasyonuna, hücre-içi Ca^{+2} düzeyi artışı ve Ca^{+2}/Mg^{+2} ATPaz aktivitesi artışlarına neden olur (32-34). Peroksidatif hasarlarda artmalar, antioksidan kapasitelerde ise azalmalar, yüksek doz tiner inhalasyonunun doğurduğu önemli komplikasyonlardır.

3. 1. 5. Tinere Bağlı Oluşan Sinir Sistemi Klinik Bulguları

Başlangıçta kısa bir keyif hali ve dizartrik konuşma vardır. Bazen de bulantı, kusma, karın ağrısı, kulak çınlaması, görsel ve işitsel halüsinasyonlar veya konfüzyona neden olur (2). Otonom sistem bulguları, kraniyal sinir tutulumları, görme bulanıklığı, depresyon ve anksiyete bozuklukları, serebellar ataksi, beyin sapı ve piramidal sistem bozuklukları vardır (62). Toluenin uzun süreli kullanımı nörotoksik sendroma benzer bulgulara yol açmaktadır. Bunlar serebellar, piramidal bozukluklar, periferik nöropati, optik atrofi, sensorinöral işitme kaybı ve kognitif bozuklukları içeren akut, geçici ve kalıcı hasarlardır (26).

3. 1. 6. Tiner Öğrenme ve Hafıza Fonksiyonu

Toluenin 2000 ppm değeri civarında inhale edilmesi geçici öforik etkilere, sonrasında bilişsel ve nörolojik hasara yol açar (65). 10000 ppm ve üzerinde inhale edildiğinde ise anestetik ve öldürücü etkisi oluşur (65). İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte toluene maruz bırakılan ratlarda serebral korteks alanında %6-10 civarında bir azalma olduğu bildirilmiştir (65). 500 ppm seviyesinde sürekli toluene maruz bırakılmada hipokampusun granüler hücre tabakasında dejenerasyon gözlenmiştir (65). Tiner D2 reseptörlerini etkileyerek dopamin-aracılıklı lokomotor davranışlarda değişiklikler ortaya çıkarır (65). Tinerin kaudat-putamen nükleus bölgelerini etkilediği ve glutaminerjik kortikostriatal piramidal hücrelerde disfonksiyona yol açtığı ve sonuçta uzaysal-bellek, çizgi üstünde yürüme ve dopamin-aracılıklı lokomotor aktivite farklılıklarına yol açtığı düşünülmektedir (63-65).

3. 1. 7. Sinaptik Plastisite

Nöronal plastisite beyin fonksiyonlarından olan öğrenme ve hafıza oluşumunda önemli görevler alır (25). CAM'nin hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkileri hücrelerin çoğalması, büyümesi ve göçü için gereklidir (31). Çözünebilen NCAM tipleri beyinde, beyin omurilik sıvısında ve plazmada bulunur (50, 51). NCAM hücre göçünü, nörit uzanımını ve fasikülasyonunu etkileyerek beyinde sinapsların oluşumunda olası rol oynarlar. NCAM'in etkisinin bloke edildiği farelerde, olfaktor bulbusun ve hipokampustaki mossy fiber sistemin gelişiminin geri kaldığı gösterilmiştir (51). Bu nedenle NCAM molekülleri beyin gelişmesi esnasında MSS'nin yapısal organizasyonuna girerken, olgun beyinde ise sinapsların yeniden oluşum ve düzenlenmesine katılmaktadırlar. Bu moleküllerin sinaptik plastisite dışında hücre göçü, aksonal büyüme, periferik aksonların yenilenmesinde de görev aldıkları düşünülmektedir (16).

3. 1. 8. Öğrenme ve Hafıza Fonksiyonunda Hipokampus

Hipokampus, serebral korteksin değişik yapılanmasından oluşan uzunca bir yapıdır. Bir ucu amigdaloid nükleuslara dayanır. Serebral korteks bölümlerinin çoğu ile olduğu kadar, limbik sistemin temel yapıları olan amigdaloid, hipotalamus, septum ve korpus mamillare ile de sayısız bağlantısı vardır. Canlılarda olfaktor bulbusun bir parçası olarak gelişmiştir. Her türlü duyuşsal algı, anında hipokampusun çeşitli bölümlerini aktive eder (24). Korteks ile alt sinirsel oluşumlar arasında algılama, limbik sistem, soyut düşünme ve algılama, öğrenme, hafıza (veri depolama), uzaysal hafıza verilerinin aktarılmasında hem köprü hem de kavşak rolü oynar (28).

3. 1. 9. Sinaptik Plastisite ve PSA-NCAM

NCAM formları içinde sinaptik plastisitede rol alan en önemli molekül polisialik asit-NCAM'dür (PSA-NCAM) (1, 51). PSA, alfa-2-8-linked sialik asit artıklarının uzun homopolimeridir (16). NCAM izoformlarının % 30'unu PSA oluşturmaktadır. Bu nedenle PSA-NCAM terimi sıklıkla kullanılmaktadır. PSA'nın buradaki rolü karşılıklı membranlar arasındaki adezyonların kolaylıkla yapılmasını sağlamaktır. Polisialize olmuş yapı NCAM'in adhezif etkilerini azaltır (16, 54).

Sinaptik plastisite ve nöronal aktiviteye bağlı nörogeneziste önemli rol alan PSA-NCAM düzeyinin, özellikle beynin belli bölgelerinde artmış olduğu gözlenmiştir. Bu bölgeler hipokampal formasyonda rol alan olfaktor sistem ve dentat girustur (15, 21, 51, 57). Yaşa bağlı olarak ortaya çıkan hafıza bozuklukları hipokampal plastisitedeki azalma ile birliktedir. MSS'nin oluşumunda NCAM'in polisialize olmamış hali rol alırken, gelişimi sırasında PSA-NCAM bolca sentezlenir. Kemirgenlerde hipokampal formasyonda, yeni oluşan nöronların farklılaşma ve matürasyonunda da PSA-NCAM ekspresyonunun aktif rol aldığı gösterilmiştir (16, 57). Dentat girus hücrelerinin polisilizasyonu ise yaşla birlikte azalır.

Kafa travması sonrası fonksiyonel iyileşme ve tamirde, nöronal bağlantıların yapı ve fonksiyonel plastisitesinde de PSA-NCAM görev alır (30). PSA-NCAM'in güçlü bir şekilde ekspresyonu beyin yapılarında göze çarpan doku reorganizasyonunda ve plastisitede önemli roller üstlenir. NCAM polisializasyonunun artışı yetişkin ratlarda; hem pasif kaçınma cevabının öğrenilmesinden sonra ve hem de Morris water maze testinde uzaysal öğrenmeden

sonra gösterilmiştir (18, 22). Bu artış ratların dentat girusunun granül hücrelerinde tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada; polisializasyondaki bu yükselmenin hipokampal oluşumda dişli granül hücrelerinin bulunduğu yerde ve öğrenmeye katılan kortiko-hipokampal bölgeden şekillenebilen entorinal korteksteki nöronlarda lokalize olduğu ifade edilmiştir (16, 44). NCAM polisializasyonunun artışı aynı şekilde öğrenmeye katılan kortiko-hipokampal yolda PSA-NCAM ekspresyonunu da aktive etmektedir (36). Ancak bu formasyon için hipotalamo-pitüiter-adrenal aksın önemli olduğu bildirilmiştir (16). Polisializasyonun artışı uygulamadan sonra yukarıda belirtilen her iki öğrenme testi için de sadece 10-12 saat gözlemlenmiştir. Bunun nedeni de muhtemelen nörogenezin artmasından önce oluşan öncül nöronlardan kaynaklanmaktadır (22).

3. 1. 10. Uzun Dönem Hafızanın Oluşması

Genellikle uzun dönem hafızanın oluşmasındaki yapısal değişikliklerin nöronal bağlantılarla oluştuğuna inanılmaktadır. Uzun dönem hafızanın oluşmasında ve öğrenmede NCAM'in önemli rolü vardır (21). Öğrenme ve hafızanın oluşumunda temel mekanizma olan sinaptik plastisiteye NCAM molekülleri aracılık etmektedir (21, 50). Öğrenme sürecinde nöronal bağlantılarda yapısal değişikliklerin oluşması uzun dönem hafızanın yerleşmesini sağlar. Bu nöronal bağlantı ve yeniden organizasyon işleminde NCAM molekülleri çok önemli görevler üstlenir (54).

NCAM ekspresyonu, özellikle PSA-NCAM, öğrenmenin ve uzun dönem hafızanın oluşumunda kesinlikle gereklidir (21). PSA-NCAM'in artışı hücre adezyon sayısında azalmaya ve nörit uyarılmasında artışa neden olmaktadır (51). Lokal uygulanan NCAM antikoru CA1 bölgesinde long-term potensiasyon

oluşumunu engellemektedir (51). Nörogenezin indüklenmesi ile hipokampal formasyon artmakta, öğrenme ve hafıza bileşenleri de olumlu etkilenmektedir. Sonuçta polisialize olmuş NCAM, uzun dönem hafızanın (depo hafızanın) kurulması esnasında nöronal bağlantıların yapısal remodellerinin oluşumuna katkıda bulunmuş olurlar (47). En önemlisi PSA-NCAM ekspresyonu hızlı bir şekilde, Ca^{+2} bağımlı nöronal aktiviteyi şekillendirebilmektedir (30, 41, 45).

3. 1. 11. Sinaptik Plastisite ve Long-term Potensiasyon

Long-term potensiasyon (LTP) ve long-term depresyon gibi mekanizmaların kortikal reorganizasyon haritalarının temelini oluşturduğu kabul edilmektedir. Bunların beyinde bilgi depolamanın hücresele temelini oluşturduğuna inanılmaktadır (30). Yetişkinlerde öğrenme ve hafızaya kaydetmede rol oynayan nöronal plastisite NCAM molekülleri tarafından sağlamaktadır (1, 54). Sinaptik plastisitenin bir ifadesi olan hafızanın oluşumunda NCAM'in rolünü anlamak için hipokampusta mossy fiber sinapsta LTP uyarısı kullanılır (16). LTP *in vivo* ve *in vitro* şartlarda hipokampal sinir liflerinin yüksek sıklıktaki uyarıları ile uyarılabilen sinaptik geçişlerdeki uzun süren bir yükselmedir. LTP ve öğrenme çoğu özellikleri paylaşır. Hafıza ve öğrenmede sinaptik değişiklikleri kontrol ettiği sanılan moleküler mekanizmaları anlamada ve tespit etmede artık yaygın olarak LTP ölçümü kullanılmaktadır. Sinaptik plastisite ve LTP formasyonu hipokampal dilimde bulunan veriler ile hazırlanır (8, 31, 51).

In vitro koşullarda lokal NCAM antikorlarının ratların hipokampal kesitlerindeki CA1 bölgelerine enjeksiyonu ile LTP'nin devamlılığını ve uyarısını engellediği gösterilmiştir (50). Sinir sisteminin gelişimi sırasında oluşan sinaptik değişiklikler, sinaptik plastisitenin de kapasitesinde değişikliklere neden olur.

Tanımlanan bu kapasite hatırlama ve öğrenme yeteneğinde önemli rol oynar. Ergenlerde bu olay öğrenme ve hafıza oluşumu gibi fizyolojik ve patolojik şartların tanımlanması ve nöronal döngünün tamamlanması ile anlaşılır (6).

3. 1. 12. Öğrenme ve Hafıza

Davranış, genler ile çevre arasındaki ilişkinin sonucudur. İnsanlarda çevrenin davranışı değiştirdiği en önemli mekanizma öğrenme ve hafızadır. Öğrenme, dünya hakkında bilginin kazanılması, hafıza ise kazanılan bilginin kodlanması, depolanması ve gereğinde tekrar kullanılmasıdır (29).

1950'li yıllarda epilepsi tedavisinde temporal lobtaki hipokampus ve komşu bölgelerinin çıkarılması ile bellekte temporal lobun önemi anlaşıldı. Hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği ve uzaysal oryantasyonun bozulduğu gözlemlendi. Uzun süreli hafıza bilginin depolanma biçimine bağlı olarak kapalı ve açık olarak ikiye ayrılmaktadır. Kapalı hafıza tipik olarak refleks olarak uygulanabilen motor ve algılama durumunda söz konusudur. Örnek olarak bireyin daha önce yazdığı bir kelimenin ilk harfini gördüğünde devamını hatırlaması verilebilir. Açık hafızada ise kişiler, yerler ve cisimlerin birbirleriyle olan bağlantılarının hatırlanması söz konusudur.

Bilgi; prefrontal, limbik ve parieto-okspital-temporal kortekslerden toplanarak parahipokampal, peririnal, ve entorinal kortekslere, sonra dentat girus, hipokampus, subikuluma gelir. Son olarak entorinal kortekse geri döner. Uyarı girişlerinin entorinal kortekse tekrar gelmesi bilgi pekiştirilmesinde, dolayısıyla açık hafızanın oluşumunda en önemli etkindir. Alzheimer'lı hastalarda açık

hafızada hasar ile entorinal kortekste dejenerasyon görülmesi arasında yakın ilişki vardır.

Açık hafızanın oluşumunda kodlama, konsolidasyon, depolama ve geri çağırma olmak üzere 4 safha vardır. Kodlama, öğrenilen bilgi ile ilk kez karşılaşıldığında gösterilen öğrenme motivasyonu ve dikkat ile bağlantılı olarak bilginin sınıflandırılmasıdır. Konsolidasyon, bilginin uzun süreli depolamaya uygun olacak şekilde değiştirilerek işlenmesidir. Konsolidasyon genlerin ekspresyonunu ve yeni protein sentezini gerektirir. Depolama, belleğin zaman içinde saklanması mekanizması ve yerleri içerir. Uzun süreli depolama kapasitesi sınırsız iken kısa süreli depolama kapasitesi çok sınırlıdır. Geri çağırma ise depolanan bilginin kullanılacağı zaman geri çağırılmasıdır.

Hipokampusun medial temporal lobu vertebralılarda bilgi depolanma merkezidir (28). Hipokampusta perforan, mossy fiber ve Schaffer'ın kollateral yolu olmak üzere birbirinin devamı olarak ilerleyen 3 ana nöral yol vardır (29). Birincisi, perforan yol, entorinal korteksten dentat girusun granüler hücrelerine giden yol; ikincisi, mossy fiber yolu, granüler hücrelerin aksonları ve hipokampusun CA3 bölgesindeki piramidal nöronlara giden yol; üçüncüsü, Schaffer'ın kollateral yolu, CA3 bölgesindeki piramidal hücrelerin eksitator kollaterallerinden başlayıp CA1 bölgesinde sonlanan piramidal hücrelerde sonlanan yolu içerir (29). Bu 3 yoldan birinin uyarılması hedef hipokampal nöronlarda eksitator postsinaptik potansiyellerin amplitüdünde artışa neden olur. Ortaya çıkan bu fasilitasyona LTP denilmektedir (29). LTP ile NCAM arasındaki ilişki, LTP başlatılmasından sonra dentat girusun ekstraselüler bölgesinde NCAM tiplerinin artışı ile ortaya çıkarılmıştır (50). NCAM blokajı LTP'da azalmaya

neden olmuştur (50). NCAM'den PSA'nın atılması NCAM blokajı ile aynı sonucu vermektedir. Sonuç olarak LTP başlangıcı için PSA-NCAM gereklidir (50).

3. 1. 13. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücre adezyon molekülleri, birçok hücrenin yüzeyinde bulunan glikoprotein yapıdaki molekülleridir. Bunlar hücrelerin birbirlerine, endotel hücrelerine veya ekstrasellüler matrikse bağlanmalarını sağlayan yüzey proteinleridir (25). CAM'nin, homofilik ve heterofilik mekanizmalar ile hücre-hücre ve hücre-substrat bağlantıları oluşturduğu gözlenmiştir (16, 25, 31). Adezyon moleküllerinin reseptörlerine ve ligandlarına bağlanmaları ile oluşan etkileşim ve yanıt sayesinde rol oynadıkları bazı fonksiyonlar şöyle sıralanabilir:

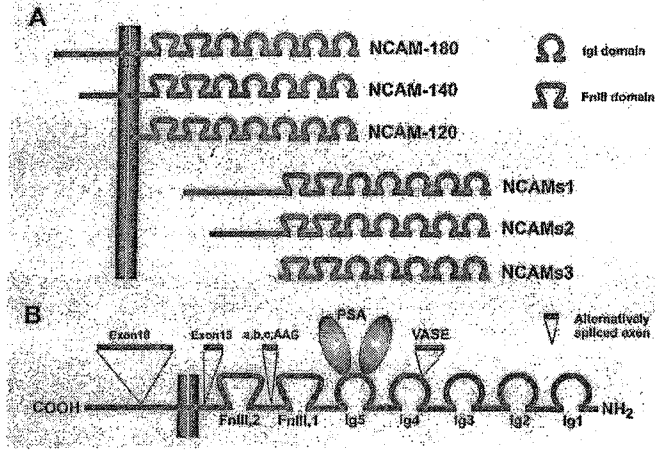
- a) Doku / organ gelişimi ve hücre çoğalması,
- b) Embriyogenez,
- c) İmmün ve enflamatuar hücrelerin enflamasyon bölgesine göçü,
- d) İmmün yanıtın başlatılması ve yayılması,
- e) Ekstrasellüler matriksten hücreye bilgi akışı,
- f) Yara iyileşmesi,
- g) Kanseri metastazı.

Moleküler biyoloji çalışmalarında, hücre adezyon ilişkilerinin kalsiyum gerektiren ve gerektirmeyen 2 grup bağlanma komponenti üzerinden işlediği görülmüştür (53). Bu iki gruptan kalsiyuma bağlı olanlar kaderinleri, kalsiyuma

bağlı olmayan grup ise immünglobulin-benzeri adezyon moleküllerini oluşturur (53). İkinci grubun ilk bulunan ve en iyi karakterize edilen grubunu NCAM oluşturur (53). İkinci grup aynı zamanda immünglobulin süper-ailesi olarak adlandırılır. CAM integrinler, immünglobulin süper-ailesi, kaderinler ve nöreksinler ve nöroliginler olarak da sınıflanabilir (8).

3. 1. 14. İmmünglobulin Süper-ailesi ve NCAM İlişkisi

NCAM'leri immünglobulin (Ig) süper-ailesine ait bir yüzey glikoproteini olup merkezi sinir sisteminin çeşitli gelişimsel olaylarında anahtar rolü alırlar (36). NCAM'leri homolog Ig modülü (veya domain'i) ile karakterizedir. Yaklaşık 100 aminoasit içeren iki beta tabakasından oluşan her bir Ig modülü dört tipe ayrılabilir; bunlar sabit tip 1 (C1-tipi), sabit tip 2 (C2-tipi), değişken tip (V-tipi) ile intermediate (I-tipi) kısımlarını içerir (50, 51). Nüklear magnetik rezonans incelemesi sonuçlarına göre N-uçlu Ig modüllerinin, yani Ig1 ve Ig2, Ig modüllerinin I-tipine ait oldukları gösterilmiştir (51). NCAM intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere 2 kısımdan oluşur (50). NCAM'lerinin ekstraselüler bölgesinde 5 adet Ig modülü (sarmalı) (Ig1-5 olarak adlandırılır) ve 2 adet tipIII fibronektin homolog modülü bulunur (50). Birleşme şekline göre yetişkin beyinde en az 3 tip NCAM tipi vardır. Bunlar NCAM-120, NCAM-140, ve NCAM-180'dir. NCAM adlandırmaları ile kDa cinsinden ağırlıkları arasında ilişki vardır. NCAM-120 doğrudan hücre membranına glikofosfatidilinozitol bağı ile tutunurken, NCAM-140 ve NCAM-180 arasındaki fark hücre içinde kalan kısımlarının kısa (NCAM-140) veya uzun (NCAM-180) hücresel domain içermesi iledir (*Şekil-1*).



Şekil 1: (A) Üç major NCAM izotipinin genel yapıları; hücre zarı ile ilişkisi. (B) NCAM izotiplerinin alternatif birleşmeler ile farklı adezyon molekülleri ve PSA ile olan bağlantısı (3 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

3. 1. 15. NCAM Moleküllerinin Yapısı ve Özellikleri

NCAM, nöronal plastisitede sinaps oluşumuna katılan moleküllerin başında gelir (8). NCAM hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri ile nöron gelişmesini arttırmada düzenleyici olarak hareket eden yüzey glikoproteinleridir (51). Bu proteinler güçlü bir şekilde ve bolca sinir sisteminde yapılırlar (8).

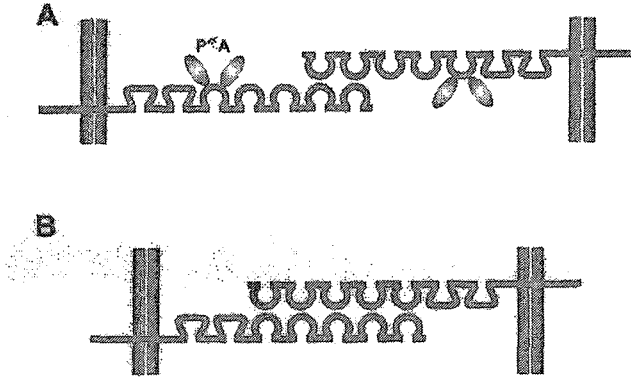
Aşırı NCAM ekspresyonu fonksiyonel değişiklik olmaksızın nöromusküler sinapsların yapı ve büyüklüğünde artışa neden olur (46). NCAM hücre membranına bağlandıktan sonra transmembran sinyalini ortaya çıkarır. Böylece NCAM, adezyonu diğer hücrelerle aracı olarak ve ekstrasellüler matrikste veya aktive intrasellüler sinyal yollarında görev alarak yaparlar (43, 51). Hücrel cevaplarda hücreler arası sinyal transdüksiyon akımını aktive ederler.

Alternatif uç uca bağlanma ile NCAM yapılarının değişik bölgelerine tutunan birkaç protein yapısı daha vardır. Bunlar Exon 15, Exon 18, a, b, c, AAG ve Ig bölgesine tutunan “variable domain alternatively spliced exo” (VASE) ve polisialikasit (PSA)’dır (51). Özellikle olarak 4. Ig bölgesi 7.ve 8. eksonlar tarafından kodlanır, bu eksonların arasına da VASE denilen 30 bazlık ekson girebilir (*Şekil-1*). Alternatif yol farklı protein tipleri ile bir single-copy geni ürünüdür, bu yol ile plazma membranına moleküller farklı şekillerde tutunurlar (51).

Ekstraselüler kısmıyla NCAM hem homofilik hemde heterofilik *Cis* ve *Trans* etkileşimlerine aracılık eder (31). Bu yapının NCAM tarafından transsellüler homofilik tanımaya aracılık edebilen antiparalel dimerlerden şekillenen bir aksi form olabileceği ifade edilmektedir (31). Bununla birlikte molekül, homofilik bağlanmaya ek olarak aynı zamanda, heterofilik ilişkiler aracılığı ile çeşitli ekstrasellüler matriks kısımlarına veya diğer hücre adezyon moleküllerine bağlanabilir (31).

NCAM homofilik ve heterofilik interaksiyonlar ile hücre adezyonunu sağlar (51). NCAM veya NCAM antikorlarının bazı nöral hücrelerde *in vitro* olarak intrasellüler Ca^{+2} artışına neden olduğu gösterilmiştir (51). Dahası, homofilik NCAM ilişkileri nörit uzanımını uyarır, homofilik aktivasyon voltaja bağlı kalsiyum kanalları aracılığı ile hücre içine kalsiyum akışına neden olarak bir sinyal iletimini ve böylece nörit uzanımını uyarır (51). Bu bağlanmada iki NCAM molekülünün Ig5 modülü ve Ig3 modülü arasında resiprokal bir etkileşim olduğu düşünülmektedir (3) (*Şekil-1, 2*). Homofilik NCAM (NCAM-NCAM) hücre adezyonunu kalsiyuma bağlı olmayan mekanizma ile yapar (50). Ek olarak,

NCAM çeşitli ekstraselüler matriks komponentlerine heterofilik hücre-substrat ilişkileri ile bağlanır (50).



Şekil 2: Homofilik NCAM moleküllerinin polisializasyonu. (A) Homofilik bağlanma ile PSA-NCAM kompleksinin oluşması. (B) PSA yokluğunda NCAM yapısındaki beş Ig domainin reziprokal olarak birleşmesi (3 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

3. 1. 16. NCAM'in Polisializasyonu

NCAM oluştuktan sonra çeşitli değişimlere uğrar (51). Bu değişiklikler fosforilasyon, sülfasyon veya glikozilasyon olabilir. Beyinde salgılanan PSA NCAM'a bağlanır (51). PSA NCAM'ın 5. Ig domain'ine N-ucuna bağlanan, uzun alfa 2-8 bağlı N-asetil nöraminik asit kökleridir (51). PSA-NCAM esas olarak erken postnatal beyinde yapılır. Yetişkin beyinde ise oranı %10'a düşer. NCAM esas olarak nöronlardan, az miktarda glial hücrelerde sentezlenir. Beyin omurilik sıvısı ve plazmada tespit edilir. NCAM üzerinde PSA'nın olmasının NCAM-aracılıklı hücre adezyonunu azalttığı gösterilmiştir (50). Diğer yandan PSA-NCAM nöronal devrelerin oluşumunda ve aktiviteye bağlı yeniden düzenlenmesinde moleküler ilişkilerin anahtarı özelliğindedir (19). NCAM üzerindeki PSA'ı sentezleyen 2 tip transferaz enzimi vardır. ST8SiaII enzimi

embriyogenezdeki PSA sentezini yapar; ST8SiaIV ise yetişkin beyindeki PSA'ı sentezler (19). PSA-NCAM'in hücre göçünde, akson büyümesi ve fasikülleşmede, sinaptik plastisitede ve hipofizin nöroglial plastisitesinde rolü vardır (19). Nöronal devrenin tamamlanması sırasında PSA-NCAM gerekli olduğundan denerve kas hücrelerinde lezyonlu motor nöronların rejenerasyonu sırasında tekrar PSA-NCAM sentezlenmektedir (50).

3. 1. 17. Öğrenme ve Hafızanın Şekillenmesinde NCAM'in Rolü

NCAM'in yönettiği ilişkiler ve kognitif fonksiyonlar arasındaki bağlantıyı gösteren çeşitli veriler vardır (16, 38). Ratlarda anti-NCAM antikor kullanımı hafıza kaybına neden olmaktadır (18). Ratlarda CA1 bölgesine anti-NCAM antikorlarının verilmesi uzun süreli potansiasyon-indüksiyonunu inhibe etmektedir. NCAM eksik ratlarda Morris water maze testinde uzaysal öğrenme kusuru gelişmektedir (17).

PSA, hipokampusta yer alan dentat girusun granüler hücrelerinin subpopulasyonunda ve onların aksonal uzantılarında (mossy fibers) kuvvetli bir biçimde salgılanmaktadır (16). Kortikosteron, genç hayvanlarda dentat girusdaki PSA-NCAM ekspresyonunu inhibe etmektedir. Böylece kortikosteron düzeyi yükselen yaşlı ratlarda PSA-NCAM ekspresyonunun azalması beklenir. Gerçekten de 24 aylık ratlarda böyle bir düşüş gözlenmiştir (16). Hipokampal mossy fiber sistemde NCAM ve PSA ekspresyonunun farelerde ayrıntılı analizi yapıldığında, NCAM ekspresyonunun nöronal düzenlenmesi yanı sıra, migrasyon gibi yapısal değişiklikler, aksonal büyüme ve fasikülasyon ile plastisite aktivitesi için de gerekli olduğunu göstermiştir. Vertebralıların hücrelerinde adezyon moleküllerinin aksonal büyümede de anahtar rol oynadığı bilinmektedir (16).

NCAM antikorlarının intraventriküler enjeksiyondan 6-8 saat sonra, öğrenme ve uzun dönem hafızaya zarar verdiği, 48 saat sonra yapılan pasif sakınma cevabı testi ile gösterilmiştir (56). Tavuklarda yapılan benzer bir deneysel çalışma hafıza kaybına neden olmuştur (37). Benzer biçimde NCAM'den yoksun bırakılan knock-out farelerde uzaysal öğrenme ve bulma yeteneğinin bozulduğu, Morris water maze test sonuçlarına göre öğrenmelerinde yetersizlik olduğu tespit edilmiştir (16, 17). NCAM'in posttranslasyonel modifikasyonunda öğrenme ile ilgili değişiklikler gözlemlenmiştir. Bununla beraber öğrenmedeki bu yetersizliğin neden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir.

NCAM sadece gelişme esnasında MSS'nin yapısal organizasyonuna katkıda bulunmaz, aynı zamanda beyindeki tahrip olmuş sinaptik modifikasyonlara da yardımcı olur. Bu nedenle NCAM ekspresyonunun, özellikle PSA-NCAM'in öğrenmenin ve uzun dönem hafızanın oluşumunda ne kadar gerekli olduğu anlaşılmaktadır (52).

NCAM'in %30'luk bir kısmı PSA-NCAM izoformu halinde bulunur (16). NCAM, özellikle PSA-NCAM öğrenmenin ve uzun dönem hafızanın oluşumunda çok gerekli bir yapıdır (52). PSA'nın buradaki rolü karşılıklı membranlar arasındaki adezyonların kolaylıkla yapılmasını sağlamaktır. Polisialize olmuş yapı NCAM'in adhezif etkilerini artırır (16, 54). PSA-NCAM'in özellikle beyin belli bölgelerinde düzeylerinin artmış olduğu gözlenmiştir. Bu bölgeler hipokampal formasyonda rol alan olfaktor sistem ve dentat gyrustur (15, 51, 57). Yaşa bağlı olarak ortaya çıkan hafıza bozuklukları hipokampal plastisitedeki azalma ile birliktedir. MSS'nin oluşumunda NCAM'in polisialize olmamış biçimi rol

oyunarken, gelişimi sırasında PSA-NCAM bolca sentezlenir ve görev alır (37, 51, 52).

3. 1. 18. Sinir Sistemi Hastalıkları ile NCAM İlişkisi

Alzheimer hastalığı, beyin yaşlanması, ve serebrovasküler yaralanmalarda bazı ortak bozukluklar vardır. Kalsiyum düzenlenmesindeki eksiklikler, mitokondri işlevlerindeki azalmalar, reaktif oksijen ürünlerinin ortaya çıkışındaki artışlar, bu ürünlerin dokularda birikimi ve immün sistem disfonksiyonu bunlardan birkaçıdır (13). Etki-sonuç ilişkilerinin açıklığa kavuşturulması için nöron hücre kültürü sistemi kullanılmaktadır. Kullanılan kültür sistemlerindeki hücrelerin yaşlarına göre bu etki-sonuç ilişkilerini ortaya çıkarmak mümkündür. Kültür modellerinde nöronların kalıtsal özellikleri ve yaşla birlikte oluşan beta-amiloid birikimi ve apoptoz gelişimi takip edilebilmektedir (13). Mevcut sorunun çözülmesi için günümüzde üzerinde çalışılan noktalar; kalsiyum artışının inhibisyonu, ROÜ etkilerinin azaltılması ve mitokondrial fonksiyonun düzeltilmesi ile enerji üretiminin sağlanmasına yöneliktir (13). Genç ve yaşlı nöronların rejenerasyon ve çoğalma yeteneklerinin ortaya çıkarılması, yaşa bağlı hasarların düzeltilmesinde ve nöron hasarı ile seyreden hastalıkların tedavisinde umut vermektedir. Bu noktada NCAM moleküllerinin olumlu etkileri gündeme gelmektedir (13).

Mizaç bozukluğu olan ve şizofren hastaların beyin omurilik sıvısı incelemesinde, beyin parankiminin tahribine bağlı yüksek NCAM düzeyleri tespit edilmiştir. Tavuklarda ve ratlarda NCAM antikorlarının intraventriküler enjeksiyonu ile öğrenme sürecinin bozulduğu görülmüştür (16, 56). Bunun yanısıra PSA-NCAM'in enzimatik olarak ortadan kaldırılmasıyla ratlarda uzaysal

öğrenme engellenmiştir (7). Deneysel olarak deniz yumuşakcıklarından *Aplysia californica*'lar üzerinde yapılan çalışmalarda *Aplysia* hücre adezyon moleküllerinin (*apCAM*) düzeylerinin düşürülmesi ile yeni sinaptik bağlantıların öğrenmeyle ilişkili formasyonunu olumsuz etkilediği gösterilmiştir (6).

3. 2. Amaç

Tinerin organizma üzerindeki birçok olumsuz etkileri araştırma konusu olmuştur. Bu çalışmanın amacı, belirli bir dönem tiner verilen ratlarda biyokimyasal ve fonksiyonel deneyler ile öğrenme ve hafıza yeteneğinin nasıl etkilendiğinin incelenmesidir. Bu çalışmada, ratlarda kronik tiner inhalasyonunun öğrenme ve hafızanın oluşmasında önemli görevler üstlendiği bilinen NCAM ekspresyonunun immunblotting yöntemi ile ölçülerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda kontrol, tiner ve iyileşme grupları arasında etki-sonuç ilişkisinin olup olmadığı ortaya konulacaktır. Tiner inhalasyonunun nöronal fonksiyonlarda neden olacağı hasar dikkate alınarak, bu maddenin NCAM ekspresyonunu azaltacağı düşünülmektedir. İyileşme grubunun sonuçları, tiner kullanımı kesildikten bir süre sonra NCAM ekspresyonundaki değişkenliği ve fonksiyonel iyileşme olup olmadığını ortaya koyacaktır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4. 1. Deney Hayvanları ve Beslenmesi

Deneylerde kullanılan Wistar-albino cinsi erkek ratlar Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Ratlar, özel olarak hazırlanmış penceresinde havalandırma tertibatı bulunan bir ortamda ve hergün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda ve su da çelik, paslanmaz bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu verildi. Hayvanlar, yem sanayi T.A.Ş. Elazığ Yem Fabrikası'nda hazırlanan pelletler halindeki özel rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen normal yemin terkibi Tablo 1'de gösterilmiştir. Hayvanların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımları bu şekilde sürdürüldü.

Tablo 1: Rat yemlerinin kalori değerleri ve karışım oranları.

Kuru madde	%	93,69
Ham protein	%	34,15
Ham yağ	%	3,00
Metabolik enerji	Kcal / kg	2095
Çinko	mg / kg	286,80
Demir	mg / kg	920,00
Bakır	mg / kg	29,33

Tablo 2. Yemdeki ham maddelerin terkipdeki oranı.

Buğday	(%)	10,00
Mısır	(%)	22,00
Arpa	(%)	15,00
Kepek	(%)	8,00
Soya küspesi	(%)	26,00
Balık unu	(%)	8,00
Et-kemik unu	(%)	5,00
Melas	(%)	5,00
Tuz	(%)	5,00
*Vitamin karması	(%)	1,25
**Mineral karması	(%)	1,25

*Vitamin karması: Deney hayvanlarına verilen yemlerin vitamin karmasında A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12 vitaminleri ile nikotinamid, folik asit, D-biotin ve kolın klorit bulunmaktadır.

**Mineral karması: Mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum ve kalsiyumdan oluşmuştur.

4. 2. Deneysel Uygulamalar

Deneysel çalışmalar ortalama ağırlıkları 270 gr (270 ± 60 gr) olan toplam 45 adet Wistar-albino rat üzerinde yapıldı. Bulundukları odanın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında 12 saat de karanlıkta takip edildi. Tüm ratlar rastgele seçilerek 3 grup oluşturuldu. Ayrıca gruplardaki her hayvanın kulağına işaret konarak tanınmaları sağlandı. Bu gruplar;

Grup I (n=15): Kontrol grubu (Herhangi bir işlem yapılmadı)

Grup II (n=15): Tiner grubu (3000 ppm konsantrasyonda tolue koklatıldı)

Grup III (n=15): Tiner + İyileşme grubu (3000 ppm konsantrasyonda tolue koklatıldı ve ardından 45 gün tiner koklatılmadan normal yaşantısına devam etti)

Her üç grupta bulunan ratlar aynı ortamda gözetim altında tutuldu. Her üç gruba da aynı standart yem verilerek yeterince su, yiyecek alımları sağlandı.

Çalışmada kullanılan tinerin kapsamı %66 tolue, %20 aseton, %10 izobutil asetat, %3 butil glikol, %1 izobutanol'den oluşmakta idi (66).

Özel bir cam kap (100x75x50 cm.) yaptırılarak, mevcut laboratuvar şartlarında Grup II ve Grup III'ü oluşturan ratlara bir ay boyunca hergün iki defa 1/2 saat 3000 ppm. tolue inhale ettirildi. Grup III'ü oluşturan ratlar tiner inhalasyonu sonrası 45 gün bekletildi. Grup I'i oluşturan ratlar ise herhangi bir kimyasal ajan almadan normal beslenmeleri sağlandı.

Ratların tiner inhalasyonu Yılmaz ve ark.'nın (66) çalışmasında bildirilen yöntem esas alınarak yapıldı. Sıvı tiner bir parça pamuğa emdirilerek küçük bir ventilatörün yardımıyla tüm cam kabın içinde dağılması sağlandı. Cam kabın içindeki tolue konsantrasyonu gaz kromatografi cihazı (UNICAM, Cambridge, U.K.) ile ölçülerek 3000 ppm düzeyinde tutuldu.

Her üç gruptaki ratlar deney sonunda öğrenme testine tabii tutularak "hayvanların etik kullanımı" ile ilgili komitenin aldığı kararlara uygun şekilde

öldürüldü. Beynin hipokampus, frontal korteks ve serebellum bölgeleri incelenmek üzere ayrıldı.

4. 3. Morris Water Maze Testinin Yapılması

Deney sonunda Grup I, Grup II, Grup III'deki tüm ratlara standart kullanılan öğrenme testi yapıldı (39, 40).

Bu işlem için sirküler bir tank (120 cm. çap ve 50 cm. derinlik) 30 cm'ye kadar suyla dolduruldu ve süt tozu ile boyanarak 2 cm suyun altına bırakılan platformun görünmesi engellenmiş oldu. Platform 10 cm. çapında ve suyun ısısı ise $24 \pm 2^\circ \text{C}$ düzeyinde sabit tutuldu. Su tankı sanal olarak 4 kısıma ayrıldı ve platform bu kadrarlardan birinin ortasına yerleştirildi. Rat diğer 1/4 oranındaki alanlardan birine bırakıldı ve yüzerek 60 sn. içinde platformu bulması beklendi. Platformu bulunca 30 sn. orada dinlenmesine izin verildi, sonra alınıp ayrı bir kafeste 30 sn. bekletildi. Tekrar su tankına bırakılarak aynı işlem her hayvan için 4 kez tekrarlanıp platformu bulma süreleri kaydedildi. 60 sn içinde platformu bulamayan rat alınıp platforma bırakıldı ve 30 sn dinlenmesine izin verildi. Her hayvan için 5 gün süreyle aynı denemeler yapıp süreler kaydedildi.

4. 4. Glutatyon, Malondialdehit ve NCAM Düzeylerinin Ölçülmesi

Doku örnekleri 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM NaCl, 0.2 mM fenilmetilsülfonil florid, 5 mM EDTA, 2mM β -merkaptetanol kullanılarak cam bir homojenizatörle soğuk ortamda homojenize edildi. Proteaz inhibitörü (Soybean; Sigma Chemical Co., Deisenhofen, Germany) ve %1'lik Triton X-100 içeren homojenatlar 4°C 'de 60 dakika süreyle 30.000 x g devirde santrifüj edildi. Süpernatant ve pelet kısımlar ayrıldı ve çalışılncaya kadar -70°C 'de saklandı.

Doku proteinleri Sodium Dodecyl Sulfate Poli Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ile ayrıştırıldı (42). Ayrıştırılan proteinler nitroselüloz membran kağıda (Schleich ve Schuell Inc. USA) transfer edildi. Non-spesifik olan bağlanmalar %1 bovine serum albuminle inkübasyon yoluyla bloklandı. Primer antikor (rabbit anti-rat NCAM antikor) %0.05 Tween-20 içeren tamponda seyreltilti. Blotlar, diaminobenzidin ve goat anti-rabbit immunoglobulin peroksidaz konjugatı kullanılarak görünür hale getirildi. Elde edilen NCAM protein bantlarının yoğunlukları LabWorks 4.0 (Ultra-violet Products Ltd. Cambridy, CD41TGUK) software programı kullanılarak NCAM 120, 140 ve 180 hesaplandı.

Doku protein miktarı Lowry prosedürüne göre çalışan ticari kit ile ölçüldü (Sigma Chemical Co.). Doku lipid peroksidasyon (LPO) [malondialdehit (MDA)+4-hidroksialkenal (4-HDA)] seviyeleri LPO-586 kiti kullanılarak ölçüldü (Oxis, Inc. Portland, OR). Redükte glutatyon (GSH) seviyeleri Ellman (20) metoduna göre tespit edildi.

4. 5. İstatistik

Gruplar arasındaki farklılıklar çift yönlü varyans analizi kullanılarak hesaplandı. Post-Hoc hesaplaması için Bonferroni'nin korreksiyon testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

GSH düzeyinin hipokampus, korteks ve serebellum bölgelerinde iyileşme gruplarında istatistiksel olarak anlamlı oranda yükseldiği gözlemlendi (Şekil 3).

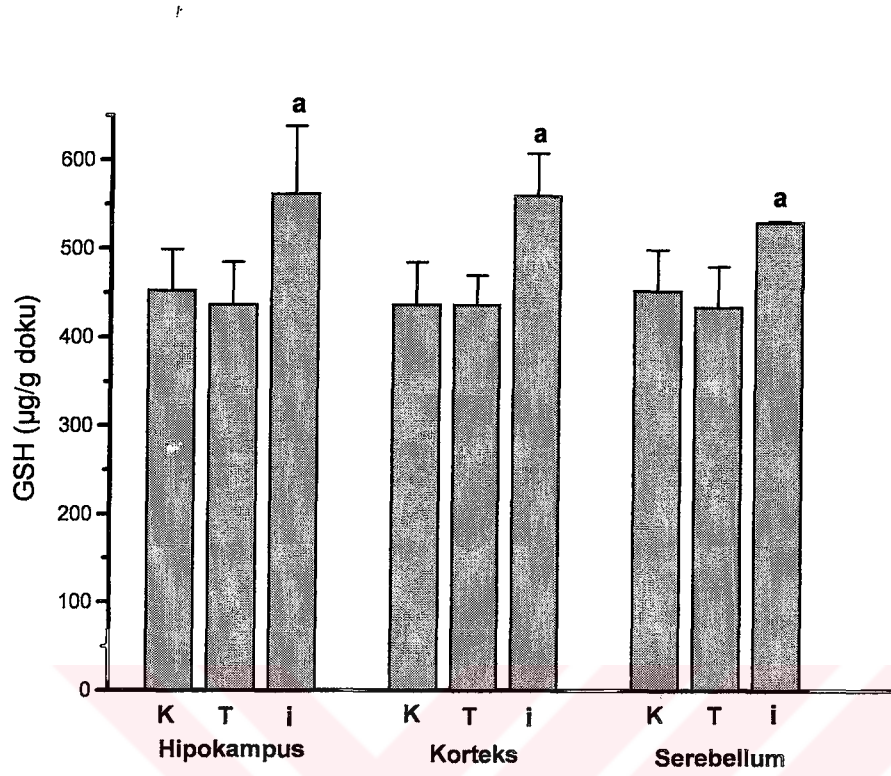
MDA düzeyinin hipokampus, korteks ve serebellum bölgelerinde tiner gruplarında istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı ve iyileşme gruplarında istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı saptandı (Şekil 4).

NCAM-120 ekspresyonunun hipokampusta değişmediği, kortekste iyileşme grubunda arttığı, serebellumda tiner grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı, iyileşme grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı gözlemlendi (Şekil 5).

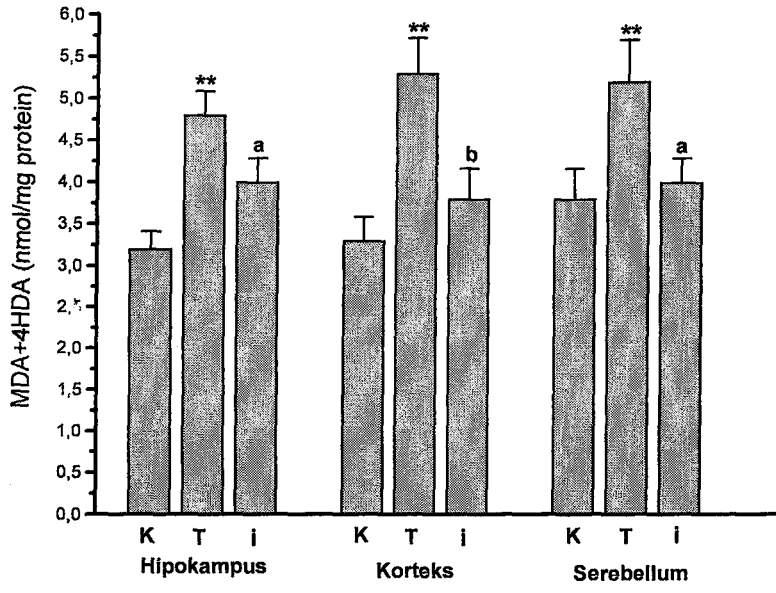
NCAM-140 ekspresyonunun hipokampusta ve serebellumda değişmediği, kortekste iyileşme grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı tespit edildi (Şekil 6).

NCAM-180 ekspresyonunun kortekste ve serebellumda tiner grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişmediği, iyileşme grubunda tiner gruplarına göre azaldığı, hipokampusta ise tiner ve iyileşme grubunda kontrol ve tiner grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi (Şekil 7).

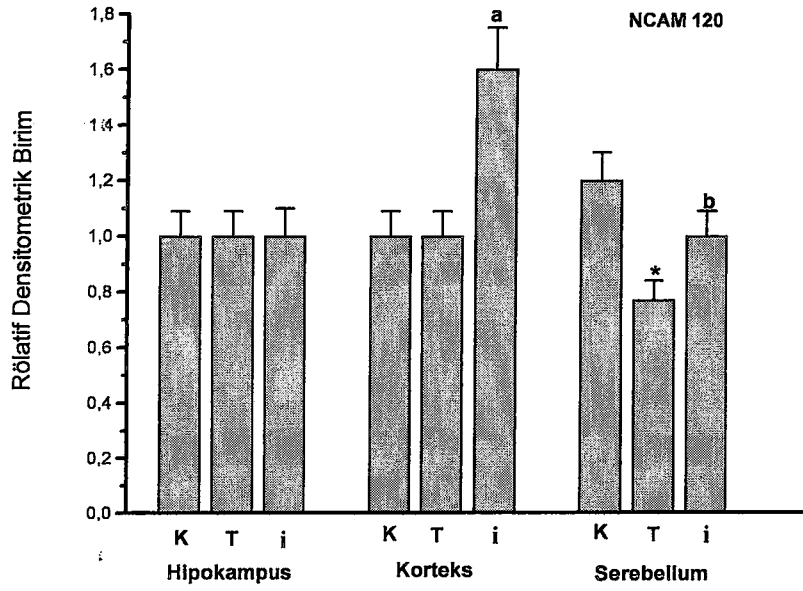
ANOVA testine göre ortalama platform bulma sürelerinde tiner grubunun öğrenme performansının zayıf olduğu görüldü ($p < 0.05$). Buna karşın iyileşmeye bırakılan ratlarda öğrenme performansının normale doğru iyileşme gösterdiği ancak istatistiksel olarak anlamlı bir düşme izlenmektedir ($p < 0.05$) (Tablo 3).



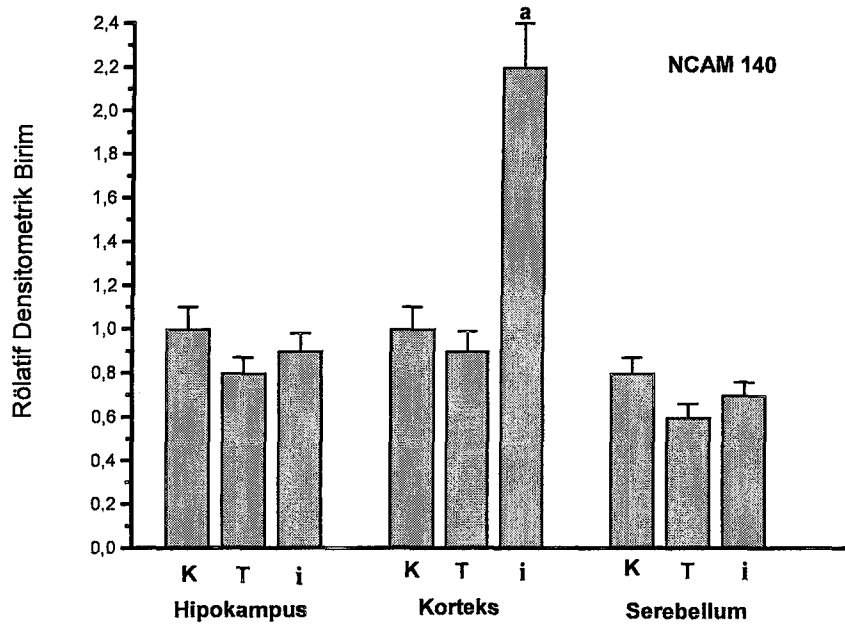
Şekil 3. Beyin dokularında redükte glutatyon (GSH) değerleri (^ap <0.05 tiner grubu ile karşılaştırıldığında; K: kontrol, T: tiner, İ: tiner+iyileşme).



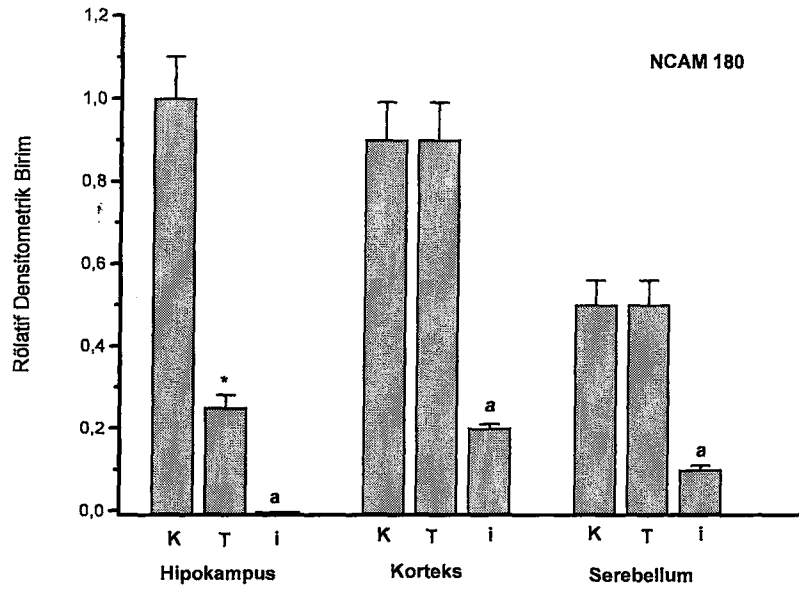
Şekil 4. Tüm grupların hipokampus, korteks ve serebellumlarında bulunan malondialdehit değerleri. (** $p < 0.01$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ^a $p < 0.05$ tiner grubu ile karşılaştırıldığında; ^b $p < 0.01$ tiner grubu ile karşılaştırıldığında; K: kontrol, T: tiner, İ: tiner+iyileşme).



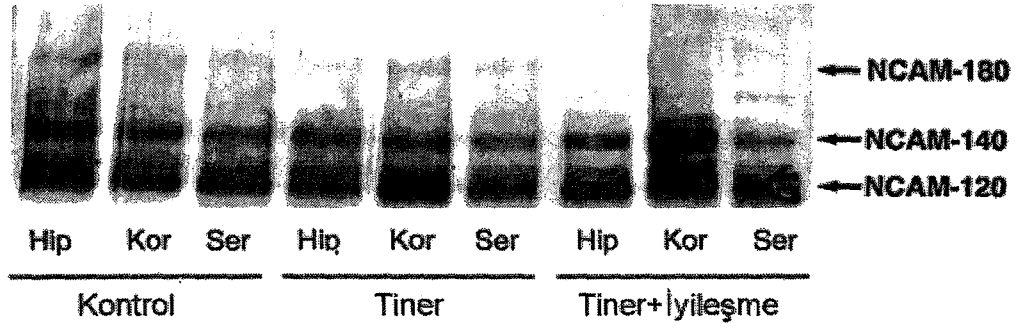
Şekil 5: Beyin dokularında NCAM 120'nin relative densitometrik analizi. (* $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ^a $p < 0.05$ tiner grubu ile karşılaştırıldığında; ^b $p < 0.01$ tiner grubu ile karşılaştırıldığında; K: kontrol, T: tiner, İ: tiner+iyileşme).



Şekil 6: Beyin dokularında NCAM 140'ın relative densitometrik analizi. (^ap<0.05 tiner grubu ile karşılaştırıldığında; K: kontrol, T: tiner, İ: tiner+iyileşme).



Şekil 7: Beyin dokularında NCAM 180'in relative densitometrik analizi. (* $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ^a $p<0.05$ tiner grubu ile karşılaştırıldığında; K: kontrol, T: tiner, İ: tiner+iyileşme).



Şekil 8: Üç ayrı NCAM formunun western blot ile saptanan protein bantları. Hip: hipokampus, Kor: korteks, Ser: serebellum.

Tablo 3. Morris water maze test sonuçları.

	Kontrol	Tiner	İyileşme
1. gün	45±5 sn	46±5 sn	44±4.6 sn
2. gün	24±3 sn	26±3 sn	25±3 sn
3. gün	14±1.8 sn	19±2 sn	16±2 sn
4. gün	9±1 sn	17±1.8 sn	13±1.5 sn
5. gün	6.5±0.7 sn	15±1.6 sn	10±1 sn

ANOVA testine göre ortalama platform bulma sürelerinde tiner grubunun öğrenme performansının zayıf olduğu görüldü ($p < 0.05$). Buna karşın iyileşmeye bırakılan ratlarda öğrenme performansının normale doğru iyileşme gösterdiği izleniyor ($p < 0.05$, tiner grubu ile karşılaştırıldığında).

6. TARTIŞMA

Nöronların kendi aralarındaki adezyonlar esas olarak NCAM-180 izoformunun fonksiyonudur (36). NCAM-120 ve NCAM-140 izoformları ise oligodendrosit, astrosit ve myelin kılıfları tarafından eksprese edilir (10, 36). Oligodendrosit adezyon molekülleri NCAM ile ilişkilidir (10). Mutant mouse'da NCAM-180'in eksik olması nedeniyle oligodendrosit adezyon moleküllerinin aslında NCAM-180 olduğu bildirilmiştir (11, 12). Çalışmamızda öğrenme fonksiyonu ile ilgili olan hipokampus dokusu dikkate alındığında yalnızca kontrol, tiner ve iyileşme gruplarında NCAM-180 grafiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi (Şekil 5, 6, 7).

Çalışmamızda kullanılan Morris water maze testi uzaysal hafızayı ölçer (29). Bu testin başarılı olması hipokampusun normal fonksiyonunu gerektirir (29). Hipokampusun en önemli görevlerinden birisi, primer belleğin (birkaç saniye ile birkaç dakika arasında olan depolama) sekonder belleğe (uzun süreli bellek, sabit bellek) çevrilmesini sağlamasıdır (24). Tekrar hatırlanması gereken bilgiler kalıcı deponun yer aldığı uzun süreli belleğin depo alanlarına taşınır. Mekanizma ne olursa olsun, hipokampus olmadan uzun süreli belleğin pekiştirilmesi mümkün olmamaktadır (24). Deneyimizde tiner inhalasyonuna bağlı olarak NCAM düzeyindeki düşüş en fazla NCAM-180 grubunda hipokampusta gözlenmiştir. NCAM-120 ve NCAM-140 değerlerinin hipokampusta anlamlı bir farklılığa yol açmadığı izlendi. Ratların Morris water maze testindeki 5. gün performansları dikkate alındığında, hipokampusta NCAM-180 düzeyindeki düşüş ile uyumlu olarak, tiner grubunda kontrol grubuna göre 2.5 katı civarında süre uzaması olduğu gözlenmiştir. İyileşme grubunda hipokampusta NCAM-180 düzeyi tiner

grubuna göre anlamlı oranda düşme göstermiştir. NCAM-180 grafiğinde iyileşme grubunun kontrol ve tiner gruplarına göre hipokampusu ek olarak, korteks ve serebellumda da istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Bu durumda Morris water maze testinde iyileşme grubunda tiner grubuna göre süre uzaması beklenmesine rağmen sonuçlar beklenilenin tersine süre kısalması şeklinde ortaya çıkmıştır. Diğer bir ifade ile biyokimyasal bulguya paradoks olacak şekilde iyileşme grubunun Morris water maze testinde 5. gün sonuçlarının tiner grubundan daha kısa fakat kontrol grubundan daha uzun olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, öğrenme fonksiyonunun değerlendirilmesinde yalnızca NCAM-180'in dikkate alınmaması gerektiğini ve biyokimyasal testlerin tek başına belirleyici olmadığını düşündürmektedir. Çünkü NCAM-120 ve NCAM-140'a ait hipokampuslardaki iyileşme grupları tiner grupları ile karşılaştırıldığında, NCAM-180'de düşme olmasına karşın, NCAM-120 ve NCAM-140 düzeyinde değişiklik olmadığı saptanmıştır.

Öğrenme ve hafızanın oluşumunda temel mekanizma olan sinaptik plastisiteye NCAM molekülleri aracılık etmektedir (25, 51, 52). NCAM yalnızca gelişme esnasında MSS'nin yapısal organizasyonuna katkıda bulunmaz, aynı zamanda beyindeki tahrip olmuş sinaptik modifikasyonların düzelmesine de yardımcı olur (52). Son araştırmalarda NCAM moleküllerinin öğrenme ve belleğin oluşmasında önemli rol oynadıkları, NCAM ve PSA-NCAM'in eliminsasyonunun öğrenme eksiklikleri ile sonuçlandığı gözlenmiştir (7, 17, 21, 44).

Uzun dönem hafızanın oluşmasında da NCAM'in önemli rolü vardır (51). Öğrenme sürecinde nöronal bağlantılarda yapısal değişikliklerin oluşması ile ve

yeniden organizasyon işleminde NCAM molekülleri görev almaktadır (54). NCAM antikorlarının intraventriküler enjeksiyonu ile ratlarda, enjeksiyondan 6-8 saat sonra öğrenme ve uzun dönem hafızaya zarar verdiği, 48 saat sonra yapılan pasif sakınma cevabı testi ile gösterilmiştir (56). Benzer deneysel çalışma tavuklarda da yapılmış ve bariz amnezi tablosu saptanmıştır (37). Aynı şekilde NCAM geninden yoksun farelerde uzaysal öğrenme ve bulma yeteneğinin bozulduğu, Morris water maze testlerinde geri kalmalar olduğu saptanmıştır (16, 17). Bununla birlikte öğrenmedeki bu yetersizliğin neden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. Ancak NCAM'in posttranslasyonel modifikasyonunda öğrenme ile ilgili değişiklikler gözlemlenmiştir. Çalışmamızda kronik tiner bağımlılığı ile, NCAM-180 ekspresyonunun özellikle hipokampusta baskılandığının gösterilmiş, ve buna paralel olarak tiner grubu ratlarda Morris water maze testinde geri kaldıkları saptanmıştır.

Yaptığımız elektroforez işleminde tüm gruplardaki hipokampuslarda NCAM-120 ve NCAM-140 ekspresyonu farklılık göstermemiştir. Tiner ve iyileşme gruplarında hipokampusta NCAM-180 ekspresyonu sırasıyla kontrol ve tiner grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Serebellum ve kortekste ise tüm gruplarda NCAM tipleri birbirlerine yakın oranlarda görülmektedir. Bu oranın hipokampusta NCAM-120 ve NCAM-140 tiplerinde de birbirlerine yakın bulunması literatür ile uyumludur (61).

Yapılan bir çalışmada NCAM-180'in polisializasyonunun ratlarda pasif bir cevabın konsolidasyonu ve oluşumu esnasında geçici olarak yükseldiği gösterilmiştir. Polisializasyonunun artışıdaki primer etkileri NCAM'in izoformlarından olan NCAM-180 için gösterilmiştir (18). PSA-NCAM düzeyinin

geçici yükseltilmesi öğrenme işlevlerinde artış ile sonuçlanmıştır (44). Çalışmamızla iyileşme grubunda NCAM-180 ekspresyonunda azalma olmasına karşın fonksiyonel incelemede Morris water maze testinde öğrenme işlevinde düzelme saptandı.

Tiner inhalasyonunun belli bir doz üzerinde uzun süre alınması beyinde, böbrekte, barsaklarda, karaciğerde çeşitli bozukluklara neden olur. Bu etkilerin bir kısmı biyokimyasal olarak lipid peroksidasyonu ve ROÜ aktivasyonu ile ortaya çıkar. Lipid peroksidasyon oluşumu sırasında *in vitro* çalışmalarda; bunun, serbest oksijen radikallerinin ve araşidonik asit metabolizmasının indirekt uyarılmasını sağlayarak prostoglandin, tromboksan ve lökotrien konsantrasyonunun artışına neden olur (48). Bu metabolitler enflamasyon sırasında açığa çıkan maddelerdir. Hücre membranı düzeyinde etkileri ile organizmada ödem, yüksek ateş ile başlayan bulgular oluşturarak enflamasyondan nekroza kadar gidebilecek bir tabloya neden olabilirler (48). Tinerin öğrenme ve hafıza üzerine olan olumsuz etkilerinde bu temel reaksiyonların aktive olması etkili olmuştur. Çalışmamızda hipokampus, korteks ve serebellumda tiner grubunda diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı miktarda fazla MDA olduğu görüldü. Bu bulgu tinerin nöral dokuda yaptığı hasarın en bariz kanıtıdır.

Beyinde esas fonksiyon gören hücreler olan nöronların işlevlerini yerine getirebilmeleri için birbirleri ile bağlantıda olmaları gerekmektedir. Bu bağlantılar çeşitli nedenlerle sağlanamadığında, fonksiyon kaybı ile kendisini belli edecektir. Yaşlanma ve kronik inhalanlara maruz kalma bu tür işlev kayıplarına neden olur. Sanayide bol miktarda kullanılan tinerin serebral fonksiyon kaybına yol açtığı

bilinmektedir. Son dönemde alkol, etanol ve tiner gibi aromatik hidrokarbonların NCAM'ler ile ilişkisi incelenerek hafıza üzerindeki etkileri araştırılmaktadır.

Yaptığımız Morris water maze öğrenme testinde tiner inhalasyonu yapılan ratların öğrenme ve bulma yeteneğinde (uzaysal hafıza) kontrol grubuna göre gecikme gözlemiştir. Tiner grubunda diğer gruplar gibi, öğrenme (bulma) olayı ilk günde 45 sn. civarında başlamış, beşinci günde 15 sn. civarında sabitlenmiştir. Bu süre kontrol grubunda 6 sn civarında iyileşme grubunda ise 10 sn düzeyine inmiştir. Bulgularımız tiner kullanımının bırakıldıktan sonra öğrenme ve hafıza fonksiyonunun iyileşmeye başladığını göstermektedir.

Tiner ile oluşturulan kronik toksisite sürecinde bozulan oksidan ve antioksidan denge ile metabolik bozukluklar beyin dokusunda çeşitli düzeyde fonksiyonel veya yapısal bozukluklara neden olabilir. Bu nedenle NCAM miktarlarında oluşan bu farklılık beyin dokusunun rejenerasyon işlevi ile ilişkili olabilir. Çünkü rejenere olan retinal ganglionlarda ve kimyasal olarak oluşturulan beyin hasarı sonucunda dokunun rejenerasyon sürecinde NCAM miktarlarında artış olduğu saptanmıştır (9, 38). Çalışmamızda NCAM-120 grubunda korteks ve serebellumda, NCAM-140 grubunda kortekste NCAM oranlarının arttığı, NCAM-180 grubunda ise hipokampus, korteks ve serebellumda NCAM oranının azaldığı gözlemlendi. Glutasyonun tüm gruplarda iyileşme dokularında arttığı ve Morris water maze testi sonuçlarının iyileşme grubunda hedefi bulma oranının tiner grubuna göre düzelme kaydettiği izlendi.

Vardığımız sonuçlar şunlardır:

- a) Kronik tiner inhalasyonu NCAM-180 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur.
- b) Tinerin öğrenme üzerinde olumsuz etkileri, NCAM-180 düzeylerinin düşüklüğü ile paralel seyretmiştir.
- c) Tinere maruz kalmanın ortadan kaldırılması tinerin olumsuz etkilerini geri çevirmesi, tinerin öğrenme üzerine olumsuz etkilerinin geri dönüşümlü olabileceğini göstermiştir.



7. KAYNAKLAR

1. Abrous DN, Montaron MF, Petry KG, Rougon G, Darnaudery M, Moal ML, Mayo W. (1997). Decrease in highly polysialylated neuronal cell adhesion molecules and in spacial learning during ageing are not correlated. *Brain Research* 744: 285-292.
2. Altındağ A, Özkan M, Oto R. (2001). İnhalanlarla ilgili bozukluklar. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*; 11:143-148.
3. Arif A. (1988). Abuse of volatile solvents and inhalants. Papers presented at a WHO Advisory Meeting 1-7.
4. Baydaş G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F, Canatan H. (2003). Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Letters* 137: 169-174.
5. Baydaş G, Reiter RJ, Yaşar A, Tuzcu M, Akdemir I, Nedzvetskii VS. (2003). Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radical Biology & Medicine* 35: 797-804.
6. Bailey CH, Kandel ER. (1993). Structural changes accompanying memory storage. *A Rev Physiol* 55: 397-426.
7. Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M. (1996). The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* 45: 143-152.

8. Benson DL, Schnapp LM, Shapiro L, Huntley GW. (2000). Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends in Cell Biology* 10: 473-482.
9. Bernhardt RR, Tongiorgi E, Anzini P, Schachner M J. (1996). Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *Comparative Neurol* 376: 253-264.
10. Bhat S, Silberberg DH. (1986). Oligodendrocyte cell adhesion molecules are related to neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J Neurosci* 6: 3348-3354.
11. Bhat S, Silberberg DH. (1988). NCAM-180, the largest component of the neural cell adhesion molecule, is reduced in dysmyelinating quaking mutant mouse brain. *Brain Res* 452: 373-377.
12. Bhat S, Silberberg DH. (1988). Developmental expression of neural cell adhesion molecules of oligodendrocytes in vivo and in culture. *J Neurochem* 50: 1830-1838.
13. Brewer GJ. (2000). Neuronal plasticity and stressor toxicity during aging. *Experimental Gerontology* 35: 1165-1183.
14. Bruckner JV, Peterson RG. (1976). Evaluation of toluene toxicity, utilizing the mouse as an animal model of human solvent abuse. *Pharmacology* 18: 244.
15. Chazal G, Durbec P, Jankovski A, Rougon G, Cremer H. (2000). Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci* 20: 1446-1457.

16. Cremer H, Chazal G, Lledo PM, Rougon G, Montaron MF, Mayo W, Le Moal M, Abrous DN. (2000). PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *J Devl Neuroscience* 18: 213-220.
17. Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S, Baerhels D, Rajewsky K, Wille W. (1994). Inactivation of the NCAM gene in mice result in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367: 455-459.
18. Doyle E, Nolan PM, Bell R, Regan CM. (1992). Hippocampal NCAM 180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in the adult rat. *J Neurosci* 31: 513-523.
19. Durbec P, Cremer H. (2001). Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system. *Mol Neurobiol* 24: 53-64.
20. Ellman GL. (1959). Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
21. Fields RD, Itoh K. (1996). Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19: 473-480.
22. Fox GB, O'Connell AW, Murphy KJ, Regan CM. (1995). Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus. *J Neurochem* 65: 2796-2799.
23. Graham DG, Anthony DC, Szakal-Quin G, Gottfried MR, Boekelheide K. (1985). Covalent cross-linking of neurofilaments in the pathogenesis of n-hexane neuropathy. *Neurotoxicol* 6: 55-64.
24. Guyton AC. (1996). *Tıbbi Fizyoloji* 9.baskı. Editör: Gökhan N, Çavuşoğlu H. Nobel Tıp Kitabevi, Sayfa 749-760.

25. Hoffman KB. (1998). The relationship between adhesion molecules and neuronal plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology* 18: 461-475.
26. Hormes JT, Filley CM, Rosenberg NL. (1986). Neurologic sequelae of chronic solvent vapor abuse. *Neurology* 36: 698-702.
27. Kandel ER. (2000). Nerve cells and behavior. "Principles of Neural Science" ER Kandel, JH Schwartz, TM Jessell (Editörler). 4. baskı. McGraw-Hill, New York. Sayfa 19-35.
28. Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. (2000). Learning and memory. "Principles of Neural Science" ER Kandel, JH Schwartz, TM Jessell (Editörler). 4. baskı. McGraw-Hill, New York. Sayfa 1227-1246.
29. Kandel ER. (2000). Cellular mechanisms of learning and biological basis of individuality. "Principles of Neural Science" ER Kandel, JH Schwartz, TM Jessell (Editörler). 4. baskı. McGraw-Hill, New York. Sayfa 1247-1279.
30. Kiss JT. (1998). A role of adhesion molecules in neural plasticity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 140: 89-94.
31. Kiss JZ, Tronscoso E, Djebbara Z, Vutskits L, Muller D. (2001). The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Research Reviews* 36: 175-184.
32. LeBel CP, Schatz RA. (1990). Altered synaptosomal phospholipid metabolism after toluene. Possible relationship with membrane fluidity, Na⁺, K⁺ - adenosine triphosphate and phospholipid methylation. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 1189-1197.
33. Mattia CJ, Adams JD, Bondy SC. (1993). Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol* 46: 103-110.

34. Mattia CJ, LeBel CP and Bondy SC. (1991). Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol* 42: 879-882.
35. Marjot R and McLeod AA. (1989). Chronic non-neurological toxicity from volatile substance abuse. *Human Toxicol* 8: 301-306.
36. Massaro AR. (2002). The role of NCAM in remyelination. *Neurol Sci* 22: 429-435
37. Mileusnic R, Rose SP, Lancashire C, Bullock S. (1995). Characterisation of antibodies specific for chick brain neural cell adhesion molecules which cause amnesia for a passive avoidance task. *J. Neurochem* 64: 2598-2606.
38. Minana R, Climent E, Baretino D, Segui JM, Renau-Piqueras J, Guerri C. (2000). Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. *Journal of Neurochemistry* 75: 954-964.
39. Morris R. (1984). Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60.
40. Morris RG, Frey U. (1997). Hippocampal synaptic plasticity: Role in spacial learning or the automated recording of attented experience? *Pli Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352: 1489-1503.
41. Muller D, Wang C, Skibo G, Toni N, Cremer H, Calaora V, Rougon G, Kiss JZ. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 17: 413-422.
42. Nedzvetsky VS, Berezich VA, Oberniak TI and Zhmareva EN. (1986). Characteristics of specific intermediate filament proteins in human brain tumours. *Biokhimiia*. 51, 1843-1850.

43. Nybroe O, Albrechtsen M, Dahlin J, Linnemann D, Lyles JM, Moller CJ, Bock E. (1985). Biosynthesis of the neural cell adhesion molecule: Characterization of polypeptide C. *J Cell Biol* 101: 2310-2315.
44. O'Connel AW, Fox GB, Bary T, Murphy KJ, Fichera G, Foley AG, Kelly J, Regan CM. (1997). Spatial learning activities neural cell adhesion molecule polysialylation in corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J Neurochem* 68: 2538-2546.
45. Rafuse VF, Landmesser L. (1996). Contractile activity regulates isoform expression and polysialylation of NCAM in cultured myotubes: Involvement of Ca^{+2} and protein kinase C. *J Cell Biol* 132: 969-983.
46. Rafuse VF, Polo-Parada L, Landmesser LT. (2001). Structural and functional alterations of neuromuscular junctions in NCAM-deficient mice. *J Neurosci* 20: 6529-6539.
47. Regan CM, Fox GB. (1995). Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochem Res* 20: 593-598.
48. Reiter RJ. (1998). Melatonin and human reproduction. *Ann Med* 30: 103-113.
49. Ron MA. (1986). Volatile substance abuse; a review of possible long-term neurological, intellectual and psychiatric sequelae. *Br J Psych* 148: 253-246.
50. Ronn LCB, Berezin V, Bock E. (2000). The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int J Devel Neuroscience* 18: 193-199.
51. Ronn LCB, Hartz BP, Bock E. (1998). The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Experimental Gerontology* 33: 853-864.

52. Rose SPR. (1995). Glycoproteins and memory formation. *Behavioural Brain Research* 66: 73-78.
53. Sanes JR, Jessell TM. (2000). The guidance of axons to their targets, *Principles of Neural Science*, fourth ed, ER Kandel, JH Schwartz, TM Jessell (Editörler), McGraw-Hill, Sayfa 1063-1086.
54. Schachner M. (1997). Neural recognition and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 9: 627-634.
55. Schaumburg H, Spencer PS. (1976). Degeneration in central and peripheral nervous system produced by pure n-hexane: an experimental study. *Brain* 99: 183-192.
56. Scholey AB, Rose SPR, Zamani MR, Bock E, Schachner M. (1993). A role for the neural cell adhesion molecule in a late, consolidating phase of glycoprotein synthesis 6 h following passive avoidance training of the young chick. *Neuroscience* 55: 499-509.
57. Seki T, Arai Y. (1991). The persistent expression of a highly sialylated NCAM in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci Res* 12: 503-513.
58. Stickney JA, Roberts AE, Silverman DM, Schatz RA. (1989). The effect of m-xylene on rat lung benzo [a] pyrene metabolism and microsomal membrane lipids: Comparison with p-xylene. *Toxicol* 58: 155-165.
59. Suleiman SA. (1987). Petroleum hydrocarbon toxicity in vitro: effects of n-alkanes, benzene and toluene on pulmonary alveolar macrophages and lysosomal enzymes of the lung. *Arch Toxicol* 59: 402-407.
60. Takeuchi A, Kawai T, Zhang ZW, Miyama Y, Sakamoto K, Higashikawa K, Ikeda M. (2002). Toluene, xylenes and xylene isomers in urine as biological

indicators of low-level exposure to each solvent; a comparative study. *Int Arch Occup Environ Health* 75: 387-393.

61. Thomsen NK, Soroka V, Jensen PH, Berezin V, Kiselyov VV, Bock E. (1996). The three-dimensional structure of the first domain of neural cell adhesion molecule. *Nat Struct Biol* 3: 581-585.

62. Uzun N, Karaali Savrun F, Kızıltan ME. (2001). Kronik tolüen ve N-heksanın toksikasyonunda periferik sinir sistemi hasarı: elektrofizyolojik inceleme. *Cerrahpaşa J Med* 32: 142-150.

63. von Euler G, Ogren SO, Eneroth P, Fuxe K, Gustafsson JA. (1994). Persistent effects of 80 ppm toluene on dopamine-regulated locomotor activity and prolactin secretion in the male rat. *Neurotoxicology* 15: 621-624.

64. von Euler G, Ogren SO, Li XM, Fuxe K, Gustafsson JA. (1993). Persistent effects of subchronic toluene exposure on spatial learning and memory, dopamine-mediated locomotor activity and dopamine D2 agonist binding in the rat. *Toxicology* 77: 223-232.

65. von Euler M, Pham TM, Hillefors M, Bjelke B, Henriksson B, von Euler G. (2000). Inhalation of low concentrations of toluene induces persistent effects on a learning retention task, beam-walk performance, and cerebrocortical size in the rat. *Exp Neurol* 163: 1-8.

66. Yılmaz B, Kutlu S, Canpolat S, Sandal S, Ayar A, Moğulkoç R, Keleştimur H. (2001). Effects of paint thinner exposure on serum LH, FSH and testosterone levels and hypothalamic catecholamine contents in the male rat. *Biol Pharm Bull* 24: 163-166.

8. ÖZGEÇMİŞ

1962 yılında İstanbul'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi 1969-1980 yılları arasında İstanbul'da tamamladım. Yüksek öğrenimimi 1980 ve 1986 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde tamamladım. 1986 ve 1988 yılları arasında pratisyen hekim olarak Gaziantep Oğuzeli Sağlık Merkezi'nde görev yaptım. 1988 ve 1994 yılları arasında Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim Hastanesi'nde Nöroşirürji Uzmanlığı'nı tamamladım. 1994 ve 1995 yılları arasında Van Devlet Hastanesi'nde Nöroşirürji Uzmanı olarak çalıştım. 1995 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji ABD'nde Yardımcı Doçent kadrosunda göreve başladım ve halen görevimi burada sürdürmekteyim. 17.09.1999 tarihinde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fizyoloji programında doktora eğitimime başladım. 1998 ve 1999 yılları arasında Japonya'da Keio Üniversitesi Nöroşirürji ABD'nde 11 ay süre ile kadavralarda kafatabanı çalışması yaptım. 2002 yılında 6 aylık bir süre ile aynı merkeze giderek nöral transplantasyon konusundaki temel teknikleri öğrendim. 24 adet yurtiçi ve 40 adet yurtdışı yayınlanmış makalem vardır.