

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

TOLÜEN SOLUYAN SIÇANLARDA OLUŞABİLECEK
KARACİĞER HASARI VE MELATONİNİN KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ufuk TAŞ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Murat ÖGETÜRK

ELAĞIĞ
2008

ONAY SAYFASI

Prof. Dr.....

.....

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ

.....

F.Ü. Tıp Fakültesi

Anatomi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Murat ÖGETÜRK

.....

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında beni yönlendiren ve yetişmemde büyük emeği olan Danışman Hocam Doç. Dr. Murat ÖGETÜRK'e tez çalışmama olan yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatın her döneminde bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerimle, sevgili eşim Ayşe Duhan ve oğlum İsmet Said'e; tez çalışmamda yardım ve katkılarından dolayı hocalarım Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ, Doç. Dr. A. Oya SAĞIROĞLU, Doç. Dr. İlter KUŞ ve Doç. Dr. Ahmet KAVAKLI'ya, mesai arkadaşlarım Uzm. Dr. Evren KÖSE, Araş. Gör. Dr. Sedat MEYDAN, Araş. Gör. Dr. Hilal IRMAK SAPMAZ, Araş. Gör. Dr. Serin AKBAYIR'a teşekkür ederim.

Tezimin biyokimyasal bulgularının elde edilmesi ve değerlendirilmesinde yapmış oldukları yardımlardan dolayı Prof. Dr. Necip İLHAN, Yrd. Doç. Dr. Dilara KAMAN, Araş. Gör. Dr. Enver SANCAKDAR'a, ı ışık mikroskopik değerlendirmelerde emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Dürrin Özlem DABAK, Uzman Dr. Tuncay KULOĞLU, Doç. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU CAMCI'ya teşekkür ederim. Ayrıca sağladığı finansmandan ötürü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışmada tolüen solunumunun sıçan karaciğeri üzerindeki zararlı etkileri ve melatoninin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla, 21 adet Wistar-albino cinsi erkek sıçan (200-220 gr) rastgele şekilde üç eşit gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar kontrol olarak düzenlendi. Grup II'deki sıçanlar, 4 hafta boyunca solunum yoluyla tolüene (3000 ppm/1saat/gün) maruz bırakılırken Grup III'deki sıçanlara ise tolüen uygulamasının yanı sıra melatonin (10 mg/kg/gün, ip) tedavisi uygulandı.

Deney sonunda dekapite edilmiş hayvanlardan karaciğer dokuları ve kan örnekleri alındı. Serum aspartat transaminaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), total bilirubin ve albümin seviyeleri ölçüldü. Sıçanlardan alınan karaciğer doku örnekleri rutin histolojik işlemlerden geçirilerek ışık mikroskop altında incelendi. Bununla birlikte dokular, apoptozis varlığının belirlenmesi amacıyla immunohistokimyasal olarak avidin-biotin-peroksidaz yöntemiyle boyandı. Karaciğer doku örneklerinde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) seviyeleri ölçüldü.

Tolüenin serum ALT, AST ve doku MDA düzeylerinde önemli oranda artışa, serum albümin oranlarında ise azalmaya neden olduğu; bunun yanı sıra serum ALP, total bilirubin ve doku SOD, GSH-Px ve CAT düzeylerini etkilemediği görüldü. Melatonin tedavisinin serum ALT, AST ve doku MDA seviyelerindeki artışı önlediği, ancak serum albümin miktarındaki değişimi etkilemediği belirlendi.

Tolüene maruz kalan sıçanların ışık mikroskopik değerlendirmesinde; yağlı dejenerasyon, balon dejenerasyon, sinüzoidlerde genişleme ve hiperemi ile orta derecede perisentral fibrozis görüldü. Ayrıca immunohistokimyasal incelemede, kontrol grubuna oranla Bax immün reaktivitesinde belirgin artış gözlemlendi. Tolüen uygulanmış hayvanlara melatonin verilmesiyle Bax immün reaktivitesindeki artışın azaldığı ve diğer histopatolojik değişikliklerin kayda değer oranda düzeldiği görüldü.

Sonuç olarak, bu biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal çalışmada tolüen toksisitesi sonucu karaciğerde oksidatif doku hasarı ve apoptozis meydana geldiği ve bu hasarın melatonin tedavisiyle önemli ölçüde önlendiği ortaya kondu.

Anahtar Kelimeler: Tolüen, melatonin, karaciğer, apoptozis, immunohistokimya.

ABSTRACT

An Investigation on Possible Liver Damage and Protective Effect of Melatonin in Toluene-Inhaled Rats

This study was designed to investigate the harmful effects of toluene inhalation and protective effects of melatonin in the liver of rats.

For this purpose, 21 adult male Wistar-albino rats (200-220 g) were randomly divided into three equal groups. Animals in group I were used as control group. The rats in group II were exposed toluene (3000 ppm/1hour/day) for 4 weeks, while the rats in group III treated with melatonin (10 mg/kg/day, ip) plus toluene inhalation. At the end of the experimental period, the liver and blood samples were taken from the decapitated animals. Serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin and albumin levels were determined. Liver tissue sections were stained with routine histological methods and examined under the light microscope. In addition, the samples were immunohistochemically stained using avidin-biotin-peroxidase method for determination of apoptosis. The liver tissue activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) levels were measured.

Toluene significantly increased serum ALT, AST and tissue MDA, and decreased serum albumin, but did not affect serum ALP, total bilirubin and tissue SOD, GSH-Px and CAT levels when compared with controls. The increases in tissue MDA, and serum ALT and AST levels induced by toluene inhalation were significantly inhibited by melatonin treatment, while no significant change was observed in serum albumin level.

In light microscopic examination of liver tissues from rats inhaled toluene, fatty change, ballooning degeneration, dilated and hyperemic sinusoids, and mild pericentral fibrosis were observed. In addition, immunohistochemical examination showed that Bax immunoreactivity was significantly increased compared with controls. Melatonin treatment significantly decreased Bax immunoreactivity and considerably ameliorates the histopathological changes.

In conclusion, this biochemical, histopathological and immunohistochemical study revealed that toluene inhalation causes oxidative injury and apoptosis in the liver, and that melatonin treatment significantly prevents these events.

Key Words: Toluene, melatonin, liver, apoptosis, immunohistochemistry.

1. GİRİŞ	1
1.1. Tolüen	1
1.1.1. Tolüenin Kimyasal Yapısı ve Formülü	1
1.1.2. Üretimi ve Kullanımı	2
1.1.3. Standartları, Kabul Edilebilir Sınırları ve Letal Dozu	3
1.1.4. Vücuda Alınımı, Dağılımı, Metabolizması ve Atılımı	4
1.1.4.1. Dağılımı	4
1.1.4.2. Metabolizması	4
1.1.4.3. Atılması	5
1.1.5. Toksik Etkileri ve Toksisite Belirtileri	5
1.1.5.1. Karaciğer Üzerine Toksik Etkileri	6
1.1.5.2. Sinir Sistemi Üzerine Toksik Etkileri	6
1.1.5.3. Göz ve Deri Üzerine Toksik Etkileri	7
1.1.5.4. Teratojenik Etkileri	7
1.1.6. Kanserojenik Etkileri	7
1.1.7. Tolüenin Toksik Etkilerini Artıran Faktörler	7
1.1.8. Tolüenin Kötüye Kullanımı	8
1.2. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	8
1.3. Melatonin	10
1.3.1. Pineal Bez	10
1.3.2. Melatonin Genel Bilgiler	11
1.3.3. Melatonin Sentezi	12
1.3.4. İnsanda Melatonin Üretimi	13
1.3.5. Melatonin Metabolizması	14
1.3.6. Melatoninin Antioksidan Etkileri ve Mekanizması	14
1.3.7. Melatoninin Genel Etkileri	15
1.4. Karaciğer	16
1.4.1. Karaciğer Embriyolojisi	16
1.4.2. Karaciğerin Anatomisi	18
1.4.2.1. Karaciğerin Lobları	18
1.4.2.1. Karaciğerin Yüzleri	18
1.4.2.2. Karaciğerin Kenarları ve Projeksiyonu	19
1.4.2.3. Karaciğeri Yerinde Tutan Faktörler	20
1.4.2.4. Karaciğerin Damar ve Sinirleri	20
1.4.3. Karaciğerin Histolojisi	21
1.4.3.1. Karaciğerin Lobüler Yapısı	21
1.4.3.2. Hepatosit	22
1.4.4. Karaciğerin Fonksiyonları	24
1.4.5. Karaciğer Hasarı (Hepatit)	25
1.4.5.1. İlaç ve Toksik Maddelere Bağlı Hepatitler	25
1.4.5.1.1. İntrensek Hepatotoksinler	25
1.4.5.1.2. İdiosenkrazik Hepatotoksinler	26
1.4.5.2. Klinik ve Histopatolojik Bulgular	26
1.4.5.3. Tanıda Kullanılan Tarama Testleri	27
1.4.5.3.1. Serum Bilirubin Düzeyi	27
1.4.5.3.2. Serum Alkalen Fosfataz (ALP) Seviyesi	27
1.4.5.3.3. Aspartat (AST) ve Alanin (ALT) Aminotransferazlar	27
1.5. Apoptozis	27

1.5.1. Apoptozisin Başlatılması	28
1.5.2. Apoptozis Modulatorleri	30
1.5.3. Apoptozis Morfolojisi	31
1.5.4. Apoptozisin Görüldüğü Durumlar	32
1.5.4.1. Fizyolojik Olarak Apoptozisin Görüldüğü Durumlar	32
1.5.4.2. Patolojik Olarak Apoptozisin Görüldüğü Durumlar	33
1.6. Nekroz	33
1.7. İmmünohistokimya	34
1.7.1. İmmüoglobulinlerin Yapısı	35
1.7.2. Monoklonal ve Poliklonal Antikorlar	36
1.7.3. İmmünohistokimya İşaretleme Yöntemleri	36
1.7.3.1. Direkt Yöntem	36
1.7.3.2. İndirekt Yöntem	36
1.7.3.2.1. Avidin-Biyotin Yöntemi (ABC Metodu)	37
1.7.3.2.2. İşaretlenmemiş Antikor Yöntemleri	37
1.7.3.2.3. Protein-A Yöntemi	38
1.7.3.2.4. İmmün-Altın Yöntemi	38
1.7.3.3. Kromojenler	38
2. GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1. Deney Grupları ve Sıçanların Bakımı	39
2.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar	40
2.3. Tedavi Protokolü	41
2.4. Biyokimyasal Değerlendirme	42
2.4.1. Doku örneklerindeki antioksidan enzim ve MDA değerleri.	42
2.4.1.1. MDA Tayini	42
2.4.1.2. SOD Tayini	42
2.4.1.3. GSH-Px Tayini	42
2.4.1.4. CAT Tayini	43
2.4.2. Karaciğer Fonksiyon Testleri ve Serum Albümin, Bilirubin düzeyi Tayini	43
2.5. Histopatolojik Değerlendirme	43
2.6. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	44
2.7. İstatistiksel Analiz	45
3. BULGULAR	46
3.1. Klinik Bulgular	46
3.2. Biyokimyasal Bulgular	46
3.3. Histopatolojik Bulgular	49
3.3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular	54
4. TARTIŞMA	57
5. KAYNAKLAR	64
6. ÖZGEÇMİŞ	76

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi (gr/kg)	40
Tablo 2. Gruplar ve tedavi protokolü	41
Tablo 3. Histolojik takip serileri	43
Tablo 4. İmmünohistokimyasal boyama prosedürleri	44
Tablo 5. İmmünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecesi	45
Tablo 6. Gruplara ait karaciğer doku örneklerindeki antioksidan enzim ve MDA değerleri	47
Tablo 7. Karaciğer fonksiyonlarını gösterir kan parametreleri	48

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Tolüenin kimyasal yapısı	2
Şekil 2. Pineal bezin anatomik konumu	10
Şekil 3. Melatoninin kimyasal yapısı	11
Şekil 4. Melatonin biyosentezi kontrol mekanizması	12
Şekil 5. Melatonin sentezi şeması	13
Şekil 6. Melatonin antioksidan etkisi	15
Şekil 7. Karaciğerin embriyolojik gelişimi	17
Şekil 8. Karaciğer alttan görünümü	19
Şekil 9. Bir karaciğer lobülünün görünümü	22
Şekil 10. Hepatik lobülün yapısı ve karaciğer hücresi	24
Şekil 11. Apoptozisin indüklenmesi ve apoptotik cismin oluşumu	29
Şekil 12. Pro-apoptotik, anti-apoptotik ajanlar ve apoptozis	30
Şekil 13. Aşama aşama apoptozis ve morfolojisi	32
Şekil 14. Apoptozis ve nekrozun morfolojik farklılığı	34
Şekil 15. İmmünoglobulinlerin yapısı	35
Şekil 16. Avidin biyotin peroksidaz yöntemi	37
Şekil 17. Tolüenin solutulduğu deney kafesleri	39
Şekil 18. Gruplara ait MDA düzeyleri	47
Şekil 19. Gruplara ait ALT düzeyleri	48
Şekil 20. Gruplara ait AST düzeyleri	49
Şekil 21. Gruplara ait albümin düzeyleri	49
Şekil 22. Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokusu, H.E X40	50
Şekil 23. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda yağlı Dejenerasyon, H.E X40	51
Şekil 24. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda hidropik dejenerasyon, H.E X40	51
Şekil 25. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda sinüzoidlerde genişleme ve hiperemi, H.E X40	52
Şekil 26. Tolüen+melatonin uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusu, H.E X40	52
Şekil 27. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu, Masson trikrom X20	53
Şekil 28. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda üçlü boyama,	

Masson trikrom X40	64
Şekil 29. Tolüen+melatonin uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda üçlü boyama, Masson trikrom X40	54
Şekil 30. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu, ABC metodu X40	55
Şekil 31. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusu, ABC metodu X40	56
Şekil 32. Tolüen+melatonin uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusu, ABC metodu X40	56

KISALTMALAR LİSTESİ

µg	: mikrogram
6-HMSF	: 6-Hidroksimelatonin sülfat
ABC	: Avidin-biyotin-peroksidaz boyama yöntemi
AIF	: Apoptosis indükleyici faktör
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
CAT	: Katalaz
CCl ₄	: Karbon tetraklorür
CYTP-450	: Sitokrom P-450
DHHS	: Department of Health and Human Services
EPA	: Enviromental Protection Agency
FasL	: Fas ligant
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IARC	: The International Agency for Research on Cancer
LC50	: Letal konsantrasyon
LD50	: Letal doz
MDA	: Malondialdehit
NAT	: N-asetiltransferaz
NK	: Natural killer
NO	: Nitrik oksit
NSC	: Nucleus suprachiasmaticus
O ₂	: Moleküler oksijen
O ₂ ⁻	: Süper oksit
OH	: Hidroksil radikali
OSHA	: The Occupational Safety and Health Administration
PAP	: Peroksidaz-antiperoksidaz
ppm	: Milyonda bir parçacık
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNF-1	: Tümör nekrozis faktör 1
TNF-2	: Tümör nekrozis faktör 2
TNT	: Trinitrotolüen

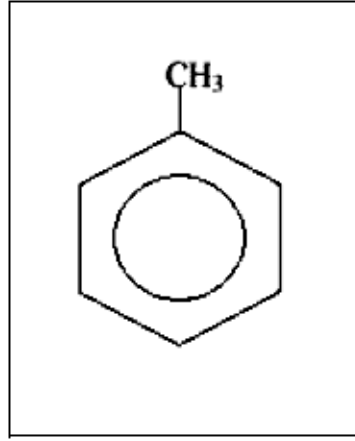
1. GİRİŞ

1.1. Tolüen

1.1.1 . Tolüenin Kimyasal Yapısı ve Formülü

Tolüen ($C_6H_5CH_3$ - CAS No: 108-88-3) berrak, renksiz, keskin ve hoş kokusu olan uçucu bir sıvı hidrokarbondur (Şekil 1). Metil benzen, metil benzol, fenil metan ve toluol gibi isimler ile de anılmaktadır (1, 2). 4,4 °C (40 °F) üzerindeki sıcaklıklarda kolayca tutuşabildiği için, oda sıcaklıklarında yanma tehlikesi söz konusudur. Tolüen birçok organik solventle kolayca karışım yaptığı halde suda çok zayıf bir şekilde çözünür. Yoğunluğu daha az olduğu için suyun yüzeyinde kalır (2, 3). Temel belirleyici özellikleri aşağıya çıkartılmıştır (1-5).

- Cas no : 108-88-3
- Görünüm : Berrak, renksiz sıvı
- Molekül formülü : $C_6H_5CH_3$
- Molekül ağırlığı : 92,13 gr/mol
- Kaynama noktası : 111 °C (760 mm/Hg)
- Donma noktası : -139 °C
- Yoğunluk : 0,861 g/cm³
- 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/m³ (25 °C)
- Koku tanımlaması : Ekşi ve yanık



Şekil 1. Tolüenin kimyasal yapısı (2)

1.1.2. Üretimi ve Kullanımı

Tolüen doğada ham petrol ve tolu ağacında bulunur (6). Ham petrolden benzin ve diğer yakıtların ayrıştırılması ve kok kömürünün yanması sırasında ortaya çıkar (1, 7, 8).

İnsanlar içme suları, yiyecekler, hava ve çeşitli tüketim ürünleri aracılığıyla tolüene maruz kalabilirler (6). Tolüen maruziyetinin temel kaynağı benzindir. Benzinin yaklaşık %5-7 ağırlığını tolüen oluşturur. Atmosfere benzinin üretilmesi, taşınması ve yanması sırasında salınır. Tolüen miktarının en fazla olduğu yerler rafineriler ile benzin istasyonlarına yakın olan yerler ve trafiğin yoğun olduğu bölgelerdir. Atmosfer kaynaklı olmayan (toprak, su vb.) tolüen salınımının %1'inden daha az bir oranda olduğu tahmin edilmektedir (9). Yarılanma ömrü yaklaşık olarak 13 saat olan atmosferdeki tolüenin, hidroksil radikaliyle reaksiyona girmesi yoğunluğunu gitgide azaltır. Tolüen petrol ürünlerinin atıklarından dolayı bazen içme sularına da karışabilir (7). Ev içerisindeki tolüenin kaynağı, ev halkının kullandığı ürünler ve sigaradır. Sigara kullananlar her bir sigarada 80-100 mikrogram (μg) tolüene maruz kalırlar. Tolüen içeren ürünlerin başında; boyalar, boya incelticiler, vernik, gomalak, pas önleyiciler, yapıştırıcılar, solvent tabanlı temizleyiciler ve bazı temizlik ürünleri gelir. Ayrıca kozmetik ürünlerde de solvent olarak kullanılır. Sanayide ise, daha toksik olan benzenin yerine tolüen kullanımı giderek artmaktadır. Bunun yanı sıra, derinin işlenmesi sırasında ve bazı kimyasal işlemler sırasında da tolüen kullanılmaktadır. Benzil klorür, benzoik asit, fenol, krezol, vinil tolüen, TNT,

tolüen diizosiyanat yapımında da tolüen kullanımı yaygındır (9, 10). Bütün bunlar incelendiğinde iş yaşamında birçok insanın tolüene maruz kaldığı gerçeğiyle karşılaşılır (1, 7). Meslek grupları içerisinde en çok ayakkabı işçileri, benzin istasyonu, rafineri ve deri sanayisi çalışanları, boyacılar, matbaacılar, kaportacılar, oto sanayi çalışanları risk altındadır (7).

1.1.3. Standartları, Kabul Edilebilir Sınırları ve Letal Dozu

Tolüen petrol ürünlerinin olduğu her yerde havada ve suda belirli oranlarda bulunur. Tolüenin varlığını gösteren en önemli işaretlerden biri kokusudur. Havadaki koku eşik değeri 8 ppm'dir. Bu oran işyerlerinde izin verilen üst değerin 1/25'i kadardır. Amerikan Çevre Koruma Örgütü (Environmental Protection Agency - EPA) içme suyunda litrede 1 mg tolüene izin vermiştir (8). Avrupa İş Sağlığı ve Güvenliği Ajansı (The Occupational Safety and Health Administration - OSHA) iş yerlerinde 8 saatlik çalışma için 200 ppm'e kadar izin vermiştir. Üst sınırı ise 300 ppm olarak belirlemiştir (2, 8). EPA içme suyunda 20 ppm için 1 gün, 3 ppm için ise 10 günden fazla maruz kalınmamasını önermektedir (3). Havadaki tolüen miktarı, endüstri alanlarına yakın olmayan şehir merkezi ve yakın çevresinde 1 ppm'in altında bir değere sahiptir. Sigara içmeyen ve tolüen içeren ürünlerle ilgili bir işte çalışmayanların, günde yaklaşık 300 µg tolüene maruz kaldıkları tahmin edilmektedir. Günde bir paket sigara tüketenler ek olarak yaklaşık 1000 µg tolüene maruz kalırlar. Çalışma ortamında 50 ppm oranında tolüen bulunan bir iş yerinde çalışanlar ise yaklaşık olarak günde 1000 mg tolüene maruz kalırlar (6).

İnsanlarda 10.000 ile 30.000 ppm arasındaki tolüen maruziyetleri koma ve ölümle sonuçlanır (9). Hayvan deneylerinde tolüenin ortalama letal dozu (LD50) rat, fare, tavşan ve kobaylarda farklı oranlarda belirlenmiştir. Bizim de çalışmamızda kullandığımız sıçanlarda, oral LD50 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 farklı türlerden kaynaklanır (2).

1.1.4. Vücuda Alınımı, Dağılımı, Metabolizması ve Atılımı

Tolüenin en çok alınma şekli havada bulunan tolüen buharının solunum yoluyla inhale edilmesidir. Bunun dışında sindirim ve deri yoluyla da vücuda alınabilir (11). İnsanlarda tolüen, solunum yoluyla alındıktan 10 saniye sonra arter kanında tespit edilmiştir (9). Tolüen solunum yoluyla alındığında, 15 ile 30 dakika içinde, sindirim yoluyla alındığında ise 1-3 saat içerisinde kanda en yüksek seviyesine ulaşır. Sindirim yoluyla alınan tolüen, solunum yoluna nazaran daha yavaş bir şekilde absorbe edilir, ancak solunum yoluyla alındığında yaklaşık yarısı absorbe olurken sindirimle alınması durumunda tamamına yakını absorbe olur. Dinlenme durumunda alınan tolüenin yaklaşık %50'si akciğerler tarafından absorbe edilir (7, 11). Tolüenin deri yoluyla absorpsiyonu akciğerle olan absorpsiyonun yaklaşık olarak %1'i kadardır. Bununla birlikte sıvı halde deriyle temas olursa absorpsiyon miktarı da artar (9).

1.1.4.1. Dağılımı

Tolüen suda çok az çözünebilen aromatik bir hidrokarbondur. Absorpsiyonu takiben, tolüenin başlıca yağ ve yağdan zengin dokular ile iyi kanlanan dokular olmak üzere, tüm vücutta dağıldığı görülür (2, 7, 9). Absorbe edilen tolüen, sırasıyla azalan oranlarda yağ dokusu (beyaz ve kahverengi yağ dokusu), mide, karaciğer, böbrekler, kemik iliği, beyin ve dalakta tespit edilebilir. Tolüen alındıktan beş saat sonra beyaz yağ dokusunda en üst seviyesine ulaşır ki, bu seviye aynı zaman da kandaki oranın yaklaşık 250 katıdır (2). Tutkal soluyarak ölen kişilerin karaciğer ve beyinde yüksek oranda tolüene rastlanır. Yine sindirim yoluyla tolüen aldıktan kısa bir süre sonra ölen kişilerin karaciğerinde yüksek oranda tolüen bulunur (9). Aynı yoğunlukta tolüene maruz kalan egzersiz yapan kişilerin deri altı yağ dokularında dinlenme halindeki kişilere oranla 10 kat daha fazla tolüen birikir. Kilolu insanlarda yağ dokusu fazla olduğundan tolüen birikimi, kilosu düşük kişilere nazaran 5 kat daha fazladır (2).

1.1.4.2. Metabolizması

Büyük bir kısmı karaciğerde metabolize edilen tolüen, ilk önce karaciğerde bulunan sitokrom P-450 enzimi yardımı ile yan zincir hidroksilasyonu ile benzil

alkole dönüştürülür. Daha sonrada alkol dehidrojenaz enzimiyle benzaldehide ve aldehit dehidrojenaz enzimi tarafından da benzoik aside dönüştürülür. Benzoik asit glisinle konjuge olarak (birleşerek), tolüenin idrardaki nihai ve başlıca metaboliti olan hippürik aside dönüşür (8, 9). Buna ek olarak küçük bir miktar benzoik asit glisin yerine glukronik asit ile konjuge olarak benzoil glukronid olarak atılır. Tolüen %1 den daha az bir oranda da orto ya da para krezol formlarına hidroksillenip, glukronid ya da sülfat ile birleşerek, minor metabolik yol diye bilinen yol ile idrara gönderilir (2, 9, 12).

1.1.4.3 . Atılması

Vücuda alınan tolüenin yaklaşık %18'i akciğerlerden serbest tolüen olarak dış ortam havasına, %2'lik kısmı ise tolüen metabolitleri halinde safra yolu ile atılır. Yaklaşık %80'i ise sitokrom P-450 oksidaz (CYTP-450 oksidaz) enzim sistemi yardımıyla dönüştürülerek başlıca iki ana metabolit halinde idrarla atılır (7, 8, 13). Birincil metaboliti hippürik asit olan tolüenin ikincil metaboliti ise orto krezol dür. Burada karışıklıklara meydan verilmemesi için, orto krezol'ün sigara içen insanlarda da idrarda tespit edilebileceğinin bilinmesi gerekir (13). Hippürik asidin atılması, tolüen alınımından itibaren yaklaşık 24 saat sonra tamamlanır (9).

1.1.5. Toksik Etkileri ve Toksisite Belirtileri

Tolüen maruziyetinin oluşturduğu klinik tablo maruziyet miktarı ve süreyle ilişkili olarak değişir. Bağımlılığına sebep olan keyif verici etkisinin yanında, uzun süreli ve orta düzeyde maruz kalındığında baş ağrısı, yorgunluk, konfüzyon, halsizlik, dengesiz hareketler, hafıza zayıflığı, mide bulantısı ve iştahsızlık görülebilir. Çok kısa sürede yüksek miktarda tolüene maruz kalınması durumunda baş dönmesi hissedilir. Maruziyet uzarsa, sersemlik, uyuklama hissi ve hatta ölüm meydana gelebilir. Tolüenin 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 (4, 6, 7). Kronik maruziyetin sonucu olarak karaciğer, böbrek ve sinir sisteminde hasar oluşabileceği gibi deride de kontak dermatit meydana gelebilir (5). 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 (14).

1.1.5.1. Karaciğer Üzerine Toksik Etkileri

Tolüenin karaciğer üzerine toksik etkilerini gösterir birçok çalışma bulunmaktadır (15-17). Tolüen içeren maddelere maruziyet sonrasında olumsuz yönde değişen karaciğer fonksiyon testlerinin yanı sıra (15, 17, 18), antioksidan enzimlerde azalma (19), karaciğerde büyüme, hepatik parankimde ekojenite artışı tespit edilmiş, makroveziküler ve mikroveziküler dejenerasyonun yanı sıra hepatosit nekrozu ve balon dejenerasyonu gözlenmiştir (20). Tolüen karaciğerde yıkıldığı için karaciğer hastalığı olan kişiler tolüene karşı daha duyarlıdır. Özellikle salisilat ve alkol gibi maddeler tolüen metabolizmasını kompetitif olarak inhibe ettiklerinden dolayı alkol ya da karaciğerde metabolize olan ilaçları kullanan kişiler tolüenden daha fazla zarar görürler (1). Yine yüksek miktarda tolüene maruz kalan madde bağımlılarında (tiner ve yapıştırıcı soluyanlar), şiddetli karaciğer hasarı olduğunu gösterir çalışmalar mevcuttur. Organik solventlere düşük dozda ve kronik maruziyetin siroza yol açabileceğini gösterir çalışmalar da bulunmaktadır (7).

1.1.5.2. Sinir Sistemi Üzerine Toksik Etkileri

Tolüen lipofilik özelliğinden dolayı hücre duvarındaki lipid yapısını değiştirir ve proteinlerle etkileşime girer. Akut dozlarda Na/K-ATPaz aktivitesini önemli oranda artırarak membran akışkanlığını artırır (21). Oluşturduğu bozuklukların oranıyla doz cevap ilişkisi tam olarak belirlenememiştir. Tolüene 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 (11, 22, 23). Tolüen bu etkileri gabaerjik, glutamaterjik, serotonerjik, dopaminerjik yolları etkileyerek yapar (24, 25). Tolüen, cerebellum ve hippocampus'da apoptotik nörodejenerasyona yol açar (26). Ayrıca serebellar, piramidal bozukluklar, periferik nöropati, optik atrofi, sinirsel işitme kaybı, bilişsel fonksiyonları da içeren geçici ve kalıcı hasarlara

da yol açar (11, 22). Kronik tolüen bağımlılarının MRI görüntülemelerinde beyaz cevher atrofisi ve bununla ilişkili olarak klinik bulgular vardır (27). Ayrıca tolüen periferik sinirlerde de hasara yol açar (22, 28).

1.1.5.3. Göz ve Deri Üzerine Toksik Etkileri

Tolüen yağda çözünebilir olduğundan, deride irritasyon ve hasara sebep olabilir. Tolüen bazlı maddelere maruz kalan insanlarda bu hasarlar görülür. 750 mg/m³ ve üzeri konsantrasyonda tolüene maruz kalan insanlarda gözde irritasyon oluşurken, 1500 mg/m³ ve üzeri bir oranda ise lakrimasyona sebep olur. Direkt kornea ile temas ettiğinde ise korneada hasar meydana gelir (5).

1.1.5.4. Teratojenik Etkileri

Tolüen bağımlısı annelerin değerlendirilmesiyle tolüen embriyo-patolojisi literatürde tanımlanmıştır. Tolüen bağımlısı annelerin çocuklarında; embriyolojik dönemde intrauterin gelişme geriliği, mikrosefalik ve dismorfik özellikler (kısa palpebral yarı, derin yerleşimli göz, küçük yüz, düşük kulak, mikrognat, spatula şeklinde parmaklar ve kısa tırnak) tespit edilmiştir. Yaşla birlikte; gelişme geriliği, lisan problemi ve serebellar disfonksiyon gibi gelişimsel gerilikler görülür (10). Prenatal tolüen maruziyetini gösteren birçok hayvansal çalışma yapılmıştır. Bunların birçoğunda gelişme geriliği ve iskelet anomalileri saptanmıştır (10, 25).

1.1.6. Kanserojenik Etkileri

Tolüene maruz kalmış insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda tolüenin kansere neden olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca Uluslararası Kanser 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) tolüeni kanserojenik maddeler arasında saymamaktadır. Ayrıca tolüenin kanserojenik etkilerini değerlendirecek yeterli çalışma bulunmamaktadır (29).

1.1.7. Tolüenin Toksik Etkilerini Artıran Faktörler

Tolüen karaciğerde metabolize edildiği için karaciğer hastalığı olan kişiler tolüenin akut etkilerine daha duyarlıdır. Daha önceden nörolojik ve kalp rahatsızlığı olanlar da daha fazla risk altındadırlar. Salisilat ve alkol, kompetitif olarak tolüenin yıkımını durdurdukları için tolüenin toksik etkilerini artırır (1).

1.1.8. Tolüenin Kötüye Kullanımı

Atmosferde belli bir oranda tolüenin bulunması herkesin tolüene maruz kaldığının bir göstergesi olmakla birlikte, mesleği gereği bu toksik maddeye daha yoğun bir şekilde maruz kalanların sayısı azımsanmayacak kadar çoktur. Bununla birlikte madde kötüye kullanımında tolüenin yeri oldukça önemlidir. Tolüen ve benzeri uçucuların kötüye kullanımı Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerin yanı sıra daha az gelişmiş ülkelerde de önemli bir problemdir (24, 30). 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 (14). Bazı kullanıcıların erişkin dönemlerinde de uçucu madde kullanmaya devam ettikleri görülür (31). Tolüen bağımlılarında paranoid psikoz, parkinsonizm, bilişsel bozukluklar (kognitif hasarlanma) ve serebeller bozukluklar gibi nörolojik ve psikiyatrik birçok rahatsızlıklar ortaya çıkar (10). Yapılan araştırmalar uçucu madde bağımlılarının %90 oranında tolüen, %5 oranında klorlu hidrokarbonlar, %3 oranında bütan ve %2 oranında diğer uçucu maddeleri kullandıklarını göstermiştir (11). Ucuz ve kolay bulunabilir olduğundan dolayı tolüen bağımlılarının tercihi sıklıkla tutkal (20) ve tinerdir (19). İstem dışı maruziyet ise iş dolayısıyla olmaktadır ki en fazla kaporta işçileri, boyacılar (16), ayakkabı işçileri (17, 32), matbaa işçilerinde (33) görülür.

1.2. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimine sahip atom veya moleküllere *serbest*

radikal adı verilir (11, 34). Moleküler oksijen insan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan girerek dokularda çok fazla kullanılma özelliğine sahiptir. Yapısı itibariyle de radikal olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri, ya da reaktif oksijen türleri (ROS) akla gelir (34). Serbest oksijen radikalleri hidroksil ($\text{OH}^\cdot$), süperoksit ($\text{O}_2^\cdot$), nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonları gibi oksijen gerektiren durumlarda ROS oluşur (35, 36). Bunların dışında bazı küçük moleküllerin oto-oksidasyonu (tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, antibiyotikler gibi), ROS oluşumuna katkıda bulunur. Ayrıca kişilerin maruz kaldığı; stres, radyasyon, antineoplastik ajanlar, bağışıklığı artırıcı bazı maddeler, hiperoksi, pestisitler, anestetik maddeler, sigara dumanı ve *aromatik hidrokarbonlar* gibi bazı eksojen ajanlar da vücutta ROS oluşumuna sebep olur (34). Bir aromatik hidrokarbon olan tolüenin de oksidatif stres oluşturarak dokularda hasara yol açtığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (11, 20, 22, 28, 32, 33, 37).

Serbest radikallerin artması veya antioksidan enzimlerin azalmasıyla, serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucu oksidatif stres ve oksidatif hasar oluşur. Oksidatif stresin ve oksidatif hasarın enflamasyon, yaşlanma, ateroskleroz, iskemik hasar, karsinogenez gibi birçok hastalığın oluşması ve ilerlemesinde rolü vardır (38, 39). Oksijen, süperoksit radikali ($\text{O}_2^\cdot$) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece toksik olan ve hücre hasarına yol açan $\text{O}_2^\cdot$, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz (CAT), peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (36, 38).

Lipit peroksidasyonun en önemli ürünü olan malondialdehit (MDA), üç 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

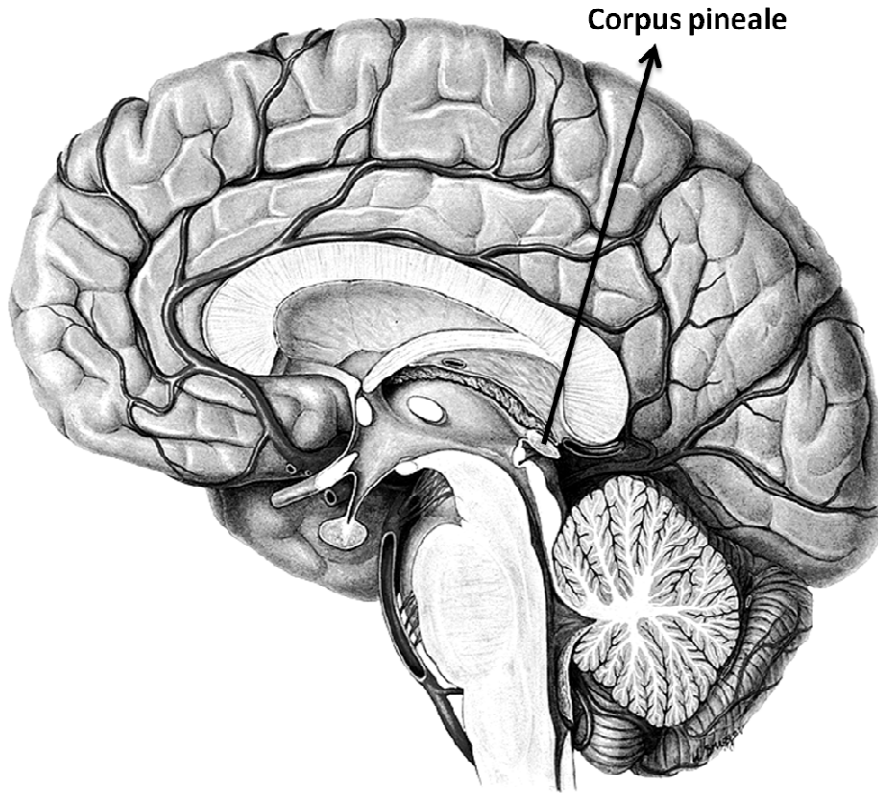
aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girdiğinden mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (40).

Günümüzde oksidatif stresin apoptozisi başlatan 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 (35, 41).

1.3. Melatonin

1.3.1. Pineal Bez

Pineal bez (epiphysis cerebri, corpus pineale, glandula pinealis), insanda colliculus superiorlar, pulvinar thalami ve splenium corporis callosi arasına yerleşmiş 5-8 mm uzunluğunda, 3-5 mm genişliğinde ve 120-150 mg ağırlığında küçük koni şeklinde nöroendokrin bir organdır (42, 43) (Şekil 2).



Şekil 2. Pineal bezin anatomik konumu (44).

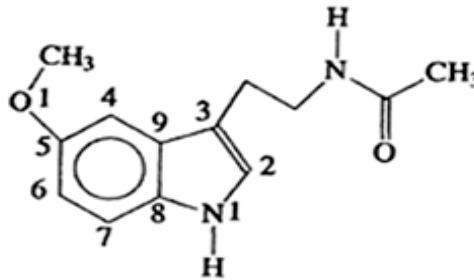
İnsan pineal bezi arteria cerebri posterior'dan ayrılan a. choroidea posterior'un ince dalları aracılığı ile beslenir. Pineal bez, böbrekten sonra ikinci en fazla kanlanan organdır. Venöz drenajı Galen venine boşalan küçük venler aracılığı ile sağlanır. Kapiller yapısı ayrışık yapılanma gösterir ve kan beyin bariyeri yoktur (45).

Pineal bez parankimasında pinealositler ve glial hücreler olmak üzere iki tip hücre yer alır. Pinealositler parankim hücrelerinin çoğunluğunu oluşturur. Nöroendokrin fonksiyona sahip olan bu hücrelerden, melatonin, serotonin ve bazı pineal peptidler salgılanır. Daha az sayıda olan glial hücreler ise parankimada bulunan destekleyici hücrelerdir (42, 46, 47).

Pineal bezin endokrin aktivitesi diğer endokrin organlardan farklı olarak sinirsel innervasyona bağlıdır. Işık ve karanlık, pineal bezden melatonin salgılanmasının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Genel olarak ışık melatonin yapımını azaltır, karanlık ise artırır (47, 48).

1.3.2. Melatonin Genel Bilgiler

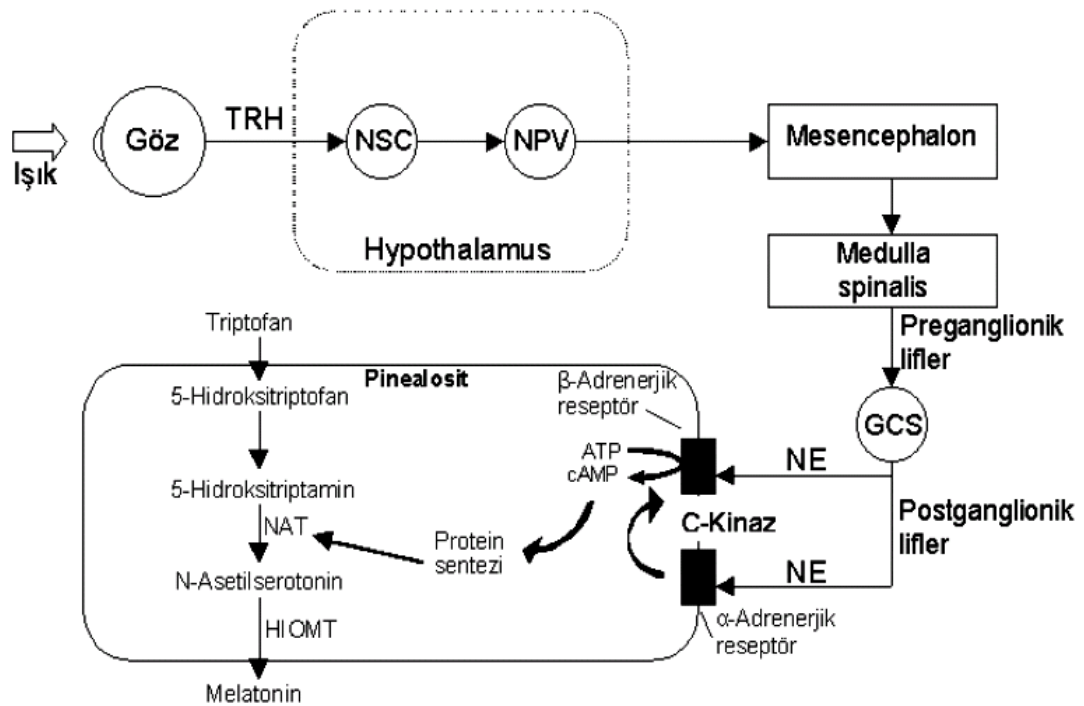
Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) (49) (Şekil 3), nöroendokrin bir organ olan pineal bezden, sirkadiyen ritimde ve karanlıkta salgılanan bir hormondur (50, 51). Melatoninin pineal bezden başka, retina, bağırsak gibi organlardan da sentezlenir. Pineal bez dışında üretilen melatonin miktarı çok düşük bir oranda olduğu için kan melatonin seviyesine etki etmez (45, 52). 232 molekül ağırlığına sahip melatonin bir indol türevidir (43, 45, 53). Yağda ve suda çözünebilen melatonin, güçlü bir antioksidan olma özelliğinin yanı sıra, daha birçok fonksiyona sahip bir hormondur (51, 52, 54).



Şekil 3. Melatoninin kimyasal yapısı (49)

1.3.3. Melatonin Sentezi

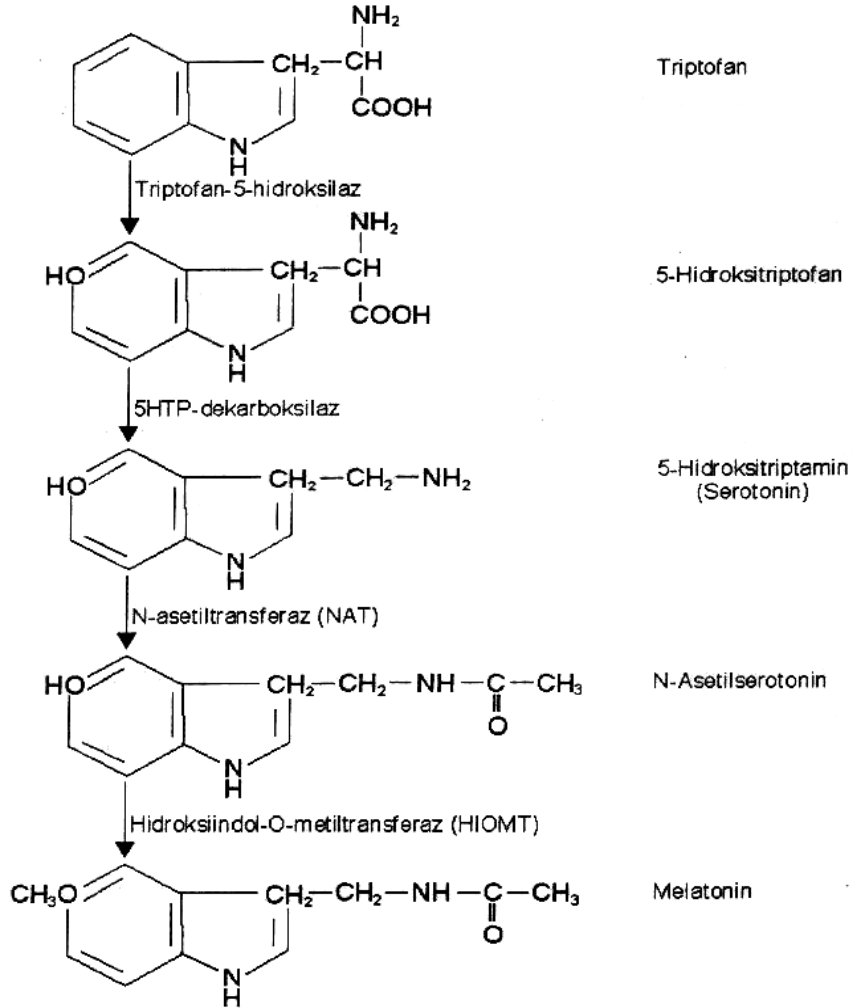
Melatonin pineal bez parankimasında bulunan nöroendokrin fonksiyona sahip hücreler olan pinealositler tarafından salgılanır (42, 46, 47). Melatoninin sentezi ve salınması karanlıkta artarken aydınlıkta azalır. Melatoninin bu kontrolü, glandula pinealis'in parankiması içerisindeki post ganglionik sempatik sinir uçlarında salınan en önemli nörotransmitter olan norepinefrin sayesinde gerçekleşir (55). Işık nucleus suprachiasmaticus'u uyarır. Uyarılan nucleus suprachiasmaticus'tan gün boyunca norepinefrin salınımı olmaz. Karanlıkta ise bu mekanizma devre dışı kaldığı için norepinefrin salınımı başlar. Norepinefrin, pinealosit membranındaki β -adrenerjik reseptörler üzerinden adenilat siklazı aktive ederek cAMP'yi dolayısıyla da melatonin yapımını artırır (43, 56) (Şekil 4).



Şekil 4. Melatonin biyosentezi kontrol mekanizması (43). TRH: Tractus retinohypothalamicus, NCS: Nucleus suprachiasmaticus, NPV: Nucleus paraventricularis, GCS: Ganglion cervicale superior.

Melatonin, serotoninin N-asetilasyonu sonucu meydana gelmektedir. Sentezin ilk aşamasında hücre içerisindeki triptofan, triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofan'a, 5-hidroksitriptofan ise L-aromatik aminoasit dekarboksilaz

(dopa dekarboksilaz) aracılığıyla 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) dönüştürülür. Serotonin de N-asetiltransferaz ile N-asetilserotonin'e ve son olarak N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz enzimi tarafından melatonine dönüştürülür (43, 55, 57) (Şekil 5). Melatonin sentezinde görev alan N-asetiltransferaz enzim miktarı karanlıkta, 15-30 kat kadar artar (55).



Şekil 5. Melatonin sentezi (58).

1.3.4. İnsanda Melatonin Üretimi

İnsanlarda melatonin düzeyi gün içerisinde değişiklik gösterir. Karanlığın ilk saatlerinde başlayan hormon sekresyonu, gece yarısı pik yapar (58). Yetişkinlerde ortalama plazma melatonin seviyesi 60-70 pg/ml dir. Melatoninin başlıca metaboliti olan 6-hidroksi melatonin sülfatın (6-HMS)' en yüksek konsantrasyonu ise 80-100

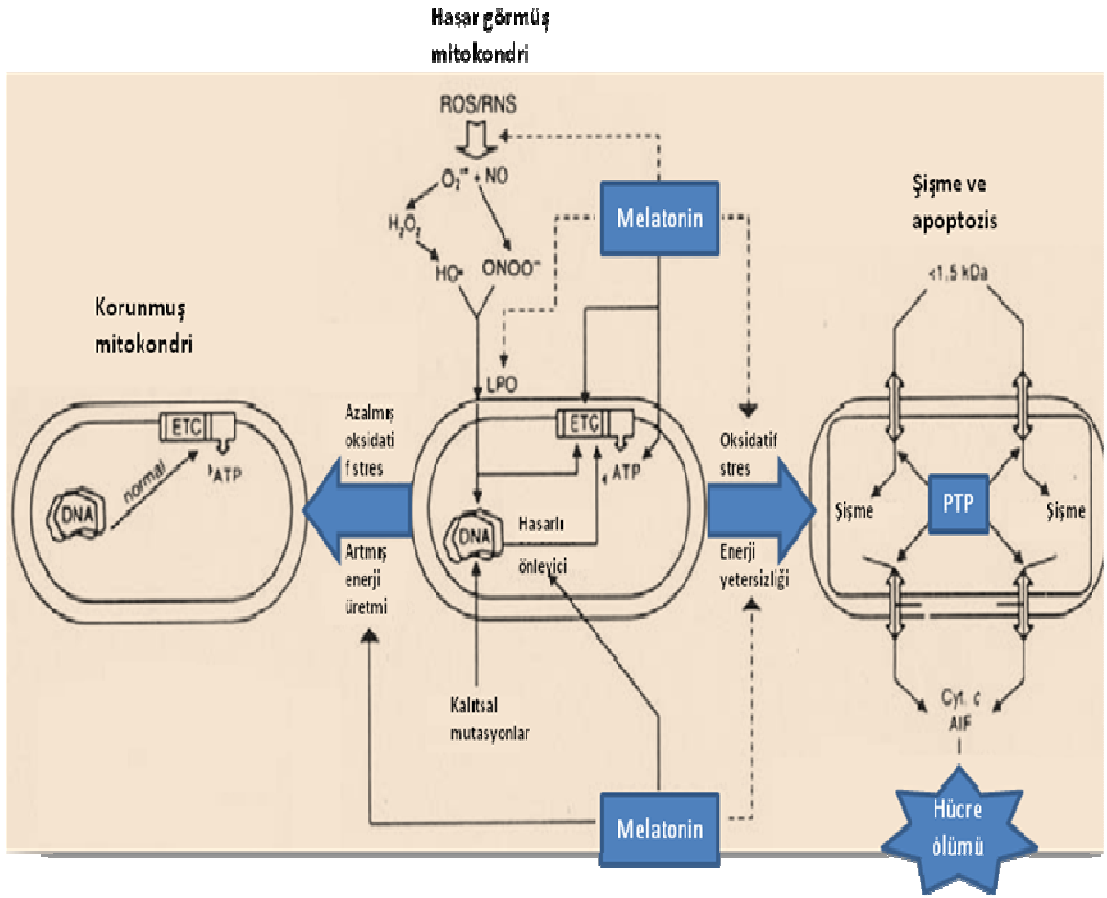
pg/ml'dir. 6-HMS'nin %70-80'i gece idrarında atılır. Melatonin ritminin en karakteristik özelliği, normal bireylerde günlük ve haftalık olarak tekrarlanabilir olmasıdır. Birey içerisinde değişmezliğe rağmen bireyler arasında ritmin amplitüdü açısından çok büyük bir değişiklik vardır (54). Cushing sendromu gibi bazı endokrinopatilerde bu ritmin kaybolması, melatoninin hormonal aktivitedeki önemi gösterir. Klinefelter sendromu, Turner sendromu, psoriasis vulgaris, myelomeningosel ve sarkoidoz gibi birçok hastalıkta melatoninin hem ritmi hem de salınım miktarı bozulur (58).

1.3.5. Melatonin Metabolizması

Melatonin hidroksilasyonla (6-hidroksimelatonin'e) karaciğerde hızlı bir şekilde metabolize edilir (58). Başlıca metaboliti, 6-HMS dir. İnsanlarda eksojen melatoninin kısa bir metabolik yarı ömrü (20-60 dk.) ve büyük bir hepatik geçiş etkisi vardır. Yapılan çalışmalarda melatonin verilen deneklerde serum ile tükürük değerlerinin kişiler arasında farklılık gösterdiği bu yüzden de melatonin kullanılırken dikkatli olunması gerektiği vurgulanmıştır (54).

1.3.6. Melatoninin Antioksidan Etkileri ve Mekanizması

Melatonin hem yağda hem de suda çözünabilir özelliğe sahip olduğu için, çekirdek dahil hücrenin her kısmına kolaylıkla ulaşabilir. Bu özellik, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlar. Bunun yanı sıra melatonin kan-beyin bariyerini de kolaylıkla geçer ve bu özelliğiyle beyin dokularında da antioksidan etkiye sahip bir hormon niteliğini taşır (51). Yapılan deneysel çalışmalar, melatoninin doğrudan serbest radikal giderici olduğunu, dolaylı olarak ise antioksidan enzimleri stimüle ederek antioksidan etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Melatonin hücre içi antioksidan olan glutatyon sentezini stimüle ederken, nitrik oksit (NO) sentezini ise inhibe eder. Antioksidan enzimlerin etkinliklerini artırma kabiliyetine sahip olan melatonin, antioksidan enzimleri oksidatif strese de korur. Mitokondrideki elektron transport zincirinden elektron sızıntısını önleyen melatonin, serbest radikal üretimini azaltarak zincirin etkinliğini de artırır. Melatonin hücre membranını oksidatif saldırılara karşı daha dayanıklı hale getirirken nükleer DNA'yı da oksidatif hasardan korur (48, 49, 59) (Şekil 6).



Şekil 6. Melatonin antioksidan etkisi (49).

Düşük dozda verilen melatoninin, antioksidan özelliğinden dolayı yaşlanmaya karşı organları koruduğu, antioksidan enzimlerin düzeylerini artırdığı bildirilmiştir (60). Dışarıdan verilen melatonin en az fizyolojik melatonin kadar etkili olduğu ve beyin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (61). Yine melatoninin, formaldehit (62), karbon tetraklorür (CCl_4) (63-65), yüksek oranda tolüen ihtiva eden tiner (19, 20, 23), tutkal (20) gibi toksik maddelerin çeşitli doku ve organlarda oksidatif stres yoluyla oluşturduğu hasarı azalttığı belirlenmiştir.

1.3.7. Melatoninin Genel Etkileri

Melatonin hem dişi hem de erkek gonadları üzerinde direkt (üreme organları üzerindeki melatonin reseptörleri yoluyla) ve dolaylı (Luteinize edici hormon salınmasını önleyerek) inhibitör etkiye sahiptir (66). Yapılan deneysel çalışmalarda

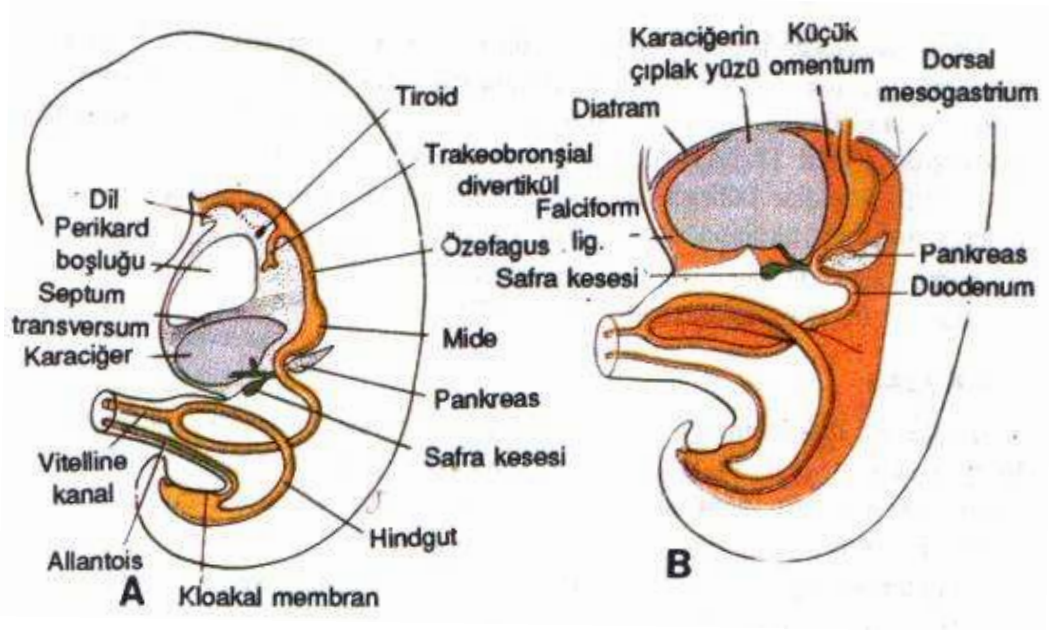
melatonin hormonunun, uterus yapı ve fonksiyonları üzerine etkilerinin olduğu bildirilmiştir (50). Pineal bezleri çıkarılmış sıçanlarda, melatonin hormonunun azalması ile birlikte antigonadal aktivitedeki gerilemeye bağlı endometrial hiperplazi belirlenmiştir (53). Pinealektomi sonrası Leydig hücrelerinde salınımı artan testosteronun melatonin idamesiyle geriye döndürüldüğü gösterilmiştir (67). Uzun süreli uçuşlarda, uçuştan önce başlanılan melatoninin jet-lag ve yorgunluğu hafiflettiği gösterilmiştir (68). Artmış oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi birçok nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Yaşlı insanlarda melatonin seviyesinin normalden düşük olduğu ve melatonin tedavisiyle hastaların birçok belirti ve bulgularında azalma olduğu gösterilmiştir (69). Bunun yanında sağlıklı kişilerde yaşla ilgili uyku problemlerinde kayda değer bir düzelme yapmadığı bildirilmiştir (70).

1.4. Karaciğer

Sindirim sistemiyle kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturan karaciğer (71) birçok maddeyi sentezleme, detoksifiye etme ve vücuttan atma özelliğine sahip egzokrin ve endokrin bir bezdir (72).

1.4.1. Karaciğer Embriyolojisi

Karaciğer, safra kesesi ve safra yolları, embriyolojik yaşamın 4. haftasında, ön bağırsağın kaudal kısmından, ventral dışa doğru bir çıkıntı olarak gelişir. Karaciğer tomurcuğu olarak nitelenebilen bu çıkıntı, gelişen kalp ile orta bağırsak arasındaki splanknik mezoderm kitlesine, septum transversuma doğru uzanır. Septum transversum, diyaframın bir kısmını ve buradaki, ventral mezenteriy yapar (73) (Şekil 7).



Şekil 7. Karaciğerin embriyolojik gelişimi (73).

Karaciğer tomurcuğu, ventral mezenter yaprakları arasında büyürken iki kısma ayrılır. Kranial de yer alan daha büyük parçası karaciğer taslağıdır. Çoğalan endoderm hücreleri, karaciğer hücre kordonları ağını ve safra sistemi intrahepatik kısmının epitelyum örtüsünü meydana getirir. Karaciğerin fibröz ve hematopoietik dokuları ve Kupffer hücreleri, septum transversumdaki mezenşim den köken alırlar. Karaciğer 5. haftadan 10. haftaya kadar çok hızlı büyür ve karın boşluğunun büyük bir kısmını doldurur. Oksijenden zengin kan miktarının, göbek veninden karaciğere akması, karaciğerin geliştiğini ve işlevsel olarak bölündüğünü gösterir. Başlangıçta sağ ve sol loblar aynı büyüklükte iken sağ lob kısa bir süre sonra daha büyük hale gelir (74).

Hematopoezin karaciğere parlak kırmızı bir renk vermesi 6. haftada gerçekleşirken, safra üretimi 12. haftadan itibaren başlar. Bu sırada safra kesesi ve sistik kanal da oluşmuş, sistik kanal hepatik kanalla birleşerek koledok kanalını meydana getirmiş ve üretilen safra bağırsağa akabilme imkânını bulmuş olur. 9. haftada karaciğer toplam fetüs ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturur. Doğumda karaciğer ağırlığı toplam vücut ağırlığının yaklaşık %5'i kadardır (73, 74).

1.4.2. Karaciğerin Anatomisi

Vücudun en büyük bezi ve organı olan karaciğer, karın boşluğunun üst tarafında, regio hypochondriaca dextra'nın tümünü, regio epigastrica'nın büyük bir kısmını doldurur. Regio hypochondriaca sinistra'da ise, linea medioclavicularis sinistra'ya kadar uzanır. 25-30 cm uzunluğunda olan karaciğerin sağ tarafı ön-arka yönde 14-16 cm, yüksekliği ise 8 cm kadardır. Erkeklerde 1400 ile 1800 gr, kadınlarda ise 1200 ile 1400 gr ağırlığında olan karaciğer, ortalama 1000 ile 2500 gr arasında değişebilir. Fetüste karaciğerin vücut ağırlığına oranı, erişkinlerdekinden daha fazladır. Erişkinde vücut ağırlığının %2'si, yeni doğanlarda ise %5'i kadardır. Bu nedenle çocukların karnı biraz daha şiş görünür. Kırmızımtırak kahverenginde olan karaciğer, sağlam ve elastiki olmasına rağmen, gevrek ve kolaylıkla parçalanabilen bir yapıya sahiptir. Çok damarlı olması nedeniyle, yaralanmaları büyük kanamalara yol açar (71, 75).

1.4.2.1. Karaciğerin Lobları

Karaciğer 4 lobdan oluşur;

1. *Lobus hepatis dexter*: Altında safra kesesi bulunan en büyük kısımdır. Regio hypochondriaca dextra'da bulunur.
2. *Lobus hepatis sinister*: Karaciğerin ikinci büyük parçası olan bu kısım regio hypochondriaca sinistra ve regio epigastrica'da bulunur.
3. *Lobus caudatus*: Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in arka tarafında bulunur.
4. *Lobus quadratus*: Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in ön tarafında bulunur (71, 76) (Şekil 8).

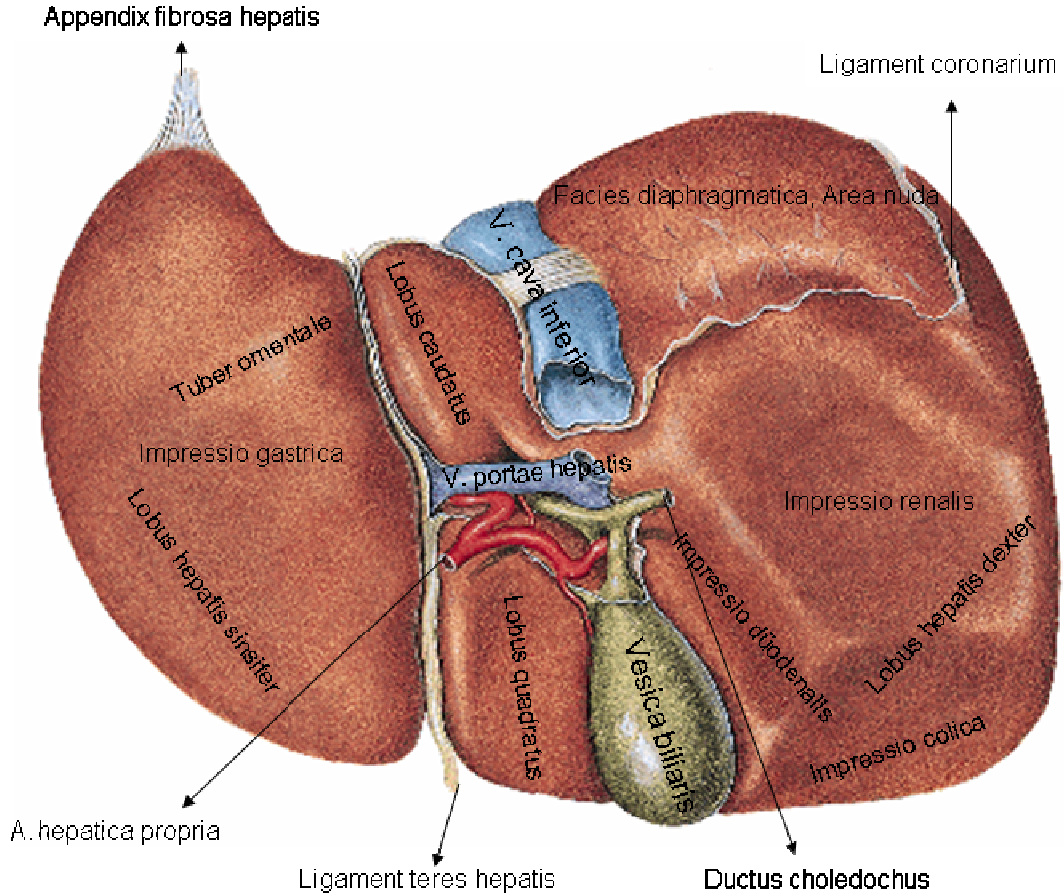
1.4.2.1. Karaciğerin Yüzleri

1.4.2.1.1. Facies Diaphragmatica

Büyük olan bu yüz, kubbe şeklinde olup diafragmanın alt yüzüne uyar. Baktığı yönler göre; pars superior, pars anterior, pars posterior ve pars dextra olmak üzere bölümlere ayrılır.

1.4.2.1.2 . Facies Visceralis

Karaciğerin karın organları ile komşu alt yüzüdür. Burada komşu olduğu organların izleri görülür (Şekil 8). Bu yüzün ortalarında porta hepatis denilen bir geçit bulunur (71, 77).



Şekil 8. Karaciğer alttan görünümü (44).

1.4.2.2 . Karaciğerin Kenarları ve Projeksiyonu

Karaciğerin konumu vücut yapısına, pozisyona ve solunum durumuna göre değişir. İnspirasyonda 3 cm aşağı inen karaciğer ekspirasyonda 3 cm yukarı çıkar. Ayakta iken biraz aşağı iner, yatar pozisyonda ise biraz yukarı çıkar. Yaşlılarda ise biraz aşağıya inmiştir.

Karaciğerin arka ve alt olmak üzere iki kenarı vardır. Arka kenarı facies visceralis ile facies diaphragmatica arasında arka tarafta oluşan kenardır. Tam bir kenara benzememesi nedeniyle bazı kaynaklarda bu kenardan bahsedilmez ve

Nomina Anatomica’da da isim verilmemiştir. Alt kenar (margo inferior), facies visceralis ile facies diaphragmatica arasında ön, kısmen de yan tarafta oluşan kenardır (71, 75).

1.4.2.3 . Karaciğeri Yerinde Tutan Faktörler

- 1) İntraabdominal pozitif basınç,
- 2) Periton bağları,
- 3) Altta bulunan karın içi organlarının appozisyon durumu,
- 4) V. cava inferior,
- 5) Pars affixa (75).

1.4.2.4 . Karaciğerin Damar ve Sinirleri

Karaciğere iki kaynaktan kan gelir.

- a) V. portae hepatis (%70),
- b) A. hepatica propria (%30).

V. lienalis ile v. mesenterica superior’un L2 seviyesinde pankreas başı arkasında birleşmesi ile oluşan v. portae hepatis, gastrointestinal sistemin abdominopelvik bölümünden aldığı oksijenden fakir kanı, a. hepatica communis’in bir dalı olan a. hepatica propria ise aorta’dan aldığı oksijenden zengin kanı karaciğere taşır. A. hepatica propria ve v. porta hepatis, porta hepatis’de ya da yakınında, karaciğerin sağ ve sol loblarına gitmek üzere uç dallarına ayrılır (Şekil 8). A. hepatica ve v. porta hepatis, karaciğer içerisinde birlikte dallanarak karaciğer segmentasyonuna uyarlar. Segmentler arasında uzanan v. hepatica’lar ise bu segmentasyona uymazlar. Karaciğerin v. centralis’lerinin birleşmesiyle oluşan v. hepatica’lar diaphragmanın hemen altında v. cava inferior’a açılırlar (77).

Karaciğer lenf üreten büyük bir organ olup, ductus thoracicus’a gelen lenfa’nın 1/4-1/2’si arasındaki kısmı karaciğerden gelir. Karaciğerin lenf damarları yüzeysel ve derin olmak üzere iki yerde bulunur. Karaciğerin her iki yüzünün ön bölümünün lenf damarları, nodi lymphatici coeliaci’ye oradanda cisterna chyli’ye drene olur. Her iki yüzünün arka bölümlerinin lenf drenajı ise nodi lymphatici phrenici’ye ya da nodi lymphatici mediastinales posteriores’e drene olurlar (78).

Karaciğerin innervasyonu, plexus coeliacus'dan orijin alan sempatik ve parasempatik liflerle sağlanır. Safra kesesi ise mideden duodenum'a yağlı besinlerin geçişi sırasında, duodenum mukozasında üretilen kolesistokinin hormonun etkisiyle kasılır (79).

1.4.3. Karaciğerin Histolojisi

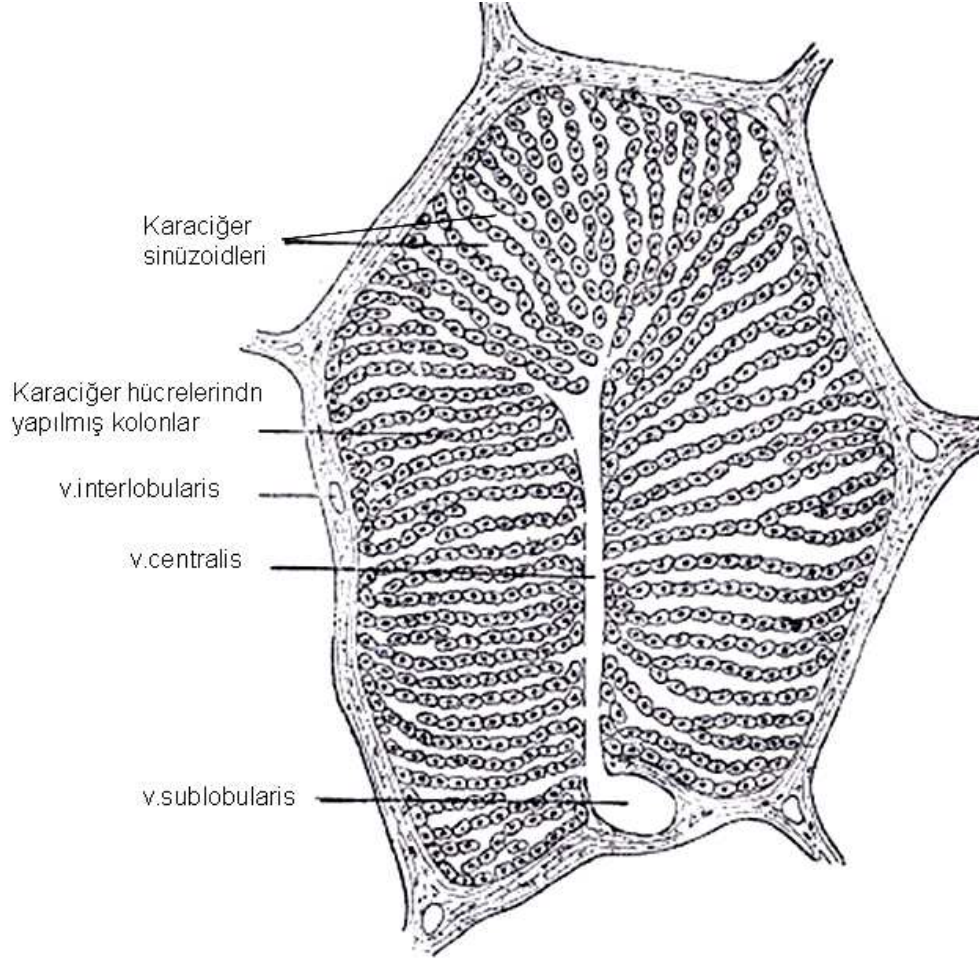
Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı bir organdır. Bu yüzden sindirim sistemi ile kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturur. İnce bağırsaklarda emilen maddelerin çoğu v. porta yoluyla karaciğere ulaşır, sadece kompleks lipitler (şilomikronlar) lenf damarlarıyla taşınır (80-83).

Karaciğer, kollajen ve elastik lif içeren bir kapsül (Glisson kapsülü) ile çevrelenmiş olup, periton ile kaplıdır (80). Porta hepatis'te, organa portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik kanallar çıkar. Bu damarlar ve kanallar, klasik karaciğer lobülleri arasında sonlandıkları portal alanlara kadar bağ dokusu ile çevrilmiştir. Bu noktadan itibaren karaciğer lobüllerindeki hepatositlere ve sinüzoidal endotel hücrelerine destek sağlayan ince bir retiküler lif ağı bulunur (81).

1.4.3.1. Karaciğerin Lobüler Yapısı

Karaciğerde fonksiyonel ve yapısal birim karaciğer lobülüdür. Klasik karaciğer lobülü genelde altıgen olarak tarif edilen, kan sinüzoidlerinin birleştiği merkezi bir venül içeren çok yüzlü bir yapıdır (76) (Şekil 9).

Lobüller birbirleriyle yakın temasta oldukları için, kesin sınırı belirlemek oldukça güçtür. Lobüller safra kanalları, lenfatikler, sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusuyla sınırlanmış bölgelere *portal alanlar* denilmektedir. Portal alanlar, lobüllerin köşelerinde bulunur ve *portal triadları* içerir. Her bir portal triadda bir ven (portal venin dalı), bir arter (hepatik arterin dalı), bir kanal (safra kanalının bir parçası) ve lenfatik damarlar bulunur. Bu yapıların hepsi bir bağ dokusu kılıfı içerisinde. İnsan karaciğerinde her lobülde 3-6 portal triad bulunur (81).

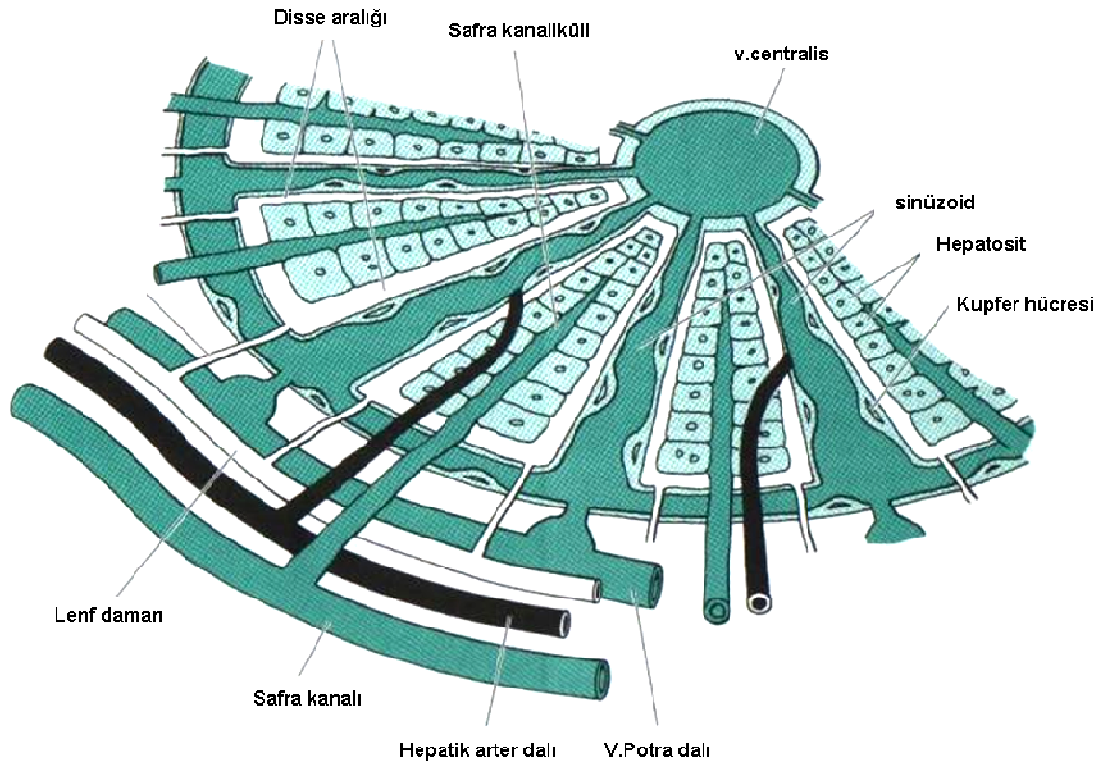


Şekil 9. Bir karaciğer lobülünün görünümü (76).

1.4.3.2. Hepatosit

Bir hepatik lobülün fonksiyonel olan ekzokrin ve endokrin hücresidir. Hepatositler, karaciğer lobülü içinde ınsal olarak dizilmişlerdir. Hücreler bir duvarın tuğlalarına benzer bir şekilde bir ya da iki hücre kalınlığında bir tabaka oluştururlar. Bu hücre plakları, lobülün periferinden merkezine doğru yönelenerek dolambaç şeklinde sünger benzeri bir yapı oluşturacak biçimde serbestçe ağızlaşırlar. Bu plaklar arasındaki boşlukta kapillerler bulunur ki bunlara karaciğer sinüzoidleri denilir (Şekil 10). Bir hepatositin bazolateral ve apikal olmak üzere iki adet hücresel bölgesi bulunur. *Bazolateral bölge* çok sayıda mikrovillus içerir ve yüzü *Disse aralığına* doğrudur. Bu bölge kandan kaynaklanan maddelerin emilmesine ve plazma proteinlerinin salgılanmasına katkıda bulunur. *Apikal bölge* ise mikrovilluslarla çevrelenmiş bir girinti şeklinde olup safra kanalikülünün kenarını çevreler. Hepatosit

içerisinde granüllü endoplazmik retikulum ve düz endoplazmik retikulumlar bulunmaktadır. Granüllü endoplazmik retikulumlarda plazma proteinleri sentezlenirken, düz endoplazmik retikulumlarda ise; kolesterol ve safra tuzlarının sentezi, bilirubin, steroid ve ilaçların glükronid ile konjugasyonu, glikojenin glikoza yıkımı, serbest yağ asitlerinin trigliseritlere esterleşmesi, glikojen, lipit sentezi ve detoksifikasyon gibi birçok karmaşık olay meydana gelir. *Sinüzoidal kapillerler* sadece kesintili bir pencereci endotel tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarlardır. Yaklaşık olarak 100 nm çapında olan pencereler eleğe benzer görünümde kümeler halinde toplanmışlardır. Endotel hücreleri ile hepatositler arasında bulunan subendotelyal boşluğa *Disse aralığı* denir. Disse aralığında hepatositlerin mikrovillusları bulunur. Kan endotel duvarından kolayca geçerek hepatosit yüzeyi ile temas eder ve sinüzoid lümeniyle karaciğer hücreleri arasında makro moleküllerin alışverişi kolaylıkla sağlanır. Endotel hücrelerinin yanında, sinüzoidler mono nükleer fagositik serinin fagositik hücreleri olan Kupffer hücrelerini de içerir. *Kupffer hücreleri* tipik makrofajlardır ve endotel hücrelerinin lümene bakan yüzeyinde bulunur. Yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek ve immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamak Kupffer hücrelerinin başlıca görevleridir. Yağ depolayıcı hücreler olan *Ito hücreleri* ise Disse aralığına yerleşmiş yıldız hücrelerdir. Bu hücreler dışarıdan verilen A vitaminini lipit damlaları içinde retinil esterler halinde biriktirme kapasitesine sahiptir ancak A vitamini metabolizmasındaki rolü tam olarak bilinmemektedir. (73, 74).



Şekil 10. Hepatik lobülün yapısı ve karaciğer hücresi (84).

1.4.4. Karaciğerin Fonksiyonları

- Karaciğer genişleyebilen bir organ olduğu için, kendi kan damarlarında büyük miktarlarda kan depolanması,
- Hepatik venöz sinüslerde yer alan büyük fagositik makrofajlar olan *Kupffer* hücreleri aracılığıyla kanın temizlenmesi,
- Büyük miktarlarda glikojen depolama, galaktoz ve fruktozu glikoza çevirme (glikoneojenez), karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden birçok önemli kimyasal maddelerin oluşturulması,
- Enerji sağlamak üzere yağ asitlerinin oksidasyonu, büyük miktarda kolesterol, fosfolipid ve lipoprotein sentezi, karbonhidrat ve proteinlerden yağ sentezi,
- Aminoasitlerin deaminasyonu, üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması, plazma proteinlerinin oluşumu, vücuttaki metabolik olaylar için önemli aminoasitlerin ve öteki maddelerin birbirine dönüştürülmesi (82),
- B12, A, D, E ve K vitaminlerinin depolanması,
- Safra asitlerinin yapılması (83),

- Faktör VIII ve Von Willebrand faktör haricindeki bütün pıhtılaşma faktörlerinin karaciğer aracılığıyla sentezlenmesi,
- Kandaki hemoglobinde bulunan demir dışında, demirin büyük bölümünün ferritin şeklinde depo edilmesi,
- İlaç, hormon ve diğer maddelerin vücuttan uzaklaştırılması gibi birçok metabolik olay karaciğerde gerçekleşir (84).

1.4.5. Karaciğer Hasarı (Hepatit)

Hepatit; Karaciğerde viral, toksik, farmakolojik bir ajan veya immünolojik bir atak ile meydana gelen hasar sonucunda ortaya çıkan geniş kliniko-patolojik hastalıklar grubunun tamamı için kullanılan bir terimdir. Altı aydan kısa sürüp tamamen iyileşme ya da ölümle sonuçlanan *akut hepatit*, altı aydan uzun süren *kronik hepatit* olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Sadece histolojik bulgularla akut ve kronik hepatiti birbirinden ayırmak mümkün değildir. Klinik bulgular mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır (83).

1.4.5.1 . İlaç ve Toksik Maddelere Bağlı Hepatitler

Vücuda alınan ilaçlar ve toksik maddeler karaciğerde detoksifiye edildiği için ilaç ve toksinler ya da bunların metabolitleri karaciğer üzerinde potansiyel toksik etkiye sahiptir (85). Karaciğer hasarı, toksik maddelerin karaciğerdeki makro molekülleri değiştirmesi, oksijen radikalleri üretmesi ve membran lipitlerini peroksidasyona uğratması sonucunda ortaya çıkar (86). Bu toksik maddeleri iki grupta incelemek mümkündür.

1.4.5.1.1. İntrensek Hepatotoksinler

Alındıktan kısa bir süre sonra (birkaç gün içinde) akut hepatite benzer reaksiyon yaparlar. Lezyonun şiddeti alınan maddenin dozuna bağlı olarak değişmektedir. Bunlara örnek olarak asetaminofen ve karbon tetraklorür'ün (CCl₄) etkileri verilebilir (83). İntrensek hepatotoksinler lobülün herhangi bir bölgesinde toplanan hücre nekrozuna yol açarlar. İlaç ve toksinlerin metabolitleri sitokrom P-450 enzimleri aracılığıyla meydana gelmektedir. Bu maddelerin oluşturduğu hasar

ise sıklıkla sitokrom P-450 enziminin çok olduğu ve hipoksinin fazlaca görüldüğü sentrilobüler bölgede görülür (86).

1.4.5.1.2. İdiosenkrazik Hepatotoksinler

Alındıktan birkaç ay sonra reaksiyonları ortaya çıkan hepatotoksinlerdir. Halotan, izoniazid gibi ilaçlar buna örnektir. İlaç metabolitleri hücre zarı ile neoantijen oluşturarak karaciğer hasarına yol açar. Bu reaksiyonlarda ateş, eklem ağrısı ve vücutta kızarıklık, eozinofili gibi viral hepatit benzeri reaksiyonlara yol açarlar (86, 87).

1.4.5.2 . Klinik ve Histopatolojik Bulgular

Birçok ilaç viral hepatite benzer şekilde halsizlik, yorgunluk, sarılık, iştahsızlık, bulantı ve kusma gibi belirtiler verir. İdiosenkrazik toksinlerle oluşan hasarda klinik tablo çok değişiktir. Alerjik reaksiyonlar gibi bulgular oluşur. Safra kanalı zedelenmelerinde ise kolestaz, sarılık, kaşıntı ve kalıcı safra kanalı hasarları oluşabilir. Doza bağımlı ilaç reaksiyonlarında ve toksik madde maruziyetinde, daha çok sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde hasar (*sentrilobüler nekroz*) oluşur. Hasar maruziyetin miktar ve süresine göre değişmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde akut karaciğer yetmezliğinin en sık nedeni olan asetaminofen toksisitesi doza bağımlı ilaç toksisitesine iyi bir örnektir (87, 88).

Toksik hasar sonucunda hepatositler de *balonlaşma dejenerasyonu*, hücre içerisinde nükleusun yerini değiştirmeyen *mikroveziküler steatoz* ve nükleusun yerini değiştiren *makroveziküler steatoz* meydana gelebilir (85, 88).

CCl₄ gibi bir kısım toksik madde, karaciğerde apoptozis gibi akut etkilerinin yanında, fibrozise yol açarak daha uzun dönemde etkili olabilecek sonuçlara yol açar. Bu etki hepatik stellat hücreler üzerinden gerçekleşir. Karaciğer hasarı durumunda ekstraselüler matriks üretiminin primer kaynağı hepatik stellat hücrelerdir. Karaciğer de hasar oluşturan herhangi bir sebepten dolayı bu hücreler aktive olarak fibrozise neden olurlar (89). Başlangıçta fibrozis portal bölgenin içinde, çevresinde ya da sinüzoidler içerisinde depolanır. Zamanla fibröz bantlar yayılıp karaciğerin çeşitli bölgelerini birleştirdiğinde *köprüleşme nekrozu* adını alır. Bazı durumlarda hasarın

durdurulması ile fibrozis durdurulabilse de genellikle fibrozis hepatik hasarın geri dönüşü olmayan bir sonucudur (84).

1.4.5.3 . Tanıda Kullanılan Tarama Testleri

1.4.5.3.1. Serum Bilirubin Düzeyi

Karaciğer fonksiyon testleri içinde spesifik olmayan orta düzeyde duyarlı bir testtir. Bilirubinin yapımı, konjugasyonu ve safraya salgılanması sırasının sonucunu yansıtır.

1.4.5.3.2. Serum Alkalen Fosfataz (ALP) Seviyesi

Alkalen fosfataz, hepatositte plazma membranında yerleşiktir. Kolestaza eşlik eden serum ve doku safra asidi düzeylerinin artması sonucunda ALP içeren hepatosit membranı parçaları çözünerek dolaşıma karışır. Karaciğer safra asit düzeylerinin artması ALP yapımını artırarak serumdaki düzeylerinin de artmasına katkıda bulunur. Karaciğerin tümöral ve infiltratif hastalıklarında ve yeni kemik yapımı gibi birçok durumda da artar.

1.4.5.3.3. Aspartat (AST) ve Alanin (ALT) Aminotransferazlar

Karaciğer hücrelerinde büyük miktarda bulunan hücre içi aminotransfer enzimleridir. Karaciğer hücre hasarı ya da ölümü sonucunda dolaşıma katılarak hasarın seviyesine göre yüksek oranda tespit edilirler. Spesifik olmamalarına rağmen genel olarak karaciğer hasarına duyarlı testlerdir. Düzeylerinin yüksek olması hemen daima viral ve toksik nedenli hepatitler sonucu oluşan akut hepatoselüler nekrozu gösterir (83).

1.5. Apoptozis

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı bir hücre ölümü gösterilmiştir. İlk defa Kerr tarafından tanımlanan bu ölüm şekline ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen “apoptozis” adı verilmiştir (90-93). Popülasyonun geri kalanının iyiliğini gerektiren durumlarda, hücrelerin kalıtsal

olarak kendilerinde var olan intihar programını devreye sokarak, programlı bir şekilde ve çevreye hiç zarar vermeden yaşamlarına son vermelerine “apoptozis” denilir (94-96). Apoptozisin genetik ve moleküler mekanizmaları 1980’lerin sonunda bir nematod solucan olan *Caenorhabditis elegans*’ın, olgun şekline dönüşmesi sırasında, tam olarak 131 hücrenin öldürülüp geriye 959 tanesinin kalmasıyla ortaya çıkartılmıştır (97).

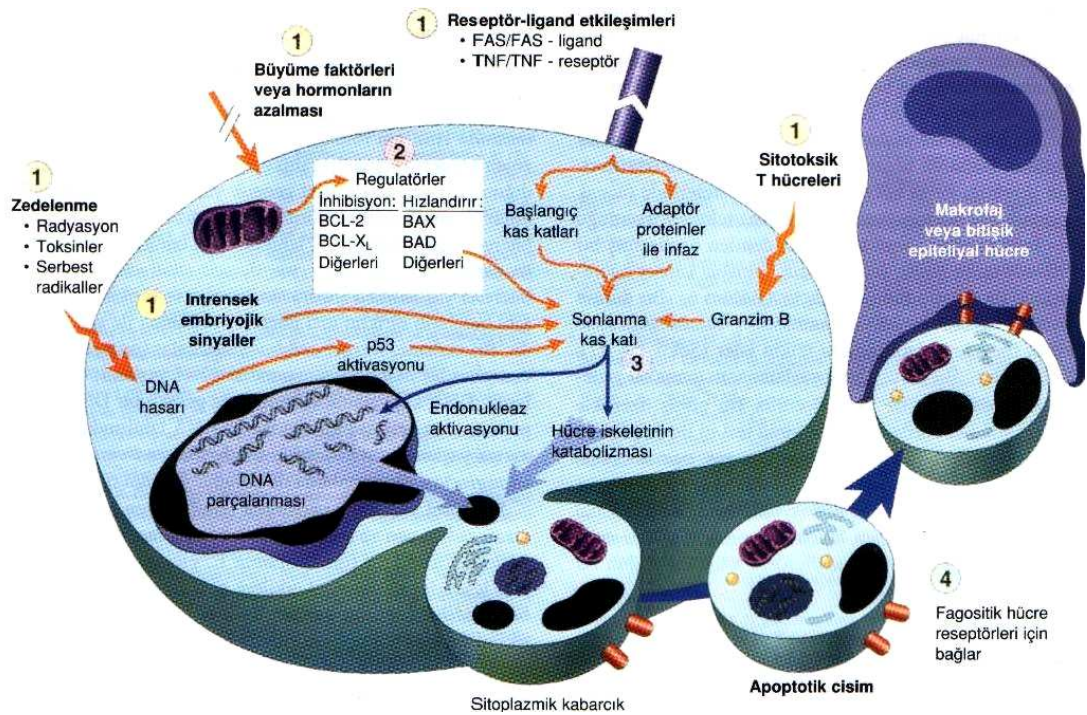
Caenorhabditis elegans’da apoptozisde rol oynayan en önemli üç gen *ced-3*, *ced-4* ve *ced-9* dur. *Ced-9* memelilerde *Bcl-2* gen ailesinin homologudur. *Ced-4* geni memelilerde *Apaf-1* (Apoptotik proteazı aktive edici faktör-1) olarak bilinmektedir. *Ced-3* ise memelilerde şu ana kadar tanımlanmış 14 üyesi bulunan kaspaz (sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz) enzimlerinin homologudur (95). Kaspaz ailesinin ise şu ana kadar 14 üyesinden 11 tanesi insanda tespit edilmiştir (98). Kaspazlar içerisinde çeşitli hücrel proteinleri parçalayan ve küçük bir bağlanma bölgeleri olanlarına cellat kaspazlar ya da sonuçlandırıcı (effektör) kaspazlar da denilmektedir. Bunlar; Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7 dir (85).

1.5.1. Apoptozisin Başlatılması

Apoptozisin moleküler mekanizması günümüzde dahi bir tartışma konusudur. Apoptozisde morfolojik değişikliklerin kaspaz kaskadının aktivasyonu sonucu olduğu kabul edilir (99). Kaspazlar reseptör aracılı (ekstresek) yol, ya da mitokondri aracılı (intresek) yolların tetiklenmesi sonucunda aktive olur. Reseptör aracılı apoptozisin tetiklenmesinde sorumlu iki esas aktör; Fas ligant (FasL) ve Tümör nekrozis faktör (TNF)’dür. Ölüm faktörü diye de bilinen bu faktörler ilgili reseptörlere bağlanarak hücre ölümünü gerçekleştirirler. FasL’in reseptörü olan Fas, APO-1 veya CD-95 adıyla da bilinen tip-1 membran proteinidir ve TNF reseptör ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerde, Natural Killer hücrelerinde bulunur ve hedef hücrede bulunan Fas reseptörü ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. TNF ise hedef hücredeki TNF reseptör ailesinin üyeleri olan Tümör nekrozis faktör-1 ve Tümör nekrozis faktör-2 adlı reseptörleri ile bağlandığında apoptozisi başlatır (96). Reseptörlerin uyarılması ile başlatıcı kaspaz olan kaspaz-8 aktive olarak aktivasyon sinyalini kaspaz-3 gibi efektör kaspazlara iletir.

Mitokondri aracılı apoptozis ise sitokrom c, apoptozis indükleyici faktör ve Smac/DIABLO gibi apoptojenik faktörlerin mitokondri intermembranal boşluğundan sitozole salınması ile tetiklenir. Sitokrom c'nin sitozole salınımıyla sitokrom c/Apaf-1/ATP/prokaspaz-9'dan oluşan apoptozom kompleksi, kaspaz-9'u ve sonrasında kaspaz-3'ü aktive eder (98, 100). Aktive olmuş kaspazlar ise DNA'nın parçalanması, fosfatidil serin eksternalizasyonu, membran proteinlerinin yıkılması gibi morfolojik değişikliklerin ortaya çıkmasıyla nihai sonu meydana getirirler (101). Ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan p53 geni, reaktif oksijen radikalleri (hem mitokondri, hem plazma membranı, hemde genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak) apoptozisi tetikleyebilirler (96) (Şekil 11).

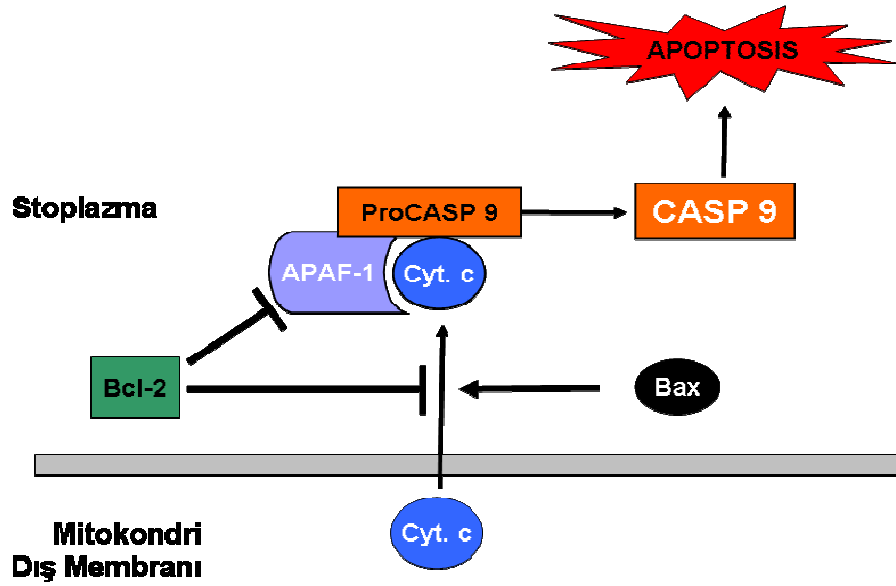
Koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, interlökin-2 gibi maddelerin ortamda azalması ve glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyarıların varlığı apoptozisi tetikleyebilir (90) (Şekil 11).



Şekil 11. Apoptozisin indüklenmesi ve apoptotik cismin oluşumu (85). İntrensek ve ekstrinsek yollarla apoptozisin oluşturulması (1), apoptozisin düzenlenmesi (2), kaspaz kaskadının aktivasyonu (3), apoptotik cismin oluşumu (4).

1.5.2. Apoptozis Modölatörleri

Apoptozisin düzenlenmesinde mitokondri merkezi bir rol oynar. Apoptozis esnasında mitokondri membran potansiyelinin azalması, geçirgenliğinin artması gibi karakteristik olmayan değişiklikler meydana gelir. Oksidatif stresin eşlik ettiği bu değişiklikler sonucunda mitokondrinin intermembranal boşluğunda bulunan ve solunum zincirinin bir parçası olan sitokrom c, sitozol içerisine salınır. Sitokrom c'nin bu salınımı Bcl-2 ailesinin mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleer membranda bulunan anti-apoptotik üyeleri (Bcl-2, Bcl-XL) tarafından durdurulabilir. Diğer taraftan Bcl-2 ailesinin sitozolde bulunan ve apoptozis esnasında sitozolden mitokondriye geçen (Bax mitokondride delikler açar) pro-apoptotik üyeleri (Bax, Bak, Bad) ise sitokrom c salınımını artırmaya çalışırlar. Özetle Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri baskın olduğunda apoptozis artarken, anti-apoptotik üyeleri baskın olduğunda apoptozis azalır (99, 101-103) (Şekil 12).



Şekil 12. Anti-apoptotik, pro-apoptotik, ajanlar ve apoptozis.

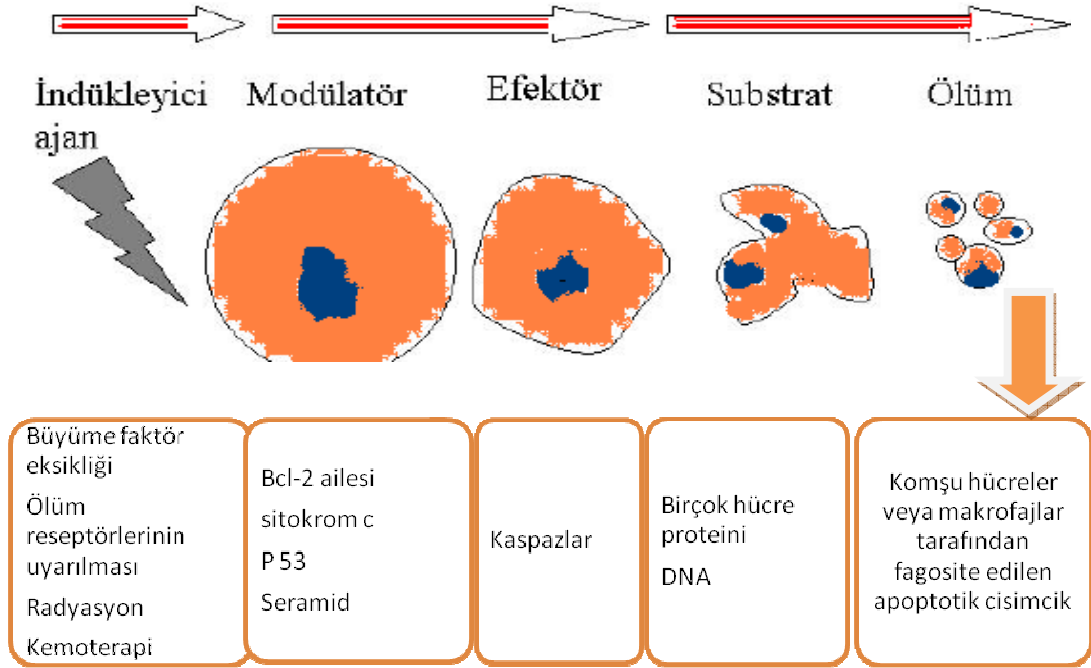
Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin en bilinenleri; Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w iken, pro-apoptotik olanlar ise; Bax, Bad, Bim, Bak, Bcl-X_s, Bid'dir (94). Bu üyelerden Bcl-2/Bax oranındaki değişiklikler bazı malign hastalıkların teşhisinde önem taşır (101).

1.5.3 . Apoptozis Morfolojisi

Apoptozis birkaç aşamada gerçekleşir. Bu aşamaların bir kısmı çeşitli görüntüleme yöntemleriyle tespit edilebilir. Mikroskoplarla görülebilen bu aşamalarda hücre yapısal olarak değişiklikler gösterir. Bir düzen içerisinde sıralanacak olursa;

- İçeriden ya da dışarıdan indükleyici bir faktörle apoptozis başlatılır.
- Hücre içerisindeki proteazlar aktive olur.
- Hücre büzülür, mikrovillus ve bağlantı bölgelerini kaybederek komşu hücrelerden ayrılır. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Hücre birkaç dakika içerisinde yaklaşık 1/3 lük bir hacmini kaybeder.
- Nükleer kromatin yoğunlaşarak nükleer membran altında toplanır. Endonükleaz enzimi DNA'yı parçalara böler. Bu arada organeller sağlamdır. Endoplazmik retikulumda dilatasyon, mitokondride ise şişme meydana gelir.
- Plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre sitoplazma ile çevrilmiş DNA parçaları ve organellerden oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır.
- Birçok hücre yüzeyi moleküllerinin değişmesinden dolayı bu apoptotik yapılar komşu hücreler ya da fagositler tarafından kolaylıkla tanınarak inflamasyona yol açmadan ortadan kaldırılır (90-92, 94, 104).

Apoptozisin indüklenmesi, düzenlenmesi ve sonrasında hücre içi proteazların aktive olmasıyla hücrenin fagositler tarafından ortadan kaldırılması aşamaları Şekil 13'te özetlenmiştir.



Şekil 13. Aşama aşama apoptozis ve morfolojisi

1.5.4. Apoptozisin Görüldüğü Durumlar

Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşayabilir. Deri, gastrointestinal sistem ve bağışıklık sistemi gibi pek çok dokuda devamlılık apoptozis ve hücre yenilenmesine bağlıdır (90).

1.5.4.1. Fizyolojik Olarak Apoptozisin Görüldüğü Durumlar

- Embriyogenez sırasında bazı canlılarda parmaklar arasındaki perdenin ve organogenez safhasında fazla üretilen hücrelerin ortadan kaldırılması esnasında apoptozis görülür (96, 105). Yine memelilerde sinir sistemi gelişirken aksonları hedefine ulaşmamış nöronlar ortadan kaldırılarak, nöronlarla hedef organlar arasındaki bağlantı hataları engellenir. Böylelikle fazla üretilen hücrelerin yaklaşık %50'si ortadan kaldırılır (96, 106).
- Sürekli yenilenen bağırsak ve deri hücrelerinde eskilerin yerini yenilerin almasıyla, eskilerin ortadan kaldırılması sırasında apoptozis görülür (90).

- Menstrasyonda endometrial hücre yıkımı, menopozda ovaryum foliküllerinin atrezisi, laktasyon sonrasında meme bezi gerilemesi, hormonların azalmasına bağlı olarak apoptozisin görüldüğü durumlardır.
- İmmün hücrelerin seçimi (sitokin deplesyonundan sonra B ve T lenfositlerin ve timusta otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılması) (106).

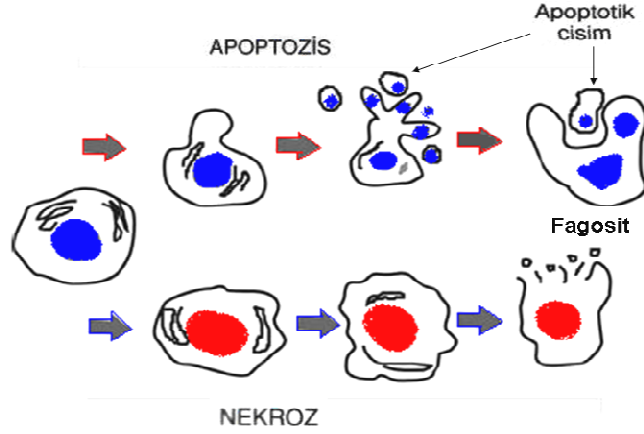
1.5.4.2 . Patolojik Olarak Apoptozisin Görüldüğü Durumlar

Virüs bulaşmış hücrelerde apoptozis indüklenir ve hücre ölür. Böylece virüs de ortadan kaldırılmış olur. Ancak Ebstein-Barr (Bcl-2'yi artırır) ve Human Papilloma virüs (P53'ü etkisizleştirir) gibi virüsler, enfekte hücrenin apoptozise gitmesini engelleyen bazı yöntemler geliştirmişlerdir (96).

- Hücrel immün red ve graft versus host reaksiyonlarında sitotoksik T lenfositler aracılığıyla apoptozis görülür (94, 106).
- Otoimmün birçok hastalıkta apoptozis mekanizması bozulur. Örneğin; Myelodisplastik sendrom da kemik iliğindeki hematopietik hücreler apoptozis ile harap olur ve kan yapımı azalır. Yine iyi bilinen bir hastalık olan Alzheimer'de nöronların ölmesinde apoptozisin önemli bir etkisi vardır (94).
- Hormona bağımlı dokularda hormon eksikliğinde patolojik atrofi görülür (90).
- Tümörlerde özellikle regresyon döneminde olmak üzere, hem büyüme hem de regresyon döneminde apoptozis görülür (90, 106).
- Isı, radyasyon, kemoterapötik ilaçlar, hipoksi ve oksidatif stres gibi nekroz oluşturan etkenler aynı zamanda apoptozis de oluşturlar (90, 92, 94, 106).

1.6. Nekroz

Hücre ölümünün başka bir şekli de nekrozdur. Nekroz, hipertermi, fiziksel hasar, hipoksi, kompleman aktivasyonu, toksik oksijen radikalleri ve UV ışık gibi zararlı uyaranlar sonucu oluşan hücre ölüm şeklidir (90). Organeller şişer, hücre sınırları düzensiz hale gelir ve bunların sonucu olarak hücrenin bütünlüğü kimyasal ve fiziksel olarak bozulur (Şekil 14).



Şekil 14. Apotosis ve nekrozun morfolojik farklılığı (85, 91, 92).

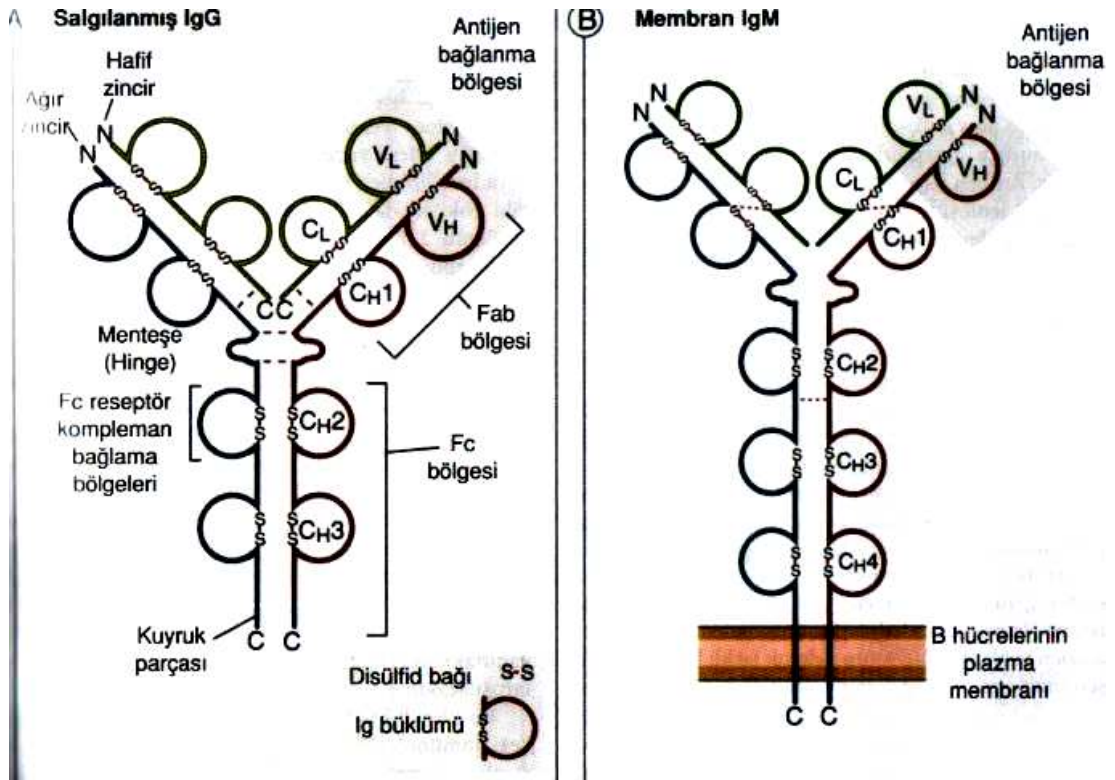
Nekrotik hücre; şişme ve plazma membranının yıkılması sonucunda sitoplazma içeriğini dışarıdaki doku aralığına salarak birtakım hücrelerin oraya akın etmesine ve dolayısıyla da inflamasyona yol açar. Oluşan bu inflamatuvar yanıt komşu hücreleri de etkiler (90, 98). En sık görülen şekli olan koagülasyon nekrozu; hücre şişmesi, sitoplazmik proteinlerin niteliklerinin değişmesi ve hücre organellerinin yıkımıyla karakterizedir. Nekrozun morfolojik görünümü, aynı zamanda meydana gelen hücrenin enzimatik sindirimi ve proteinlerin niteliklerinin değişmesi olmak üzere iki olayın sonucudur. Ölü hücreler eozinle boyanmada bir artış, hematoksilenle boyanmada ise azalma gösterirler. Hücreler esas olarak glikojen partiküllerinin kaybına bağlı olarak canlı hücrelerden daha camsı homojen bir görünüme sahip olabilirler. Enzimler organelleri parçaladığından sitoplazma vakuollü hale gelir ve güve yeniği görünümü ortaya çıkar (88).

1.7. İmmünohistokimya

Organizmaya yabancı olarak tanınan her maddeye *antijen*, antijenin antikor tarafından tanınmasını sağlayan özgün diziye ise *antijenik belirleyici* veya *epitop* denilir. İmmünohistokimyasal tekniklerin temel prensibi, işaretlenmiş antikorlar ile doku/hücredeki spesifik antijenler arasında antijen-antikor kompleksi oluşturmaktır. Antijen-antikor kompleksi oluşuktan 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 (107) (Şekil 15).

1.7.1. İmmünoglobulinlerin Yapısı

İmmünoglobulinler Y harfi şeklinde, iki hafif (L) ve iki ağır (H) polipeptid zincirinden yapılmış glikoproteinlerdir. Hafif ve ağır terimleri molekül ağırlığını ifade etmek için kullanılır (108, 109). Hem L hem de H zincirleri değişebilen amino uçlara (N-terminallere) ve sabit karboksil uçlara (C-terminallere) sahiptir. H zincirleri antijenik ve yapısal özelliklerine göre farklılaşma göstererek molekülün sınıfını ve alt sınıfını belirler. Sınıflar gama (IgG), alfa (IgA), mü (IgM), delta (IgD) ve epsilon (IgE) olarak isimlendirilir. Alt sınıflar ise alta yazılan rakamlarla ifade edilir (108, 109). Antikoru antijen bağlayan parçası Fab (fragment antigen binding) olarak isimlendirilir. İmmün cevabın özgünlüğü Fab tarafından belirlenir. Antikoru biyolojik aktiviteleri düzenleyen ve diğer antikoru bağlanmalarına izin veren kısmı ise Fc (fragment crystalline) olarak isimlendirilir.



Şekil 15. İmmünoglobulinlerin yapısı (108).

1.7.2. Monoklonal ve Poliklonal Antikorlar

İmmünohistokimyada, monoklonal ve poliklonal olmak üzere iki tür antikor kullanılır. Poliklonal antikorlar tavşan, at, keçi, tavuk gibi birçok hayvan türünden elde edilir. Poliklonal antikorlar farklı hücreler tarafından üretildiklerinden immünohistokimyasal olarak da farklıdırlar. Kendilerini meydana getiren antijen üzerindeki çeşitli epitoplarla reaksiyon verirler. Poliklonal antikorlar monoklonal antikorlarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek reaksiyona girme istek ve kabiliyetine sahiptirler. Ayrıca poliklonal bir anti serumun kros-reaktifliği absorbe edilebilir, ancak monoklonal antikorların reaktifliği absorbe edilemez. Bunların yanında monoklonal antikorlar daha spesifiktirler ve poliklonal antikorlarla karşılaştırıldığında; yüksek homojenlik, nonspesifik antikorların olmayışı, tanımlanmanın kolay olması gibi avantajlara sahiptirler (107, 110).

1.7.3. İmmünohistokimya İşaretleme Yöntemleri

İmmünohistokimyanın temel prensibi, antikorlar kullanılarak dokudaki antijenlerin yerlerinin belirlenmesi esasına dayanır. İmmünohistokimya yöntemi gerek ışık, gerekse elektron mikroskopide; tek aşamalı (direkt) veya iki aşamalı (indirekt) olmak üzere iki şekilde uygulanabilir (107).

1.7.3.1 . Direkt Yöntem

Gösterilmek istenen antijene has antikor floresan boya, enzim, altın tanecikleri v.b. işaretler ile işaretlenir ve işaretli antikorun dokudaki antijenle birleşmesi sağlanır. Tek aşamalı olduğundan çabuk tamamlanması bir avantaj olsa da, primer antikor işaretlendiğinden antikorun reaksiyon gücünde azalmaya neden olur. Hassasiyeti düşük olduğundan günümüzde pek kullanılmamaktadır (110).

1.7.3.2 . İndirekt Yöntem

İki aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada işaretsiz primer antikor kullanılarak antijen-antikor birleşmesi sağlanır. İkinci aşamada ise işaretli sekonder antikor ile primer antikorun Fc bölgesi reaksiyona girer. Bu yöntem direk metoda göre daha hassastır. Bu yöntemde primer antikor ile birden fazla sekonder antikor

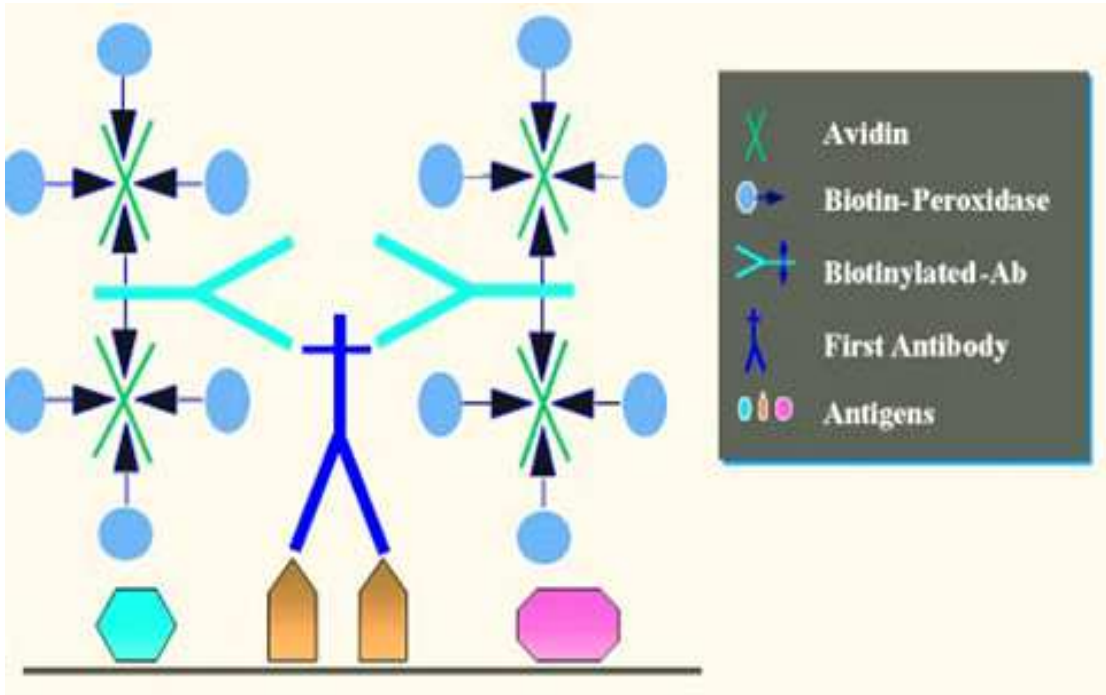
bağlanabildiğinden daha güçlü bir işaretleme elde edilir. İndirekt yöntem kullanılan maddelere göre farklı şekillerde yapılabilir (107, 110).

1.7.3.2.1. Avidin-Biyotin Yöntemi (ABC Metodu)

Biyotinli sekonder antikorun üzerine peroksidaz enzimiyle işaretli avidin-biyotin kompleksinin ilave edilmesiyle gerçekleştirilen yöntemdir. Oluşan kompleks üzerine kromojen ilave edilerek mikroskop altında görünür hale getirilir (107, 111) (Şekil 16).

1.7.3.2.2. İşaretlenmemiş Antikor Yöntemleri (Enzim-Antienzim Yöntemi)

Bu yöntemde sekonder antikorun üzerine çözünabilirliği yüksek olan enzim-antienzim kompleksi ve substrat kromojen solüsyonu kullanılır. Kullanılan enzim kompleksi göre isimlendirilir. Enzim-antienzim kompleksi olarak en sık peroksidaz-antiperoksidaz (PAP), alkali fosfataz- anti alkali fosfataz (APAAP) enzim sistemleri kullanılır.



Şekil 16. Avidin biyotin peroksidaz yöntemi (107).

1.7.3.2.3 . Protein-A Yöntemi

Bir bakteriden elde edilen protein A'nın sekonder antikor gibi kullanılarak gerçekleştirilen yöntemdir.

1.7.3.2.4 . İmmün-Altın Yöntemi

Sekonder antikorun altın partikülleriyle işaretlenmesiyle gerçekleştirilen yöntemdir (110, 112).

1.7.3.3 . Kromojenler

İmmünohistokimyasal boyama metotları ile ortaya çıkan son ürünün görünür hale gelmesi için bazı renkli madde öncüleri kullanılır.

Peroksidaz enzim tayini: DAB (diaminobenzidin) kahverengi, Tetra metil benzidin mavi, AEC (3-amino-9-ethyle carbazole) kırmızı, 4-chloro-1-naphtol koyu mavi rengi verir.

Alkali fosfataz enzim tayini: Fast red/Napthol kırmızı, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium mavi mor rengi verir (110).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Grupları ve Sıçanların Bakımı

Çalışmamızda Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edilen toplam 21 adet 200-220 gr ağırlığında erişkin, Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışma için yerel etik kurul onayı alındı. Hayvanlar hava sirkülasyonlu cam kafeslere (25x40x100 cm) yerleştirildi (Şekil 17). Sıçanlar rastgele üç eşit gruba ayrılarak bir haftalık alışma döneminden sonra uygulamalara başlandı.



Şekil 17. Tolüenin solutulduğu deney kafesleri.

Uygulama süresince sıçanlar oda sıcaklığında (22 ± 1 °C) ve %40-50 nem oranında tutuldu. Işık düzeni ise 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde ayarlandı. Yeme ve içmeleri tolüen ve melatonin uygulaması hariç diğer zamanlarda

serbest bırakıldı. Sıçanların günlük fizik muayeneleri yapıldı, vücut ağırlıkları uygulama başlangıcından itibaren her hafta, haftada bir gün düzenli olarak ölçülerek kaydedildi. İçeriği Tablo 1’de gösterilen hayvan yemleri Elazığ Yem Sanayi AŞ. Yem Fabrikasında hazırlandı.

Tablo 1. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi (gr/kg).

Buğday	150
Mısır	100
Arpa	270
Kepek	80
Soya	294
Balık Unu	80
Tuz	6
Kavimix VM 23-Z *	2
Methionin	2
DCP **	16

*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nikotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth, 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biyotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

**% 18 fosfor, %25 kalsiyum, %0,2 flor’dan oluşur.

2.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar

Çalışma grupları şu şekilde oluşturuldu;

Grup I. Kontrol Grubu: Haftanın 7 günü temiz hava solutuldu.

Grup II. Tolüen Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 1 ay boyunca haftanın 6 günü, saat 16:00 ile 17:00 arasında, günde 1 saat olmak üzere 3000 ppm dozunda %99,9’luk tolüen solutuldu.

Grup III. Tolüen+Melatonin Grubu: Bu gruba ise aynı dozda solutulan tolüenin yanı sıra, haftanın 6 günü, saat 17:00 ile 18:00 arasında 10 mg/kg/gün dozundaki melatonin intraperitoneal yolla bir ay boyunca uygulandı (Tablo 2).

Tablo 2. Gruplar ve tedavi protokolü.

Grup No	Tolüen (ppm)	Melatonin (mg/kg)	Uygulama süresi (gün)
I	0	0	30
II	3000	0	30
III	3000	10	30

2.3. Tedavi Protokolü

Uygulama öncesinde fizik muayeneleri yapılan sağlıklı sıçanlar deneye alındı. Çalışmamızda tolüen uygulama dozu, 3000 ppm olarak belirlendi. Uygulamada tolüenin %99,5'lik formu (Sigma-Aldrich tolüen %99,9 solution), kullanıldı. 25x40x100 cm boyutlarındaki cam kafes bir tel elek vasıtasıyla iki eşit bölüme ayrıldı. $3,75 \text{ mg/m}^3$ 1 ppm ve tolüenin yoğunluğu $0,861 \text{ g/cm}^3$ olarak alındığında hacmi 100 L olarak hesaplanan cam kafeste 3000 ppm dozunda tolüen olması için $1,3 \text{ cm}^3$ tolüen gerekiyordu. Tolüenin bir anda buharlaşamayacağını, havalandırma ve hayvanların solumalarıyla oluşacak kayıpları da düşünerek 3000 ppm dozu oluşturabilmek için $1,6 \text{ cm}^3$ tolüen kullanıldı. Tolüen, Şekil 17'de görüldüğü gibi bölünmüş kafes içerisinde sıçanların olmadığı kısımdaki kağıt üzerine damlatıldı. Kağıt üzerindeki tolüenin çabuk buharlaşması için kafes içerisini havalandıran pompanın hortumu kağıt üzerine gelecek şekilde ayarlandı. Tolüen buharlaştıktan hemen sonra kafes içerisinde hayvanların konulacağı kısımdaki havadan örnek alınarak gaz kromatografisi cihazında değerlendirildi. Tolüen konsantrasyonunun istenen yoğunlukta (3000 ppm) olduğu görüldü. Kafeslerin diğer tarafına gaz çıkışını sağlayacak olan delikler açıldı. Böylelikle sıçanlara aynı dozda tolüen 60 dakika süreyle solutulmuş oldu.

Grup II'deki sıçanlara sadece tolüen solutulurken Grup III'dekilere ayrıca melatonin enjeksiyonları yapıldı. Toz halindeki melatonin (Sigma, St. Louis MO, USA) %1 etanolda çözüldükten sonra fizyolojik serum ile sulandırılarak 10 mg/kg dozunda olacak şekilde ayarlandı. Her gün uygulamadan birkaç dakika önce hazırlanarak haftanın 6 günü, 17:00-18:00 saatleri arasında intraperitoneal yolla

uygulandı. Melatonin tedavisine tolüen uygulamasından bir gün önce başlandı, dekapitasyon gününe kadar 30 gün boyunca devam edildi.

Bir aylık deney süresi sonunda tüm sıçanlar dekapite edilerek öldürüldü. Biyokimyasal inceleme için kanları alındı. Hayvanların karaciğerleri çıkartılarak ikişerli parçalara bölündü. Her sıçana ait iki parçadan biri biyokimyasal diğeri de immünohistokimyasal incelemeler için kullanıldı.

2.4. Biyokimyasal Değerlendirme

Biyokimyasal analizler için alınan karaciğer doku örnekleri öncelikle soğuk (+4 °C) 0.15 M'lık potasyum klorür (KCI) ile yıkandı ve kurutma kâğıdı ile kurutuldu. Daha sonra dokular homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lık KCI çözeltisi içinde 16000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+4°C'de) santrifüjlenerek süpernatant elde edildi ve analiz zamanına kadar (1 hafta) -40 °C'de bekletildi. Elde edilen süpernatant da, antioksidan enzimlerden olan SOD, GSH-Px, CAT ile oksidatif hasarın bir göstergesi MDA değerleri spektrofotometrik olarak tayin edildi.

2.4.1. Doku Örneklerindeki Antioksidan Enzim ve MDA Değerleri

2.4.1.1 . MDA Tayini

Lipit peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metoduna göre yapıldı (113) ve sonuçlar nmol/gr doku proteini olarak ifade edildi.

2.4.1.2 . SOD Tayini

Süperoksit dismutaz enzim değerleri Sun ve ark. (114)'nın modifiye ettiği metotla belirlendi ve aktivitesi U/gr doku proteini olarak belirtildi.

2.4.1.3 . GSH-Px Tayini

Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve Valentine (115)'nin metoduna göre çalışıldı ve U/gr doku proteini olarak ifade edildi.

2.4.1.4 . CAT Tayini

Katalaz aktivitesi Aebi metodu kullanılarak bakıldı (116) ve sonuçlar k/gr protein ile belirlendi.

2.4.2. Karaciğer Fonksiyon Testleri ve Serum Albümin, Bilirubin Düzeyi Tayini

Hayvanlardan alınan kan örnekleri 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek serumları alındı. Serum AST, ALT, ALP seviyeleri ve serum albümin, direk bilirubin değerleri otoanalizör cihazıyla (Olympus AU 600, Opticak Co Ltd, Japan) çok kısa bir süre içerisinde belirlendi.

2.5 . Histopatolojik Değerlendirme

Her gruptan alınan karaciğerler %10’luk formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra, sol ve sağ karaciğer lobları 1-2 mm kalınlığında parçalara ayrıldı. Önce yıkama işlemi yapılan kesitler, daha sonra histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 3).

Tablo 3. Histolojik takip serileri.

Sıra Numarası	Kullanılan Madde	Kimyasal Bekletilme Süresi
1	%70 Alkol	2 saat
2	%80 Alkol	1.5 saat
3	%96 Alkol I	30 dakika
4	%96 Alkol II	30 dakika
5	%100 Alkol I	30 dakika
6	%100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	30 dakika
9	Xylol II	30 dakika
10	Yumuşak Parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak Parafin	1 saat
12	Y. Parafin + Sert Parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat

Yukarıdaki takip serilerinden geçirilen dokular, daha sonra parafin bloklara (Sigma–paraplast embedding media, Stenheim, Germany) gömüldü. Mikrotomla 5µm kalınlığında kesitler alınarak Hemotoksilen-Eozin (HE) ve Masson trikrom boya yöntemleriyle boyandı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX-50 araştırma mikroskopunda incelendi. Önce küçük büyütme (X10) ile karaciğerin geneli incelendi. Daha sonra büyük büyütme alanında (X40) karaciğer hücreleri, v. centralis, portal alan ve hücre tabakaları incelenerek fotoğraflandı.

2.6 . İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Parafin bloklardaki karaciğerden 5 µm. kalınlıkta kesitler alınarak, poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. Daha sonra lamalar immünohistokimyasal olarak boyandı. İmmünohistokimyasal boyamada Avidin-biyotin-peroksidaz boyama yöntemi (ABC Metodu) kullanıldı. Primer antikor olarak Bax poliklonal IgG₁ kullanıldı (Tablo 4).

Tablo 4. İmmünohistokimyasal boyama prosedürleri.

Sıra	İşlem	Süresi
1	Deparafinizasyon	1 saat
2	Distile su	5 dakika
3	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)’de (pH: 7,6)	5 dakika
4	%3’lük H ₂ O ₂ ’de	5 dakika
5	PBS’de (pH: 7,6)	5 dakika
6	Primer antikor (Bax) –oda ısısında	30 dakika
7	PBS’de (pH: 7,6)	5 dakika
8	Sekonder antikor	30 dakika
9	PBS’de (pH: 7,6)	5 dakika
10	Streptavidin peroksidaz	30 dakika
11	PBS’de (pH: 7,6)	5 dakika
12	AEC Kromojen	10 dakika
13	Distile su	5 dakika
14	Zıt boya olarak Mayer’s hematoksilen	1 dakika
15	Akarsuda	1 dakika
16	Kurulama	
17	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Kesitler Olympus BX50 araştırma mikroskobu ile değerlendirildi. Boyanma yaygınlığı ve şiddeti immünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde esas alındı. Boyanma yaygınlığı parankimal hücreler ve portal alandaki boyanın dağılımı; şiddeti ise hücrelerin boyayı tutması esas alındı. Bu gözlemler sayısal 0'dan +6'e kadar semi kantitatif olarak derecelendirildi. Sonunda boyanma yaygınlığı ve şiddetini gösteren değerler toplanarak aşağıda belirtilen “boyanma yoğunluğunun derecesi” ortaya çıkarıldı (Tablo 5).

Tablo 5. İmmünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecesi.

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Minimal
+2	Az
+3	Orta
+4	Çok
+5	Şiddetli
+6	Çok şiddetli

2.7. İstatistiksel Analiz

Sayısal veriler, aritmetik ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 15.0 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. $P < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1 . Klinik Bulgular

Hayvanlar deneyin başlangıcında tolüen verilen kafeslere girmek istemezken deney süresinin sonlarına doğru rahat bir şekilde giriyorlardı. Deneyin ilk günlerinde kafesin çıkışındaki kapakları zorlayarak çıkmaya çalışan hayvanlar, deney sonuna doğru birbirlerine sokularak toplu halde yatıyorlardı. Tolüen uygulanan kafeslere konulduktan 15-20 dakika sonra hayvanların reflekslerinde azalma olduğu ve hareket ettiklerinde dengelerini sağlayamadıkları görüldü. Günlük tolüen solutulmasının sona ermesinden sonra, kafeslerinden çıkarılan hayvanların kaslarındaki tonusun oldukça azaldığı, salyalarının aktığı, solunum sayılarının ve kalp atım hızlarının arttığı tespit edildi. Hayvanlara kafeslere yerleştirilirken ve kafeslerinden çıkarılırken oldukça şefkatli davranılmasına rağmen deney sonunda başlangıçtaki hallerine oranla oldukça saldırgan tavırlar sergiledikleri gözlemlendi. Tolüen verilen hayvanların tedavi ve kontrol grubuna oranla yemlerini daha geç tükettikleri görüldü. Deneye başlamadan önce ağırlıkları ölçülen hayvanlar, deney süresi boyunca her pazartesi tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Hayvanların deneyin başlangıcındaki ve sonundaki ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında fark olmasına rağmen bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

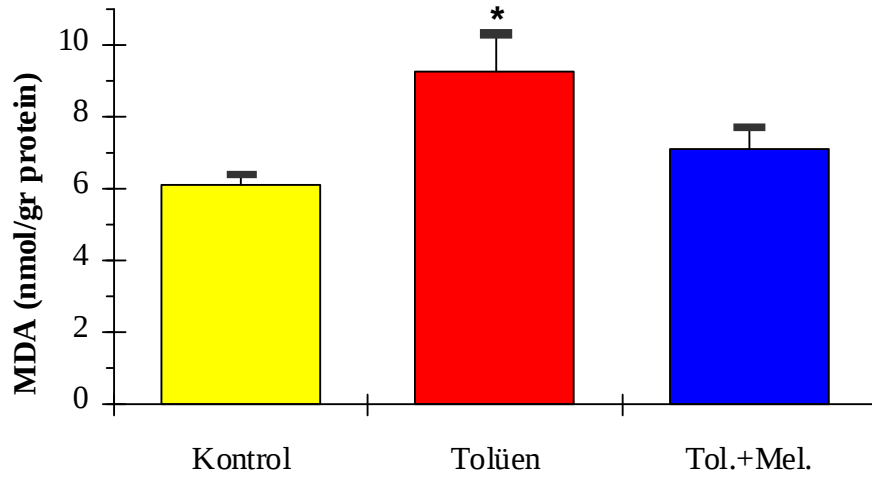
3.2 . Biyokimyasal Bulgular

Gruplara ait karaciğer doku örneklerinde, spektrofotometrik olarak SOD, GSH-Px, CAT ve MDA değerleri belirlendi (Tablo 6). Oksidatif hasarı belirlemede önemli bir parametre ve dokuda lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin, tolüen uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ve bu artışın melatonin tedavisiyle gerilediği tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 18).

Tablo 6. Gruplara ait karaciğer doku örneklerindeki antioksidan enzim ve MDA değerleri.

Doku Parametreleri	Kontrol	Tolüen	Tol+Mel	P
MDA (nmol/gr pro.)	6,14±0,28	9,29±1,05*	7,11±0,65	0,017
SOD (U/gr pro.)	47,48±4,98	56,41±8,06	41,61±6,08	0,209
GSH-Px(U/ gr pro.)	18,40±1,64	19,15±1,92	21,10±1,30	0,415
CAT (k/mg pro.)	0,15±0,04	0,23±0,04	0,20±0,04	0,238

Değerler ortalama ± SH şeklinde verilmiştir. (*p<0,05, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



Şekil 18. Gruplara ait MDA düzeyleri (*p<0,05, diğer gruplarla karşılaştırıldığında).

Antioksidan enzimlerden olan SOD, GSH-Px ve CAT değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

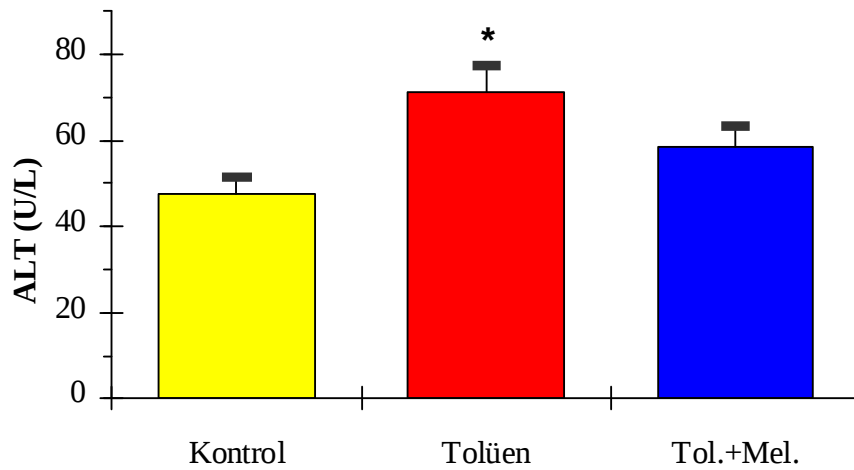
Serum AST, ALT, ALP seviyeleri ve albümin, total bilirubin düzeylerinin tayini yapıldı (Tablo 7).

Tablo 7. Karaciğer fonksiyonlarını gösterir kan parametreleri.

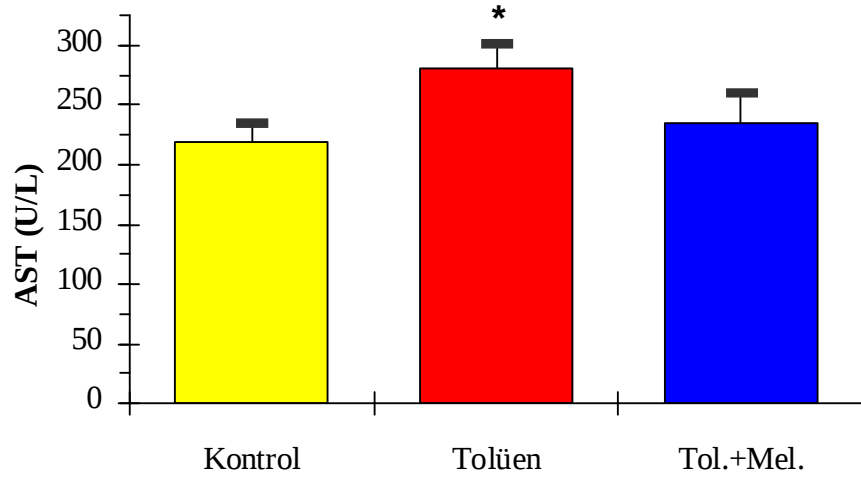
Kan Parametreleri	Kontrol	Tolüen	Tol+Mel	P
ALT (U/L)	47,71±3,88	71,43±6,23*	58,43±5,17	0,028
AST (U/L)	219,29±15,91	280,43±21,39*	234,57±26,65	0,012
ALP (U/L)	201,86±17,28	223,00±22,51	195,86±11,59	0,474
Total bilirubin (mg/dl)	0,12±0,01	0,13±0,01	0,14±0,02	0,581
Albümin (gr/dl)	3,36±0,07	2,85±0,12*	2,99±0,08	0,006

Değerler ortalama ± SH şeklinde verilmiştir. (*p<0,05, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).

Tolüene maruz bırakılan hayvanlarda karaciğer hasarının göstergelerinden olan ALT, AST enzim düzeylerinin kontrol grubuna oranla oldukça yüksek olduğu, bu yüksekliğin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 19-20).

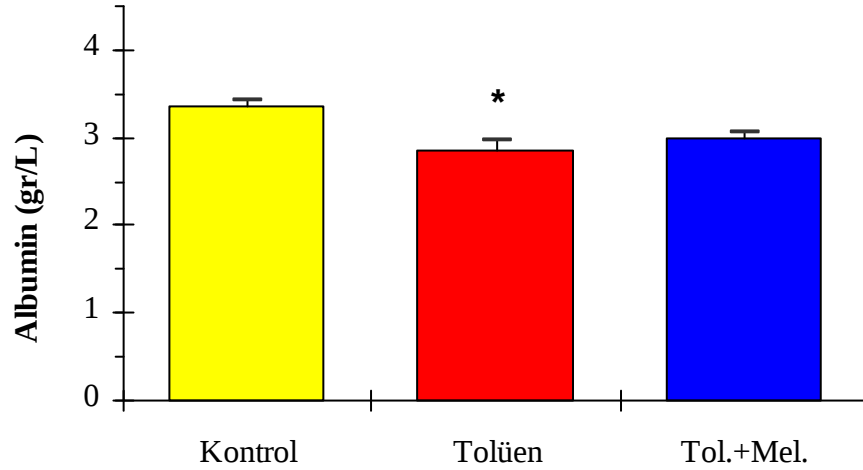


Şekil 19. Gruplara ait ALT düzeyleri (*p<0,05 diğer gruplarla karşılaştırıldığında).



Şekil 20. Gruplara ait AST düzeyleri (* $p<0,05$, diğer gruplarla karşılaştırıldığında).

Serum albümin ve total bilirubin düzeylerinin tayini yapıldığında ise albümin düzeyinin anlamlı bir şekilde düştüğü (Şekil 21), bilirubin düzeylerinin ise bir anlam ifade etmediği görüldü. Melatonin tedavisinin albümin seviyesinde kayda değer bir değişiklik yapmadığı tespit edildi.

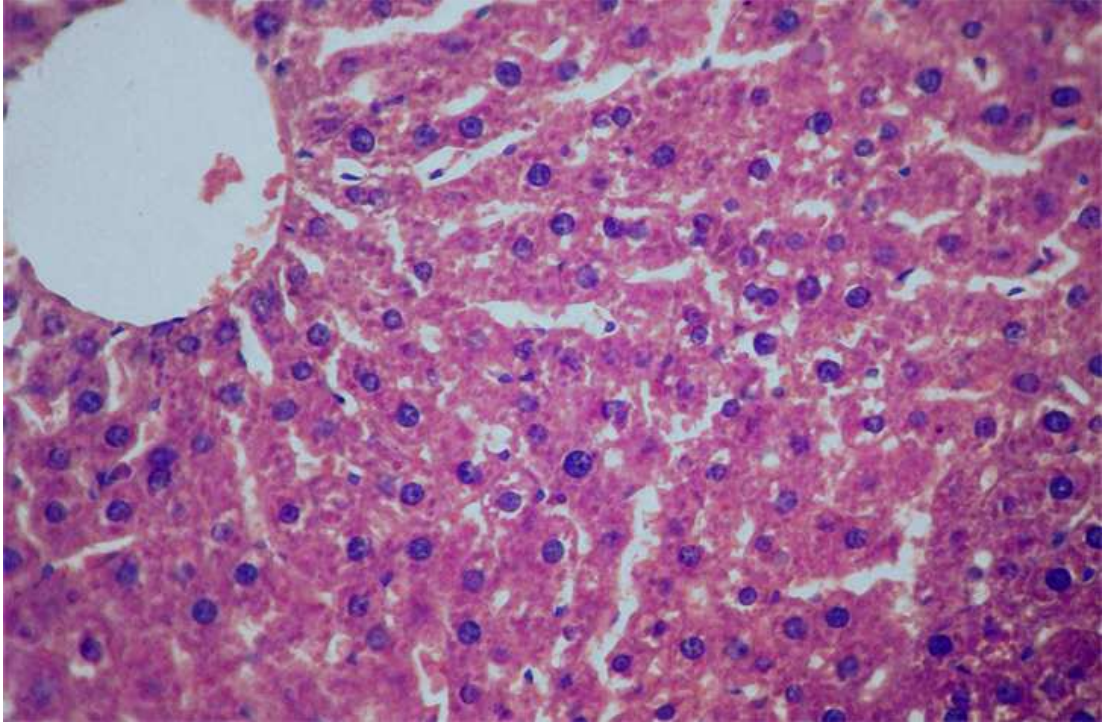


Şekil 21. Gruplara ait albümin düzeyleri (* $p<0,05$, diğer gruplarla karşılaştırıldığında).

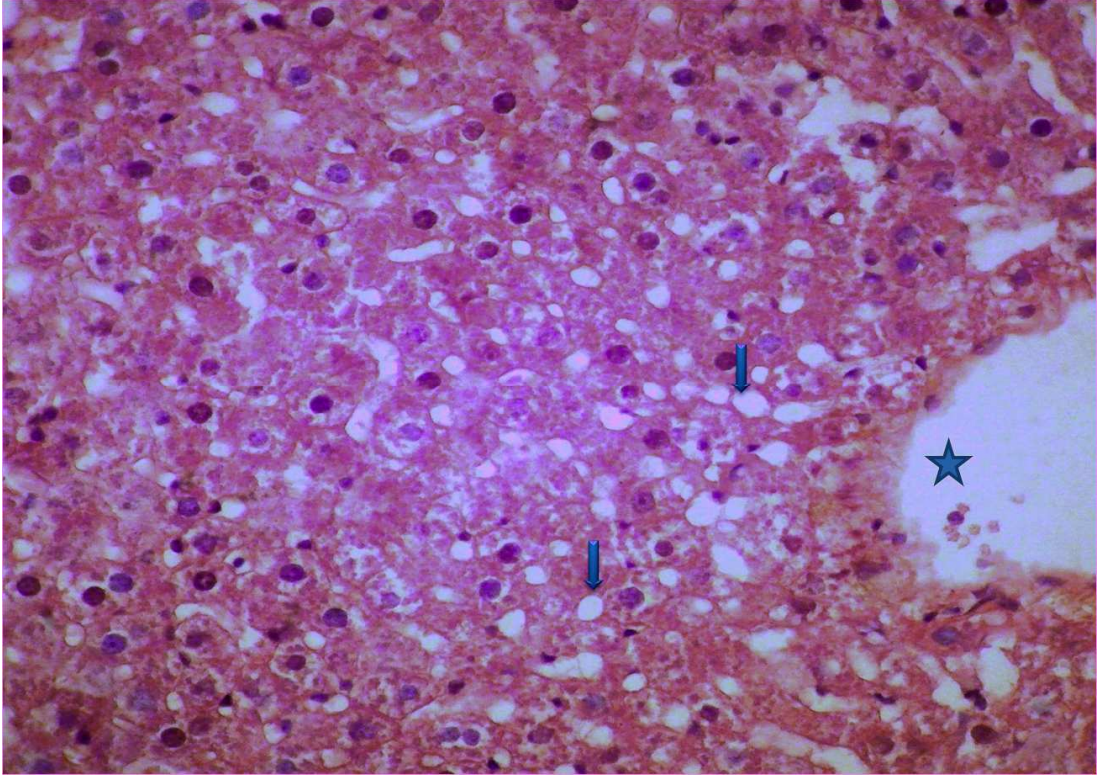
Çalışmamızın biyokimyasal bölümünde elde ettiğimiz bu sonuçlar; tolüenin karaciğer dokusunda oksidatif hasara yol açtığını ve meydana gelen bu hasarın melatonin uygulamasıyla önlendiğini ortaya koydu.

3.3. Histopatolojik Bulgular

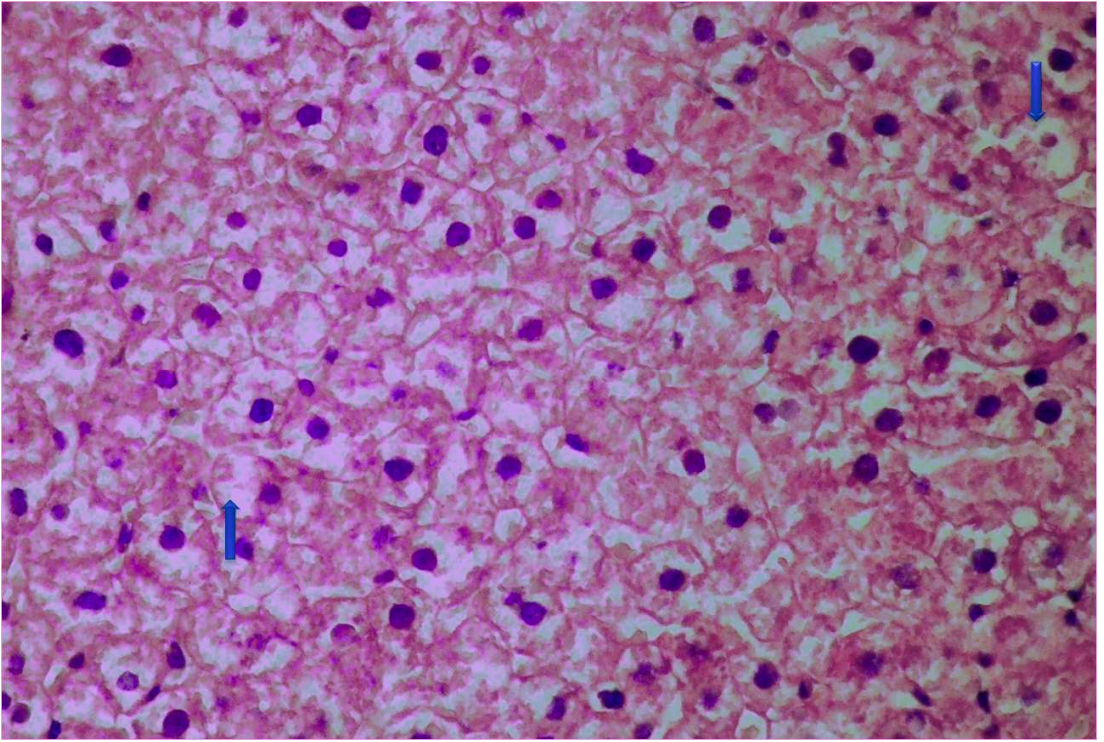
Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar incelendiğinde, kontrol grubuna ait karaciğer dokularının normal yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 22). Tolüen verilen sıçanların karaciğerlerinde yağlı dejenerasyon, hidropik dejenerasyon, sinüzoidlerde genişleme ve hiperemi görüldü (Şekil 23, 24, 25). Ayrıca bu hepatositlerin yer yer apoptotik değişimleri de sergilediği saptandı. Tolüen ile birlikte melatonin verilen sıçanlarda ise yağlı dejenerasyon, hidropik dejenerasyon, sinüzoidal konjesyon ve apoptotik değişimlerin azaldığı görüldü (Şekil 26). Hepatoselüler dejenerasyon şiddeti bakımından tolüen grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta hasarın daha az olduğu görüldü.



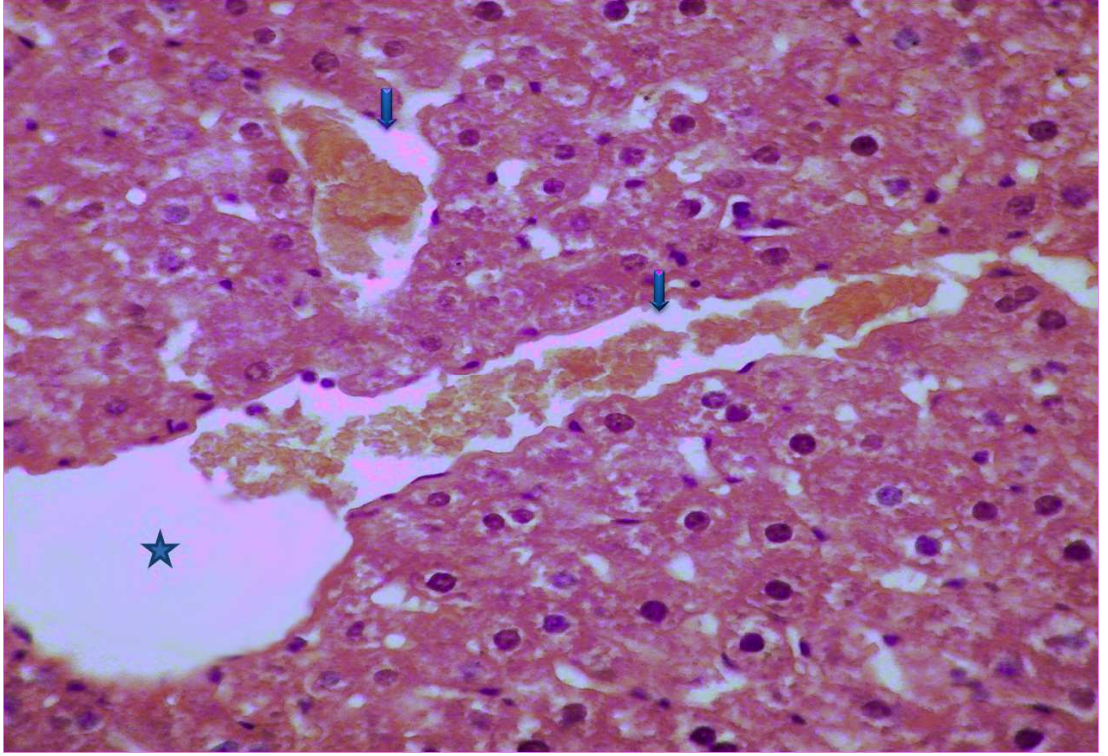
Şekil 22. Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokusu, H.E X40.



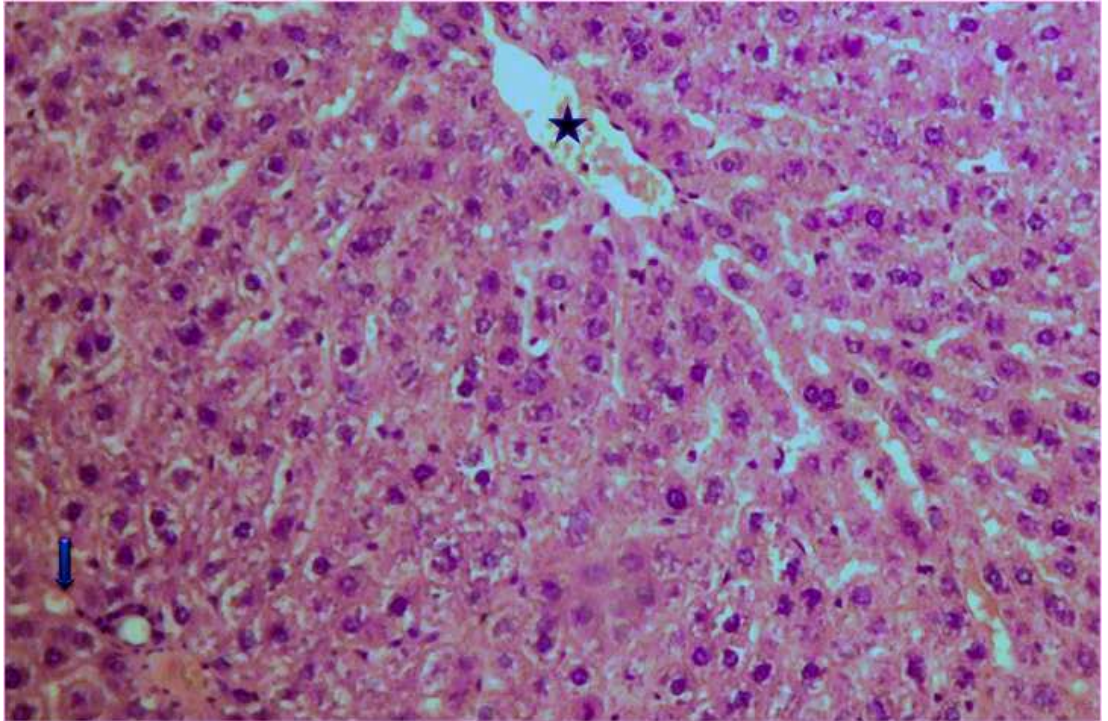
Şekil 23. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda yağlı dejenerasyon (ok).
(*) v.centralis, H.E X40.



Şekil 24. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda hidropik dejenerasyon (ok), H.E X40.

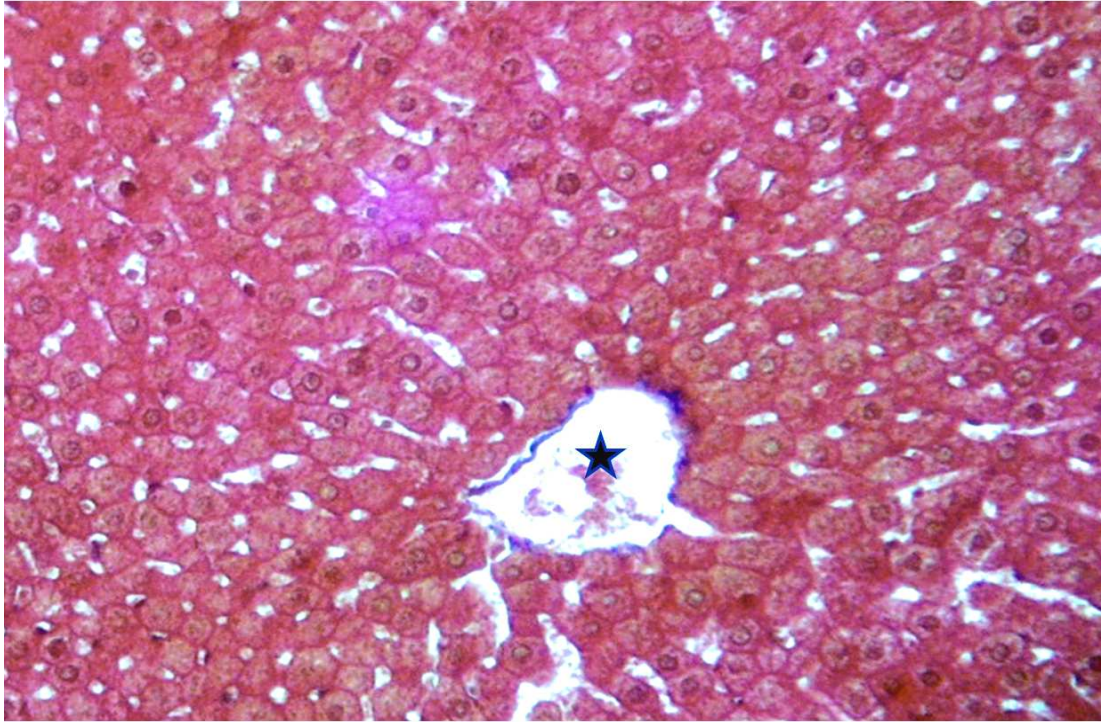


Şekil 25. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda sinüzoidlerde (ok) genişleme ve hiperemi. (*) v.centralis, H.E X40.

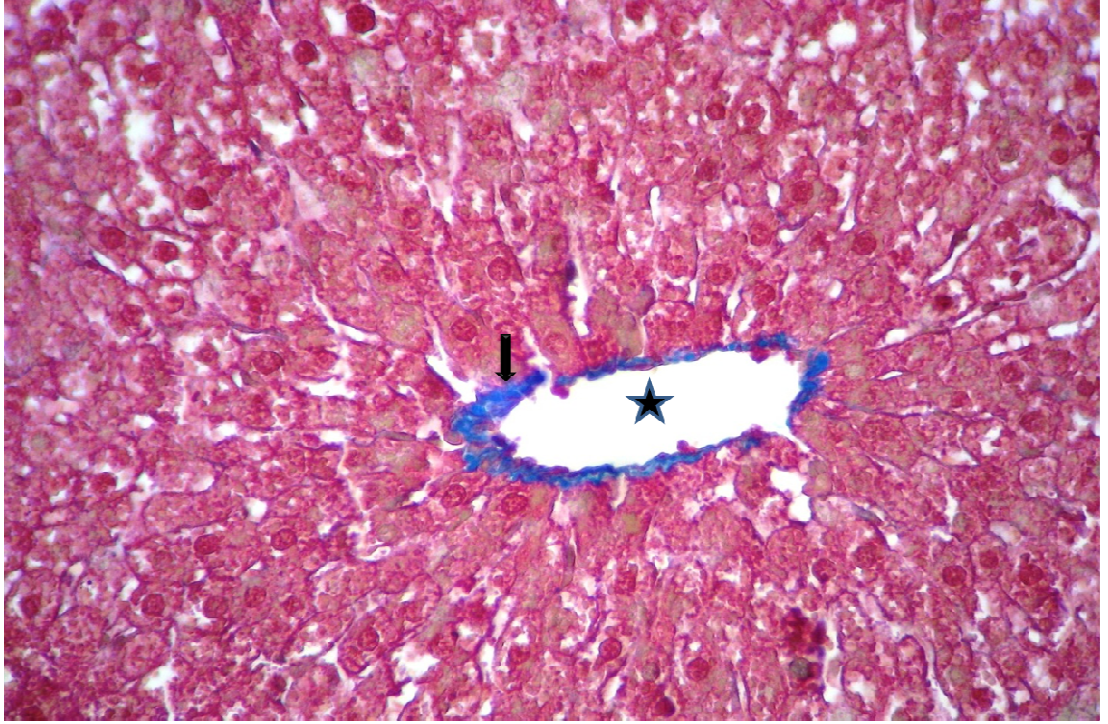


Şekil 26. Tolüen+melatonin uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusu. Karaciğer hücre hasarının tolüen grubuna oranla oldukça az olduğu görülüyor. (*) v.centralis, H.E X40.

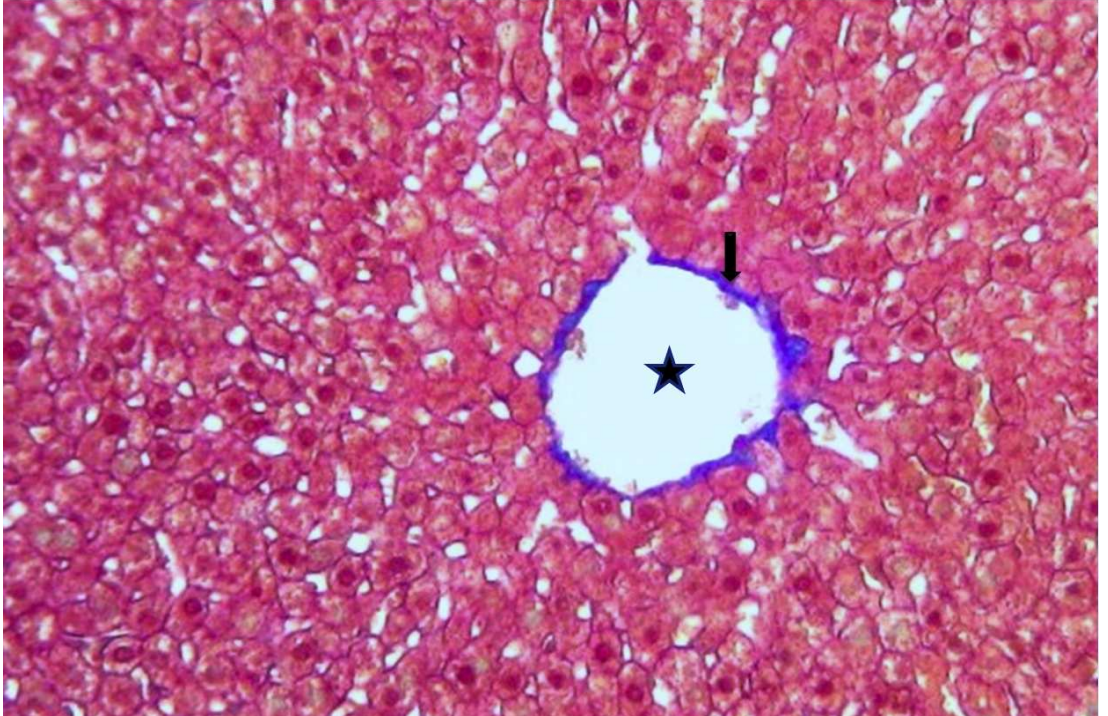
Masson trikrom ile boyanan preparatlar incelendiğinde kontrol dokusunda minimal derecede fibrozis gözlemlendi (Şekil 27). Tolüen verilen sıçanlarda v.centralis etrafında ve portal alanda fibröz doku artışı olduğu görüldü (Şekil 28). İki grup karşılaştırıldığında ise fibröz doku artışının tolüen verilen sıçanlarda daha fazla olduğu tespit edildi. Melatonin verilen sıçanların karaciğer parankim yapılarının daha düzgün olduğu görüldü (Şekil 29).



Şekil 27. Kontrol grubuna ait karaciğer parankim yapısı. (*) v.centralis, Masson trikrom X40.



Şekil 28. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda üçlü boyama. V.centralis etrafında (*) orta derecede fibrozis görülmekte, Masson trikrom X40.



Şekil 29. Tolüen+melatonin uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusunda üçlü boyama. V.centralis etrafında (*) fibrozis, tolüen grubuna oranla daha az, parankim yapısı daha düzgün bir yapıda izleniyor, Masson trikrom X40.

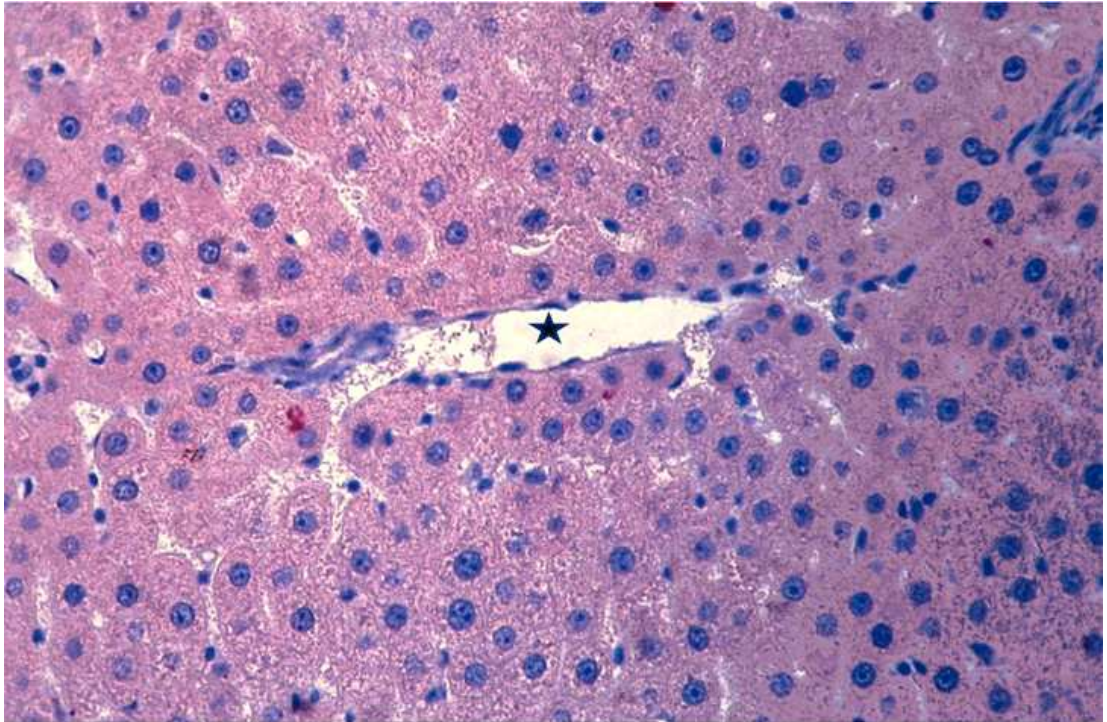
3.3.1 İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda, apoptozisin varlığını ortaya koymak için her üç gruba ait karaciğer doku kesitlerinde yapılan immünohistokimyasal boyamada Bax immün reaktivitesi gözden geçirildi. Bax proteininin karaciğer dokusunda görünür hale getirilerek incelenmesi için yapılan bu boyamada, saptanan reaksiyonun yoğunluğuna göre semi kantitatif değerlendirme yapıldı.

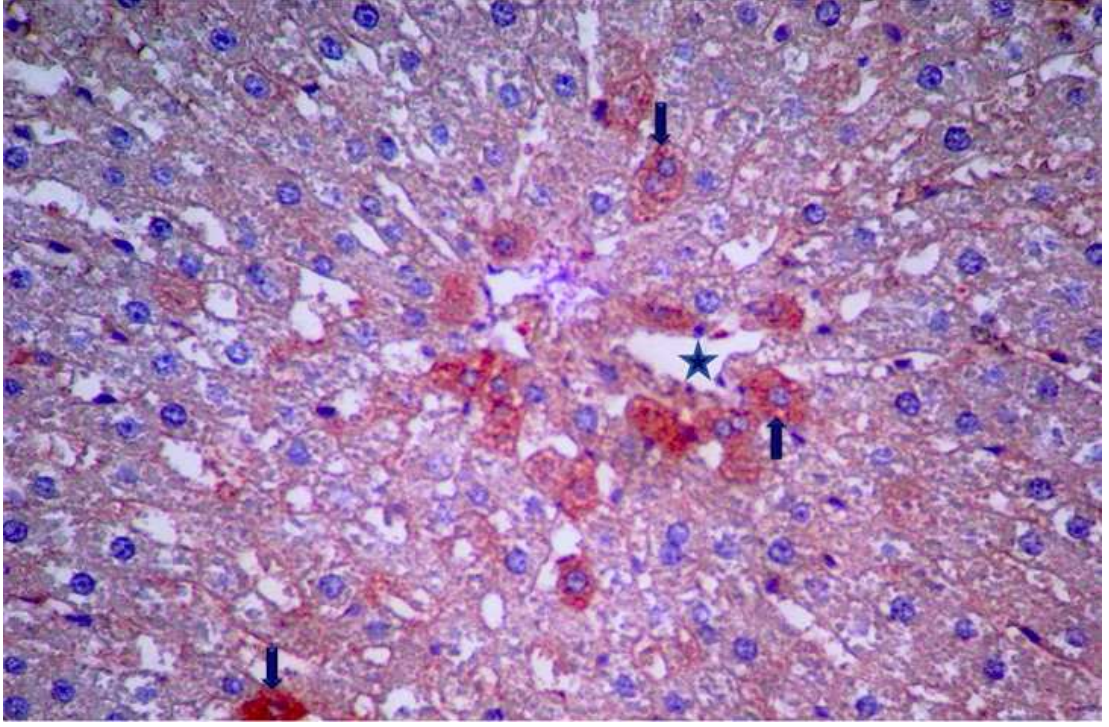
Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri incelendiğinde, v.centralis etrafında ve parankimde hücre sitoplazmalarında, immünohistokimyasal olarak Bax immün reaktivitesinin negatif olduğu (0) görüldü (Şekil 30).

Tolüen uygulanan sıçanlarda ise, karaciğer hücre sitoplazmalarında şiddetli derecede (+5) Bax immün reaktivitesinde önemli oranda artış meydana geldiği tespit edildi (Şekil 31).

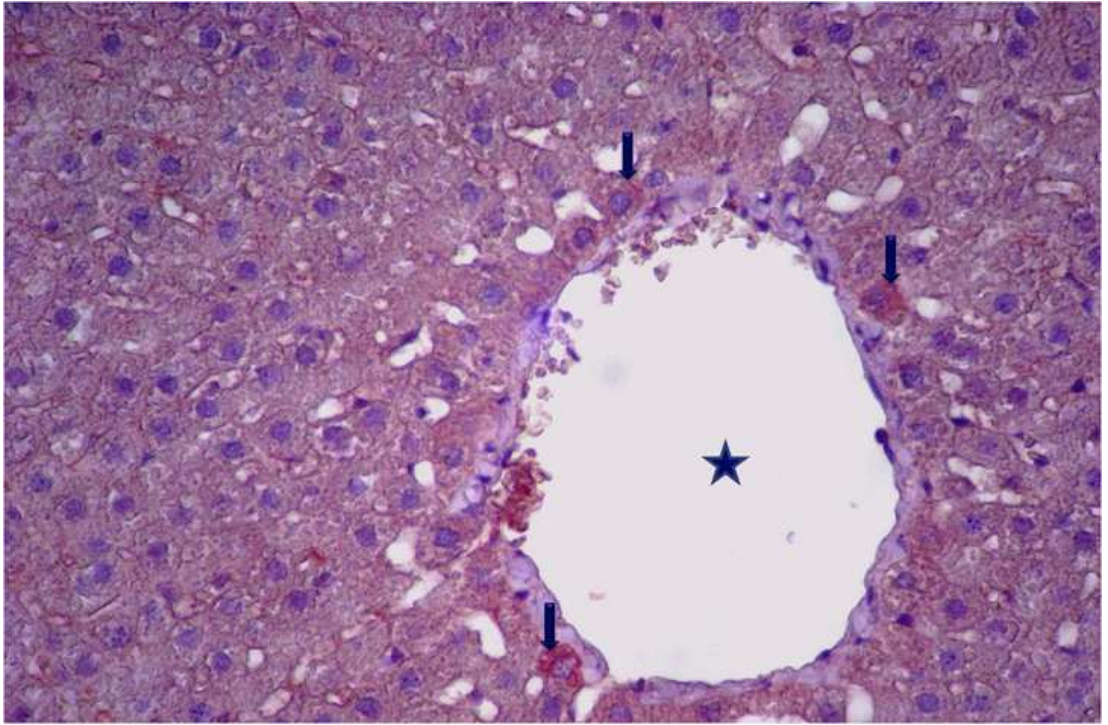
Tolüen maruziyeti ile birlikte melatonin enjekte edilen grupta ise, Bax immün reaktivitesinin, karaciğer hücre sitoplazmalarında az (+2) boyanma olduğu gözlemlendi (Şekil 32). Yapmış olduğumuz immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda, tolüen maruziyetine bağlı olarak karaciğer dokusunda meydana gelen apoptozisin melatonin enjeksiyonu ile baskılandığı tespit edildi.



Şekil 30. Kontrol sıçanlarına ait karaciğer doku kesiti. Parankimal ve v. centralis etrafındaki (*) hücre sitoplazmalarında Bax immün reaktivitesinin negatif olduğu görülmekte. ABC X40.



Şekil 31. Tolüen uygulanan sıçanlara ait karaciğer dokusu. V. centralis etrafındaki (*) hücrelerde daha belirgin olmak üzere, karaciğer hücre sitoplazmalarında, Bax immün reaktivitesinde önemli oranda artış olduğu göze çarpmakta (ok). ABC X40.



Şekil 32. Tolüen maruziyeti ile birlikte melatonin uygulanan gruba ait karaciğer dokusunun görünümü. Sadece v. centralis (*) etrafındaki hücrelerde bir miktar boyanma gözlenirken (ok) lobülün diğer kısımların da Bax immün reaktivitesinde artış olmadığı görülmekte. ABC X40.

4. TARTIŞMA

Organik solventler hayatın birçok alanında kullanıldıkları için oldukça sık karşılaşılan maddelerdir. Bir organik solvent olan tolüen ise; benzinden tırnak boyasına, tutkaldan oda spreyine, silgiden duvar boyasına kadar evde ve endüstride sayısız yerde kullanılması ile birlikte, bağımlılık yapıcı bir madde olması ve istenildiğinde kolaylıkla temin edilebilmesi nedeniyle popülasyonun önemli bir bölümünü etkilediğinden, diğer organik solventlerden farklı olarak özel bir öneme sahiptir. Tolüen özellikle tiner ve tutkal içerisinde yüksek oranlarda bulunması ve bu maddelerin bağımlılığının da çok fazla olması nedeniyle, tolüenin etkilerini tiner ve tutkala maruz kalan insan ve hayvanlarda inceleyen birçok çalışma mevcuttur (11, 16-20).

Tolüenin özellikle santral sinir sistemi ve karaciğer başta olmak üzere birçok doku üzerinde toksik etkilerinin olduğuna dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır (10, 11, 15, 21, 22, 25). Bu kadar zararlı etkileri olan ve büyük oranda karaciğerde metabolize edilen tolüenin, karaciğerde meydana getireceği hasarı azaltmaya ve önlemeye yönelik çalışma sayısı yok denecek kadar azdır.

Tolüenin karaciğer üzerindeki toksik etkilerini ve bu etkilere karşı melatoninin önleyici rolünü inceleme yönüyle çalışmamız, alanında ilk çalışmadır. Üstelik inceleme sadece bir metotla sınırlandırılmamış, amaçlanan hedefe klinik, biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal yaklaşımlarla ulaşılmaya çalışılmıştır.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada tolüen ve tolüenle birlikte melatonin verilen hayvanların, kafese konulduktan sonra 15-20 dakika içerisinde solunum sayılarının ve kalp atım hızlarının arttığı tespit edildi. 30-40. dakikalar içerisinde hayvanlardan bazılarının ayakta durmakta zorlandığı görüldü. Bir saatin sonunda, tolüenli ortamdan alındıklarında, salyalarının aktığı ve hareketlerinin oldukça yavaşladığı görüldü. Hayvanlar deneyin ilk günlerinde daha uysalken, deneyin son günlerinde daha saldırgan bir tavır sergileme eğilimindeydiler. Tolüenin çeşitli yollarla etkileyerek psikomotor hasarlanma, lokomotor aktivitelerde eksitasyon ve daha sonrada inhibisyon, ayakta durma refleksinin kaybolması ve sedasyon gibi bizim gözlemlerimizi destekleyen etkilerinin olduğu bilinmektedir (6, 11, 22-25, 27).

Karaciğer üzerinde toksik etkilerinin olduğu bilinen organik solventler bu etkilerini ROS (serbest oksijen radikalleri) oluşumunu artırarak gösterirler (19, 23, 117, 118). Oksijen, süperoksit radikaline (O_2^-) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan SOD aracılığıyla H_2O_2 ve O_2 'ye çevrilir. Süperoksit radikalinden daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan CAT, peroksidaz ve GSH-Px gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (36, 38). ROS oluşumunun çok fazla olduğu durumlarda ise serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki denge bozularak oksidatif strese ve oksidatif hasara yol açar (38, 39). Bu durum ise lipid peroksidasyonun en önemli ürünü olan MDA düzeylerinde artışa neden olur (40).

Mattia ve arkadaşları intraperitoneal olarak tolüen uyguladıkları ratlarda, tolüenin aldehit dehidrojenaz tarafından parçalanması sırasında, süperoksit anyonunun artışına bağlı olarak, karaciğer ve beyin dokusunda ROS oluşumunun hızlandığını göstermişlerdir (37). Onları destekler nitelikte Ulakoğlu ve arkadaşlarının %63 oranında tolüen ihtiva eden tiner kullanarak yaptıkları çalışmalarında da karaciğer ve akciğer dokularında lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeylerinin yüksek, SOD ve GSH-Px düzeylerinin ise düşük olduğunu bulmuşlardır (19). Tolüenin intraperitoneal olarak kullanılıp karaciğer hasarının araştırıldığı başka bir çalışmada da aynı şekilde MDA düzeyinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (15). Zavodnik ve arkadaşları, tolüenden daha toksik bir madde olduğu bilinen CCl_4 'ün karaciğerde histolojik düzeyde hasara yol açtığını ancak lipid peroksijenaz ürünleri ve GSH-Px düzeylerinde önemli bir değişiklik yapmadığını bildirmişlerdir (119). 3000 ppm dozunda tolüen solutulan hayvanların periferik sinir dokularında da MDA düzeyinin yüksek, SOD ve GSH-Px düzeylerinin ise düşük olduğu görülmüştür (22, 28). Halefioğlu ve arkadaşları ise yüksek dozda tolüen içeren tinerin serum MDA seviyeleri ile eritrositlerde SOD ve GSH-Px düzeylerini artırdığını tespit etmişlerdir (120). 11-19 yaş grubu tiner ve tutkal bağımlısı ergen ve çocuklarda, eritrosit SOD aktivitesi ile plazma MDA düzeylerinin kontrol grubuna oranla oldukça yüksek olduğu, eritrosit GSH-Px düzeylerinin ise kontrol grubuna oranla oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (118). Yapılan bu

çalışmalara bir bütün olarak bakıldığında organik solvent maruziyeti sonrasında lipit peroksidasyonunun büyük oranda arttığı, antioksidan enzim düzeylerinin ise bazen arttığı, bazen azaldığı bazen de değişmediği görülmektedir. Çalışmamızda ise, tolüene maruz kalmış hayvanların karaciğer doku örneklerinde MDA düzeylerinin kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinin ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirlendi. MDA düzeyindeki bu artış, tolüenin karaciğerde lipit peroksidasyonuna ve doğal olarak oksidatif hasara yol açtığını göstermiştir.

Oksidatif stres kalsiyum dengelerini ve mitokondri membran potansiyelini değiştirerek mitokondride hasara yol açar. Hem mitokondri hem de DNA hasarına yol açan oksidatif stres hücreyi apoptozise yani programlı lme sürükler (35, 41). Karaciğer hasarında ise, hücrelerde yüksek oranda bulunan hücre içi aminotransfer enzimleri olan aspartat ve alanin aminotransferazlar dolaşıma katılarak hasarın seviyesine göre yüksek oranda tespit edilirler. Spesifik olmamalarına rağmen yüksek düzeyler hemen daima viral ve toksik nedenli hepatitler sonucu oluşan akut hepatoselüler nekrozu gösterir. Yine spesifik olmamakla birlikte serum bilirubin düzeyi ve ALP seviyeleri de karaciğer hasarı durumunda artar (63, 64, 83).

Guzelian ve arkadaşları 200 ppm'in daha altında bir dozda tolüene maruz kalan matbaa işçilerinde ALT ve AST değerlerinin normalin 2-3 katı oranında arttığını tespit etmişlerdir. (33). Abdominal enjeksiyon yoluyla tolüenin verildiği başka bir çalışmada ise ALT, AST, MDA ve hippürik asit oranlarının önemli derecede arttığı tespit edilmiştir (15). İşleri nedeniyle organik solventlere maruz kalan ayakkabı tamircilerinde ise, ALT, AST, ALP ve konjuge bilirubin düzeylerinin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (17). Dossing ve arkadaşları organik solvent zehirlenmesi şüphesi nedeniyle hastaneye başvuran 156 kişiden 32'sinde karaciğer enzimlerinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (32). Boya yaparken zehirlenen kişilerin kanlarında ölümcül dozda tolüen tespit edilirken karaciğer fonksiyon testlerinin aşırı derecede yükseldiği rapor edilmiştir (121).

Çalışmamız sonuçları değerlendirildiğinde, tolüene maruz kalmış hayvanlarda serum ALT ve AST değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı, aynı zamanda Serum albümin düzeylerinin de belirgin oranda azaldığı belirlendi. ALP ve

totalbilirubin değerlerindeki değişikliklerin ise anlamlı olmadığı görüldü. ALT ve AST düzeylerindeki artış ve albümindeki azalma, tolüenin karaciğer dokusunda hasara ve ölüme yol açtığına dair önemli bir bulgudur.

Hücresinin hasarlanması ve apoptozise gitmesi esnasında mitokondride, membran potansiyelinin azalması ya da artması gibi karakteristik olmayan değişiklikler meydana gelir. Oksidatif stresin eşlik ettiği bu değişiklikler sonucunda sitokrom c, sitozol içerisine salınır. Sitokrom c'nin bu salınımı Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri (Bcl-2, Bcl-XL) tarafından durdurulabilir. Diğer taraftan Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri (Bax, Bak, Bad) ise sitokrom c salınımını artırmaya çalışırlar. Hücresinin ölmesi ile yaşaması arasındaki ince çizgiyi belirleyen bu proteinlerden pro-apoptotik (Bax) olanların artması hücreyi ölüme biraz daha yaklaştıır (89, 99, 101-103, 122).

Lee ve arkadaşları, organik bir solvent olan CCl₄ enjeksiyonundan 64 saat sonra, Bax proteininde artış ve hepatik stellat hücrelerde apoptozisi immünohistolojik olarak göstermişlerdir (89). Yine CCl₄ kullanılan benzeri bir çalışmada ise peri portal bölgede hidropik dejenerasyon, yağlı dejenerasyon ve geniş nekrotik alanlarla lenfositik infiltrasyon bulgularına rastlanılmıştır (119). Organik solvent zehirlenmesi şüphesi nedeniyle hastaneye başvuran hastaların bir kısmında, önemli derecede yağlanma, portal alanda fibrozis ve genişleme tespit edilmiştir (32). Düşük oranda tolüene maruz kalan kişiler üzerinde yapılan bir çalışmada ise sentrilobüler ve periportal yağ birikimi ve Kupffer hücrelerinde hiperplazi olduğu gösterilmiştir (37). Yüksek oranda tolüen içeren tutkal soluyan bir vakada karaciğerde büyüme tespit edilirken, histolojik incelemeler sonrasında perisentral ve midzonal hepatosit nekrozu, balon dejenerasyonu, makroveziküler, mikroveziküler yağlı dejenerasyon ve perisentral fibrozis belirlenmiştir (15).

Gerçekleştirmiş olduğumuz bu deneysel çalışmada, Bax immünreaktivitesi için avidin-biyotin- peroksidaz yöntemi uygulandı. Kontrol grubuna oranla tolüen grubunda Bax immün reaktivitesinde özellikle v. centralis etrafında olmak üzere önemli oranda artış görüldü. Işık mikroskopik değerlendirmede ise tolüen verilen grupta, yağlı dejenerasyon, balon dejenerasyon, sinüzoidlerde genişleme ve hiperemi ve orta derecede perisentral fibrozis gözlemlendi. Yapılan deneysel çalışmalar melatoninin hem doğrudan hem de dolaylı olarak antioksidan etkili olduğunu açığa

çıkarmıştır. Melatonin hücre içi antioksidan olan glutatyon sentezini stimüle ederken, nitrik oksit (NO) sentezini ise inhibe eder. Antioksidan enzimlerin etkinliklerini artıran melatonin aynı zamanda antioksidan enzimleri oksidatif strese de korur. Mitokondrideki elektron transport zincirinden elektron kaçışını önlerken, serbest radikal üretimini de azaltarak zincirin etkinliğini artırır. Melatonin hücre membranını oksidatif saldırılara karşı daha dayanıklı hale getirirken nükleer DNA'yı da oksidatif hasara karşı korur (48, 49).

Reiter ve arkadaşları, melatoninin hem direk hem de dolaylı olarak antioksidan özelliğe sahip olduğunu, bu güçlü antioksidan özelliğinden dolayı insanlarda aşırı derecede ROS'un üretilip oksidatif stresin görüldüğü durumlarda tedavi maksadıyla kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır (49). Ögetürk ve arkadaşları solunabilir bir organik solvent olan ve deneysel karaciğer toksisitesi oluşturmada kullanılan CCl₄ ile yaptıkları bir çalışmada oluşan karaciğer hasarında dolayı, serum ALT, AST, ALP, total ve konjuge bilirubin değerlerinin yükseldiğini ve bu değerlerin melatonin tedavisiyle önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir (63). Benzeri çalışmalarda ise melatoninin toksik maddeye karşı karaciğeri koruduğu hem biyokimyasal hem de histolojik olarak gösterilmiştir (64, 119). % 60-70 oranında tolüen içeren tiner (3000 ppm/45 gün) ile yapılan bir çalışmada Baydaş ve arkadaşları, oksidatif hasarın hipokampus, korteks ve serebellumda astrositlerin spesifik işaretleyicisi olan glial fibriller asidik protein (GFAP) seviyesinde artışa neden olduğunu, melatonin tedavisinin ise bu artışı durdurduğunu göstermişlerdir (23). Baydaş ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise tinerin (3000 ppm/45 gün) ROS aracılığıyla santral sinir sisteminde hasar oluşturarak hafıza kaybına neden olduğunu melatoninin ise bu durumu tersine çevirdiğini belirtmişlerdir (117). Melatoninin oldukça toksik etkili bir madde olan formaldehitin meydana getirdiği oksidatif hasarı önlediği de gösterilmiştir (62). İskemi-reperfüzyon hasarı oluşturmak suretiyle melatoninin koruyucu etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, dışarıdan verilen melatoninin en az fizyolojik melatonin kadar beyin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (61). Mayo ve arkadaşları, sinir sisteminde 6-hidroksidopaminin oksidatif stres oluşturarak neden olduğu apoptozisin, melatonin tarafından önlendiğini göstermişlerdir. Melatoninin şu ana kadar bilinen bir yan etkisi olmayıp, kan beyin bariyerinden çok kolay bir şekilde

geçtiğinden, Parkinson ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda oldukça yüksek bir tedavi edici potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır (123). Melatonin özellikle mitokondri üzerinde etki göstererek yaşlanmayla birlikte artan oksidatif stresin etkisiyle meydana gelen doku hasarını önlediği bildirilmiştir (60, 124).

Çalışmamız bulguları incelendiğinde, tolüen uygulaması ile karaciğerde meydana gelen hasar üzerinde, hasara karşı melatoninin koruyucu rolü belirgindi. Kontrol grubuna oranla tolüen verilen hayvanlarda, Bax immün reaktivitesinde artış olduğu, bu artışın melatoninin tedavisiyle önemli ölçüde azaldığı, aynı zamanda diğer histopatolojik değişikliklerde de düzelme sağlandığı görüldü. Bütün bu bulgular melatoninin karaciğer hücre hasarını azalttığını göstermektedir.

Tolüen karaciğerde metabolize edildiği için, karaciğer rahatsızlığı olan kişilerde tolüenin toksik etkileri artar (7). Tolüene sürekli maruz kalan kişilerin alkol almaları durumunda karaciğer hasarının çok daha kolay hale geleceği de şüphesizdir (7, 125, 126). Yine başka sebeplerden dolayı yağlı karaciğer hastalığı bulunan kişilerde tolüenden kolayca zarar görebilirler (126). Hepatit B, C gibi viral hepatitlerinde karaciğerde hasara yol açarak apoptozise neden olduğu oldukça iyi bilinen bir konudur. Yine tüberküloz tedavisindeki en önemli ilaçlar olan izoniazid, rifampisin, pirazinamid birbirlerinin hepatotoksik etkilerini artırarak daha fazla karaciğer hasarına neden olurlar (127).

Sonuç olarak çalışmamız bulguları göz önünde bulundurulduğunda, karaciğer hastalığı yönüyle riskli (Hepatit B ve C, alkol alışkanlığı olanlar, tüberküloz, mantar hastaları gibi büyük oranda karaciğerde parçalanan ilaçlar kullananlar, vb.) diyebileceğimiz kişilerin tolüenin yüksek oranda bulunduğu ortamlardan uzak durmaları sağlanmalıdır. Tolüenle ilgili işlerde çalışanlar iş yerini yeterince havalandırmalı çalıştıkları yerlerdeki tolüen oranının dünya standartlarının üzerinde olup olmadığı kontrol edilmelidirler. Ayrıca tolüene devamlı maruz kalan kişilerin, periyodik olarak karaciğer fonksiyon testleri yapılmalı ve uzman bir doktor kontrolünden geçmelidirler. Özellikle kış aylarında artan hava kirliliğiyle birlikte atmosferdeki tolüen oranının da arttığı düşünülerek, kişi ya da kurumlar bu konuda gerekli tedbirleri almalıdırlar. Yüksek dozlarda tolüene maruz kalan işçiler ya da tolüen bağımlılarına oksijen ve sıvı tedavisinin yanında, yaptığı oksidatif stres göz önünde bulundurularak güçlü bir antioksidan verilmelidir. Tolüenin özellikle beyin

ve karaciğer olmak üzere birçok dokuda aşırı derecede biriktiği dikkate alındığında, kan beyin bariyerini kolayca geçebilen, hücrenin DNA'sına kadar kolayca nüfuz edebilen bilinen en güçlü antioksidanlardan biri olan melatonin de tedavideki yeri iyi değerlendirilmelidir.

5. KAYNAKLAR

1. Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). Determination of Acute Reference Exposure Levels for Airborne Toxicants, 1999. http://www.oehha.ca.gov/air/acute_rels/pdf/108883A.pdf
2. Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). Public Health Goal for Toluene in Drinking Water, 1999. http://oehha.ca.gov/water/phg/pdf/tolu_f.pdf
3. U.S.Environmental Protection Agency (EPA). Toxicological Review of Toluene, 2005. <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0118-tr.pdf>
4. Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). Chronic Toxicity Summary, 1999. http://www.oehha.org/air/chronic_rels/pdf/108883.pdf
5. Health Protection Agency (HPA). Toluene Toxicological Overview, 2007. http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1194947395545
6. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Toluene, 1994. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts56.pdf>
7. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Case Studies in Environmental Medicine; Toluene Toxicity, 2006. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/toluene/>
8. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Toluene, 2000. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.pdf>
9. Faust RA. Toxicity Summary for Toluene. OAK Ridge Reservation Environmental Restoration Program, Chemical Hazard Evaluation Group Biomedical and Environmental Information Analysis Section Health Sciences Research Division, 1994. <http://riskassessment.ornl.gov/documents/toluene.pdf>
10. Jones HE. Neurobehavioral consequences of intermittent prenatal exposure to high concentrations of toluene. Neurotoxicology and Teratology 1997; 4: 305-13.

11. Uzun N, Karaali SF, Kızıltan ME. Peripheral nerve system damage in chronic toluene and n-hexane intoxication: electrophysiologic investigation. *Cerrahpaşa J Med* 2001; 32: 142-50.
12. Dossing M, Aelum JB, Hansen SH, Lundqvist GR, Andersen NT. Urinary hippuric acid and orthocresol excretion in man during experimental exposure to toluene. *Br J Ind Med* 1983; 40: 470-3.
13. Güçlü O. 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, 2004.
14. Vural M, Ögel K. Uçucu maddelerin kalp üzerine etkileri. *Bağımlılık Dergisi* 2005; 6: 142-146.
15. Bae SW, Yoon IS. The beneficial effects of melatonin for toluene hepatotoxicity in rats. *J Biomed Lab Sci* 2001; 7: 99-102.
16. Tsatsakis AM, Dolapsakis G, Troulakis G, Christodoulou P, Relakis K, Trikilis N et al. Fatal and non-fatal outcome by accidental intoxication with paint thinner. *J Clin Forensic Med* 1997; 4: 133-137.
17. Tomei F, Giuntoli P, Biagi M, Baccolo TP, Tomao E, Rosati MV. Liver damage among shoe repairers. *Am J Ind Med* 1999; 36: 541-547.
18. Sotaniemi EA, Sutinen S, Sutinen S, Arranto AJ, Pelkonen RO. Liver injury in subjects occupationally exposed to chemicals in low doses. *Acta Med Scand* 1982; 212: 207-215.
19. Zengin Ulakoğlu E, Saygı A, Gümüştas MK, Zor E, Akkaya A, Kökoğlu E. Kronik tiner inhalasyonunun sıçan akciğer ve karaciğer dokuları lipid peroksidasyonlarına etkisi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 1998; 29: 75-78.
20. Park CK, Kwon KT, Lee DS, Jo CM, Tak WY, Kweon YO, et al. A case of toxic hepatitis induced by habitual glue sniffing. *Korean J Hepatol.* 2003; 4: 332-336.

21. Calderon-Guzman D, Espitia-Vazquez I, Lopez-Dominguez A, Hernandez-Garcia E, Huerta-Gertrudis B, Coballase-Urritia E, et al. Effect of toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and Na^+/K^+ -ATPase in adult rat brain. *Neurochem Res* 2005; 30: 619-624.
22. Coskun O, Yüncü M, Kanter M, Buyukbas S. Ebselen protects against oxidative and morphological effects of high concentration chronic toluene exposure on rat sciatic nerves. *Eur J Gen Med* 2006; 3: 64-72.
23. Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F, Canatan H. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett* 2003; 137: 169-174.
24. Balster RL. Neural basis of inhalant abuse. *Drug Alcohol Depend* 1998;51:207-14.
25. Bowen SE, Batis JC, Mohammadi MH, Hannigan JH. Abuse pattern of gestational toluene exposure and early postnatal development in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2005; 27: 105-116.
26. Ladefoged O, Hougaard KS, Hass U, Sorensen IK, Lund SP, Svendsen GW, Lam HR. Effects of combined prenatal stress and toluene exposure on apoptotic neurodegeneration in cerebellum and hippocampus of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 94: 169-176.
27. Environment Protection and Heritage Council (EPHC). Toluene health review, 2003. http://www.ephc.gov.au/pdf/Air_Toxics/Tol_Health_Review.pdf
28. Coskun O, Oter S, Korkmaz A, Armutcu F, Kanter M. The oxidative and morphological effects of high concentration chronic toluene exposure on rat sciatic nerves. *Neurochem Res* 2005; 30: 33-38.
29. International Agency For Research On Cancer (IARC). Summaries & Evaluations, Toluene, 1985. <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol71/030-toluene.html>

30. Beyer CE, Stafford D, LeSage MG, Glowa JR, Steketee JD. Repeated exposure to inhaled toluene induces behavioral and neurochemical cross-sensitization to cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 154: 198-204.
31. Inhalant abuse. First Nations and Inuit Health Committee. Canadian Paediatric Society (CPS). *Paediatrics & Child Health* 1998; 3 (2): 123-126.
32. Dossing M, Arlien-Soborg P, Milling Petersen L, Ranek L. Liver damage associated with occupational exposure to organic solvents in house painters. *Eur J Clin Invest* 1983; 13: 151-157.
33. Guzelian P, Mills S, Fallon HJ. Liver structure and function in print workers exposed to toluene. *J Occup Med* 1988; 30: 791-796.
34. Akyol O. Şizofrenide oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004; 5: 15-25.
35. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Journal of Medicine* 2004; 35: 159-169.
36. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83-104.
37. Mattia CJ, Adams JD, Bondy SC. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 103-110.
38. Halliwell B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol* 1984; 62: 71-77.
39. Kargın F, Fidancı UR. Böbrek hastalıklarında köpeklerde antioksidatif metabolizma. *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi* 2001; 12: 13-17.
40. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004; 15: 91-96.
41. Edelfors S, Hass U, Hougaard KS. Changes in markers of oxidative stress and membrane properties in synaptosomes from rats exposed prenatally to toluene. *Pharmacol Toxicol* 2002; 90: 26-31.

42. Kuş İ, Özen OA. Pineal bezin ışık ve elektron mikroskop düzeyde incelenmesi. Fırat Tıp Dergisi 2001; 3: 436-441.
43. Kuş İ, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2002; 22: 221-226.
44. Sobotta
45. Paloğlu ÖS, Beşkonaklı E. Pineal bez ve yaşlanma. Geriatri 1998; 1: 13-18.
46. Kuş İ, Öner H, Songur A, Sarsılmaz M. Sıçanlarda ovarektominin ve ovarektomi sonrası uygulanan östrojenin pineal bez üzerine etkisi: Işık mikroskopik çalışma. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 18: 9-17.
47. Kus I, Sarsılmaz M, Ozen OA, Turkoglu AO, Pekmez H, Songur A, Kelestimur H. Light and electron microscopic examination of pineal gland in rats exposed to constant light and constant darkness. Neuro Endocrinol Lett 2004; 25: 102-108.
48. Acuna CD, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. Curr Top Med Chem 2002; 2: 133-151.
49. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. Acta Biochim Pol 2003; 50: 1129-1146.
50. Pekmez H, Kuş İ, Ögetürk M, Kutlu S, Zararsız İ, Sarsılmaz M. Sıçanlarda oksitosinle indüklenmiş miyometriyum kasılmaları üzerine melatonin hormonunun etkisi. Fırat Tıp Dergisi 2004; 9: 1-5.
51. Kuş İ, Zararsız İ, Yılmaz HR, Özdem Türkoğlu A, Pekmez H, Sarsılmaz M. Sıçan prefrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2004; 13: 1-7.

52. Hansson I, Holmdahl R, Mattsson R. Pinealectomy ameliorates collagen II-induced arthritis in mice. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 432-436.
53. Pekmez H, Kus İ, Çolakoğlu N, Ögetürk M, Kuloğlu T, Sarsılmaz M. Pinealektomili sıçanlarda uterusun ışık mikroskop düzeyde incelenmesi. *Fırat Tıp Dergisi* 2005; 10: 92-95.
54. Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2003; 56: 103-112.
55. Klein DC, Weller JL, Moore RY. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 3107-3110.
56. Keleştimur H. İnsanda pineal bezin fonksiyonları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 1996; 10: 141-147.
57. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodvel VW. Harper'in Biyokimyası. Menteş G, Ersöz B (Çev. Ed.) s.388-393, İstanbul, Barış Kitabevi, 1993.
58. Grivas TB, Savvidou OD. Melatonin the "light of night" in human biology and adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis* 2007; 2: 6.
59. Subramanian P, Mirunalini S, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Melatonin treatment improves the antioxidant status and decreases lipid content in brain and liver of rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 571: 116-119.
60. Manda K, Bhatia AL. Melatonin-induced reduction in age-related accumulation of oxidative damage in mice. *Biogerontology* 2003; 4: 133-139.
61. Kavakli A, Parlakpınar H, Yahsi S, Ogeturk M, Acet A. The effects of melatonin on focal cerebral ischemia-reperfusion model. *Saudi Med J* 2004; 25:1-2.
62. Zararsiz I, Kus I, Ogeturk M, Akpolat N, Kose E, Meydan S, et al. Melatonin prevents formaldehyde-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rats: an

- immunohistochemical and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 413-418.
63. Ogeturk M, Kus I, Kavakli A, Zararsiz I, Ilhan N, Sarsilmaz M. Effects of melatonin on carbon tetrachloride-induced changes in rat serum. *J Physiol Biochem* 2004; 60: 205-210.
64. Kus I, Ogeturk M, Oner H, Sahin S, Yekeler H, Sarsilmaz M. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 169-174.
65. Ogeturk M, Kus I, Kavakli A, Oner J, Kukner A, Sarsilmaz M. Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 85-92.
66. Kuş İ, Sarsılmaz M, Ögetürk M, Özen OA, Pekmez H. Sıçanlarda melatoninin testisler üzerine etkisinin ışık mikroskop düzeyde incelenmesi. *Fırat Tıp Dergisi* 2000; 2: 13-21.
67. Kus I, Akpolat N, Ozen OA, Songur A, Kavakli A, Sarsilmaz M. Effects of melatonin on Leydig cells in pinealectomized rat: an immunohistochemical study. *Acta Histochem* 2002; 104: 93-97.
68. Petrie K, Conaglen JV, Thompson L, Chamberlain K. Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *BMJ* 1989; 298: 705-707.
69. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behav Brain Funct* 2006; 2 (15): 1-23.
70. Baskett JJ, Broad JB, Wood PC, Duncan JR, Pledger MJ, English J, Arendt J. Does melatonin improve sleep in older people? A randomised crossover trial. *Age Ageing* 2003; 32: 164-170.
71. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 3. Baskı (2. Cilt), Ankara: Güneş Kitabevi, 1997: 265-272.

72. Millard PR. Essential Histopathology. Scientific Publications, Oxford. 1990: 133.
73. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Başaklar C (Çev. Ed.) s.230-231, Ankara, Palme Yayıncılık, 1993.
74. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı, Ankara: Tıp Teknik, 1998: 301-302.
75. Dere F. Anatomi. 3. Baskı, Adana: Okullar Pazarı Kırtasiye, 1994: 633-639.
76. Gray H. Anatomy of The Human Body. <http://www.bartleby.com/107/250.html>
77. Bannister LH. Alimentary System. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Fergusson MWJ, (editors). Gray's Anatomy. 38th Edition, New York. Churchill Livingstone, 1995:1795-1813.
78. Moore KL, Agur AMR. Essential Clinical Anatomy. Elhan A. (Çev. Ed.) s.173, Ankara, Güneş Kitabevi, 2006.
79. Snell RS. Clinical Anatomy for Medical Students. Yıldırım M. (Çev. Ed.) s.229, İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri, 2004.
80. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Payolojiye Giriş. Demir R (Çev. Ed.) s.459-69, Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
81. Junquera LC, Carnerio J, Kelley RO. Basic Histology. Aytekin Y (Çev. Ed.) s.307-319, İstanbul, Barış Kitabevi, 1998.
82. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Çavuşoğlu H (Çev. Ed.) s.797-799, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2001.
83. Saunders WB. Cecil Essential of Medicine. Tuzcu M (Çev. Ed.) s.320-22, İstanbul, Talat matbaası, 1995.
84. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ, Larson CP. Clinical Anesthesiology. 3rd Edition, Lange 2002: 708-722.

85. Kumar V, Cotran SR, Robbins SL. Temel Patoloji. Çevikbaş U (Çev. Ed.) s.713-744, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2000.
86. Yazıcı H, Hamuryudan V, Sonsuz A. İç Hastalıkları. 1. Baskı, İstanbul. İstanbul medikal yayıncılık, 2007: 856-880.
87. Eren M, Saltı-Temizel İN, Koçak N. İlaça bağlı hepatotoksisite. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2004; 47: 222-227.
88. Wanda MH, Colin GR, Matthew AW. Handbook of toxicologic pathology. 2nd Edition, California: Academic Press, 2002: 243-249.
89. Lee JI, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. J Hepatol 2003; 39: 960-966.
90. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. Toraks Dergisi 2001; 2: 91-95.
91. Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar. Anadolu Kardiyoloji Dergisi 2002; 4: 323-329.
92. 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.
93. Parlakpınar H, Koç M, Acet A. Yaşlanmada apoptosis ve melatoninin etkisi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2004;24:62-67.
94. Ergin M, Alkan S. Apoptozis. Arşiv 2002;11:495.
95. Woo M, Hakem A, Elia AJ, Hakem R, Duncan GS, Patterson BJ, et al. *In vivo* evidence that caspase-3 is required for Fas-mediated apoptosis of hepatocytes. J Immunol 1999; 163: 4909-4916.
96. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: Tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi 2003;4:165-174.

97. Di Fiore Histoloji Atlası. Demir R (Çev. Ed.) s.90, Palme Yayıncılık, Ankara, 2001.
98. Friedlander MR. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. NEJM 2003; 348: 1365-1375.
99. Hoijman E, Rocha Viegas L, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE, Pecci A. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. Endocrinology 2004; 145: 418-425.
100. Fulda S, Debatin KM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. Cancer Detect Prev 2006; 30: 217-223.
101. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. J Gastroenterol Hepatol 2000; 15: 109-120.
102. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997; 88: 355-365.
103. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev 2001; 15: 2922-2933.
104. Abbasoğlu E, Hoşal BM. Apoptozis: göz hastalıklarındaki yeri. Türkiye klinikleri Oftalmoloji Dergisi 2001; 10: 115-120.
105. Itoh K, Suzuki K, Bise K, Itoh H, Mehraein P, Weis S. Apoptosis in the basal ganglia of the developing human nervous system. Acta Neuropathol 2001; 101: 92-100.
106. Öztürk F. Apoptozis. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;9:143-148.
107. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet Pathol 2005; 42: 405-426.
108. Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology and Immunology. Özgüven T (Çev. Ed.) s 428-438, Ankara, Güneş Kitabevi, 2001.
109. Abbas AK, Lichtman A. Temel İmmünoloji İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları. Deniz G (Çev. Ed.) s.63-69, İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007.

110. Demir R. Histolojik Boyama Teknikleri Başvuru Kitabı. 1. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2001: 227-237.
111. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 1981; 29: 577-580.
112. Linnoila I, Petrusz P. Immunohistochemical techniques and their applications in the histopathology of the respiratory system. Environ Health Perspect 1984; 56: 131-48.
113. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 1990; 186: 407-421.
114. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34: 497-500.
115. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70: 158-169.
116. Aebi H. Catalase. In Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer HU (Ed). New York, Academic Press, 1974: 673-677.
117. Baydas G, Ozveren F, Akdemir I, Tuzcu M, Yasar A. Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin. J Pineal Res 2005;39:50-56.
118. Dünderöz MR, Türkbay T, Akay C, Sarıcı US, Aydın A, Denli M, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescents with inhalant abuse. Turkish Journal of Pediatrics 2003; 45: 43-45.
119. Zavodnik LB, Zavodnik IB, Lapshina EA, Belonovskaya EB, Martinchik DI, Kravchuk RI, et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. Cell Biochem Funct 2005; 23: 353-359.

120. Halifeoglu I, Canatan H, Ustundag B, Ilhan N, Inanc F. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. *Cell Biochem Funct* 2000; 18: 263-267.
121. Hobara T, Okuda M, Gotoh M, Oki K, Segawa H, Kunitsugu I. Estimation of the lethal toluene concentration from the accidental death of painting workers. *Ind Health* 2000; 38: 228-231.
122. Öñiz H. Apoptoz: ölmeye yatmak. *Sağlık Bakanlığı Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi* 2004; 14: 1-20.
123. Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res* 1998; 24: 179-192.
124. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ. Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2002; 32: 143-148.
125. Sanchez E, Fernandez-D'Pool J. Liver function in patients exposed to a toluene in a hydrocarbon processing plant. *Invest Clin* 1996; 37: 255-270.
126. Brautbar N, Williams J. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. *Int J Hyg Environ Health* 2002; 205: 479-491.
127. Ceylan E. Bingöl Verem Savaş Dispanseri'nde tüberküloz tedavisine bağlı toksik hepatit sıklığı. *Toraks Dergisi* 2005; 2: 132-136.

6. ÖZGEÇMİŞ

15.05.1977 tarihinde Malatya’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya’da tamamladım. 1996 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım. 1999 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesine yatay geçiş yaptım. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. Mezun olduktan sonra 2004 yılına kadar Malatya ili Kuluncak ilçesinde pratisyen hekim olarak çalıştım. 2004 yılı Nisan dönemi TUS sınavında başarılı olarak, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında uzmanlık yapmaya başladım. Evliyim ve bir çocuk sahibiyim.