

**Subkronik Tiner İnhalasyonunun Ratlarda DNA Hasarı, Protein
Oksidasyonu,Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelerdeki
Değişimleri ve Bunlara α -Lipoik Asitin Etkisinin Araştırılması**

Yüksek Lisans Tezi

Bio. Tuğba ŞAHİN

Prof.Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ARALIK 2008

**Bu tez TUBİTAK HIZLI-DESTEK Programı Kapsamında, 107T615
Proje No ile Desteklenmiştir.**

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Yüksek Lisans Tezi

**Subkronik Tiner İnhalasyonunun Ratlarda DNA Hasarı, Protein
Oksidasyonu, Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelerdeki
Değişimleri ve Bunlara α -Lipoikasitin Etkisinin Araştırılması**

Bio. Tuğba ŞAHİN

Prof. Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ARALIK 2008

ONAY SAYFASI

Prof.Dr. Muhsin KONUK danışmanlığında, Tuğba ŞAHİN tarafından hazırlanan Subkronik Tiner İnhalasyonunun Ratlarda DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu, Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimleri ve Bunlara α -Lipoikasitin Etkisinin Araştırılması başlıklı bu çalışma, lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca/...../2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı, SOYADI	İmza
Başkan:	Prof.Dr. Muhsin KONUK	
Üye:	Doç. Dr. Mustafa CEMEK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ	

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetin Kurulu'nun
...../...../2008. tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Zehra BOZKURT
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
RESİMLER DİZİNİ.....	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Selülozik Tiner.....	4
2.2. Tinerin Farmakokinetiği ve Metabolizması.....	5
2.3. Tinerin Dağılımı ve Etkileri.....	6
2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemleri	7
2.4.1. Serbest Radikaller	7
2.4.1.1. Oksijen ve Oksijen Radikalleri	8
2.4.1.2. Azot Radikalleri	12
2.4.2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	13
2.4.2.1. Endojen Kaynaklar	13
2.4.2.2. Ekzojen Kaynaklar	15
2.4.3. Oksidatif Stres	16
2.4.3.1. Tiner ve Oksidatif Stres.....	17
2.4.4. Serbest Radikallerin Etkileri	18
2.4.4.1. Lipitlerde Oksidatif Hasar	19
2.4.4.2. Proteinlerde Oksidatif Hasar	19
2.4.4.3. Karbonhidratlarda Oksidatif Hasar	20
2.4.4.4. DNA’da Oksidatif Hasar	20
2.4.5. Antioksidan Savunma Sistemleri, Antioksidanlar	23
2.4.5.1. Hücre İçi Savunmada Görev Alan Antioksidanlar.....	24
2.4.5.2. Hücre Dışı Savunmada Görev Alan Antioksidanlar	25
2.4.6 . α -Lipoik Asit	26
2.4.6.1. Lipoik Asidin Etki Mekanizması	29
2.4.6.2. Lipoik Asidin Antioksidan Aktivitesi	30
2.4.6.3. Lipoik Asidin Etkileri.....	31
2.4.6.4. Lipoik Asidin Klinikte Kullanımı	32
3. MATEYAL ve METOD	35
3.1. Araç ve Gereçler	35
3.2. Kimyasal Maddeler.....	36
3.3. Deney Hayvanları	37

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	38
3.4.1. Deneysel Gruplar ve Deneme Protokolü.....	38
3.5. Kan Örneklerinin Alınması.....	39
3.6. Mononükleer Lökositlerin Ayrıştırılması.....	40
3.7. Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasar Tayini	40
3.8. MDA Tayini.....	44
3.9. Methemoglobin Düzey Tayini.....	45
3.10. Protein Oksidasyonu.....	46
3.11. Total Antioksidan Kapasite	46
3.12. Redükte Glutasyon Tayini.....	47
3.13. NOx.....	47
3.14. Glikoz, Total Kolesterol, Trigliserid, HDL Kolesterol, LDL Kolesterol AST, ALT ve Toluol düzeyleri Tayinleri.....	49
3.15. İstatistik Analizler.....	49
4. BULGULAR	50
4.1. Beden Ağırlığı Profilleri	50
4.2. Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimler	51
4.2.1. Plazma Glikoz Düzeyleri	53
4.2.2. Kolesterol ve Trigliserid Düzeyleri.....	53
4.2.3. LDL-Kolesterol ve HDL-Kolesterol Düzeyleri	55
4.2.4. AST ve ALT Düzeyleri	56
4.2.5. MDA Düzeyleri.....	58
4.2.6. Mononükleer Lökosit DNA Hasar Düzeyleri	58
4.2.7. Protein Oksidasyonu.....	59
4.2.8. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri	60
4.2.9. GSH Düzeyleri	61
4.2.10. NO Düzeyleri	62
4.2.11. MetHb Düzeyleri.....	62
4.2.12. T grubu Toluol Düzeylerinin Bazı Parametrelerle olan İlişkisi	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	XII

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Subkronik Tiner İnhalasyonunun Ratlarda DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu, Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimleri ve Bunlara α -Lipoik Asitin Etkisinin Araştırılması

Tuğba ŞAHİN

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhsin KONUK

Uçucu maddelerin endüstriyel amaçlar dışında keyif verici ve uyarıcı olarak kötüye kullanımı önemli boyutlardadır. Endüstriyel amaçla yaygın kullanılan tiner ve benzeri çözücülerin inhalasyonu ROS'inin aşırı üretilmesine neden olduğu ve DNA, proteinler ve lipidlere etki ederek hücre hasarına ve yaşlanmaya neden olduğu bilinmektedir. Organizma ise serbest radikallerin zararlı etkilerini enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivasyonu ile dengeleyip uzaklaştırmaktadır. Çalışmamız, subkronik tiner inhalasyonunun oksidan-antioksidan denge üzerine etkilerini ve toksisitenin oksidatif stresle ilişkili olup olmadığını belirlemek ve α -lipoik asitin subkronik tiner toksikasyonuna karşı koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, kontrol grubu (K), zeytin yağı (Z), α -lipoik asit (LA), tiner (T) ve tiner + α -lipoik asit (LAT) olmak üzere, her grupta 15 Sprague-Dawley cinsi rat içeren 5 grup oluşturulmuştur. Deneme süresi olan 8 hafta sonra deneklerden alınan kan örneklerinde; MDA, GSH, MetHb, Toluol ve Mononuklear Lökosit DNA hasar düzeyleri, protein oksidasyonu, NO_x metabolitleri, TAK, Glikoz, Total Kolesterol, Trigliserid, HDL Kolesterol, LDL Kolesterol, AST ve ALT düzeyleri tespit edildi. Elde edilen veriler SPSS paket programı kullanılarak Anova ve Duncan testleri ile analiz edilmiş, p<0.05 anlamlı değeri kabul edilmiştir. Sonuç olarak, çalışmadan elde ettiğimiz veriler subkronik tiner inhalasyonuna maruz kalmış ratlarda artmış oksidatif stresin olumsuz etkilerinin tamponlamasında ve komplikasyonların önlenmesi veya hafifletilmesinde α -lipoik asitin koruyucu olabileceğini ortaya koymaktadır.

2008, 98 sayfa

Anahtar Kelimeler: Tiner, Oksidatif Stres, Lipit peroksidasyonu, α -Lipoik Asit

ABSTRACT

M. SC Thesis

**Determination of Effect α -Lipoic Acid on
DNA Damage, Protein Oxidation, Lipid Peroxidation and Some Biochemical Paramets
at Subchronic Thinner Inhalated Rats.**

Tuğba ŞAHİN

Afyon Kocatepe Universty Graduate School of Naturel and Applied Sciences

Department of Biyology

Supervisor: Prof. Dr. Muhsin KONUK

The misuse of volatile chemicals for pleasure rather than industrial purposes has been increasing for a long time. Some of the well known side effects of thinner and thinner like compounds are: causing the increase of ROS, damage to cellular components e.g. DNA, proteins, lipids and cellular aging. Living organisms defend and tolerate themselves against to their harms. The present study was carried out to determine both the effects of sub-chronic thinner inhalation on oxidant-antioxidant balance, and relation between toxicity and oxidative stress and possible protective effect of α -lipoic acid against to thinner toxication in rats. In the study, rats, Sprague-Dawley, were divided into 5 groups as follow: Control (K), Olive oil (Z), α -lipoic acid (LA), Thinner (T), and α -lipoic acid+thinner (LAT). Each group was composed of 15 rats and study lasted 8 weeks. After completing the animal studies, MDA, GSH, MetHb, Toluol, and mononuclear leucocyte damage levels, protein oxidation, NO_x metabolites, TAC, Glucose, Total Cholesterol, triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, AST and ALT levels were determined in the blood specimen of the rats employed. The data obtained from the study were analysed statistically by using SPSS package software and both Anova and Duncan tests were performed. p<0.05 level was accepted as statistically significant level. The results indicated that α -Lipoic acid has protective and balancing effect against to complications occurred by thinner inhalation in rats.

2008, 98 page

Key words: Thinner, Oxidative Stress, Lipid peroxidation, α -Lipoic Acid

TEŐEKKÖR

Tez boyunca iyi niyet ve sabırla beni destekleyen yardımları ve yol göstericiliği ile bana kuvvet veren, değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Muhsin KONUK'a sonsuz teőekkör ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca hep yardımcı olan, deneyimlerinden faydalandığım hocalarım Yrd. Doç. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ'ye, Dr. A. Fatih FİDAN'a ve Yrd. Doç. Dr. S. Elif KORCAN'a teőekkörü bir borç bilirim. En sıkıntılı anlarımda bana destek olan, hiç bıkmadan gece gündüz beni dinleyen ve hep gülümsememi sağlayan dostlarıma ve hep yanımda olan bana her zaman inanan, güvenen, destek olan, varlığı ile daima güç veren aileme sonsuz teőekkör ediyorum.

Son olarak, bu tez çalışmasını desteklediği için TÜBİTAK'a da teőekkör ederim.

Tuğba ŞAHİN

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1. Simgeler

°C	: Santigrad Derece
gr	: Gram
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	:Milimol
ng	:Nanogram
nm	:Nanometre
nmol	:Nanomol
UI	:Arbitrary unit
α	:Alfa
β	:Beta
μ g	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre
μ mol	: Mikromol

2. Kısaltmalar

•OH	: Hidroksil radikali
$^1\text{O}_2^-$	: Singlet oksijen
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
DHLA	: Dihidrolipoik asit
DMSO	: Dimetil sulfoksid
DNPH	: 2,4-dinitrofenilhidrazinin
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
GABA	: Gamaaminobütirik asit
GC-MS	: Gaz kromatografisi kütle spektrometresi

GSH	: Glutasyon (indirgenmiş)
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Glutasyon (yükseltgenmiş)
H [•]	: Hidrojen
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
HDL	:Yüksek dansiteli lipoprotein
HMA	:Yüksek Kaynama Dereceli Agaroz
HNO ₃	: Nitrik asit
K	: Kontrol Grubu
L	: Lipoik Asit grubu
LA	: Lipoik asit
LAT	: Lipoik asit+ Tiner grubu
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LMA	: Düşük Kaynama Dereceli Agaroz
LP	: Lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
MetHb	: Methemoglobin
NaCl	: Sodyum klorür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)
NaOH	: Sodyum hidroksit
NEDD	: N-(1-naphthyl) ethylenediamin
NO	: Nitrik oksit
NO ₂	: Nitrojen dioksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NO _x	: Nitrik Oksit metabolitleri
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit radikali
OH [•]	: Hidroksil
ONOOH	: Peroksinitrit
PCO	: Protein karbonil
PDH	: Pirüvat dehidrogenaz
PKC	: Protein kinaz C

RO•	: Alkoksil
ROO-	: Peroksil radikal
SCGE	: Single Cell Gel Electrophoresis
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
Stkrn oksdz	: Sitokrom oksidaz
T	: Tiner grubu
TBA	: Tiobarbitüric asid
TCA	: Trikloroasetik asid
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü
VC13	: Vanadium klorür
VLDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
Z	: Zeytin yağı grubu
α -LA	: Alfa lipoik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Çocukluk çağında kullanılan uyuşturucu maddeler.....	3
Şekil 2.2. Moleküler Oksijenin Farklı Formlarının 2p Orbital	9
Elektronlarının Konfigürasyonu.....	9
Şekil 2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistemin Denge Hücrenin.....	16
Kaderini Belirler.....	
Şekil 2.4. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türlerinin Vücuttaki Etkileri.....	18
Şekil 2.5. Serbest radikal aracılığı ile oksidatif DNA hasarı	22
Şekil 2.6. Alfa Lipoik Asit.....	27
Şekil 2.7. Lipoik Asit ve Dihidrolipoik Asidin Kimyasal Yapıları	27
Şekil 2.8. Alfa Lipoik Asidin R ve S formlarının Kimyasal Yapıları	28
Şekil 2.9. Antioksidan rejenerasyon yolu. R-lipoik asit vitamin E, vitamin C ve onun redükte formlarında geri dönüşüm yaparken dihidrolipoik asit mitokondri içinde güçlü antioksidan olarak aktivite gösterir.....	30
Şekil 2.10. R-Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin antioksidan etkisi.....	30
Şekil 3.1. Comet Analiz Akış Diyagramı	41
Şekil 3.2. Comet Analiz Tekniğinde Kullanılan Puanlandırma Cetveli.	44
Şekil 3.3. Sodyum Nitrat Kalibrasyon Eğrisi	49
Şekil 4.1. Beden Ağırlığı Profilleri.....	50
Şekil 4.2. Plazma Glikoz Düzeyleri.....	53
Şekil 4.3. Gruplardaki Plazma Kolesterol Düzeyleri.....	54
Şekil 4.4. Gruplardaki Plazma Trigliserid Düzeyleri	54
Şekil 4.5. Plazma LDL-kolesterol Düzeyleri.....	55
Şekil 4.6. Plazma HDL-kolesterol Düzeyleri	56
Şekil 4.7. Grupların AST Düzeyleri	57
Şekil 4.8. Grupların ALT Düzeyleri	57
Şekil 4.9. MDA Düzeyleri	58
Şekil 4.10. Deney Gruplardaki Ratların Mononukleer Lökosit.....	59
DNA Hasar Düzeyleri.....	59
Şekil 4.11. Gruplardaki Protein Oksidasyonu Düzeyleri.....	60
Şekil 4.12. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri	61
Şekil 4.13. Kan GSH Düzeyleri.....	61
Şekil 4.14. Gruplardaki NOx Düzeyleri	62
Şekil 4.15. Gruplardaki MetHb Düzeyleri.....	63

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Deney Hayvanları.....	37
----------------------------------	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sık Karşılaşılan Radikaller, Simgeler ve Kimlikleri	10
Çizelge 4.1. Gruplarda Gözlenen Beden Ağırlığı Değişimi.....	50
Çizelge 4.2. Ölçülen Parametrelere Ait Bulguların Aritmetik Ortalama, Standart Hata ve Anlamlılık Düzeyleri.....	52
Çizelge 4.3. Kan Toluol düzeyi ile DNA hasarı ve bazı Oksidan/Antioksidan parametreler arasındaki ilişki düzeyleri.....	64

1.GİRİŞ

Sanayide yaygın olarak kullanılmaları nedeniyle imalattan günlük yaşama, birçok aşamada insanlar uçucu çözücülere inhalasyon, deri ve oral yol ile maruz kalmaktadırlar (Vural 1996). Son yıllarda bu maddelerin özellikle de tinerin uyuşturucu amaçlı kullanılması söz konusu olmuştur. Diğer uyuşturucu maddelerin pahalı, temininin zor ve kullanımının yasak olması nedeniyle, daha çok sosyoekonomik düzeyi düşük ve ailevi problemleri olan gençler tarafından tiner tercih edilmektedir. Tinerin uyuşturucu amaçlı kötüye kullanımı ülkemizde de sağlık açısından ve sosyal açıdan giderek önemli bir sorun haline gelmektedir. Bu yüzden tinerin kötüye kullanılmasının sağlık üzerindeki etkilerinin belirlenmesi; bu çocukların, ailelerinin ve toplumun bu konuda bilgilendirilmesi ve eğitilmesi gereklidir. Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi Alkol ve Madde Bağımlıları Araştırma ve Tedavi Merkezi'nin (AMATEM) kayıtlı verilerine göre, tiner bağımlılığı nedeniyle tedavi için başvuran çocuk sayısı 1995 yılı içine 529 olmuştur. İngiltere'de ise narkotik amaçla kullanılan uçucu bileşik inhalasyonunun yılda yaklaşık 100 ölüme yol açtığı bildirilmektedir (Flanagan et al. 1990).

Çevresel ve kimyasal ajanlara maruz kalma, hücrelerde radikal oluşumu ve reaksiyonlarını arttırarak oksidatif strese yol açmaktadır. Oksidatif strese neden olan tehlikeli reaktif oksijen türleri, çeşitli biyolojik makromoleküllerle (DNA, RNA, lipoproteinler) kolaylıkla etkileşebilmektedir. Bir organik çözücü olan tinerin toksik etkisi reaktif oksijen bileşikleri (ROS) oluşması şeklinde ortaya çıkmakta ve serbest radikallerin aşırı üretimi veya yetersiz nötralisasyonu proteinler, lipitler ve DNA'da hasara yol açmaktadır. Birçok uçucu bileşik ve/veya karışımların uzun süreli olarak kullanımının akciğer ve karaciğerde kalıcı hasarlara yol açtığı gösterilmiştir (Al-Alousi 1989, Marjot and McLeod 1989). Organik solventlerin hücre hasarındaki toksik etkilerini reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşumu yolu ile gösterdikleri de bildirilmiştir (Mattia et al. 1991). Süperoksid anyonu, ferril ve hidroksil iyonları gibi reaktif oksijen ürünlerinin lipid peroksidasyonlarını başlattığı bilinmektedir. Geleneksel olarak dokularda ROS'un yaptığı hasar lipid peroksidasyonlarının ölçümü ile belirlenmektedir. Biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonlarına yol açan ROS oluşumu membran fonksiyonlarının bozulmasına böylece akışkanlığın azalmasına, membrana bağlı proteinlerin inaktivasyonuna, hücre-içi Ca^{2+} düzeyi artışı ve Ca^{2+} Mg^{2+} ATP-az aktivitesi artışlarına neden olmaktadır (Lebel and Schatz 1990, Mattia et al. 1991). Bazı organik solventlerin ve toluenin pulmoner alveoler makrofajlarda ve akciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyonlarını başlattığı (Suleiman 1987, Stickney 1989), karaciğerde ise ileri ROS

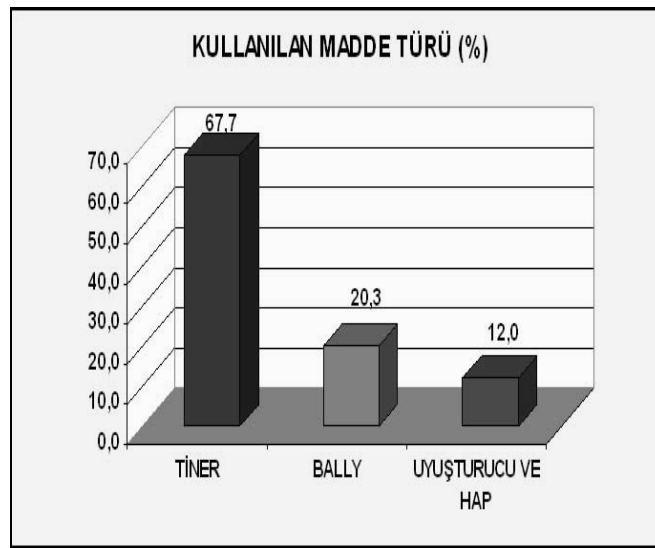
oluşumunu hızlandırdığına ait deneysel çalışmalar mevcuttur (Mattia et al. 1993). Peroksidatif hasarlarda artma ve antioksidan kapasitelerde ise azalmalar, yüksek doz tiner inhalasyonunun doğurduğu önemli komplikasyonlardır. Ancak solventlerin karışım halinde bulunduklarında çok düşük konsantrasyonlarda bile olsalar, birbirleriyle sinerjik etki gösterdiklerini ve hatta birbirlerinin toksik etkilerini arttırabildiklerini de göz önünde bulundurmalıdır.

Lipoik asit bilinen çok yönlü antioksidanlardan biridir. Lipoik asit sitrik asit döngüsünde asetil CoA sentezinden sorumlu olan pirüvat dehidrogenaz (PDH) enzim komplekslerinin aktivitesinde çok önemli role sahiptir (Perham 1991). Yağ ve suda fonksiyon gösterebilen lipoik asit; serbest oksijen, süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri, hipoklorit ve peroksinitrit gibi geniş bir yelpazedeki serbest radikallerin nötralizasyonunu başarabilir (Biewenga ve ark. 1997). En iyi antioksidan olarak kabul edilen lipoik asit, Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , ve Pb^{2+} gibi geçiş metallerle stabil kompleksler yaparak biyolojik sistemlerdeki ağır metalleri de etkisizleştirebilmektedir.

Bu tez çalışmasında organik solventlerden selülozik tinerin organizmada oluşturacağı oksidatif stres ve buna bağlı olarak oluşan hücre hasarına karşı lipoik asitin koruyucu etkisinin araştırılması ile hem endüstriyel boyutta işçi sağlığının korunmasında hem de uçucu maddeleri kullanan bağımlıların tedavilerinde yeni modülasyonların geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Organik çözücüler gerek günlük yaşantımızda evlerde, gerekse endüstride birçok iş yerinde yaygın olarak kullanılan sıvı maddelerdir. Sayıları her geçen gün artmaktadır. 1880'lerde yirmi kadar çözücü bilinirken, bugün sayıları binleri geçmektedir. Bunlardan en az üç yüz tanesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çözücüler başlıca; inceltici olarak boyalarda, cilalarda, yapıştırıcılarda, daktilo düzelticilerinde, kuru temizleme sıvılarında bulunmaktadır (Ramsey et al. 1989, Flanagan et al. 1990). Tinerin endüstriyel amaçlı kullanımının yanı sıra son yıllarda uyuşturucu amaçlı kullanımı da söz konusu olmuştur.



Şekil 2.1. Çocukluk çağında kullanılan uyuşturucu maddeler (İnt.Kyn.1).

Tiner temini kolay, ucuz ve kullanılması yasak olmadığı için özellikle de sosyoekonomik düzeyi düşük ve ailevi problemleri olan gençler tarafından uyuşturucu madde olarak suistimal edilmektedir (Flanagan et al. 1990, Mattia et al. 1991). Kötü amaçlı organik çözücü inhalasyonu en çok yirmi yaşın altındaki gençlerde görülür. Fakat beş yaşın altında ve altmış yaşın üzerinde bildirilen vakalar da mevcuttur (Cross et al. 1987). İngiltere'de 1984–1986 yıllarında adölesan okul çocukları arasında rapor edilen uçucu madde suistimalinin prevalansı %5-9'dur (Flanagan et al. 1990, Mattia et al. 1991). Ülkemizde ise 1990 yılında İstanbul'da üniversite öğrencilerinde yapılan başka bir araştırmada sedatif hipnotik kullanım oranı %15, uyarıcı ilaç kullananlar %2,6 ve esrar kullanımı olanlar %6 olarak bulunmuştur (Yüksel ve Dereboy 1994). 1995 yılında Sağlık Bakanlığının 7 ilde yaptığı bir çalışmada alkol dışı madde kullanım oranı %3,5 olarak bulunmuştur.

2.1. Selülozik Tiner

Selülozik ve sentetik olmak üzere iki çeşit tiner bulunmaktadır. Ülkemizde bulunan tiner genellikle boya tineri olarak adlandırılmaktadır. Çalışmamızda selülozik tiner kullanılmıştır. Selülozik tiner; bünyesinde hidrokarbonlar, esterler, glikol eterler, ketonlar ile alkoller bulunduran ve nitro-selüloz esaslı her türlü boyaların, verniklerin vizkozitelerini düşürerek uygulama kolaylığı sağlamak için kullanılan çözücü karışımdır (Tiner 1992). Boya tineri, kimyasal yapısından dolayı saf bir madde olarak tanımlanamaz, gaz kromatografik analizinde 200'den fazla aromatik ve alifatik maddenin karışımından oluştuğu ortaya çıkmıştır (Carabez et al. 1998).

Ülkemizde kullanılan tinerin fiziksel ve kimyasal özellikleri Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından belirlenir. Buna göre selülozik tinerin asetik asit oranı en çok % 0.03, toplam hidrokarbon miktarı en çok % 56, aromatik hidrokarbon oranı en az % 30, alifatik hidrokarbon oranı en çok % 25 ve alkoller, esterler, ketonlar, glikol eterlerin oranı ise en az % 44 olmalıdır. Benzen ve klorlu hidrokarbonlar bulunmamalıdır. Toluenle seyrelme oranı en az %1 olmalıdır (Tiner 1992). İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü tarafından ülkemizdeki selülozik tinerin içeriğini gaz kromatografisi metodu ile analiz edilmiştir. Sonuçlara göre ülkemizdeki tinerler, yaklaşık olarak % 63 oranında toluen, % 13 aseton, % 10 izobutil asetat, % 7,5 izobutanol, % 6,5 butilglikol içermektedir.

Toluen: Toluen, benzen halkasına metil grubu eklenmesi ile elde edilen aromatik bir hidrokarbondur (Ellenharn et al. 1988). Toluen yanıcı ve patlayıcıdır (Ramsey et al. 1989, Allen et al. 1992). Naftenden zengin petrol ürünlerinden ve kömürden hidroformasyon ile üretilir (Allen et al. 1992). Renksizdir ve karakteristik bir kokusu vardır. Endüstride boya, vernik, zambak, cila ve laklarda çözücü olarak sık bir şekilde kullanılır. (Ellenharn et al. 1988, Ramsey et al. 1989, Vural 1996). Toluen inhalasyon ve deri yolu ile absorbe edilir. Daha çok yağda çözünür olduğundan özellikle yağdan zengin olan sinir sistemi gibi dokularda yüksek konsantrasyonlara ulaşır (Ellenharn et al. 1988, Flanagan et al. 1990, Vural 1996). İnhal edilen miktarın %50'si absorbe edilir. Kullanım miktarı idrardaki hippurik asit miktarı ile monitörize edilebilir (Ellovaara et al. 1979, Ellenharn et al. 1988). Toluenin karsinojenik etkisi yoktur. Mutajenik etki olarak kromatid kırıkları yapar. Teratojenik, embriyotoksik olduğu ve plasentadan geçtiği bilinmektedir. İmpotans ve sperm hücre anomalileri yaptığı gösterilmiştir (Allen et al. 1992).

Aseton: Genel olarak izopropil alkolün dehidrojenasyonu sonucu elde edilir (Allen et al. 1992). Uçucu, yanıcıdır ve tipik bir kokusu vardır (Ellenharn et al. 1988). Kimyasal ve farmakolojik işlemlerde, tekstilde, tinerde, mürekkepte, yapışkanlarda, temizlik malzemelerinde ve laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılır (Allen et al. 1992). Hafif intoksikasyonda uyuşukluk, baş ağrısı, bulantı, kusma, konuşmada bozulma, ciddi intoksikasyonda ise koma gözlenebilir. Karsinojenik ve mutajenik etkisi gözlenmemiştir (Ellenharn et al. 1988, Allen et al. 1992).

İzobutil-asetat: İzobutil asetat, izobutil alkol ve asetik asitten elde edilir. Oksitleyici maddelerin varlığında veya orta derece ısıtıldığında yanıcı olup, buharı patlayıcıdır. Organik maddelerde çözücü ve tatlandırıcı olarak veya birçok karışımda butil asetat ve metil izobutil keton yerine kullanılabilir. Toksikasyonunda şiddetli ise baş ağrısı, bulantı, kusma, baş dönmesi, depresyon hali ve bilinç kaybı gözlenir. İzobutil asetatin karsinojen veya mutajen olmasına dair bir bilgi yoktur (Allen et al. 1992).

İzobutanol: Butiraldehidin alkole indirgenmesinde izobutanol meydana gelmektedir. İzobutanol yanıcı bir maddedir. Cilalarda, nitro sellüloz yapımında butil asetatla birlikte veya yağlarda, reçinelerde, verniklerde, formaldehid köpüğünde çözücü olarak kullanılır. Antibiyotiklerin, hormonların ve vitaminlerin farmakolojik sentezinde de kullanılmaktadır. İnhalasyonu ve deri emilimi fazla toksik değildir (Allen et al. 1992).

2.2. Tinerin Farmakokinetiği ve Metabolizması

İnhalan maddelerin en toksiklerinden biri olan tiner, vücuda solunum yoluyla alındıktan 10 saniye sonra bronşlardan kana karışmaktadır. Kan yoluyla tüm vücuda yayılmakta; adipoz dokuda, yüksek yağ içeren dokularda ve vasküler dokularda birikmektedir. Uzun süreli tiner kullanımının akciğer, karaciğer ve beyin dokularında kalıcı hasarlara yol açtığı gösterilmiştir (Mattia et al. 1991, Ulakoğlu et al. 1998a, Baydas et al. 2003). Toluen, kan yoluyla dokulara ulaştıktan sonra, çeşitli enzimatik etkileşimlerle diğer bileşiklere dönüşmektedir. Vücuda giren toluen; ilk olarak karaciğerde bulunan sitokrom P-450 (CYP-450) enzimleri ile etkileşerek yan zinciri hidroksillemekte ve benzil alkole dönüşmektedir. Daha sonra alkol dehidrogenaz enzimi ile oksitlenerek, benzaldehide ve aldehid dehidrogenaz etkisi ile benzoik aside transforme olmaktadır. Oluşan bu benzoik asidin, idrar yoluyla vücuttan atılması için bir

dönüşüme daha ihtiyacı vardır. Benzoik asit glisin ile birleşerek temel idrar metaboliti olan hippürik asidi oluşturur. Vücuda giren toluenin %60-70'i 24 saat içinde hippürik aside dönüştürülerek idrar yoluyla vücuttan atılmakta, %10-20'si de solunum ve terleme ile deriden atılmaktadır (Eisenberg 2003). Yarı ömrü 0,5-3 gündür (Filley 2004).

Yağda çözünen organik maddelerden oluşan uçucu maddelerin hepsi kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçerek, bilinç düzeyini etkiler. İnhalanların merkezi sinir sistemindeki farmakolojik etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak; alkole benzer biçimde, nöronal hücre membranının akışkanlığını ve beyin gama aminobütirik asit (GABA) düzeylerini arttırarak etki gösterebileceği öne sürülmüştür. Etkileri birkaç dakikadan birkaç saate kadar devam edebilir. İdrarda hippurat/ kreatinin oranının 1gr/gr'ın üstünde olması tiner kullanımını düşündürebilir; ancak, benzoik asit gibi gıda koruyucuların yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceği de unutulmamalıdır (Filley et al. 2004, Altındağ ve ark. 2001).

2.3. Tinerin Dağılımı ve Etkileri

Tinerin akut etkileri keyif verici olup; öfori, zindelik, ajitasyonu takiben gevşeme, baş dönmesi, görsel ve işitsel halusinasyonlar, yorgunluk ve uyku hali şeklinde gözlenir. Ayrıca kullanım sırasında öksürme, tükürük miktarında artış, deride kızarma, bulantı, kusma, fotofobi, uyum bozukluğu, diplopi, ataksi, konuşmada bozulma, reflekslerde azalma ve nistagmus ortaya çıkar (Meadows 1996). Kronik kullanımı sonrası aşırı kilo kaybı, yorgunluk, hırçın davranışların yanı sıra santral sinir sisteminde, kalpte, karaciğerde, akciğerlerde ve böbreklerde kalıcı hasarlar oluşur (Flanagan 1990, Meadows 1996, Ulakoğlu 1998a). Tiner, inhalasyonundan sonra, lipid yönünden zengin olan santral sinir sisteminde daha fazla toplanarak hasar oluşturur (Filley et al. 2004).

Bir çalışmada, altmış gün inhalasyon sonrası periferik miyelinli sinir liflerinin boyut ve kalınlıklarında değişiklikler tespit edilmiş, miyelin kılıfta ödem, aksonlarda incelmeye gözlenmiştir. Doksan gün sonrasında ise sinir liflerinde atrofi saptanmıştır (Carabez 1998, Filley et al. 2004).

2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemleri

Son on yıl içinde dünyanın çeşitli yerlerindeki araştırmacılar yeni, iki yönlü bir insan sağlığı modeli ortaya koymuşlardır. Bu modelin ilk kısmı serbest radikallerle ilgilidir. İkinci kısmı ise serbest radikalleri; önleme yönelik, bilince dayalı doğal bir sağlık sistemi yoluyla etkili bir şekilde kontrol altına alınmasıyla ilgilidir.

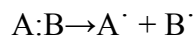
2.4.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir (Akkuş 1995). Atomlar, nötron ve protondan oluşan bir çekirdek ve bu çekirdeğin çevresinde dönen elektronlardan oluşurlar. Atom çekirdeğinin çevresindeki, elektronların bulunduğu boşluğa da orbital denir. Her bir orbitalde spinleri birbirine zıt ($\uparrow\downarrow$) olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşlenmiş veya ortaklanmış elektronlar denir (Halliwell 1987).

Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulundurduklarında bozulur. Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Başka bir ifadeyle serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir (Halliwell 1987, Cheeseman 1993). Kimyasal ve biyokimyasal tepkimeler daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir.

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir (Halliwell 2001).

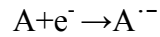
1- Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır):



2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (Akkuş 1995).

Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidirler. Zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde de önemli rol oynarlar. Moleküler oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunludur. Hücre farklılaşması ve apoptoziz, mikroorganizmalara karşı savunma, steroid yapıda çok sayıdaki bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için, serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur (Cheeseman 1993, Bergendi 1999).

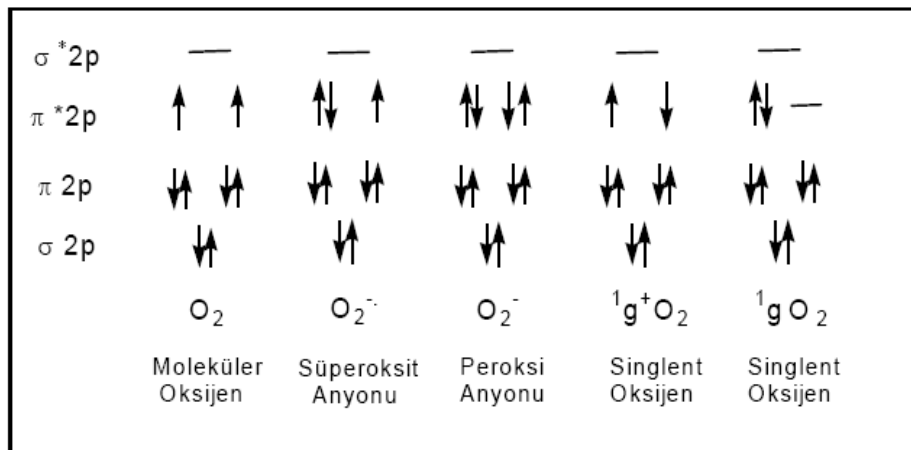
2.4.1.1. Oksijen ve Oksijen Radikalleri

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen *diradikal* yapıya sahip bir moleküldür. Fakat oksijenin reaktivitesi beklenenin aksine çok düşüktür. Diradikal yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir moleküle tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de farklı orbitallerde spinleri aynı yönde elektron içermesi gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere, atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bu nedenle, oksijenin diğer moleküllere olan

reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama *spin kısıtlaması* olarak adlandırılır. Oksijenin enzimatik olarak vücutta kullanımı sırasında, içerdikleri metal iyonlarının yardımı ile, spin kısıtlaması aşılar. Dış orbital elektronlarının mevcut durumunun değiştirilmesi onu reaktif hale getirir ve kullanımına olanak sağlar. Bu amaçla spin kısıtlaması iki yolla aşılabılır (Kılınç and Kılınç 2002).

a. Oksijene elektron transferi: Serbest metal iyonları, çok daha etkili olmak üzere ise, proteinlere bağlı metal iyonları aracılığı ile oksijene bir veya iki elektron aktarımı katalizlenebilir. Oksijene tek elektron transferi ile süperoksit radikali oluşur. Spin kısıtlaması kalktığı için süperoksit, oksijene göre çok daha reaktiftir. İki elektron transferi ile de peroksi anyonu oluşur. Bu tür ortamdan aldığı iki proton ile H_2O_2 oluşturur.

b. Enerji absorpsiyonu: Bu mekanizma ile oksijenin iki uyarılmış formu oluşur. Singlet oksijen (1O_2) diye adlandırılan oksijenin bu formlarında dış orbital paylaşılmamış elektronlarından birisinin spini değişmiştir. Delta formunda zıt spinli elektronlar aynı orbitalde veya sigma formunda ise ayrı ayrı orbitallerde bulunabilirler. Her iki formun reaktivitesi çok yüksektir. Oksijenin spin kısıtlaması aşılmış formları Şekil 2.2’de görülmektedir.



Şekil 2.2. Moleküler Oksijenin Farklı Formlarının 2p Orbital Elektronlarının Konfigürasyonu (Kılınç and Kılınç 2002).

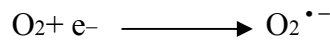
Oksijen bulunan bir ortamda oksijenin metabolize edildiği aerobik canlılarda daima radikal üretimi gerçekleşir. Hücresel koşullarda oluşabilen oksijen radikalleri ile oksijen içeren reaktif türlerin önemli olanları Çizelge 2.1’de görülmektedir (Dündar ve Aslan 2000).

Çizelge 2.1. Sık Karşılaşılan Radikaller, Simgeler ve Kimlikleri (Dündar ve Aslan 2000).

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H•	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O ₂ • ⁻	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH•	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O ₂ ⁻	Yarılma ömrü hızlı, güçlü oksidatif etkili
Perhidroksi radikal	HO ₂ •	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO•	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl ₃	CCl ₄ metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Thyl radikali	RS•	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO•	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L- arjinin amino asitinden in vivo üretilir.
Nitrojen dioksit	NO ₂	NO’nin oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

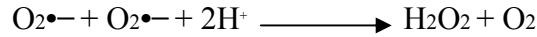
Canlı organizmada oluşabilen radikallerin sayısı yüzlerle ifade edilse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalının özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler (Kılınç ve Kılınç 2002).

1.Süperoksit Radikali: Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali, O₂•⁻’ dir. O₂•⁻ kimyasal olarak oksijen molekülüne bir elektronun eklenmesi ile oluşur (Halliwell 1984, 1992).

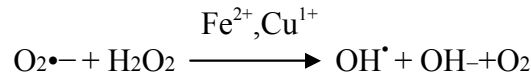


Bu reaksiyon, elektronların mitokondride solunum zincirlerindeki taşıyıcılardan sızması ve direkt olarak oksijene geçmesi ile meydana gelebilir. $O_2^{\bullet-}$ in en önemli kaynağı polimorfonüveli lökositler (PMNL) dir. PMNL'lerdeki üretim, membrana bağlı redükte NADPH oksidaz şantı veya heksoz monofosfat şantının bir sonucudur (Halliwell 1984, 1991).

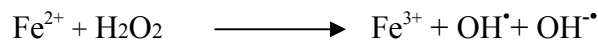
2. Hidrojen Peroksit: H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ 'in dismutasyonundan sonra NADPH oksidaz şantından PMNL'ler tarafından üretilir. Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin esas üretimi; $O_2^{\bullet-}$ 'in dismutasyonu ile olup, iki O_2^- yapılarına iki hidrojen atomu alarak H_2O_2 ve O_2 oluştururlar. Bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) adı verilen enzim tarafından katalizlenir (Cheeseman 1993). H_2O_2 , birçok fizyolojik fonksiyonu olan zayıf bir oksidandır. Hücre membranları arasında serbest olarak difüze olabilme yeteneği mevcuttur. H_2O_2 , fizyolojik pH ve ısıda, metal iyonları yokluğunda oldukça istikrarlı olması yanında, özellikle proteinlerdeki “hem” grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur (Halliwell 1984, 1991). Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında LPO gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Bu reaksiyona Fenton Reaksiyonu adı verilir (Halliwell 1992).



3. Hidroksil Radikali (OH $^-$): Bilinen en reaktif oksidandır. Yarılanma ömrü çok kısadır. Haber-Weiss reaksiyonu ile veya Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 'ten meydana gelir (Halliwell 1992).



Demir iyonları katalizörlüğünde “Fenton” tepkimesi gerçekleşir ve reaksiyon ortalama 4000 kez hızlanır (Dündar ve Aslan 2000).

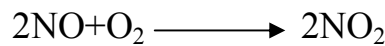


4. Singlet Oksijen: 1O_2 gerçek bir radikal değildir ve eşleşmemiş elektron içermez. Diğer reaktif oksijen türleri ile karşılaştırıldığında oldukça zararsızdır. 1O_2 , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünden ters yönde olan farklı bir

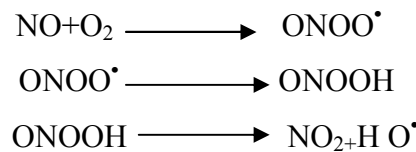
yörüngeye yer değiştirmesi ile oluşabileceği gibi, $O_2^{\cdot-}$ nin dismutasyonu ve H_2O_2 'in HOCl ile reaksiyonu sonucunda da meydana gelebilir (Foote 1984).

2.4.1.2. Azot Radikalleri

NO, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyonu içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan önemli bir pro-oksidatif ve antioksidatif sinyal molekülü olması yanında, çok reaktif bir radikaldir (Archer 1993, Alderton 2001). Reaktif nitrojen türleri lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir. Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen $NO^{\bullet}$ bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür. Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir. Nitrik oksit bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. NO.'ın yarı ömrü 10-20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz enziminin “hem” demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini sağlar (Moncada 1991, Reiter 1991, Lancaster1996). NO metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp nitrojen dioksidi (NO_2) oluşturur (Reiter 1991).



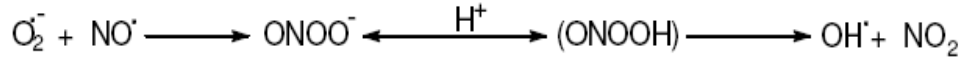
NO'ın radikal oksijen türleri ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti ($ONOOH$) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla $OH^{\bullet}$ radikalinin oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir:



1. Peroksinitrit ($ONOO^-$) :

$ONOO^-$, NO'nun $O_2^{\cdot-}$ ile *in vivo* reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir türevidir. NO ve $O_2^{\cdot-}$ 'in $ONOO^-$ 'e göre nispeten daha dayanıklı olmalarına karşılık, $ONOO^-$ daha reaktiftir.

ONOO⁻, konjugatı olan ONOOH ile bir denge halindedir. ONOOH, bir saniyeden az olan yarılanma ömrü ile anstabil ve hızla OH⁻ benzeri reaktiviteye sahip bir tür oluşturmak için parçalanır (Radi 1995).



ONOO⁻, eşlenmemiş elektron içermemesi nedeniyle serbest radikal değildir. Çok güçlü oksidan olması; dekompozisyonuyla OH⁻ benzeri ürün oluşması ve nitrokarbonat anyonu gibi çeşitli reaktif türlere kaynak oluşturmasıyla açıklanabilir. ONOO⁻ direkt olarak oksidatif DNA hasarına yol açmaktadır. LPO'yu başlatması, tiyoller, sülfidler, askorbat, proteinler ve karbohidratları okside etmesi, güçlü oksidan olduğunun kanıtıdır (Radi 1995, Kayalı 2004).

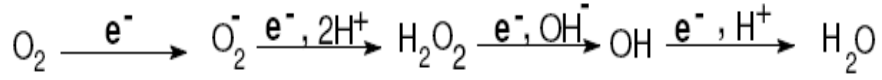
2.4.2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında olduğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkilerin etkisiyle de oluşabilir (Freeman et al. 1982, Halliwell 1984, Cheeseman et al. 1993, Gutteridge 1995). Böylece serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır

2.4.2.1. Endojen Kaynaklar

Normal olarak metabolizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da, bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır. Serbest radikallerin en fazla üretildiği metabolik işlem, mitokondriyal elektron transport zinciridir.

Elektron Taşıma Zinciri (ETZ): Mitokondrinin hücre için önemi büyüktür; çünkü enerji üretimini ve hücresel solunumu sağlar. Fizyolojik şartlarda ETZ ye giren oksijenin %1-3'ü O₂^{·-} dönüşmektedir (Valko 2006). Mitokondri iç zarında O₂^{·-} nin dismutasyonu ile hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşumu ilk kez 1971 yılında Loschen ve Flohe (Loschen 1971) tarafından gösterilmiştir.



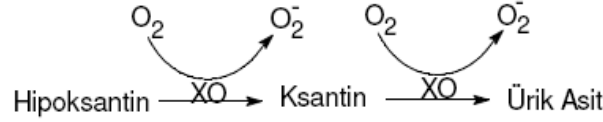
Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal oluşmasının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Fizyolojik koşullar altında mitokondriyal elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır (Sies 1991, Canbas 1994).

Sitokrom P-450 (CYP 450): Endoplazmik retikulumda bulunan bir enzim sistemidir. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda, membrana ilişkin sitokrom P-450 ve b5 gibi sitokromların yağ asitleri ile ksenobiyotiklerin oksidasyonu ve dioksijenin redüksiyonu ile serbest radikaller oluşur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur (Pal 1994, Çelik 2005).

Ksenobiyotikler: Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Metiadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin gibi bileşikler alternatif bir redoks siklusuna girerler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikalini oluştururlar (Halliwell 1991). Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intra sellüler renitin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan hidroksil radikali gibi ikincil radikallerin oluştuğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar (Brent et al. 1993).

Arakidonik asit metabolizması: Mikrozomal ve plazma membranı tarafından radikal üretiminin önemli enzimleri olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz (arakidonik asit metabolizması) aktivitesi, serbest oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında arakidonik asit salınımına yol açar (Akkuş 1995). Öte yandan lipooksijenaz lipid peroksitleri üzerinden lökotrienlerin oluşumunu katalize eder. Aynı zamanda bazı ksenobiyotiklerden bu esnada reaktif ara ürünler oluşmaktadır. Bu ara ürünler hedef yapılarla etkileşerek toksik etki gösterirler (Akkuş 1995, Çelik 2005).

Ksantin Oksidaz (XO): Çok yönlü ve hemen hemen bütün canlı türlerinde bulunan XO, pürinlerin hidroksilasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Hipoksantin, oksijen varlığında XO ile ksantine oksitlenir; ksantin ise aynı enzimle tekrar oksitlenerek ürik asidi oluşturur. Her iki adımda da $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 radikalleri oluşur (Borges 2002).



NADPH oksidaz: Özellikle fagosit ve lenfositlerde bulunan bu enzim mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma elemanıdır ve plazma membranının dış yüzeyinde yerleşmiştir. Bir mikroorganizma ile karşılaşıldığında nötrofiller aktive olarak lizozomal içeriklerini dışarıya vermeye başlarlar. SOR oluşumu ile birlikte mitokondri dışındaki oksijenin tüketiminde bir patlama gösterirler ve mikroorganizma yok edilir. Bu olaya “solunum patlaması” adı verilir ve bu olaydan sorumlu olan enzim NADPH oksidazdır (Cross 1987, Halliwell 1987).



Peroksizomlar: Özellikle karaciğerde bulunmakla beraber diğer bütün organlarda da mevcuttur. Yüksek miktarda oksidaz içerdiklerinden dolayı, çok önemli hücre içi H_2O_2 -kaynağıdır. Ancak peroksizomlarda katalaz aktivitesi de çok yüksek olduğu için H_2O_2 -’in zararlı etkisi kısmen ortadan kaldırılır (Freeman 1982, Halliwell 1987).

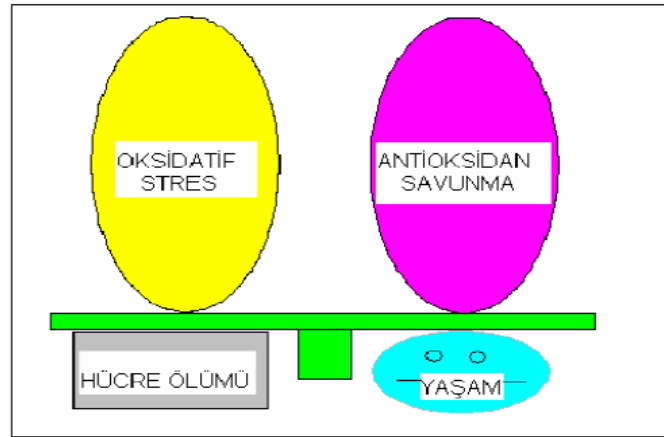
2.4.2.2. Ekzojen Kaynaklar

Çevresel kimyasal ajanlara maruz kalma gibi eksojen nedenler, hücrelerde radikal oluşumu ve serbest radikal reaksiyonlarını artırarak oksidatif strese yol açmaktadır (Stevenson et al. 1994, Dünder ve ark. 2000). Organizmadaki serbest radikal reaksiyonlarını arttıran ekzojen kaynaklar; diyetel, çevresel ve ilaçlar olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Doymamış yağ asitleri, dayanıklı olmayıp kolayca otooksidasyona uğramaktadırlar. Yüksek kalorili diyet özellikle mitokondri kaynaklı serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır (Cross 1987, Halliwell 1987, Valko 2006). Diyetel Fe ve Cu içeriğindeki artış, Haber-Weiss ve

Fenton reaksiyonlarını hızlandırmaktadır. Gıdaların uygun olmayan koşullarda hazırlanması ve saklanması da radikal reaksiyonları için uygun ortam yaratmaktadır (Halliwell 1984). Fazla miktarda ve uzun süre alkol alımı, sigaranın gerek dumanı gerekse katranı çeşitli radikallerin oluşmasına neden olmakta ve organizmanın antioksidan kapasitesini azaltmaktadır. Ozon, azot dioksit, kükürt dioksit, hidrokarbonlar ayrıca asbest ile ksenobiyotikler, önemli birer çevre sorunu ve radikal kaynağı olabilmektedirler (Cross 1987, Valko 2006).

2.4.3. Oksidatif Stres

Aerobik yaşam, reaktif oksijen türlerinin devamlı olarak üretilmesi ve bunların benzer bir hızla antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılması ile karakterizedir. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu durum özetle: Serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Serafini 2004).



Şekil 2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistemin Denge Hücrenin Kaderini Belirler (Serafini 2004).

Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyonu ($2O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$), nitrik oksit ($NO^{\cdot}$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$), ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini

oluştururlar (Babior 2000). Serbest radikal zincir reaksiyonları genellikle, moleküllerden H'nın uzaklaştırılmasıyla başlar. Mitokondriyal elektron transport zincirinde oksijenin tamamlanmamış redüksiyonu, sigara içimi, radyasyon gibi çeşitli faktörler oksidatif strese neden olabilirler (Kuyvenhoven 1999).

Oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarıyla birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumların patogeneğinde oksidatif stresin rolünden söz edilmektedir.

2.4.3.1. Tiner ve Oksidatif Stres

Organik solventlerin hücre hasarındaki toksik etkilerini, CYP-450'ye bağlı monooksijenazı arttırmak suretiyle, SOR oluşumu yolu ile gösterdikleri de bildirilmiştir. Oluşan süperoksit anyonu, ferril ve hidroksil iyonları gibi SOR'nin LPO'nu başlattığı bilinmektedir. Membranlarda LPO oluşması; membran fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Peroksidatif hasarlarda artma, antioksidan kapasitede ise azalma tiner inhalasyonunun doğurduğu önemli komplikasyonlardandır (Lebel et al. 1990, Mattia et al. 1993a, b).

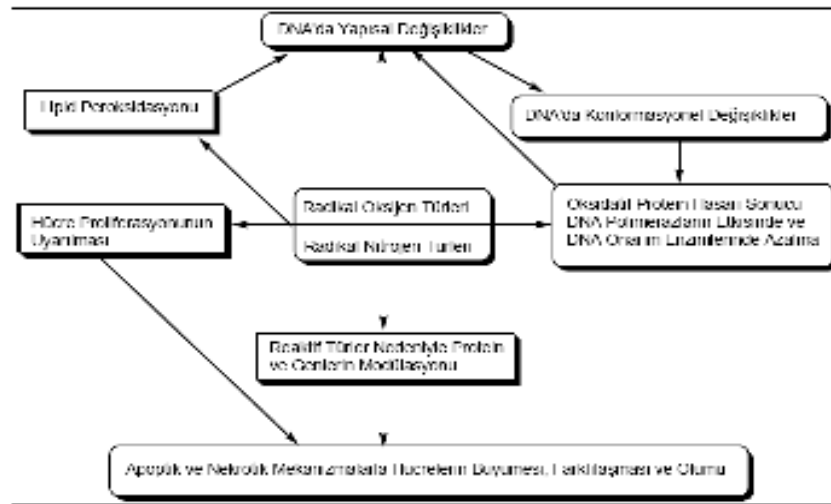
Toluen, kan yoluyla dokulara ulaştıktan sonra, çeşitli enzimatik etkileşimlerle diğer bileşiklere dönüşmektedir. Vücuda giren toluen; ilk olarak karaciğerde bulunan sitokrom P-450 (CYP-450) enzimleri ile etkileşerek yan zinciri hidroksillenmekte ve benzil alkole dönüşmektedir. Daha sonra alkol dehidrogenaz enzimi ile oksitlenerek, benzaldehide ve aldehid dehidrogenaz etkisi ile benzoik aside transforme olmaktadır. Oluşan bu benzoik asidin, idrar yoluyla vücuttan atılması için bir dönüşüme daha ihtiyacı vardır. Benzoik asit glisin ile birleşerek temel idrar metaboliti olan hippürik asidi oluşturur. Vücuda giren toluenin %60-70'i 24 saat içinde hippürik aside dönüştürülerek idrar yoluyla vücuttan atılmakta, %10-20'si de solunum ve terleme ile deriden atılmaktadır (Eisenberg 2003). Yarı ömrü 0,5-3 gündür (Filley et al. 2004). Tiner inhalasyonu sonucu vücutta oluşan toksik maddeler, CYP-

450 ile zararsız hale getirilmektedir. Ancak yüksek doz ve uzun süre kullanım, CYP-450'ye bağlı monooksijenazı arttırarak ve SOR oluşumunu aktive ederek, enzim indüksiyon sınırını aşınca vücutta biriken toksik metabolitler hücreye zarar verirler. Vücutta meydana getirdiği diğer etkileri de hipoksi, asidoz ve aşırı glutamat birikimidir (Iqbal 2001).

Tiner inhalasyonun belli bir doz üzerinde uzun süre alınması hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak beyinde birkaç bölgede, böbrekte, bağırsaklarda, karaciğerde çeşitli bozukluklara neden olur. Bu etkilerin bir kısmı biyokimyasal olarak lipid peroksidasyonu ve ROÜ aktivasyonu ile ortaya çıkar. Hücre membranı düzeyinde etkileri ile organizmalarda ödem, ateş, şişlik vb. oluşturarak enflamasyondan nekroza kadar gidebilecek bir tabloya neden olabilirler (Reiter 1998). Tinerin öğrenme ve hafıza üzerine olan olumsuz etkilerinde bu temel reaksiyonların aktive olması etkili olmuştur.

2.4.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller Şekil 2.4'de görüldüğü gibi hücrede lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklere etkilidir (Çelik 2005).



Şekil 2.4. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türlerinin Vücuttaki Etkileri (Çelik 2005).

Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ile membran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir. Radikaller yoğun olarak

üretildiklerinde, aerobik solunumu ve kapillar permeabiliteyi bozarak, hücrel potasyum kaybını ve kapillar trombosit agregasyonunu hızlandırır (Dündar 2000, Çelik 2005).

2.4.4.1. Lipitlerde Oksidatif Hasar

Lipid peroksidasyonu serbest radikal zincir reaksiyonu için iyi bir örnektir (doymamış yağ asitlerinin hücre membranlarında ve lipoproteinlerdeki oksidasyonu) (Kuyvenhoven 1999). Tüm biyolojik zarlar; poliansatüre yağ asitleri ile amfipatik lipidler ve zar proteinlerinin birleşmesinden oluşur. LPO, hücre membranında bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksit, alkol, aldehid, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli zararlı ürünlere dönüşmesidir. Yani LPO, doymamış yağ asitlerinin serbest radikallere ve oksijene bağımlı hasarıdır (Valko 2006). Oksidasyona uğrayan lipidler de, serbest radikal oluşturarak hücrel makromoleküllere hasar verebilmektedir. Membranın integral veya periferel proteinlerine ve DNA'ya çok yakın mesafede bulunan lipidlerden oluşan lipid alkoksil ($LO\bullet$) ve lipid peroksil ($LOO\bullet$) radikalleri, hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerine $OH\bullet$ radikalinden daha etkin olarak hasar yapabilmektedir. $OH\bullet$ radikaline göre daha düşük reaktiviteye sahip oldukları için hücreler ve dokular arasında taşınabilecek kadar uzun yarı ömürlü olan lipid hidroperoksidler ve karbonil bileşikler, başlamış olan serbest radikal reaksiyonlarını ilerletme ve oksidatif stresi hücre/dokuda yaygınlaştırma potansiyeline sahiptirler. Lipid oksidasyonunun neden olduğu oksidatif DNA hasarında metaller kritik rol oynamaktadır. $LOOH$ etkisi ile DNA'da tek dal kırığı oluşumunda Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının katalitik etki yaptığı ve Fe^{2+} 'nin, Fe^{3+} 'den daha etkin olduğu öne sürülmüştür (Yang 1996). LPO hücrel komponentlere en çok zarar veren reaksiyonlardan biridir. Reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerden en önemlileri; malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE)'dir (Baydas 2003, Gutteridge 1995).

2.4.4.2. Proteinlerde Oksidatif Hasar

Proteinler hücrenin yapı taşıdır, ayrıca önemli biyokimyasal reaksiyonlarda görevli enzimlerin yapı taşıdır. Proteinler yaklaşık yirmi amino asitten oluşmuştur. Serbest oksijen radikalleri, proteinlerde de yapısal değişiklikler meydana getirebilir. Ancak serbest radikallere karşı

lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler, serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin ölçülmesi ile proteinlerin oksidatif hasarı ölçülebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda; proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Enzimler protein yapısında olduklarından, enzim aktivitelerinde değişiklikler ortaya çıkar (Akkus 1995, Wu 2003).

2.4.4.3. Karbonhidratlarda Oksidatif Hasar

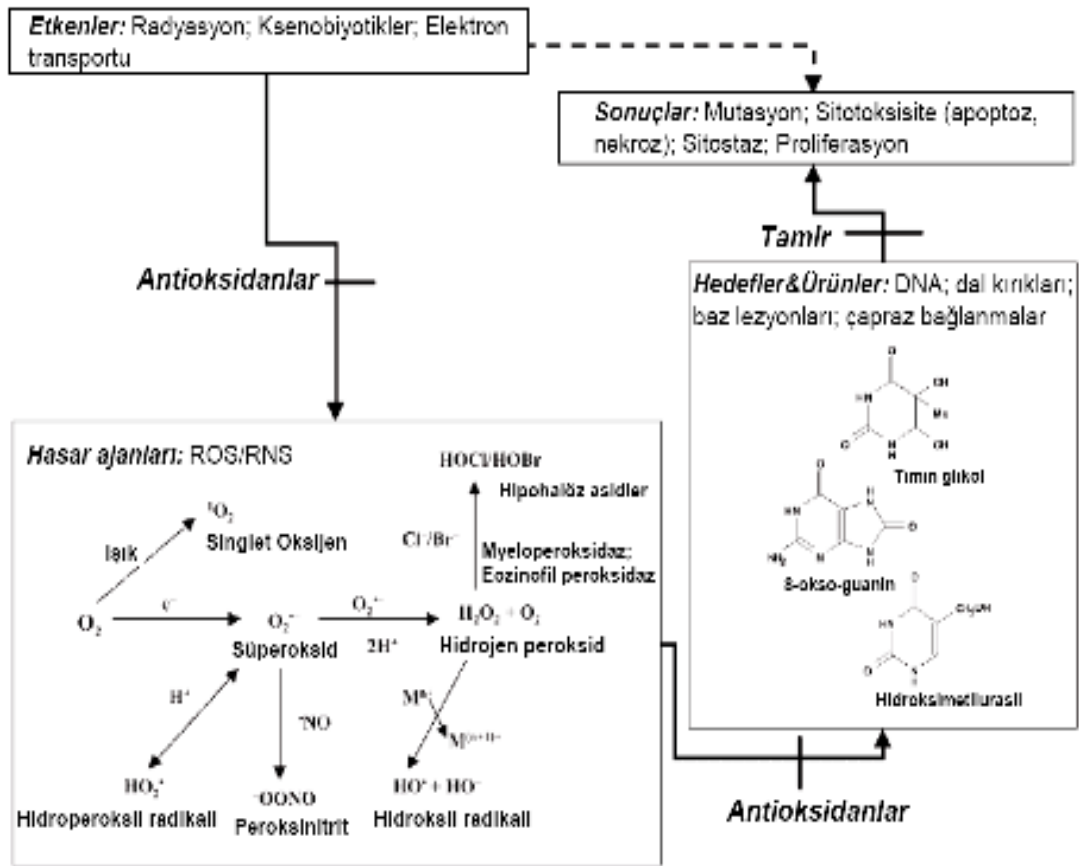
Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler, fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak, O_2^- ve H_2O_2 'i meydana getirirler. Okside olan glukoz, proteinlerle reaksiyona girerek glikozilasyon ve glikasyon ürünlerini oluşturur (Halliwell 1984). Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bunlar diyabet ve sigara kullanımı ile gelişen kronik hastalıklar da önemli rol oynarlar (Reznick 1992).

2.4.4.4. DNA'da Oksidatif Hasar

DNA; hücrenin genetik materyalidir. Ayrıca proteinleri kodlayan DNA'nın fonksiyon bozukluğu veya inaktivasyonu, kodladığı proteinleri etkiler (Wu 2003). İnsan bedeninin her hücresindeki DNA, günde 10.000 kez serbest radikal saldırısına maruz kalmaktadır. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne veya mutasyona neden olur. DNA hasarının çeşitli hastalıkların etyolojisinde ve yaşlanmada önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Ames et al. 1992, Halliwell et al. 1992, Andican et al. 2004, Çelik 2005). Serbest radikaller DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, purin ve pirimidin bazların spesifik modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olur (Dizdaroğlu 1991, Shigenara et al. 1991). Deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu baz salınımını ve DNA zincir kırıklarını indüklerken oksidatif baz modifikasyonları mutasyonlara

yol açabilmektedir (Kuchino et al. 1987, Cheng et al. 1992). Farklı radikal metabolitlerinin DNA hasarlarına neden oluş mekanizmalarıda farklıdır (Dizdaroğlu 1993). DNA’da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon dal kırıklarıdır. Zincir kırıkları DNA onarımı sırasında nukleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir. Tek dal kırıklarında, diğer daldaki bilgi doğru okunarak ‘hasarlı dal onarıcı enzimlerle’ onarılabilirdiğinden çift dal kırıkları daha önemlidir (Evans 2004).

Son yıllarda gelişen “*Single Cell Gel Electrophoresis*” (SCGE) tekniği DNA sarmal kırıklarının tespiti için hassas, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. SCGE tekniği “*Comet Assay*” ya da “*Microgel Electrophoretic Technique*” olarak da adlandırılmaktadır (Fairbain ve ark, 1995). İnsan hücrelerinde DNA tek sarmal kırıklarının tespiti ilk kez Rydenberg ve Johanson tarafından gerçekleştirilmiştir. Nötral teknik olarak adlandırılan bu yöntemle DNA’nın ayrılmasına izin veren hafif alkali şartlar altında lam üzerindeki agarozda gömülmüş olan hücreleri parçalayarak hücreleri proteinlerinden ayırmışlardır. Daha sonra nötralize edip akrinin oranı ile DNA’yı boyamış ve kırmızı flörosana yeşilin oranı hesaplamışlardır. Kırmızı flörosans tek sarmalı, yeşil flörosans ise çift sarmalı göstermiştir. Fakat bu teknik çok yaygın kullanılmamıştır (Fairbain et al. 1995).



Şekil 2.5. Serbest radikal aracılı ile oksidatif DNA hasarı (İnt.Kyn.2).

Ostling ve Johanson 1984 yılında nötral tekniği modifiye ederek, hücredeki DNA hasarının direkt gösterilmesinde “*Microgel Electrophoretic Technique*” olarak sunmuşlardır. Ostling ve Johanson agarozda süspanse edilen radyasyona maruz kalmış hücreleri lam üzerine yayarak, yüksek tuz ve deterjanla lizis işlemine tabi tutmuşlar ve ardından elektroforez uygulanarak akrinin oranj gibi DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyamışlar ve floresan mikroskopta değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucunda gevşemiş ve kırılmış DNA parçaları nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermiş, bu nedenle hasarlı hücreler **comet** olarak adlandırılmıştır. Kuyruk uzunluğu DNA hasarını saptamak için ölçülmüş ve kuyruk uzunluğunun çalışmada kullanılan oksidatif ajan dozunun fonksiyonu olduğu gözlemlenmiştir (Ertürk 2001). Ancak, DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa DNA da hasar oluşturan çoğu ajan DNA çift sarmalından çok DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılamamaktadır (Ünal 1998). Bu nedenle Singh ve ark. 1988 yılında alkalin

comet metodunu tanımlamışlardır. Böylece “ *tek sarmal kırıkları*” denilen ve sadece alkali teknikle ortaya çıkarılabilen DNA tek sarmal kırıklarını tanımlama imkânı doğmuştur. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları proteinlerin % 95 inden fazlasını yok edebilmekte, böylelikle SCGE tekniğin yeni dizaynı bireysel hücrelerde DNA hasar büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır (Ostling et al. 1984, Singh et al. 1988, Tice et al. 2000).

2.4.5. Antioksidan Savunma Sistemleri, Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde, hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır. Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asidler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (Rangan 1993, Yalçın 1998).

Başlıca antioksidan etki çeşitleri;

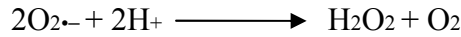
1. Reaktif oksijen türlerinin enzim reaksiyonları aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi,
2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi,
3. Metal iyonların bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesidir.

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale

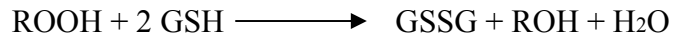
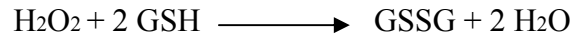
getirilirlir. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (Halliwell 1995).

2.4.5.1. Hücre İçi Savunmada Görev Alan Antioksidanlar

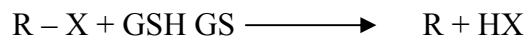
Süperoksit Dismutaz (SOD) : SOD'nin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının ($O_2^{\cdot-}$) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. İki serbest oksijen radikalini, radikal olmayan moleküllere dönüştürdüğünden, antioksidan sisteminin en önemli öğelerinden biri olarak bilinir (Bergendi 1999).



Glutatyon peroksidaz: Sitozolde yerleşik bir enzim olan GSH-Px tetramer yapıdadır. Dört selenyum atomu içerir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizleyerek, hidrojen peroksidin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar:

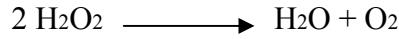


Glutatyon S-Transferazlar (GST) Glutatyon S-transferazlar (GST), başta arakidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar. GST' lar, karaciğerde sitokrom P-450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler.

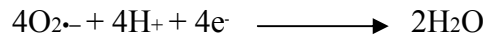


Glutasyon redüktaz: Glutasyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder.

Katalaz (CAT) : Katalaz enzimi H₂O₂'yi, oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler, bir radikal olmamasına rağmen, reaktivitesi en fazla olan reaktif oksijen türü olan OH⁻ ın öncüsüdür ve bu nedenle birçok reaktif oksijen türünden daha fazla oksidatif neden olur. CAT, solunum yapan tüm organizmalarda bulunan ve iki fonksiyon gösteren bir enzimdir (Halliwell 1990, Frei 1994).



Sitokrom oksidaz Sitokrom oksidaz, mitokondrial ETZ'nin son parçasıdır ve elektronların son alıcı olan oksijene transferinden sorumludur. Bu bölgede taşınmış olan elektronlar, O₂ ve serbest protonlar H₂O oluşturmak için bir araya gelirler. (Akkus 1995). Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit (O₂•-) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin (O₂•-) zararlı etkilerine engel olurlar.



2.4.5.2. Hücre Dışı Savunmada Görev Alan Antioksidanlar

Albumin: Yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını bağlar ve lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. Bakır iyonlarının bağlanmasıyla protein yapısında hasar ortaya çıkar. Ancak albumin yarı ömrü oldukça kısa bir protein olduğundan kolaylıkla yenilenebilmektedir. Böylece bakır iyonlarının diğer proteinlerdeki sülfidril gruplarına bağlanması ve bu proteinleri hasara uğratması engellenmiş olur. Albumin kanda serbest yağ asidlerinin ve bilirubinin taşıyıcısıdır (Yu 1994, Yalçın 1998).

Bilirubin: Bilirubinin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve süperoksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısı olduğu bildirilmiştir (Yu 1994, Yalçın 1998).

Ürik asid: Normal plazma konsantrasyonlarında antioksidan etki gösteren bir moleküldür. Antioksidan etkiyi çeşitli yollarla gösterir:

- a)Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir.
- b)Singlet oksijen, HOCl, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve $\text{LOO}^{\cdot}$ gibi reaktif oksijen türlerini temizler

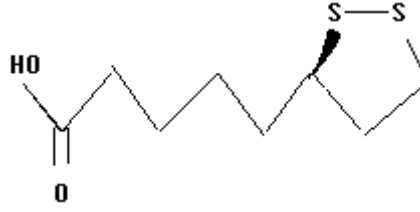
Transferrin: Dolaşımdaki serbest demirin bağlanması görev almaktadır.

Seruloplazmin: Seruloplazmin muhtemelen SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

2.4.6 . α -Lipoik Asit

Lipoik asit; enerji üretimi ve metabolizmada yer alan mitokondriyal enzimlerde bir kofaktör olarak görev yapan, doğal olarak meydana gelen bir bileşiktir (Cadenas 2001). Pek çok prokaryotik ve ökaryotik hücre tiplerinde bulunur. Lipoik asit (LA) vücutta doğal olarak üretilmesine rağmen araştırmacılar 1930 yılına kadar varlığının farkında değillerdi. 1937 yılında *Lactobasillus*'un gelişimi için gerekli olan, growth faktör denen patates ekstresinin bir bileşeni olarak bulunmuştur (Bullock 1954). 1951 yılında Reed ve arkadaşları 100 kg karaciğerden 30 miligram lipoik asit pürifiye etmişlerdir (Morris 1995). Takip eden yıllarda moleküler yapısı açığa kavuşmuşturulmuş ve 1,2 ditiyolen-3 pantotenik asit olarak adlandırılmıştır (Streeper1997, Cadenas 2001). Mitokondriyal kompleksleri bol olan hayvan ve bitki dokularında bol miktarda bulunur. Bitkiler içinde en fazla lipoik asit içerenler sırasıyla ıspanak, brokoli ve domatesdir. Hayvan dokuları içerisinde en fazla böbrek, kalp ve karaciğerde bulunur (Kramer 2001).

İnsanlarda lipoik asit enerji oluşumunu içeren çeşitli 2-oksoasit dehidrogenazların parçasıdır (Kramer 2001). Sekiz karbonlu bir bileşiktir ve ditiyolen halka yapısında iki sülfür atomu içerir (Aalt 2002).

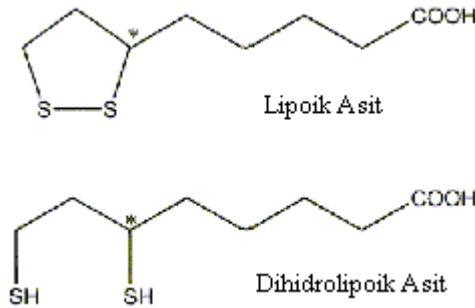


Şekil 2.6. Alfa Lipoik Asit (Cremer et al. 2006).

İki formu bulunmaktadır:

1-Okside lipoik asitte 6. ve 8. pozisyonlarda bulunan kükürtler kapalı bir halka meydana getirir.

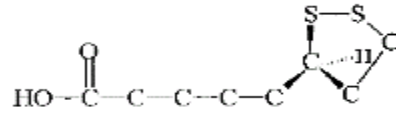
2-Lipoik asidin redükte şekli açık zincir şeklinde olup 6. ve 8. pozisyonunda bulunan kükürtler sülfidril grubu halinde bulunmaktadır. Lipoik asidin redükte şekline dihidrolipoik asit(DHLA) adı verilmektedir (Gözükara 1989).



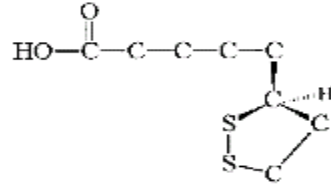
Şekil 2.7. Lipoik Asit ve Dihidrolipoik Asidin Kimyasal Yapıları (Kramer, 2001).

Lipoik asidin bu iki formu oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile birbirine dönüşebilmektedir (Gözükara 1989). Lipid ve sulu ortamda çözünür oldukları için kolayca emilir ve hücrelere taşınarak, DHLA'ya indirgenir. Hem redükte hem de okside formlar biyolojik aktivite göstermesine rağmen dihidrolipoik asit biyolojik olarak daha aktif form olarak kabul edilmektedir (Bullock et al. 1954).

Alfa lipoik asit sitrik asit siklusundaki multienzim dehidrogenaz kompleksinin (piruvat dehidrogenaz ve α ketoglutarat dehidrogenaz) kofaktörüdür. Alfa lipoik asidin iki ayrı izomerik konfigürasyonu vardır. R formu doğal, S formu ise sentetiktir (Goralska 2003). Hem R hem de S formları izomerdir (Streegeer et al. 1997). R-enantiyomer S-enantiyomere 28 defa daha hızlıdır (Aalt et al. 2002).



R- Lipoik Asit



S- Lipoik Asit

Şekil 2.8. Alfa Lipoik Asidin R ve S formlarının Kimyasal Yapıları (Cadenas 2001).

Redükte DHLA ve okside α -LA formlarının her ikisi de $\bullet\text{OH}$ 'i, HOCl ve $^1\text{O}_2$ doğrudan temizler, H_2O_2 ise redükler. Alfa lipoik asit ve DHLA doğal olarak fizyolojik sistemlerde bulunduklarından ideal terapötik antioksidan olduğu düşünülebilir. Dihidrolipoik asidin antioksidan etkisi kanıtlanmış olmasına rağmen özellikle demirin varlığında prooksidan etki gösterebilir. Dihidrolipoik asit *in vitro* hem ferrik hem ferröz demir ile şelat oluşturur. Bu nedenle demirin oksidatif hasarını önler. Ancak ferritinden demirin ayrılmasını ve Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye dönüşümünü azaltarak oksidatif hasarı arttırabilir (Goralska 2003). Alfa lipoik asit ve DHLA'nın antioksidan ve prooksidan olarak fonksiyon gösterme yeteneği oksidan stresin tipi ve fizyolojik şartlar tarafından belirlenmektedir. Tiyol bileşikleri tarafından oluşturulan prooksidan etkilerin çoğu $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve $\bullet\text{OH}$ oluşmasına bağlanmaktadır (Çakatay 2006).

Lipoik asit bakteriden insana kadar olan tüm organizmalarda sentezlenir. İnsanlarda sentez yeri karaciğer ve diğer dokulardır (Biewenga 1997). Ökaryotlarda lipoik asitin biyosentez yolu mitokondride bulunur. Bununla beraber bitkilerde biyosentez yolunun plastidlerde de bulunduğu hipotezi vardır (Yasuno 2002).

Lipoik asit oral verildiğinde % 93' den fazlası bağırsaktan emilir, karaciğerde metabolizmayla % 20-30 ilk geçiş etkisine uğrar. α -LA emilmesini takiben 1,2 ditiyolen halkasının indirgenmesiyle DHLA formuna indirgenir, sonradan S-metilasyona uğrayabilir. α -LA ve DHLA her ikisi de aynı zamanda β - oksidasyona uğrarlar. Hem ratlarda hem de insanlarda α -LA idrarla atılır, ana metaboliti 4,6 bismetilmerkaptiheksanoik asittir. Ratlarda oral verilen radyoaktif α -LA'nın yaklaşık % 80'i idrarda bulunmuştur (Cremer 2006).

Yiyeceklerdeki ve biyolojik lipoik asidin tespit edilmesinde gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bunlardan GC ve GC-MS metodları yüksek derecede spesifiktir (Kramer 2001).

Lester Packer' in 'Mucize Antioksidan' adlı lipoik asit hakkındaki kitabında, insanlar için düzenli olarak 100 mg/gün lipoik asit alınması önerilmektedir. Tedavi edici ajan olarak daha yüksek dozlarda kullanılabilir. Bazıları sağlık problemlerinde lipoik asit miktarının günlük 400-600 mg'a kadar çıkılabileceğini tespit etmiştir (David 2000).

Klinik araştırmalar lipoik asidin kullanılması ile karsinojenik etkilerin olmadığını göstermiştir. Yüksek dozlarda bile ciddi yan etkiler gözlenmemiştir. Minör yan etkiler deri reaksiyonlarını ve bulantı-kusma gibi gastrointestinal etkileri içerir. Bununla beraber bu etkiler yalnız intravenöz infüzyonla hergün 1200 mg veya daha yüksek dozda alanların küçük bir yüzdesinde gözlenmiştir. LD₅₀ Ratlarda LD₅₀ yaklaşık 400-500 mg/kg' dır (Packer 1994).

2.4.6.1. Lipoik Asidin Etki Mekanizması

Araştırmacılar son yıllarda lipoik asidin serbest radikal hasarını uzaklaştıran vitamin E ve vitamin C'yi geri dönüştürdüğünü göstermişlerdir. Antioksidan döngüsünün ana bileşenlerinden biri vitamin E' dir. Bu vitamin membranlar ve yağ dokusundaki yüksek serbest radikal reaktivasyonunu durdurmak için çalışır (Liu 2002). Lipoik asit aynı zamanda vitamin E' yi rejenere eden vitamin C ve glutatyon ile birbirlerini etkileyerek membranları korur. (Packer 1995). Lipid peroksit ve lipid alkoksil gibi yağlı serbest radikalleri yok etme işlemi sırasında vitamin E' nin kendisi de serbest radikal haline gelir. Vitamin E radikali vitamin C ile rejenere olur. Bu ise bir radikalden tekrar bir antioksidan meydana gelmesiyle sonuçlanır. Fakat bu işlemin sonunda vitamin C'nin istikrarlı olmayan formu olan yeni bir semikarbon radikali meydana gelir. Vitamin C tekrar glutatyon ile çevrilebilir. Bu noktada vitamin E, vitamin C ve glutatyon hücrel hasarı önleme ve serbest radikal kontrolü için birlikte uyum içinde çalışırlar. Bu aynı zamanda, antioksidan rejenerasyon döngüsünde sınırlandırıcı bir faktör olarak kaydedilen glutatyonun elde edilmesinde önemli bir basamaktır (Liu 2002).

Lipoik asit ve onun redükte formu DHLA dokularda serbest halde bulunur. DHLA güçlü bir redüktandır ve böylece okside antioksidanları rejenere edebilir. Antioksidanlar, radikalleri uzaklaştırdıkları zaman kendileri radikal hale gelirler. DHLA direkt ve indirekt olarak askorbat, glutatyon, koenzim Q10 ve vitamin E'yi rejenere edebilir (Kramer 2001). DHLA bütün antioksidanları redükte edebilir ve lipoamid redüktaz, glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerini rejenere edebilir. Böylece lipoik asit ve DHLA antioksidan ağda merkezi bir görev alır. Lipoik asit suda çözünen ve membranda çözünen özelliklerin ikisine de sahip olduğundan lipid/su fazları arasındaki okside antioksidanların indirgenmesini olanaklı kılar (Busse 1992, Podda 1994, Han 1997, Sen 1997, 1999).

LA'in redüksiyonu ile oluşan DHLA, LA'den daha çok antioksidan özelliğe sahiptir. Yalnız DHLA endojen antioksidanları rejenere eder ve oksidatif hasarı tamir ederken hem DHLA hem de LA metal kelasyonu ve ROS (serbest oksijen ürünleri)'ni uzaklaştırabilme kapasitesine sahiptir. LA Fe^{+2} ve Cu^{+2} kelasyonu ile antioksidan aktivite gösterirken, DHLA Cd^{+2} kelasyonu da yapabilir (Biewenga 1997).

2.4.6.3. Lipoik Asidin Etkileri

1. Serbest Radikalleri Uzaklaştırmak: Lipoik asit bilinen çok yönlü antioksidanlardan biridir. Yağ ve suda fonksiyon gösterebilen lipoik asit serbest oksijen, süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri, hipoklorit ve peroksinitrik gibi geniş bir yelpazedeki serbest radikallerin nötralizasyonunu başarabilir (Biewenga et al. 1997).

2. Metal Kelasyon: Vücudumuz için en tehlikeli şeylerden biri toksik metallerdir. Toksik metaller yıllar boyunca dokularımıza yerleşir ve sürekli vücudumuza zarar verir. Bir saç analizi kadmiyum, bakır ve alüminyum gibi toksik metallerin yüksek düzeylerine sahip olduğumuzu gösterir. Lipoik asit toksik metalleri yakalar, bağlar, onları nötralize eder ve vücuttan kolayca atılabilecekleri bir şekile getirir (Sumathi et al. 1996).

3. Antioksidan Rejenerasyon: Serbest radikal ile nötralize edilen bir antioksidan özelliğini yitirir. Bununla beraber canlı sistemlerde antioksidanlar sıklıkla diğer antioksidanların yardımıyla rejenere olabilirler. Örneğin glutatyon vitamin C'yi rejenere edebilir. Vitamin C

vitamin E'yi rejenere hale döndürebilir. Çok yönlü yapısı sayesinde lipoik asit glutasyonu, vitamin C, E ve mitokondriyal antioksidan koenzim Q' yu rejenere edebilir (Packer et al. 1997).

4. Moleküler Hasar Onarımı: Serbest radikal aktivite DNA, lipid ve proteinler gibi fizyolojik maddelerde hasar meydana getirir. Canlı organizmalar bu hasarların bazılarını tamir edecek bir kaç mekanizma geliştirmiştir. Lipoik asit okside olmuş moleküler hasarın tamirinde rol oynar (Kok et al. 1996).

5. Lipoik Asit ile Glikasyondan Yaşlanmanın Azalması: Glikasyon protein molekülleri ve glukoz arasında kimyasal bağların oluşumudur. Bu işlem yaşlanmanın ve özellikle diyabet ile birlikte olan bir çok hastalığın etkilerine katkıda bulunur ve proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarını bozar. Araştırmacılar albümine nonkovalent bağlarla bağlanan lipoik asidin glikasyona karşı proteinleri koruduğunu bulmuşlardır. Böylece lipoik asit hem antioksidan özellikler hem de antiglikasyon özellikleri ile bir antiaging gibi davranır (Packer 1998).

6. Lipoik Asit Doğal Enerji Verici: Lipoik asit hücrenin enerji yapım yeri olan mitokondri için yakıt hazırlamaya yardım eder. Vücut lipoik asit olmaksızın enerji için şekeri kullanamaz ve lipoik asit vücudun ilk doğal enerji yoludur. Lipoik asit aynı zamanda yorgunluğun ana nedeni olan serbest radikallerin nötralizasyonu ile vücuda enerji verir (Shih 1983).

2.4.6.4. Lipoik Asidin Klinikte Kullanımı

Lipoik asidin antioksidan etkilerinin geniş olması onu tedavi edici uygulamalar için güçlü bir aday yapar. Hayvan ve insan çalışmaları klinik kullanımları önermektedir (Maitro et al. 1995).

1. Ateroskleroza Karşı Koruyucu Etkisi: Ateroskleroz; hayvanlarda arterlerde plakların oluşumu ile karakterizedir. Serbest radikaller arteriyel kolesterol plaklarında LDL(düşük dansiteli lipoproteinler) birikiminin oksidasyonu ile ateroskleroz meydana getirir. Lipoik asit vitamin E'nin rejenarasyon döngüsünü destekler ve böylece vitamin E daha yüksek konsantrasyonlarda LDL'de etki gösterir (Packer et al. 1997).

2. Katarakta Karşı Koruyucu Etkisi: Gözün içi aköz bir ortamdır, vitamin E, betakaroten gibi yağda çözünen antioksidanlar fazla koruyucu değildir (Packer et al. 1997). Hayvan çalışmaları lipoik asidin katarakt oluşumuna karşı da güçlü bir koruyucu olduğunu göstermiştir. Katarakt gözün lensinde antioksidan aktivitenin azalmasıyla beraberdir ve lipoik asidin en önemli lens oksidanı olan glutasyonu rejenere ettiği bilinmektedir (Korkina et al. 1993). Californiya Üniversitesi'nin bir rat çalışmasının sonuçları lipoik asidin 5 mg/kg dozda % 60 katarakt oluşumundan koruduğunu göstermiştir (Korkina et al. 1993).

3. Radyasyona Karşı Koruyucu Etkisi: Lipoik asidin radyasyona maruz kalma ile meydana gelen serbest radikal hasarı azalttığını gösteren Çernobil radyasyon kurbanlarını içeren Rus çalışması çok ilginçtir. 16 çocuklu bir gruba 28 gün boyunca günde 400 mg lipoik asit verilmiş, 12 çocuklu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında radyoaktif izotopların idrarla atılması ve beyaz kan hücrelerinde serbest radikal aktivitesinde azalmalar görülmüştür (Fuchs et al. 1993).

4. AIDS Tedavisindeki Etkisi: Bilim adamları lipoik asidin HIV-1'in ve DNA'ya direk bağlanan diğer virüslerin replikasyonunu engelleyebildiğini bulmuşlardır (Packer et al. 1997). Dr.Lester Packer ve Chandan K. Sen (1995) lipoik asidin, immün sistem görünümünü özellikle T lenfositleri düzelttiğini tespit etmişlerdir. Dr. Packer test tüp deneylerinde lipoik asidin AIDS (kazanılmış immün yetmezlik sendromu) virüsünün replikasyonunu sağlayan genin aktivasyonunu tamamen engellediğini bulmuştur (Packer et al. 1997). Bir çalışmada AIDS'li 12 kişiye lipoik asit verilmiş, glutasyon düzeyleri % 100, vitamin C düzeyleri % 90, T₄ hücreleri % 66 artmıştır ve oksidatif stres katılanların % 70' inde azalmıştır (Packer et al. 1997).

5. Hafıza ve Beyin Fonksiyonlarına Etkisi: Alman araştırmacılar lipoik asidin yaşlı farelerde uzun dönemli hafızada pozitif etkileri olduğunu bulmuşlardır. Rochester Üniversitesi medikal merkezindeki araştırmacılar Parkinson ve Huntington hastalığı gibi kronik ve akut nörolojik bozuklukların tedavisinde olası bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir (Packer et al. 1997).

6. İnme ve Kalp Krizinde Etkileri: Serbest radikallerin fazla miktarları iskemi veya travma ile yaralanan dokular yaratır. Kan pıhtısı, düşük oksijen seviyeleri ile iskemi meydana gelir (Packer 1998). Lipoik asidin; inme ve kalp krizlerinde yetersiz oksijen sağlanmasına bağlı

hasardan dokuları koruduğu gösterilmiştir. Bilim adamları lipoik asit ile tedavi edilen hayvanlarda ölüm hızının lipoik asit ile tedavi edilmeyenlerin yalnızca 1/3 kadar olduğunu bulmuşlardır. (Packer et al. 1997).

7. Diyabet ve Diyabetik Nöropatinin Tedavisindeki Etkileri: Lipoik asit son zamanlarda diyabetin tedavisi ve katarakt, maskular dejenerasyon ve ağrılı periferik sinir dejenerasyonu olan nöropatiyi içeren diyabet komplikasyonlarını önlemede Avrupa’da kullanılmaktadır (Packer et al. 1997). Çalışmalar lipoik asidin bu sinir disfonksiyon semptomlarının azalmasına yardım edebildiğini göstermektedir (Jacob et al. 1996). Almanya’da yürütülen çift kör, plasebo kontrollü, randomize, çok merkezli bir çalışmada 63 periferik nöropatili Tip II diyabet hastasının % 85’ inde intravenöz günlük 600 mg lipoik asit infüze edildikten 3 hafta sonra semptomlarında belirgin azalma olmuştur (Jacob et al. 1996).

8. Kanser Karşı Koruyucu Etkileri: Serbest radikaller ile hasarlanan DNA hücrenin normal yapısını değiştirir. Serbest radikallere maruz kalan hücreler mutasyona uğrar, kontrolsüz çoğalır hücre membranlarını, organlarını ve bağışıklık fonksiyonunu bozar böylece kanser meydana gelir. Lipoik asit antioksidan özellikleri ile kanser gelişiminin hızını azaltan bir rol oynayabilir. Lipoik asit aynı zamanda kanser başlamadan önce bir gün kanser meydana getirecek genetik programa sahip hücreleri durdurma potansiyeline de sahiptir (Shih 1983). Ratta karaciğer tümör oluşumunda karsinogen metabolizma boyunca oksidatif stresin etkili olduğu bilinmektedir. Lipid peroksidasyon düzeyleri N-dietilnitrozamin verilmesinden 3 ile 24 saat sonra yükselmektedir (David 2000).

3. MATEYAL ve METOD

3.1. Araç ve Gereçler

Bu tez çalışmasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında bulunan ve aşağıda özellikleri verilen cihazlar/ labratuvar malzemelerinden yararlanılmıştır.

- Elektroforez düzeneği
 - 20x20 yatay elektroforez tankı (*Thermo Labsystem*)
 - Güç kaynağı (*Power Station 200. Labnet*)
- Flöresan mikroskop (*Olympus CX-41*)
- Işık mikroskobu (*Olympus*)
- Spektrofotometre (*Shimadzu. UV-1601*)
- Kültür plağı okuyucusu (*Multiscan Spectrum. Thermo Labsystem.*)
- Buz Dolabı/Derin Dondurucu (*Siemens*)
- Soğutmalı santrifüj (*Nüve. NF 1000 R.*)
- Vorteks (*Nüve. NM 110*)
- Hassas terazi (*Precisa. 205 ASC. 0,0001 g'a duyarlı*)
- Su banyosu (*Nüve. BM 402*)
- Isıtıcı tabla (*Nüve. HP 221*)
- Shaker (*Nüve. SC 350*)
- Dijital pH metre (*Inolab*)
- Değişik hacimlerde otomatik pipet (*Ependorf, Scorex*)
- Farklı boyutlarda deney tüpü, balon joje ve beher glas (*Isolab*)
- Ependorf tüpü (*0,5-1,5 ve 2 ml'lik, Roth*)
- Lam (*Özel yapım buzlu lam*)
- Lamel (*24 x 60 mm , 24 x 50 mm, Isolab*)
- Lam / lamel pensi (*Roth*)
- Mikro Plate (*96 kuyucuklu, Roth*)
- Cerrahi makas, pens, doku tutucular
- Cerrahi eldiven
- Polietilen enjektör (*2,5, 5, 10 ml, Ayset*)
- İnsulin enjektörü
- Lityum-Heparinli tüp

3.2. Kimyasal Maddeler

1. Comet analiz için:

- *Histopaque 1077 (Sigma)*
- *PBS tablet (Mg+2 – Ca+2 free) (Sigma)*
- *NaCl (Merck)*
- *EDTA-Na₂ (Merck)*
- *Tris-HCl (Sigma)*
- *Trisma base (Sigma)*
- *Triton X100 (Sigma)*
- *DMSO (Sigma)*
- *NaOH (Merck)*
- *Ethidium bromide (Sigma)*
- *Düşük kaynama dereceli agaroz (LMP-37 °C) (Sigma)*
- *Normal kaynama dereceli agaroz (HMP-65 °C) (Sigma)*

2. Lipid peroksidasyonu (MDA tayini) için:

- *Thiobarbitüric asit (TBA) (Merck)*
- *Trichloroacetic asit (TCA) (Merck)*

3. Protein Oksidasyonu (PO) için:

- *HCl (Merck)*
- *2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Fluka)*
- *Ethanol (Sigma)*
- *Etil asetat (Sigma)*
- *Guanidin HCl (Sigma)*
- *Trichloroacetic asit (TCA) (Merck)*

4. Total Antioksidan Kapasite için:

- *Antioxidant Assay Kit (Cayman Chemical Kat. No:709001)*

5. NO_x için;

- *Vanadium klorür (VCl₃, Merck)*
- *Sülfanilamit (Merck)*
- *N-(1-naphthyl)ethylenediamin (NEDD) (Merck)*

6. Glikoz için:

- *Glucose Oxidase Liq. Reagent Set (Teco Diagnostic Kat.No:G520-480)*

7. Total Kolestrol için:

- *Kolestrol FL Kit (Chema Diagnostica Kat. No:CTF400CH)*

8. Trigliserid için:

- *Globe Diagnostic (Kat. No:AD018AF)*

9. HDL için:

- *HDL Cholestrol (Drict. Enzimatic colormetric) Kit (Spinreact Kat.No166-T)*

10. LDL için:

- *LDL Cholestrol (Enzimatic colormetric. Liquid) Kit (Spinreact Kat.No:LIQ-398)*

3.3. Deney Hayvanları

Araştırma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalları araştırma laboratuvarları ile Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulunun 3307 referans no ve 085 sayılı izni ile hayvan denemelerine başlanmıştır.

Çalışmada ortalama 3 aylık ve 260-310 gr olan 75 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanılmıştır. Hayvanların seçiminde sağlık durumlarının iyi olmasına ve daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış olmalarına özen gösterilmiştir. Araştırmadan 10 gün önce gözlem altına alınan deneklerin deney ortamına adaptasyonu sağlanmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1 Deney Hayvanları

Denekler 12 saat karanlık, 12 saat aydınlıkta kalacak şekilde ve her bir kafeste 3 rat olmak üzere ayrılmışlardır. Çalışma süresince tüm denekler eşit çevresel koşullar altında tutulmuştur. Deneklere çalışma süresince standart rat yemi ve su *ad libitum* olarak verilmiş, yemleme gün içinde saat 09.00 ile 19.00 da olmak üzere iki kez yapılmıştır.

Deneye başlamadan önce çıkabilecek aksaklıkların en aza indirilmesi amacıyla, laboratuvar şartlarında selülozik tiner inhalasyonunun uygulamasına bağlı oluşabilecek komplikasyonlar için toksikasyon şiddeti izlenerek bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir.

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

3.4.1. Deneysel Gruplar ve Deneme Protokolü

Sekiz haftalık bir deney uygulaması için denekler 5 gruba ayrılmıştır.

1. **Grup:** *Kontrol Grubu (K) (n=15)*
2. **Grup:** *Subkronik tiner inhalasyonu Grubu (T) (n=15)*
3. **Grup:** *Subkronik tiner inhalasyonu + α -lipoik asit Grubu (LAT) (n=15)*
4. **Grup:** *α -lipoik asit Grubu (L) (n=15)*
5. **Grup:** *Zeytinyağı Grubu (Z) (n=15)*

Kontrol Grubu (K): Sağlıklı kontrol grubu olarak 15 adet denek, standart rat yemi ile 8 hafta boyunca beslenmişlerdir. Deneme süresince vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

Subkronik tiner inhalasyonu Grubu (T): Deneklere 8 hafta boyunca günde 2 kez olmak üzere belli bir hacimde içinde NaOH tabletleri bulunan hayvanların dışarıdan gözlenebildiği ve dışarıdan hava ile izolasyonu sağlandığı düzenek içinde, 5 ml selülozik tiner inhalasyon için konulmuş ve hayvanların %50'sinin ayakta durma refleksleri kaybolduğunda uygulama sonlandırılmıştır. Ratlar standart rat yemi ile 8 hafta boyunca beslenmişlerdir. Deneme süresince vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

Subkronik tiner inhalasyonu + α -lipoik asit Grubu (LAT): Bu gruptaki ratlara T grubundaki uygulamayı takiben hemen her bir hayvan için 100 mg/kg/gün dozda α -lipoik asit 2 cc

zeytinyağında çözündürülerek gastrik gavaj yoluyla verilmiştir. Ratlar standart rat yemi ile 8 hafta boyunca beslenmişlerdir. Deneme süresince vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

α -lipoik asit Grubu (L): Bu gruptaki ratlara her bir hayvan için 100 mg/kg/gün dozda α -lipoik asit 2 cc zeytinyağında çözündürülerek gastrik gavaj yoluyla uygulanmıştır. Ratlar standart rat yemi ile 8 hafta boyunca beslenmişlerdir. Deneme süresince vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

Zeytinyağı Grubu (Z): Bu gruptaki her bir hayvan için 2 cc zeytinyağı gastrik gavaj yoluyla uygulanmıştır. Ratlar standart rat yemi ile 8 hafta boyunca beslenmişlerdir. Deneme süresince vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

3.5. Kan Örneklerinin Alınması

8 haftalık deneme süresi sonunda, bir gece öncesinden yem verilmeyen hayvanların canlı ağırlık ölçümleri kaydedilmiştir. Denekler 10 mg/kg Xylazine HCl ve 50 mg/kg Ketamin HCl enjeksiyonu ile anestezi altına alınmıştır. Daha sonra tekniğine uygun olarak göğüs kafesleri açılmıştır. Çalışır durumda iken kalpten 5ml'lik heparinli enjektörlerle, ortalama 6-9 ml kan alınarak heparinli tüplere aktarılmış ve tüpler soğuk zincir altında zaman kaybetmeden laboratuvara getirilmiştir.

Alınan tam kan örneklerinden 2 şer ml'si Mononükleer lökositlerin seperasyonu, MDA, methemoglobin (MetHb) ve redükte glutatyon (GSH) tayininde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Geriye kalan kan örnekleri Nüve NF 1000 R model santrifüj cihazı ile 3500 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek plazmaları ayrılmıştır. Plazmalar 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınarak, biyokimyasal parametreler inceleninceye kadar derin dondurucuda korunmuştur (-30°C). Örneklerde protein oksidasyonu, total antioksidan kapasite, nikrit oksit metabolitleri (NO_x), glikoz, kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, AST ve ALT miktarlarının analizleri yapılmıştır.

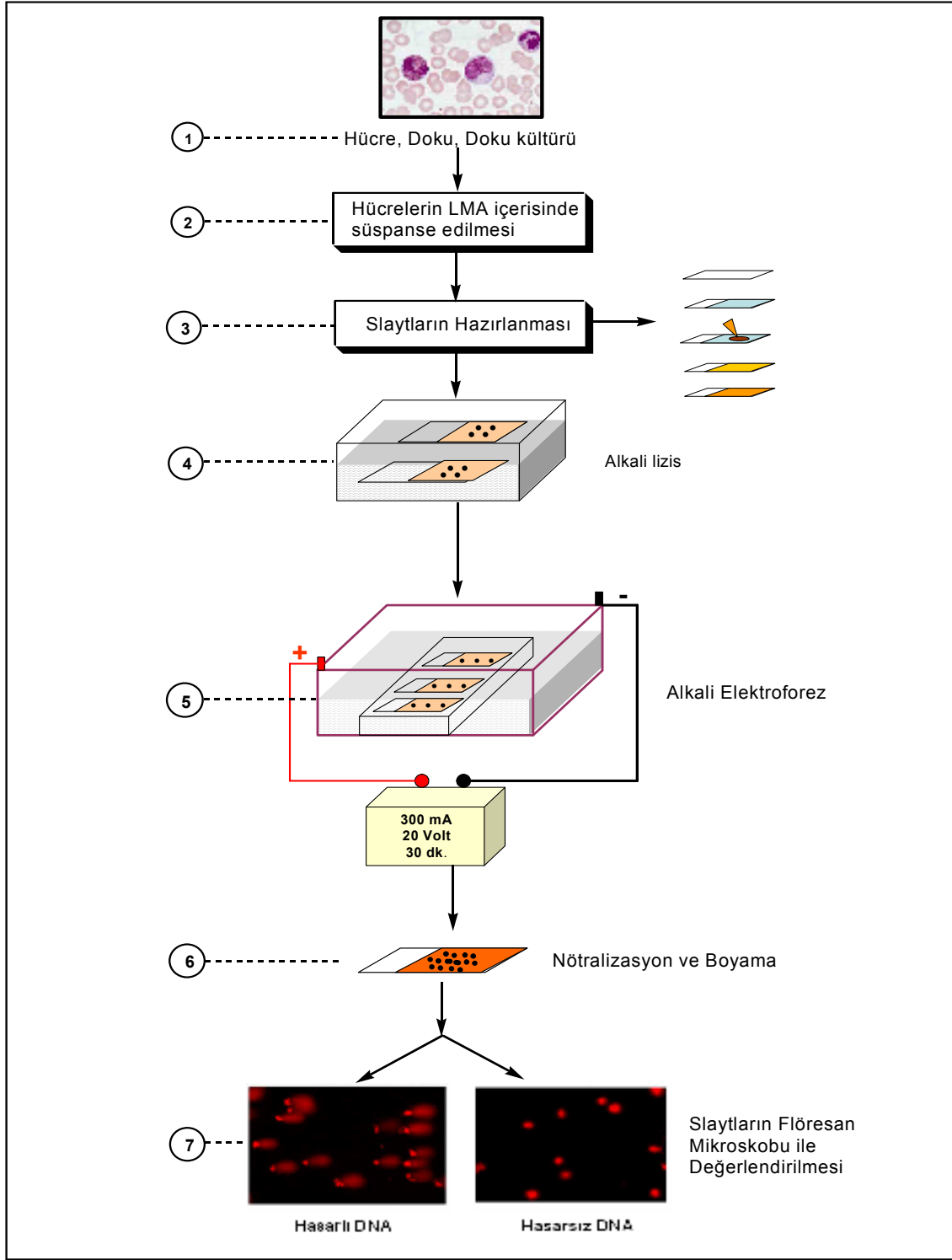
3.6. Mononükleer Lökositlerin Ayrıştırılması

Yöntem tam kan örneğinin Histopaque 1077® ile santrifüj edilmesinden sonra tüpte oluşan gradient farkı nedeniyle Mononükleer lökositlerin tüpte belli bir alanda toplanmaları esasına dayanır (İnt.Kyn.3). Mononükleer lökositlerin seperasyonu için, temiz cam deney tüplerine konan 1 ml Histopaque 1077 üzerine heparinize taze kan sızdırma şeklinde ilave edilmiş ve tabaka oluşması sağlanmıştır. Daha sonra tüpler 2100 rpm'de 25 °C de 30 dk. santrifüj edilmiştir. Orta tabakada biriken mononükleer lökositler pipet yardımıyla dikkatlice alınıp 1 ml tuzlu fosfat tamponu (pH:7,4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm'de 25 °C de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp pelet tuzlu fosfat tamponu ile (pH:7,4) mm³ de 10⁶ Mononükleer lökosit olacak şekilde dilüe edilmiştir (Koçyiğit ve ark. 2005).

3.7. Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasar Tayini

Prensip:

Comet assay yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. Tek hücreler veya çekirdekçikler Şekil. 3.1 de görüldüğü gibi agarozda gömülür; yüksek tuz ve deterjan içeren lizis solusyonunda hücrelerin lize olmaları sağlanır, daha sonra DNA'ların elektroforez de yürütülmeleri esnasında hasarsız DNA'lar bütünlüğünü kaybetmeden yürür yani kuyruk (comet) oluşturmaz, oysa hasarlı DNA'ların fragmentleri oluşan hasardan dolayı farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda farklı hızda hareket eder ve kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar, sonuç olarak elde edilen DNA migrasyon görüntüleri değerlendirilerek bir kanı oluşturulur (Ostling and Johanson 1984, Singh et al. 1988, Horoz ve ark. 2006).



Şekil 3.1. Comet Analiz Akış Diyagramı

Yöntemin Uygulanışı:

1. Slaytların hazırlanması

PBS içerisinde hazırlanan % 1'lik NMP agaroz jelden 80 µl alınarak buzlanmış lam üzerine damlatılmış ve lam üzeri lamel ile kapatılarak 2-4 °C'de 5 dk bekletildikten sonra lameller kaldırılmış ve birinci agaroz tabakası hazırlanmıştır. Hazırlanan lamalar nemli kutularda 2. ve 3. agaroz katları dökülene kadar saklanabilir (Ostling and Johanson 1984, Singh et al. 1988, Horoz ve ark. 2006). PBS ile mm³ te 10⁶ hücre olacak şekilde süspanse edilmiş Mononükleer lökositlerden 10 µl alınarak 80 µl %0.5'lik LMP agaroz ile (37 °C) karıştırılarak birinci agaroz kat üzerine tabakalandırılmış ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dk bekletilmiştir. Üçüncü aşamada aynı konsantrasyonda LMP agaroz jel hazırlanarak ikinci tabakanın üzerine ince bir kat halinde tabakalandırılarak slâytların hazırlanması tamamlanmıştır.

2. Lizis Aşaması

Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılır (Ostling and Johanson 1984, Singh et al. 1988, Horoz ve ark. 2006). Bu amaçla, hücreler lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra, slaytlar yaklaşık 1 saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletilmiştir.

Lizis solüsyonunun hazırlanması;

- Stok lizis solüsyonu:
 - 100mM EDTA-Na₂
 - 2.5 M NaCl
 - 10 mM Trizma base'den oluşan stok lizis solüsyonu distile su içerisinde hazırlanır.
- Çalışma Solüsyonu:
 - Lizisten bir saat önce hazırlanır. % 1 oranında triton X-100 ve % 10 DMSO bolon jojeye alınır.
 - Üzeri stok lizis solüsyonu ile 100 ml ye tamamlanır ve pH' sı 10'a ayarlanır.
 - Çalışma solüsyonu bekletilmeden buzdolabına alınarak soğutulur.

3. Elektroforez Tamponu

Alkali elektroforez çözeltisi, 1 mM EDTA- Na_2 ve 300 mM NaOH'in distile su içerisinde çözündürülmesi ile hazırlanır (Ostling and Johanson 1984, Singh et al. 1988, Horoz ve ark. 2006). Tampon hazırlandıktan sonra buzdolabında soğutulur (pH>13). Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slâyetler alkali elektroforez tamponunda 20-30 arasında inkübasyona bırakılmıştır.

4. Elektroforezde Yürütme

Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözelti içerisinde 300 mA 20 volt' luk elektriksel alanda 5-25 °C'de 30 dk (Ostling and Johanson 1984, Singh et al. 1988, Horoz ve ark. 2006) yürütülmüştür.

5. Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini slâyetlerden uzaklaştırmak için slâyetler 3 dk ve 3 kez 5 ml/slayt 0.4 M Tris HCl pH 7.5 nötralizasyon tamponu ile yıkanmıştır (Ostling and Johanson 1984, Singh et al. 1988, Horoz ve ark. 2006).

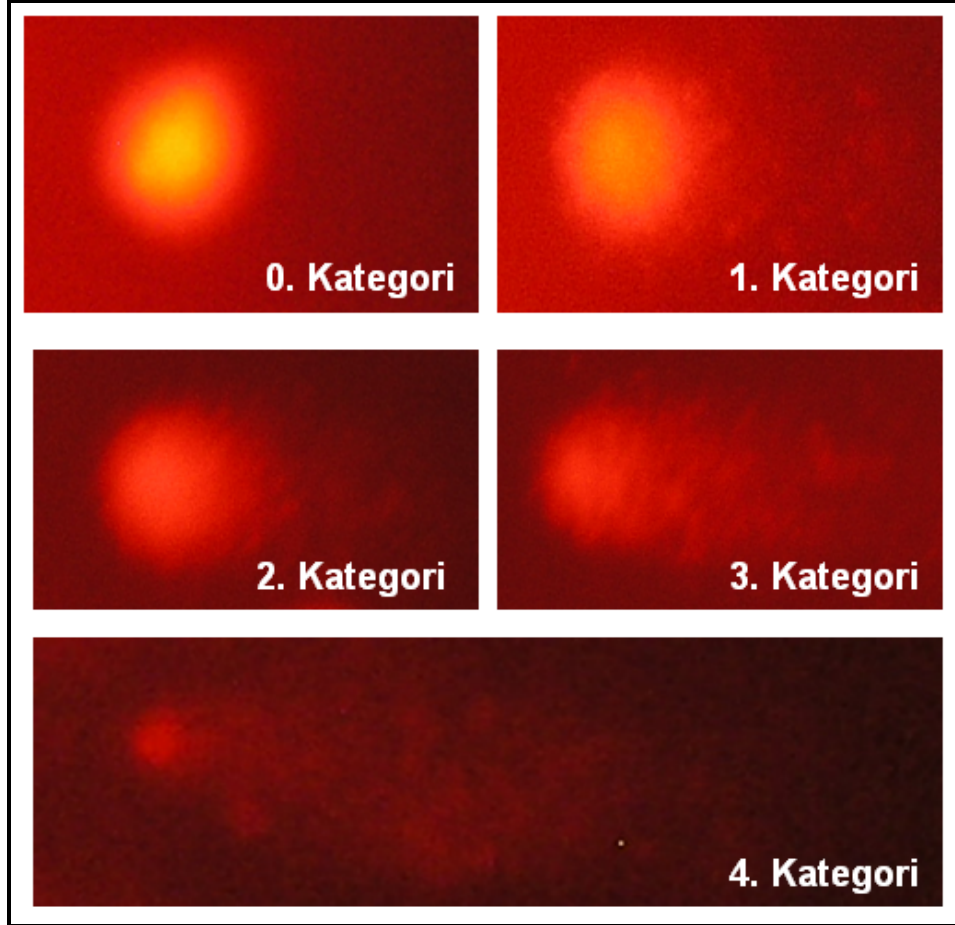
6. Boyama

Nötralizasyon tamamlandıktan sonra slâyetler, flöresan boya olan Ethidium bromid boyası (5µg/ml) kullanılarak DNA'lar boyanmış ve dört saat içinde değerlendirilmiştir (Koçyiğit ve ark. 2005).

7. Değerlendirme

Ethidium bromid ile boyanan slâyetlerin üzerine lamel kapatılarak 20 büyütme flöresan mikroskop (Olympus CX-41) ile 100 adet DNA görüntüsü değerlendirilmiştir. Değerlendirme görsel skorlama yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Kobayashi et al. 1995). Migrasyon uzunluğu fargmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri 5 alt

kategoride sınıflandırılarak puanlandırılmıştır. Şekil 3.2’de görüldüğü gibi hiç hasar bulunmayan DNA’lar 0, hasar olan DNA’lar hasarın derecesine göre 1 den 4’e kadar puanlandırılmıştır ve sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak değerlendirilmiştir (Collins 2004).



Şekil 3.2. Comet Analiz Tekniğinde Kullanılan Puanlandırma Cetveli.

3.8. MDA Tayini

Prensip:

Serbest radikaller sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden MDA tayini, Draper ve Hadley'in (1990) çift kaynatma yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Metot, yağ asitlerinin peroksidasyonunda bir son ürün olan MDA (malondialdehit)'in, TBA ile reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümde maksimum absorbands vermesi prensibine dayanmaktadır.

Reaktifler:

- %10'luk TCA çözeltisi: 10 gr. TCA distile su ile 100 ml.'ye tamamlanarak hazırlanır.
- % 67'lik TBA çözeltisi: 100 ml. 0.05 N NaOH çözeltisinde 0.67 gr. TBA çözdürülerek hazırlanır.

Yöntemin uygulanışı:

Tam kan örneklerinden alınan 0.5 ml numune, 2.5 ml %10'luk TCA ile temiz vida kapaklı deney tüpünde karıştırılarak 95 °C'de 15 dk kaynatılmıştır. Daha sonra hemen soğutulmuş 4 °C'de 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatandan 1 ml alınmış ve üzerine % 67'lik TBA'dan 0.5 ml eklenerek 15 dk kaynatılmış ve hemen soğutulmuştur. Soğutmayı takiben en geç 45 dk içerisinde, Shimadzu UV-1601 marka spektrofotometrede, 532 nm dalga boyunda distile suya karşı absorbanans değeri okunarak, elde edilen değerler dilusyon katsayısı ile çarpılmış ve nmol/ml biriminde MDA miktarı belirlenmiştir.

3.9. Methemoglobin Düzey Tayini

Methemoglobin miktarının tayini için EDTA' lı tüplere alınan kandan 75 µl alınarak, hemen hemoliz edilebilmesi amacıyla içinde 5 ml fosfat buffer bulunan tüplere aktarıldı (Schalm et al. 1975, Harrison and Jollow 1986). Daha sonra bu hemolize solüsyon dört eşit parçaya ayrılarak 1, 2, 3, 4 olmak üzere numaralandırıldı. % 10'luk KCN' den birer damla 2 ve 4 nolu tüplere, % 20'lik K₃Fe(CN)₆'dan birer damla ise 3 ve 4 nolu tüplere konuldu. Vortekste karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 635 nm dalga boyunda distile suya karşı okundu. Sonuçlar aşağıda gösterilen formül yardımıyla hesaplandı.

$$\% \text{Methemoglobin} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100$$

3.10. Protein Oksidasyonu

Prensip

Levine ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir metot olup proteinlerin oksidasyonu sonucu oluşan karbonil grupları ile 2,4-dinitrofenilhidrazinin reaksiyona girmesi ile oluşan hydrozone bileşiklerinin renginin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanan bir yöntemdir (Levin et al. 1990, Ceylan ve ark. 2006)

Reaktifler:

- DNPH çözeltisi; 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazin 2 M'lık HCl içinde çözülerek hazırlanır.
- % 10 TCA çözeltisi; 10 gr. TCA distile su ile 100 ml.'ye tamamlanarak hazırlanır.
- Guanidin HCl çözeltisi; 6 M guanidin HCl, 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH:2,3) içinde çözülerek hazırlanır.
- Etanol:Etil asetat çözeltisi; 1:1 oranında etanol ve etil asetat karıştırılarak hazırlanır.

Yöntemin uygulanışı:

15 µl plazma, 0.5 ml DNPH çözeltisi ile karıştırılarak oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 0.5 ml TCA çözeltisi eklenerek vortekslenmiş ve 15000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pelet 2 kez 1:1 oranında karıştırılmış etanol:etil asetat ile yıkanmıştır. Kalan pelet üzerine 0.6 ml Guanidin HCl çözeltisi ilave edilip 15 dk 37 °C'de inkübasyona bırakılarak peletin çözülmesi sağlanmış ve Shimadzu UV-1601 marka spektrofotometrede 365 nm'de absorpsiyonları okunmuştur. Elde edilen absorpsiyon değerleri, absorpsiyon katsayısı ($\epsilon_{\text{max}}=22000/\text{M}/\text{cm}$) ile çarpılarak sonuçları nmol/mg protein şeklinde hesaplanmıştır.

3.11. Total Antioksidan Kapasite

Total antioksidan kapasite, Cayman Chemical (Kat. No: 709001) "Antioxidant Assay" kiti kullanılarak, Multiscan Spectrum (Thermo) kültür plağı okuyucusunda tayin edilmiştir. Sonuçlar mM olarak verilmiştir.

3.12. Redükte Glutasyon Tayini

Prensip:

EDTA'lı kanın distile su ile hazırlanan hemolizinde, sülfidril (SH) taşımayan tüm proteinler çöktürücü (presipitasyon) çözelti ile çöktürüldü. GSH, elde edilen berrak sıvıda sülfidril gruplarının DTNB [5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit)] ile reaksiyonu sonucu sarı rengin oluşumu ile ölçüldü. EDTA'lı kanlarda GSH konsantrasyonunun tayini, 24 saat içerisinde, spektrofotometrede 412 nm'de gerçekleştirildi.

Reaktifler :

1. Çöktürücü çözelti: 1.67 g metafosforik asit, 0.2 g EDTA (disodyum etilen diamin tetraasetik asit), 30 g NaCl 100 ml'ye distile suda eritilerek tamamlandı.
2. Fosfat çözeltisi: 0.3 M disodyum fosfat distile su ile hazırlandı.
3. DTNB (Ellman's ayırıcı): 40 mg DTNB [5,5'ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)] % 1 sodyum sitrat, 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Yöntemin uygulanışı:

EDTA'lı tüm kandan 200 µl alındı. Üzerine 1.8 ml distile su eklendi, hemoliz gerçekleştirildi. 3 ml çöktürücü çözelti ile hemolizat karıştırıldı. 5 dakika bekleme sonrası, karışım Whatman süzgeç kâğıdından (N.42) süzüldü. Örnek numuneden elde edilen süpernatantın 2 ml'si başka tüpe aktarıldı. Üzerine 8 ml fosfat çözeltisi, 1 ml DTNB ayırıcı eklendi. Blank için 2 ml çöktürücü çözelti (3 kısım çöktürücü çözelti+ 2 kısım distile su), 8 ml fosfat çözeltisi ve 1 ml DTNB ayırıcı tüpe alınarak hazırlandı. Standart için, 40 mg GSH çözeltisi taze olarak hazırlandı. Spektrofotometrede 412 nm'de blanka karşı standart numunelerin optik dansiteleri okundu. Sonuçlar mg/dl tüm kan olarak hesaplandı (Beutler et al. 1963).

3.13. NO_x

NO yarı ömrü çok kısa olan bir madde olup oksidasyon ile stabil metabolitleri olan nitrat ve nitrite dönüşür. Bu yüzden NO seviyesi genellikle bu metabolitlerin tespiti ile değerlendirilir (İnan ve ark. 2005). Bu nedenle, plazma örneklerinde nitrik oksit miktarı Miranda ve ark

(2001)'nın "*Vanadium klorür (III) - Gries Reaksiyonu*" yöntemi ile belirlenmiştir (Miranda et al. 2001, Bülbül 2003).

Prensip:

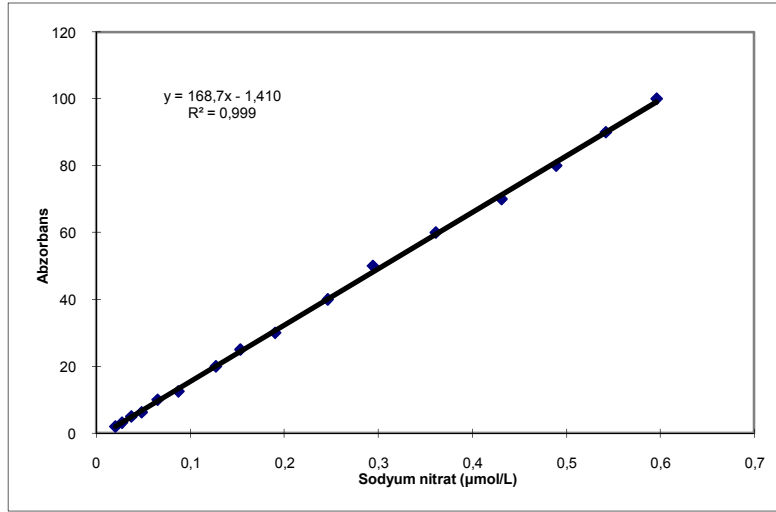
Vanadium klorür'ün 37°C'de ortamdaki nitratı nitrite dönüştürmesi ve Griess reaksiyonu olarak adlandırılan, nitritin asitik ortamda primer bir aromatik amin olan sülfanilamit ile diazotizasyonu ve N-(1-naphthyl) ethylenediamin (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması esasına dayanır.

Reaktifler:

- Vanadium klorür (VCl_3) çözeltisi: 50 ml hidroklorik asitte 400 mg Vanadium klorür çözündürülmesiyle hazırlanır.
- Sülfanilamit çözeltisi: 2 g sülfanilamitin % 2'lik hidroklorik asit ile 100 ml'ye tamamlanması ile hazırlanır.
- NEDD çözeltisi: Distile su ile hazırlanmış % 0.1'lik NEDD çözeltisidir.

Yöntemin uygulanışı:

Plazmadan alınan 100 µl örnek üzerine, 100 µl Vanadium klorür çözeltisinden eklenmiş, bunun üzerine seri halde 50 µl sülfanilamit ve 50 µl NEDD çözeltileri ilave edilmiştir. Örnekler 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldıktan sonra Multiscan Spectrum (Thermo) kültür plağı okuyucusuna yerleştirilerek 550 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Sonuçlar Şekil 3.3'de görülen daha önce değişik konsantrasyonlardaki sodyum nitratın absorbans değerlerine göre hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Beden Ağırlığı Profilleri

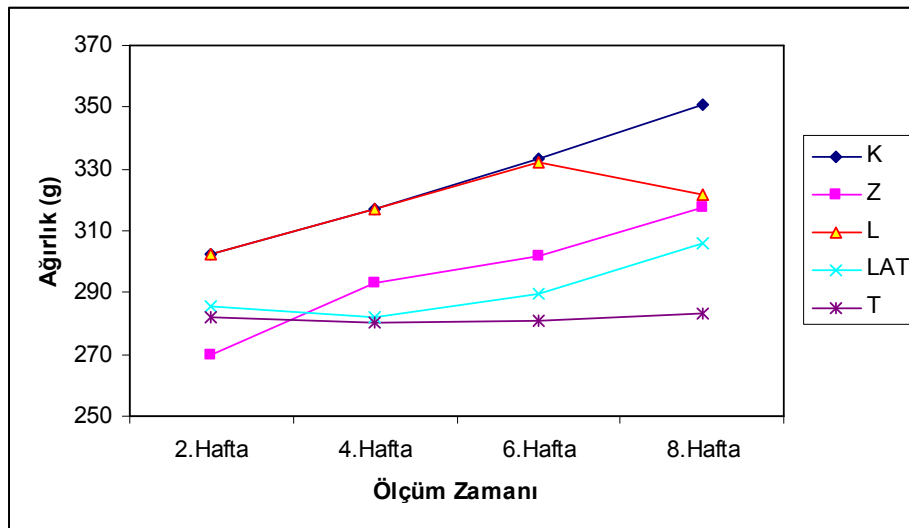
Grupların beden ağırlık parametresine göre değerlendirilmesinde; Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1’de görüldüğü gibi tiner uygulanan tüm gruplarda beden ağırlığı profillerinin, kontrol grubuna göre, özellikle deneme süresinin 45. gününden sonra anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.01$).

Çizelge 4.1. Gruplarda Gözlenen Beden Ağırlığı Değişimi

Ölçüm Zamanı	K $\bar{x} \pm SE$	Z $\bar{x} \pm SE$	L $\bar{x} \pm SE$	LAT $\bar{x} \pm SE$	T $\bar{x} \pm SE$
2.Hafta	302.71 $\pm$ 5.02	269.87 $\pm$ 10.96	302.66 $\pm$ 11.49	285.28 $\pm$ 11.43	282.15 $\pm$ 11.80
4.Hafta	317.28 $\pm$ 12.62	292.88 $\pm$ 14.00	316.75 $\pm$ 9.07	281.92 $\pm$ 12.32	280.53 $\pm$ 12.78
6.Hafta	333.57 $\pm$ 8.70 ^a	301.77 $\pm$ 13.64 ^{a,b}	332.08 $\pm$ 14.98 ^a	289.50 $\pm$ 11.56 ^b	281.15 $\pm$ 12.52 ^b
8.Hafta	350.71 $\pm$ 14.18 ^a	292.44 $\pm$ 12.81 ^{a,b}	321.41 $\pm$ 10.5 ^{a,b}	305.78 $\pm$ 11.29 ^b	283.30 $\pm$ 9.69 ^b

a,b: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir. ($p<0.01$)

Deneme süresi olan 8 hafta sonunda elde edilen veriler, lipoik asitin subkronik tiner inhalasyonunun neden olduğu canlı ağırlık kaybına karşı ratları koruyamadığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.1. Beden Ağırlığı Profilleri

4.2. Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimler

Çalışmada oluşturulan beş deneme grubundan, alınan kan örneklerinde glikoz, kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, ALT, AST, metHb, MDA, mononuklear lökosit DNA hasarı, protein oksidasyonu, total antioksidan kapasite, GSH ve nitrik oksit metabolit (NO_x) düzeyleri tayin edilmiştir. Bu göstergelerin 8 haftalık araştırma süresi sonundaki düzeylerine ait bulguların istatistiksel değerleri ve karşılaştırması Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

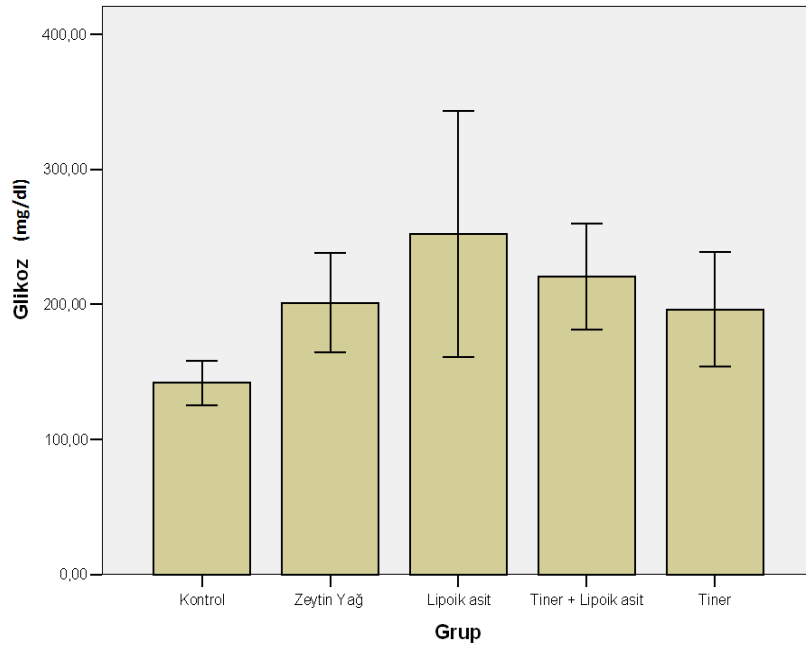
Çizelge 4.2. Ölçülen Parametrelere Ait Bulguların Aritmetik Ortalama, Standart Hata ve Anlamlılık Düzeyleri

Parametre	Kontrol $\bar{X} \pm SE$	Z $\bar{X} \pm SE$	L $\bar{X} \pm SE$	LAT $\bar{X} \pm SE$	T $\bar{X} \pm SE$
Glikoz (mg/dl)	142.00±6.9 ^{*b}	201.25±15.53 ^{*a,b}	252.50±38.52 ^{*a}	220.62±16.57 ^{*a}	196.25±17.9 ^{*a,b}
T-Kolesterol (mg/dl)	87.62±2.68	95.00±3.75	94.00±4.10	101.37±9.12	86.75±2.19
Trigliserid (mg/dl)	52.41±2.24 ^{**b}	79.62±3.54 ^{**a}	54.62±9.88 ^{**b}	53.25±3.22 ^{**b}	51.87±2.66 ^{**b}
LDL-kolesterol (mg/dl)	18.90±4.50 ^{***c}	31.82±4.58 ^{**b,c}	41.07±6.65 ^{***a,b}	51.6±8.78 ^{***a}	39.62±4.69 ^{***a,b}
HDL- kolesterol (mg/dl)	42.50±3.73	52.25±3.46	42.00±5.65	39.12±2.15	36.75±2.96
AST (U/l)	64.62±5.96 ^{*b}	62.75±6.05 ^{*b}	71.87±2.82 ^{*b}	78.62±6.00 ^{*a,b}	88.00±474 ^{*a}
ALT (U/l)	90.12±2.34	91.37±2.85	86.75±4.50	98.62±561	100.62±3.22
MetHb (%)	1.76±0.08 ^{***c}	1.77±0.17 ^{***c}	1.40±0.08 ^{***c}	4.13±0.41 ^{***b}	6.92±0.85 ^{***a}
MDA(nmol/ml)	6.89±0.12 ^{***b}	6.82±0.15 ^{***b}	6.98±0.19 ^{***b}	7.37±0.21 ^{***b}	9.14±0.28 ^{***a}
Mononuklear Lökosit DNA Hasarı (AU)	70.14±2.96 ^{***c}	75.28±8.69 ^{***c}	79.14±3.56 ^{***c}	179.85±7.39 ^{***b}	202.71±6.70 ^{***a}
Protein Oksidasyonu (nmol/mg)	1.78±0.10 ^{**b}	1.76±0.09 ^{**b}	1.69±0.08 ^{**b}	1.84±0.08 ^{**b}	2.31±0.12 ^{***a}
Total Antioksidan Kapasite(mM)	3.20±0.21 ^{**a}	3.71±0.39 ^{**a}	3.72±0.33 ^{**a}	2.86±0.23 ^{**a,b}	2.31±0.20 ^{**b}
GSH (mg/dl)	95.69±4.62 ^{**b,c}	102.44±4.28 ^{**a,b}	112.04±6.09 ^{**a}	88.57±1.83 ^{**c}	87.67±2.56 ^{**c}
NO _x (μmol/l)	5.52±0.28	5.55±0.32	4.56±0.23	5.13±0.40	5.95±0.38
Toluol (ng/ml)	-	-	-	1.42 ±0.09	1.41±0.17

a,b,c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$

4.2.1. Plazma Glikoz Düzeyleri

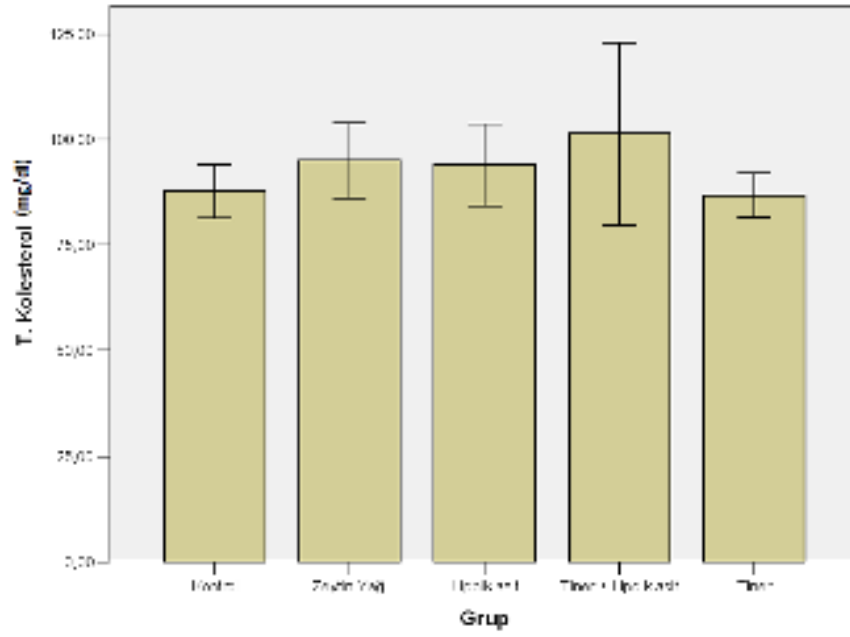
Grupların glikoz parametresine göre değerlendirilmesinde, Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi Z, L, T ve LAT gruplarının glikoz düzeyleri kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek ($p<0.05$) bulunmuştur. Ayrıca L ve LAT gruplarının glikoz seviyelerinin Z ve T gruplarından anlamlı olarak yüksek olduğu ($p<0.05$) görülmüştür.



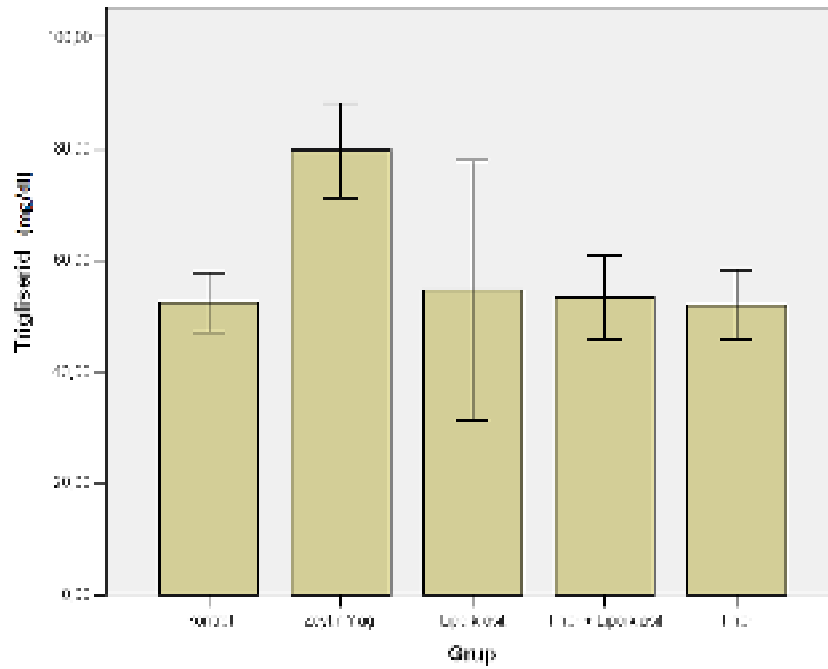
Şekil 4.2. Plazma Glikoz Düzeyleri

4.2.2. Kolesterol ve Trigliserid Düzeyleri

Grupların kolesterol ve trigliserid parametresine göre değerlendirilmesinde; Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi plazma kolesterol düzeyleri Z, L ve LAT gruplarında kontrol grubuna oranla artmış T grubunda ise azalmıştır ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Trigliserid düzeyleri ise Z grubunda diğer tüm deneme gruplarına oranla anlamlı olarak artmıştır ($p<0.01$).



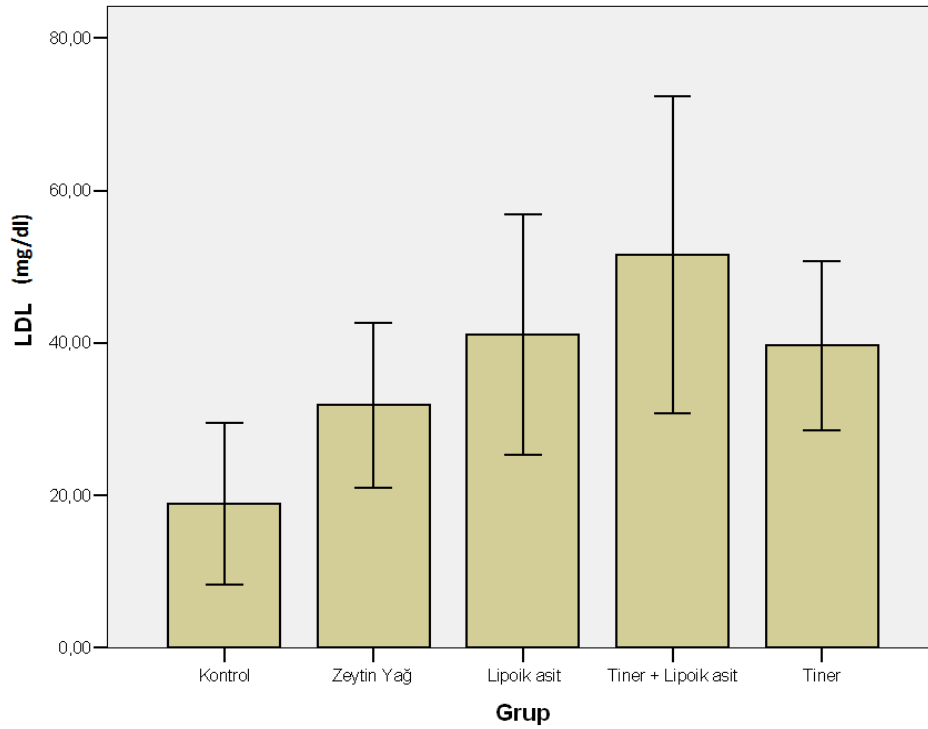
Şekil 4.3. Graplardaki Plazma Kolesterol Düzeyleri



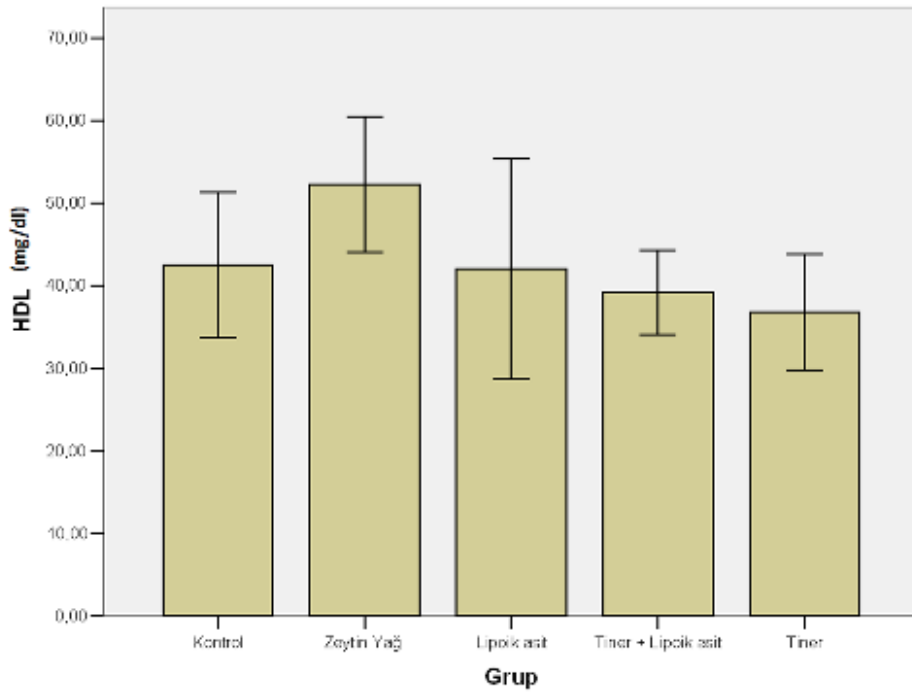
Şekil 4.4. Graplardaki Plazma Trigliserid Düzeyleri

4.2.3. LDL-Kolesterol ve HDL-Kolesterol Düzeyleri

Grupların LDL-kolesterol parametresine göre değerlendirilmesinde; Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış dikkati çekmektedir ($p<0.01$), bununla beraber LAT grubu LDL düzeyi L ve T gruplarına oranla artmış ($p<0.01$), T ve L grupları arasında ise anlamlı bir değişim izlenmemiştir. HDL-kolesterol parametresine göre değerlendirilmesinde ise; Şekil 4.6 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi L, LAT ve T gruplarındaki ratların HDL-kolesterol düzeyleri kontrol grubuna oranla azalmış, Z grubunda ise artış göstermiştir, ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir.



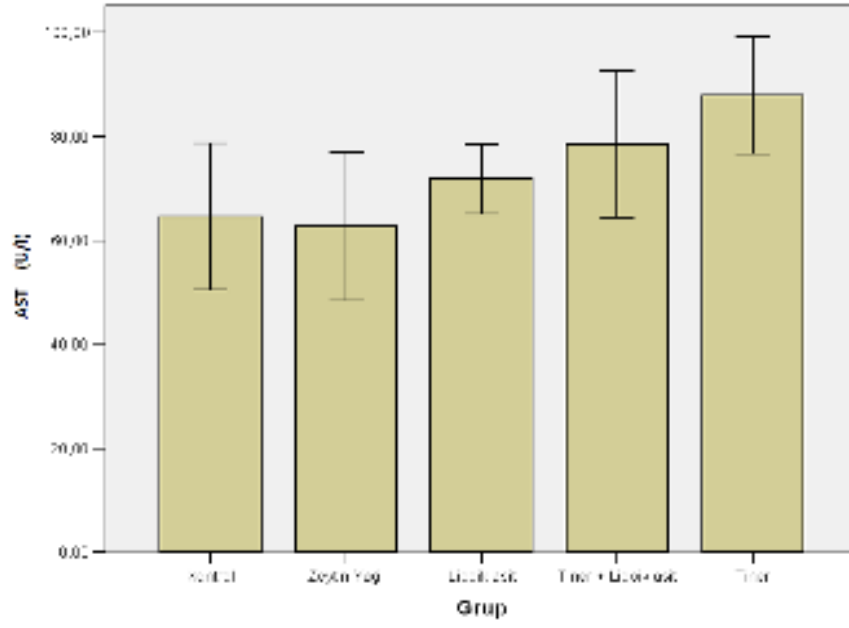
Şekil 4.5. Plazma LDL-kolesterol Düzeyleri



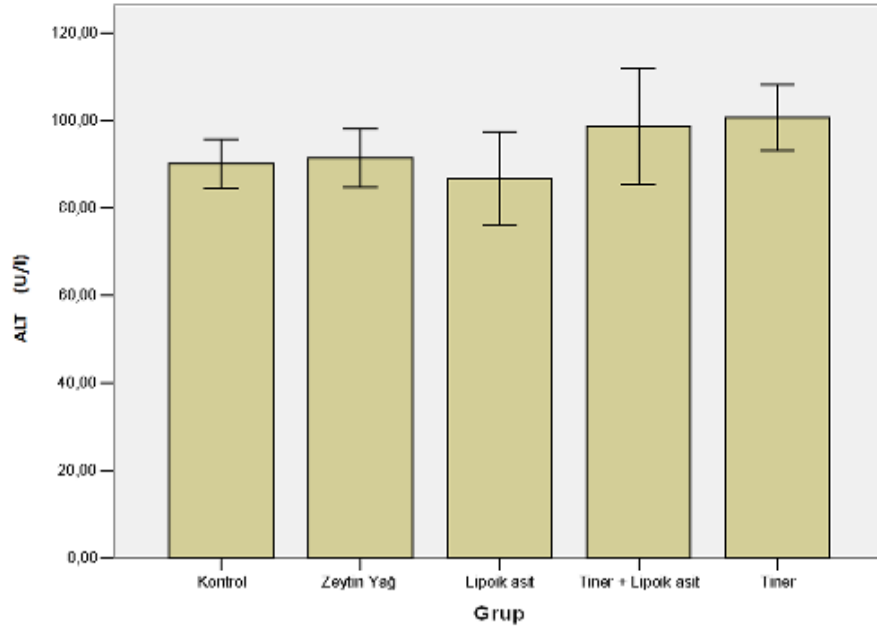
Şekil 4.6. Plazma HDL-kolesterol Düzeyleri

4.2.4. AST ve ALT Düzeyleri

Grupların AST ve ALT parametresine göre değerlendirilmesinde; Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi LAT ve T gruplarındaki ratlarda AST düzeylerinin kontrol, Z ve L gruplarını oluşturan ratların AST seviyelerine oranla anlamlı olarak arttığı ($p<0.05$), diğer yandan LAT grubu AST düzeylerinin, T grubuna göre istatistiksel önemlilikte azaldığı ($p<0.05$) ve lipoik asitin subkronik tiner inhalasyonunun AST düzeyindeki artışa karşı koruyucu özellik gösterdiği gözlenmektedir. ALT düzeylerindeki değişim ise; LAT ve T gruplarındaki ratlarda ALT düzeyleri kontrol grubuna oranla artmış, L grubunda ise azalmıştır, fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir.



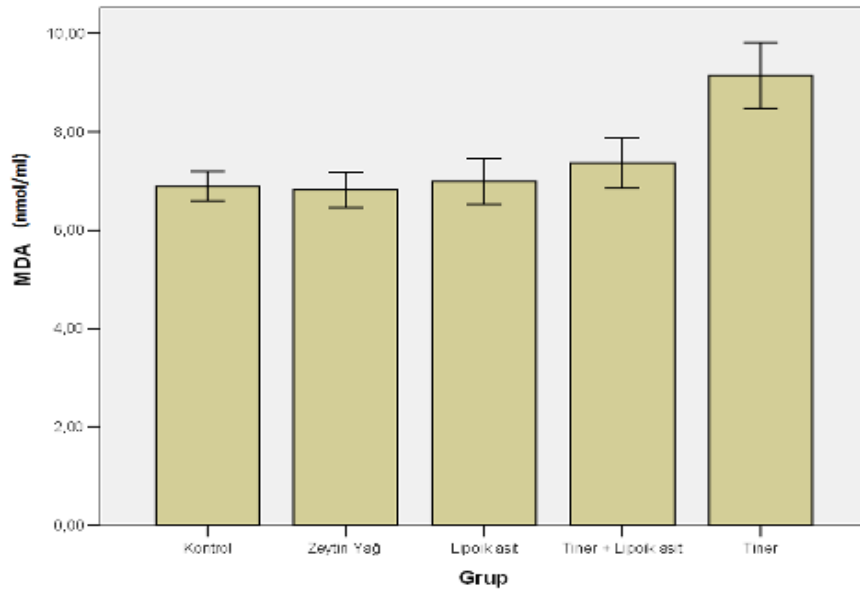
Şekil 4.7. Grupların AST Düzeyleri



Şekil 4.8. Grupların ALT Düzeyleri

4.2.5. MDA Düzeyleri

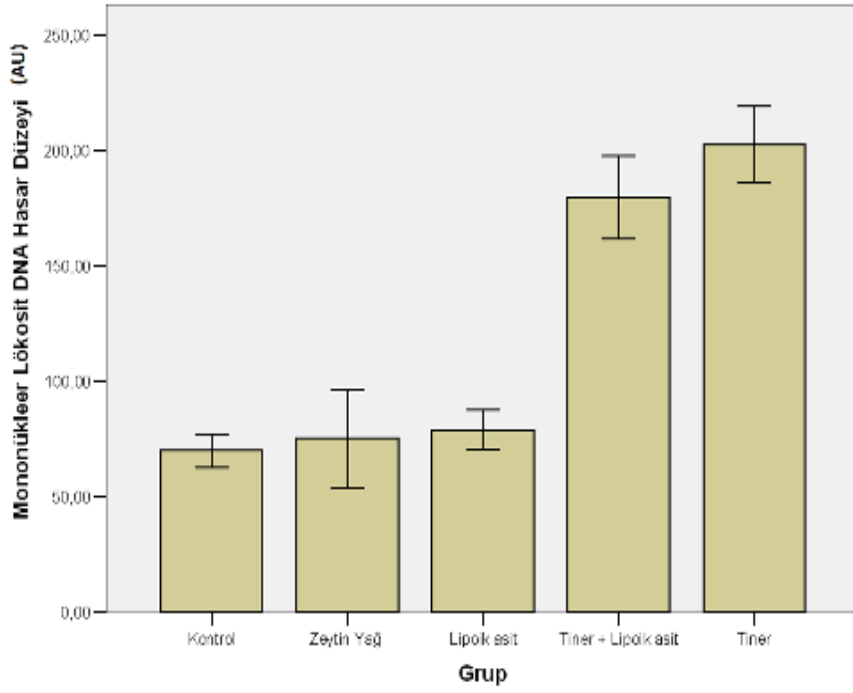
Grupların MDA parametresine göre değerlendirilmesinde; Şekil 4.9 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi T grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak ($p<0.001$) artış dikkati çekmektedir. Diğer yandan LAT grubunda MDA düzeyinin, T grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$) ve kontrol grubu düzeylerine gerilediği gözlenmiştir.



Şekil 4.9. MDA Düzeyleri

4.2.6. Mononükleer Lökosit DNA Hasar Düzeyleri

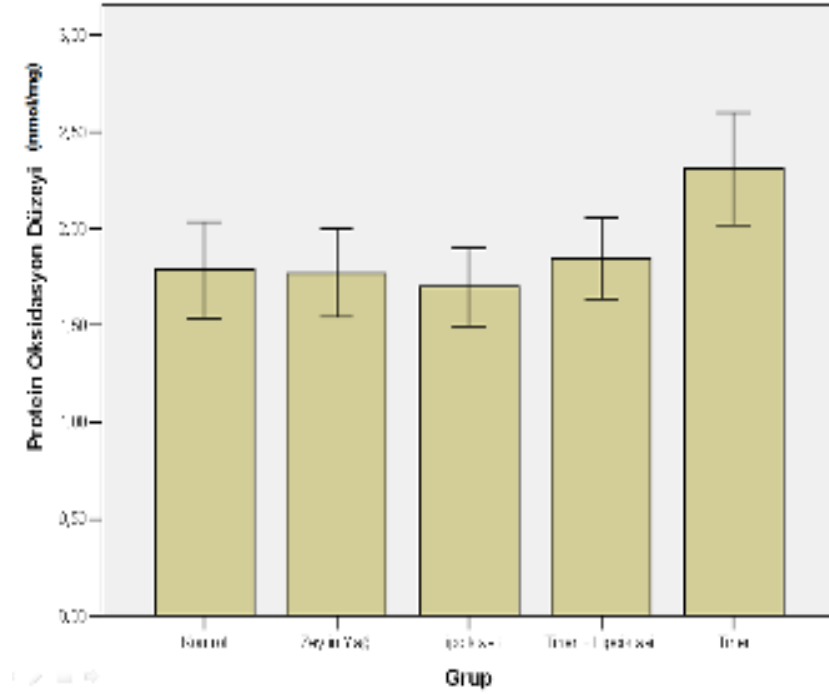
Grupların mononükleer lökosit DNA hasar düzeyleri incelendiğinde; Şekil 4.10 ve Çizelge 4.2 ’de görüldüğü gibi T ve LAT grubundaki ratlarda DNA hasar düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu ($p<0.001$), LAT grubu DNA hasar düzeylerinin ise T grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$) görülmüştür. Z ve L grubundaki ratların mononükleer lökosit DNA hasar düzeyleri ise kontrol grubu değerlerine yakın düzeyde olup, istatistiksel bir değişim göstermemiştir.



Şekil 4.10. Deney Gruplardaki Ratların Mononükleer Lökosit DNA Hasar Düzeyleri

4.2.7. Protein Oksidasyonu

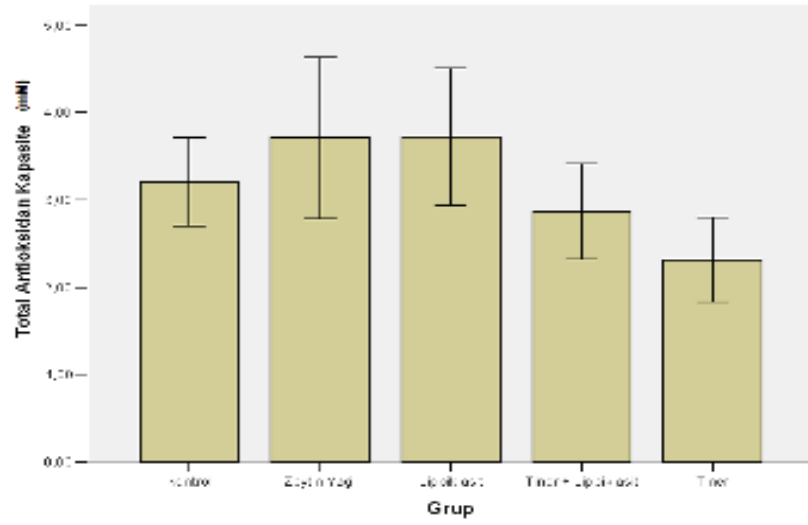
Grupların protein oksidasyon parametresine göre değerlendirilmesinde; Şekil 4.11 ve Çizelge 4.2 'de görüldüğü gibi T grubunda protein oksidasyonun kontrol grubuna oranla anlamlı olarak ($p < 0.01$) arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte LAT grubunda protein oksidasyonunun, T grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.01$) ve kontrol grubu düzeylerine gerilediği dikkati çekmektedir.



Şekil 4.11. Grublardaki Protein Oksidasyonu Düzeyleri

4.2.8.Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri

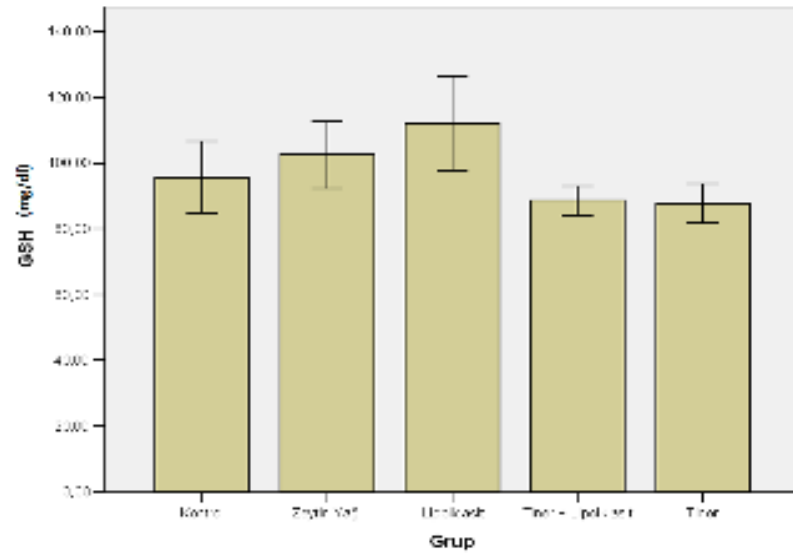
Grupların total antioksidan kapasite düzeyleri değerlendirilmesinde; Şekil 4.12 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi LAT ve T grupları TAK düzeyleri, kontrol grubuna oranla düşük bulunmuştur ($p<0.01$). Diğer yandan LAT grubunda TAK düzeyleri, T grubuna oranla anlamlı olarak artmıştır ($p<0.01$) ve kontrol grubu düzeylerine gerilediği gözlenmiştir. Z ve L grupları TAK düzeylerinde ise kontrol grubuna oranla istatistiksel anlamı olmayan bir artış gerçekleşmiştir.



Şekil 4.12. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri

4.2.9. GSH Düzeyleri

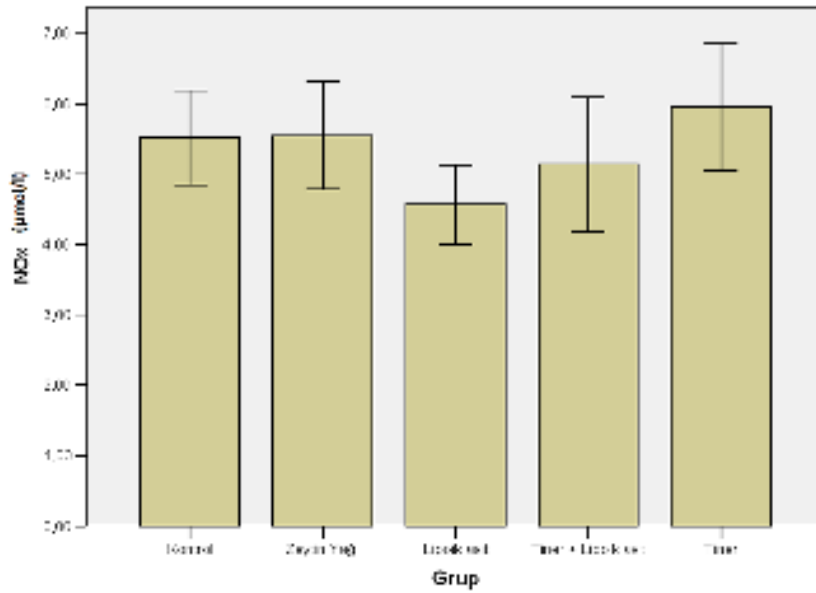
Grupların GSH parametresine göre değerlendirilmesinde; Şekil 4.13 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi Z ve L grupları GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.01$). LAT ve T gruplarında GSH düzeyleri ise diğer gruplara göre istatistiksel önemlilikte ($p<0.01$) azalmıştır.



Şekil 4.13. Kan GSH Düzeyleri

4.2.10. NO Düzeyleri

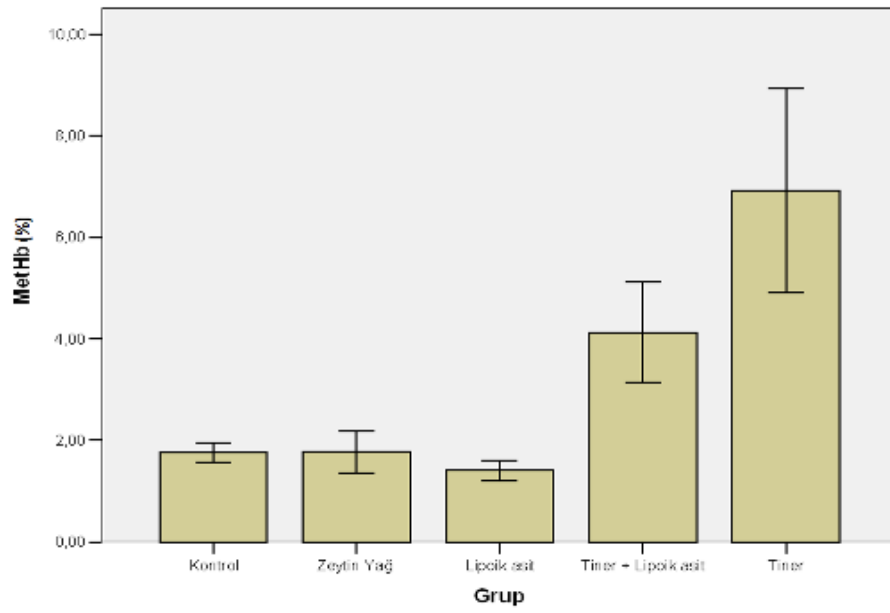
Grupların nitrik oksit parametresine göre değerlendirilmesinde; Şekil 4.14 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi Z ve T gruplarında kontrol grubuna göre yüksek, L ve LAT gruplarında ise kontrol grubuna oranla düşük bulunmuş, fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir.



Şekil 4.14. Gruplardaki NOx Düzeyleri

4.2.11. MetHb Düzeyleri

Grupların MetHb parametresine göre değerlendirilmesinde; Şekil 4.15 ve Çizelge 4.2 ’de görüldüğü gibi T grubu MetHb düzeyinin diğer tüm deneme gruplara oranla anlamlı olarak ($p<0.001$) artış gözlenmiştir. Diğer yandan LAT grubunda MetHb düzeyinin, T grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$), L ve Z gruplarında ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel önemde bir değişimin gerçekleşmediği dikkati çekmektedir.



Şekil 4.15. Gruplardaki MetHb Düzeyleri

4.2.12. T grubu Toluol Düzeylerinin Bazı Parametrelerle olan İlişkisi

Tiner uygulanan grupların toluol düzeylerinin bazı parametrelerle ilişkisi değerlendirildiğinde; Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi Toluol seviyeleri ile MetHb, mononükleer lökosit DNA hasarı ve MDA seviyeleri ile pozitif, GSH ve total antioksidan kapasite seviyeleri ile negatif bir ilişki izlenmektedir. MetHb, seviyeleri ile MDA ve mononükleer lökosit DNA hasarı seviyeleri arasında pozitif, total antioksidan kapasite seviyeleri ile de negatif bir ilişki bulunmuştur. Kan MDA seviyeleri ile protein oksidasyonu arasında pozitif, GSH ve total antioksidan kapasite seviyeleri arasında ise negatif bir ilişki vardır. Protein oksidasyonu ile GSH ve total antioksidan kapasite seviyeleri arasında negatif bir ilişki gözlenmektedir.

Çizelge 4.3. Kan Toluol düzeyi ile DNA hasarı ve bazı Oksidan/Antioksidan parametreler arasındaki ilişki düzeyleri

Mononüklear								
	Toluol	MetHb	Lökosit DNA	MDA	PO	GSH	TAK	NOx
	Hasarı							
Toluol	1	0.745 <0.05	0.851 <0.05	0.885 <0.01	0.691 NS	- 0.869 <0.01	- 0.703 NS	0.495 NS
MetHb		1	0.891 <0.01	0.715 <0.05	0.640 NS	- 0.635 NS	- 0.917 <0.01	0.120 NS
Mononüklear Lökosit DNA Hasarı			1	0.871 <0.05	0.563 NS	- 0.764 <0.05	- 0.837 <0.05	- 0.124 NS
MDA				1	0.779 <0.05	- 0.895 <0.01	- 0.851 <0.01	0.634 NS
PO					1	- 0.524 NS	- 0.734 <0.05	0.453 NS
GSH						1	0.694 NS	- 0.537 NS
TAK							1	- 0.303 NS
NOx								1

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda tiner, ratlara fiziksel temas olmaksızın günde iki kez inhale ettirilmiş, tiner inhalasyonu süresince, önce; ratların hareketlerinde yavaşlama, yürümede zorluk, derin soluk alış verişleri ve çalışmanın sonuna doğru ratların agresifleştiği gözlenmiştir. Çalışma boyunca elde edilen veriler, tiner uygulanan tüm gruplarda beden ağırlığı profillerinin, kontrol grubuna göre, özellikle deneme süresinin 45. gününden sonra anlamlı olarak azaldığını göstermiştir. Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, Yamada et al. (1993) 7 gün boyunca günde iki kez tiner inhale ettirilen sıçanlarda kilo artışının belirgin şekilde azaldığını bildirmiştir. Yine Bölükbaşı'nın (2005) bildirdiğine göre, haftada 5 gün, günde 8 saat süre ile toluen inhale ettirilen bir çalışmada, 15 adet sıçanın başlangıçtaki ortalama ağırlığı olan 252 gr'dan, 6 hafta sonunda 321 gr'a çıktığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlam taşımadığı tespit edilmiştir (Jenkins et al. 1970, Bölükbaşı 2005). Kuzugüden (2007) ise ratlarda 30 gün boyunca günde 1 saat 3000 ppm tiner buharı uyguladıkları çalışmada ratların ağırlıklarının belli aralıklarla ölçüldüğünde sadece kontrol grubu ratlarda ağırlık artışı olduğunu, tiner verilen grupta ratların giderek zayıfladığını bildirmiştir. Cremer et al. (2006); 2 yıl süren çalışmalarında ratlara oral yolla 20, 60, 180 mg/kg/gün α - Lipoik asit vermişler, 20 veya 60 mg/kg/gün α - LA verdikleri ratlarla kontrol grubundaki ratlar arasında vücut ağırlığı bakımından farklılık olmadığı halde, 180 mg/kg/gün dozunda α -LA verilen ratlarda yiyecek alımında azalma ve vücut ağırlıklarında düşme olduğunu bildirmişlerdir. α -Lipoik asidin 180 mg/kg/gün gibi yüksek dozda verilmesinin prooksidan aktivite meydana getirebileceğini, bu nedenle vücut ağırlığında azalmalar meydana gelebileceğini düşünmüşlerdir. Yine araştırmacılar α -Lipoik asidin hipotalamik ATP'nin aktive ettiği protein kinazı (AMPK) baskıladığını göstermişlerdir. Hipotalamik AMPK enerji harcanması ve yiyecek alımının düzenlenmesinde önemlidir. AMPK'nın baskılanması yiyecek alımında azalmaya ve aynı zamanda enerji harcanmasını artırmaktadır. Uzmanlar bu çalışmada leptin sinyal yolundan bağımsız etki gözlediklerini belirtmişlerdir (Cremer et al. 2006, Karaca 2007). Çalışmadan elde ettiğimiz beden ağırlık değişimleri literatür bilgileriyle uyumluluk göstermektedir. Ancak deneme süresi sonunda elde edilen

veriler, lipoik asitin subkronik tiner inhalasyonunun neden olduğu canlı ağırlık kaybına karşı ratları koruyamadığını ortaya koymaktadır.

Çalışma sonunda, rutin biyokimyasal parametrelerin değeriendirilmesi sonucu elde ettiğimiz veriler, kan örneklerinde glikoz düzeylerinin, Z, L, T ve LAT gruplarında kontrol grubuna oranla arttığını, bununla beraber L ve LAT gruplarında glikoz düzeylerinin diğeri gruplardan istatistiksel önemde yüksek olduğunu göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalar, α - LA'i ağır metallerle oluşan zehirlenmelerde detoksifikasyon ajanı olarak kullanıldığını, antioksidan özelliğı kendisinin dihidrolipoik aside indirgenirken, serbest radikalleri temizlemesinden ve de metal iyonlarıyla şelat yapmasından kaynaklandığını bildirmekte ayrıca hücrelerin glikoz kullanımını artırdığı için diyabet tedavisinde de yaygın olarak kullanıldığını belirtmektedirler. (Rudich et al. 1999, Thirunavukkarasu 2005). Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler tiner uygulamasının glikoz düzeyini artırmasının yanında subkronik tiner inhalasyonuna karşı ratlara koruyucu amaçla verilen α - LA'in kan glikoz düzeyini hem tinerli hemde sağlıklı kontrol grubunda dahada arttırdığını ortaya koymuştur. Bu bulgumuz daha önce yapılan çalışmalarla tezat teşkil etmekte ve bu mekanizmanın sebeplerinin daha açık bir şekilde ortaya konması için konu üzerinde daha detaylı çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Çelik ve ark. (2005), meslekleri gereğı organik solventlere maruz kalan işçilerde serum total kolesterol, trigliserid, LDL ve HDL düzeylerini araştırdıkları çalışmada; total kolesterol düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek, trigliserid, HDL ve LDL düzeyleri arasında ise önemli bir değışimin olmadığını, ayrıca solventlere maruz kalan obez bireylerde total kolesterol, LDL, VLDL ve trigliserit, düzeyleri obez olmayan bireylere göre anlamlı şekilde yüksek bulunduğunu, HDL düzeylerinin ise istatistiksel olarak düşük olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda LDL-kolesterol düzeyi değışimine bakıldığında, tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış, aynı zamanda LAT grubu LDL düzeyinin de L ve T gruplarına oranla artışı gözlenmiştir. HDL-kolesterol düzeyleri ise gruplar arasında farklılık

göstermemiştir. Plazma kolesterol düzeylerinde ise çalışma gruplarında farklılık görülmemesine rağmen, trigliserit düzeyleri açısından Z grubunda diğer gruplara oranla artış kaydedilmiştir. Maritim et al. (2003) streptozotosinle diyabet oluşturulan ratlarda 10 ve 50 mg/kg/gün dozunda α -Lipoik asidi *ip* olarak 14 gün vermişler, AST düzeylerinde 10 mg/kg/gün dozunun etkisi olmadığını, buna karşın 50 mg/kg/gün dozunda belirgin azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Guzelian et al. (1988) 289 matbaa işçisinde yaptığı çalışmada günde 8 saat 200 ppm den daha az toluene maruziyetin karaciğer hasarının göstergesi olan ALT ve AST düzeylerinde artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmalarda yapılan karaciğer biyopsilerinde hafif peri santral yağ değişimi dikkati çekmiştir. Pari and Murugavel (2004) yaptıkları çalışmada klorokinin meydana getirdiği karaciğer toksisitesinde α - Lipoik asidin 10, 30 ve 100 mg/kg/gün verilmesiyle, artmış olan AST, ALT ve ALP düzeylerinde azalmalar olduğunu, α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda 10 ve 30 mg/kg/gün dozuna göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Fornazzari et al. (1983) toluene maruz kalmanın karaciğer hasarına neden olduğunu. Boewer et al. (1988) ise tolue maruziyeti ile karaciğer hasarının indikatörü olan (serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve γ -glutamiltransferaz (GGT) düzeyleri arasında pozitif korelasyonun olduğunu bildirmiştir (Fornazzari 1988). Çalışmamızda da tiner inhalasyonunun, karaciğer hasarının önemli göstergelerinden olan AST ve ALT düzeylerinde değişiklik gözlenmiştir. LAT ve T gruplarındaki ratlarda AST düzeyleri kontrol, Z ve L gruplarına oranla anlamlı olarak artmış, diğer yandan LAT grubu AST düzeylerinin, T grubuna göre önemli düzeyde azalmıştır. LAT grubu AST düzeylerinin, T grubuna göre önemli düzeyde azalması ve lipoik asitin subkronik tiner inhalasyonunun neden AST düzeyindeki artışa karşı koruyucu özellik gösterdiği anlaşılmaktadır. Buna karşılık ALT düzeylerinde gruplar arasında farklılık gözlenmemesi dikkat çekici ve yeni araştırmalarla nedenin ortaya konması gerektiği düşünülmektedir.

Serbest radikallerin lipitler üzerine yaptığı etki lipid peroksidasyonu (LP) olarak adlandırılır. LP doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun

uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Hidrojen atomunun koparılmasıyla oluşan serbest yağ asiti radikali, moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksit radikalini oluşturur. Oluşan peroksit radikali başka bir yağ asidi molekülü ile yeni bir hidroperoksit ve yeni bir yağ asiti radikali oluşturacak şekilde hızla reaksiyona girer. Oluşan bu yağ asidi radikali yeniden oksijen ile birleşir bir hidrojen atomunun daha ayrılmasını sağlar. Başlayan bu zincir reaksiyonları oluşan yeni radikallerin etkisiyle artarak devam eder. Lipit peroksidasyonu sonucu, hücre zarı akışkanlığı ve permabilitesi zayıflar ve hücre bütünlüğü bozulabilir. Lizozomal membranların yıkımlanması hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur. Lipid peroksidasyonu birçok nedenin yanı sıra, hem yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktifleşen lipooksijenaz yolu ile prostoglandinlerden, hem de serbest radikaller ve geçiş metallerinin etkisi ile endotelial ve fagositik hücrelerin membranlarında bulunan lipidlerden, nonenzimatik yollarla da oluşur. Daha sonra bu ürünler, karşılıklı olarak birbirlerini aktive ederek, lipid peroksidasyonunu artırır (Fidan 2007). Karaözler ve ark. (2002) uzun süre çözücü etkisine maruz kalan boyacıların kanında MDA ve sitokin düzeylerini inceleyerek belirgin bir şekilde artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Halifeoğlu ve ark. (1999) çalışmalarında da tiner ile çalışan işçilerde tinerin lipid peroksidasyonuna ve antioksidan enzimlere etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada oksidatif hasar göstergesi olarak plazma MDA düzeylerini ölçerek numune grubunu kontrol grubu ile kıyasladıklarında; tiner ile çalışanların MDA düzeylerinde belirgin bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Ulakoglu ve ark. (1998) yapmış oldukları çalışmada ratları beş hafta boyunca tinere maruz bırakmışlar ve tiner teneffüsü süresince lipid peroksidasyon ürünlerinde (MDA ve 4-DHA) anlamlı artışlar gözlemlemişlerdir. Dünderoz ve ark. (2003) tiner soluyan çocuklarda tinerin lipid peroksidasyonuna etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada tiner soluyan çocukların eritrosit ve plazma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bozic et al. (2003) 3, 7 ve 11 gün toluen uyguladıktan sonra ratların eritrositlerini incelemişler ve sonuç olarak toluenin oksidatif stresi ve MDA oluşumunu indüklediğini bildirmişlerdir. Çeşitli çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engellemek veya oksidan/antioksidan dengeneyi sağlamak için

antioksidan molekül olarak nitelendirilen birçok madde kullanılmıştır. Çalışmamızda antioksidan molekül olarak kullanılan α -LA ile yapılan araştırmalarda, Hagen et al. (1999) diyetle α -LA uygulamasının ratların karaciğerinde yaşlanmaya bağlı olarak artan MDA düzeylerinde azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir. Arsenik toksisitesi geliştirilmiş ratlarda da α -LA uygulamasının karaciğer ve böbrekte MDA oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Kokilavani et al. 2005). Arivazhagan et al. (1999) ise yaşlı ratlarda antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu üzerinde α -Lipoik asidi 100 mg/kg/gün dozunda *ip.* olarak 7 ve 14 gün vermişler, lipid peroksit düzeylerinin yaşla birlikte arttığını ve α -Lipoik asit verilmesiyle azaldığını tespit etmişlerdir. Tiner inhalasyonu sonucu vücutta oluşan toksik maddeler, CYP-450 ile zararsız hale getirilmektedir. Ancak yüksek doz ve uzun süre kullanım, CYP-450'ye bağlı monooksijenazı arttırarak ve serbest radikal oluşumunu aktive ederek, enzim indüksiyon sınırını aşınca vücutta biriken toksik metabolitler hücreye zarar verirler. Bununla beraber Doksorubisin ile miyokard toksisitesi geliştirilmiş ratlarda α -LA uygulamasının kalp dokusundaki MDA oluşumunu azalttığı bulunmuştur. Doksorubisin metabolitlerinin Fe^{+2} 'i ferritinden ayırdığı ve ferröz iyonların elektron transferi ile H_2O_2 ve $\bullet OH$ oluşturarak lipid peroksidasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. α -Lipoik asidin metal şelasyonu yapma ve $\bullet OH$ radikali gibi serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahip güçlü bir antioksidant olduğu ileri sürülmektedir (Al-Majed et al. 2002). Çalışmamızda lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA, T grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak artmıştır. Diğer yandan LAT grubunda MDA düzeyleri, T grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı ve kontrol grubu düzeylerine gerilediği gözlenmiştir. T Grubunda Kontrol Grubuna göre LP ürünlerindeki artış hemen hemen tüm çalışmalarda aynı netliktedir. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi Toluol seviyeleri MDA seviyeleri arasında pozitif bir ilişkinin bulunması LP'deki artışın artan kan toluol düzeyinin bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, LAT Grubunda MDA düzeylerinin T Grubu'na göre anlamlı olarak azalması, α -Lipoik asitin oksidasyon reaksiyonlarının yıkımlayıcı etkilerine karşı koruyucu etki sağladığını göstermektedir. Yine L ve LAT Gruplarındaki MDA seviyelerinin Kontrol Grubu verilerine yaklaştığı olması, α -

Lipoik asit'in lipid peroksidasyonunu önlemede güçlü bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir.

Hemoglobinin oksijene bağlanması ve salıverilmesi sırasında hemoglobin yapısındaki iki değerlikli demirin üç değerlikli demire yükseltgenmesi ile methemoglobin oluşur; NADH, methemoglobin yapısındaki üç değerlikli demirin yeniden kullanılmak üzere iki değerlikli demire indirgenmesinde görevli enzimler için gereklidir. Methemoglobin konsantrasyonu, normal hemoglobinin %10'una ulaştığında klinik olarak siyanozise ve daha yüksek konsantrasyonda ise asfeksiye neden olabilmektedir (Noyan 2004, Durmaz ve ark. 2007). Biyolojik sistemlerde oksihemoglobin ve oksimiyoglobin gibi hemoproteinler reaktif oksijen türlerinin anlamlı ve önemli diğer bir kaynağıdır. Bunların otooksidasyonunun onların demir içeriklerinden oksijene elektronun transferi vasıtasıyla süperoksit radikali meydana getirdikleri gösterilmiştir (Çelik 2005). Çalışmamızda MetHb ölçüm sonuçları, T grubunda diğer tüm deneme gruplarına oranla anlamlı olarak artmıştır. Diğer yandan LAT grubunda MetHb düzeyinin, T grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı, L ve Z gruplarında ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel önemde bir değişimin gerçekleşmediği gözlenmiştir. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi MetHb ile Toluol ve MDA arasında pozitif bir ilişki vardır. Artan Toluol miktarı ve oksidatif stres ile MetHb arasında pozitif bir ilişkinin bulunması subkronik tiner inhalasyonunda oluşan methemoglobinemi ve artan oksidatif stresin inhale olunan toluolün bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda düşük düzeydeki DNA hasar düzeylerini hassas bir şekilde gösterebilmesi, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, ekonomik olması, sonuçların birkaç saat içinde elde edilebilmesi ve değerlendirilmesi gibi nedenlerden dolayı DNA hasar tespitinde giderek yaygınlaşan Comet Analiz yöntemi kullanılmıştır. DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür. İnsan bedeninin her hücresindeki DNA, günde yaklaşık 10.000 kez serbest radikal saldırısına maruz kalmakta ve DNA hedefli serbest radikal atakları, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Hidroksil radikali daha çok bazlar ve

deoksiribozla reaksiyona girerken, hidrojen peroksit membranlardan geçerek çekirdek DNA'sına ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne neden olabilmektedir (Weitberg 1985, Arouma 1989, Dizdaroğlu 1992, Halliwell 1992 Fidan 2007). Alfaro et al. (2005) tiner inhalasyonunun DNA üzerine etkilerini yapmış oldukları çalışmada tiner inhalasyonuna bağlı olarak DNA hasarının arttığı ayrıca DNA hasarı, artmış MDA düzeyi ve azalmış glutatyon düzeyleri arasında korelasyon olduğunu saptamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada 104–1170 ppm toluene maruz kalan 104 işçide lenfositlerinde kromozom kırıklarının olduğu bildirilmiştir Metreküpte 26–420 mg toluen içeren fabrikada çalışan işçilerde kontrol grubuna göre kromozom hasarının arttığı bildirilmiştir (WHO 1986). Çeşitli çalışmalarda lipid peroksidasyon ürünlerinin DNA hasarına sebep olabileceği rapor edilmiştir. Lipid hidroperoksitleri direk olarak DNA'da zincir kopmalarına ve lipid peroksil ve alkoksil radikalleri ise DNA'da baz oksidasyonuna sebep olabilmektedir. Biyolojik sistemlerde metHb oluşumu esnasında oluşan serbest radikallerin potansiyel biyolojik hedeflerinden biri DNA'dır. Sitotoksik ve mutajenik lezyonları da içeren DNA hasarı kanser oluşumunun başlangıç safhasında gösterilmiştir. DNA ile etkileşime giren oksijen kaynaklı radikaller baz artıkları ve eksilmeleri, iplik kırılmaları, çatı kaymaları ve DNA-protein çapraz bağları oluşturur. Bu oluşan DNA lezyonlarının tamirinin bozulması mutasyonlar, transkripsiyon ve replikasyonun baskılanması ve kromozomal kırıklar gibi kalıcı genetik değişikliklere yol açar (Çelik 2005). Çalışmamızda DNA hasarı göstergesi olarak değerlendirdiğimiz mononuklear lökosit DNA hasar sonuçları T ve LAT gruplarında kontrol grubuna oranla anlamlı olarak artmıştır. Diğer yandan LAT grubunda T grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı ve gerilediği gözlenmiştir. T Grubunda Kontrol Grubuna göre DNA hasar düzeyindeki artış diğer çalışmalarla aynı netliktedir. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi artan oksidatif stres ile DNA hasarı arasında pozitif bir ilişkinin bulunması tiner inhalasyonuna bağlı olarak DNA hasarının artan oksidatif stresin bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Yine LAT grubundaki DNA hasar seviyelerinin T grubuna oranla anlamlı olarak azalması, α -Lipoik asit'nin DNA hasarını önlemede güçlü bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu ve tiner

inhalasyonuna bağlı olarak gelişen DNA hasarının baskılanmasında koruyucu olarak kullanabileceğini ortaya koymaktadır.

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen turevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir. Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde amino asitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmaları içeren yapısal değişiklikler meydana gelir (Ripine et al. 1997). Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte, süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve süperoksit radikalinin protonlanmış formu olan hidroperoksilin varlığı da gereklidir. Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler. Serbest radikaller etkisiyle IgG ve albümin gibi fazla sayıda disfit bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. ‘‘Hem’’ proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin O_2 veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (Reznick et al 1992, Mccord 1993, Akkus 1995, Berlett and Stadtman 1997, Stadtman and Levine 2003, elik 2005). Yaptığımız çalışmada tiner inhalasyonu protein oksidasyonunu indüklemiştir. Protein oksidasyonu T grubunda kontrol grubuna oranla artmıştır. Lipoik asit uygulamasının protein oksidasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit ierigine göre değişir. Aynı zamanda izelge 4.3’te görüldüğü gibi kan MDA seviyeleri ile protein oksidasyonu arasında da pozitif bir ilişkinin varlığını ortaya koymaktadır. Bu pozitif ilişki artan kan toluol düzeyinin bir sonucu olarak LP deki artışın oluşturduğu zincirleme reaksiyonların protein oksidasyonunun önemli sebeplerinden biri olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan Sethumadhavan and Chinnakannu (2006) ge, orta yaşlı ve yaşlı ratlarda gelişen protein oksidasyonunun lipoik asit tarafından düzeltilebildiğini bildirmektedirler. Ayrı bir çalışmada akatay ve ark. (2000)

lipoik asitin diabete bağlı gelişen protein oksidasyonunu azalttığını ortaya konmuştur. LAT grubundaki protein oksidasyon seviyelerinin T grubuna oranla anlamlı olarak azalması, α - Lipoik asit'in protein oksidasyonunu önlemede güçlü bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için serum, eritrosit ve dokularında genel olarak antioksidanlar diye adlandırılan bir defans mekanizması mevcuttur. Antioksidanlar hem endojen serbest radikalleri inaktive etmek hemde antioksidanlarla DNA hasarının ve lipid peroksidasyonunun azaltılması, bu makromoleküllerle serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin etkileşiminin azaltılması yoluyla olabilir. Antioksidanlar, bu doku hasar reaksiyonlarını önlemek için direkt olarak etki edebildikleri gibi indirgenmiş glutatyon ve enzimlerin formasyonunun artırılması yoluyla indirekt olarak da etki edebilirler. Serbest radikallerin uyardığı oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemi bir bütün olarak mücadele eder. Tüm vücuttaki antioksidan durumu değerlendirmek için total antioksidan kapasite ölçümleri yapılmaktadır. Total antioksidan kapasiteye majör katkı, plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Albumin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan durumun %85'inden fazlasını oluşturmaktadır (Çelik 2005). Glutatyonun (GSH) hücre, doku ve organ sistemlerinin bütünlüğünün yapısal ve fonksiyonel olarak korunmasında antioksidan bir molekül olarak önemi büyüktür (Aksoy 2002). Glutatyon vücutta redükte ve okside olmak üzere iki formda bulunur. Bütün dokularda bulunmasına rağmen karaciğerde oldukça aktif bir şekilde sentezlenmektedir. Hücrelerde -SH grubu içeren ana moleküldür. Sülfidril grubu serbest radikaller ile direkt etkileşime girerek enzimatik olmayan antioksidan sistemin önemli bir parçasını oluşturur. Serbest oksijen radikalleri ve yabancı maddelerin enzimatik detoksifikasyonunda da kofaktör olarak görev alabilir. Böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Detoksifikasyon sırasında yükseltgenmiş endojen antioksidanları indirgeyerek rejenerasyonlarını sağlar. Bu esnada kendisinde yükseltgenmiş olur. Glutatyon redüktaz NADPH varlığında GSSG' yi GSH'a dönüştürür (Yalçın 1998, Valko et al 2006). Halifeoglu ve ark. (2000), tiner ile çalışan işçilerde artmış SOD, azalmış GSH-Px aktivitelerinin

ortaya çıktığını, Baydas ve ark. (2003) ise tiner uyguladıkları ratlarda beyinde antioksidan enzimlerden olan SOD aktiviteleri ve glutatyon düzeylerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Ilgazlı ve ark.'da (2004) günde 2 kez birer saat tiner inhale ettirdikleri ratlarda kanda 12 hafta boyunca değişimleri incelemişler; ancak SOD aktivitelerinde artış ve glutatyon seviyelerinde azalma olmakla birlikte anlamlı değişiklik saptayamamışlardır. Ulakoğlu ve ark. (1998) kronik tiner inhalasyonunda ratların akciğer ve karaciğer dokularındaki GSH seviyeleri araştırılmış ve her iki dokuda da GSH değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir.

Lipoik asit ağızdan alındığında hızla emilir, hücreye alınır ve ortamda serbest olarak bulunan dihidrolipoik asit (DHLA)'e redükte olur. Daha sonra DHLA sistini sistine indirger, hücre sisteni sistinden 10 kat hızlı alır ve GSH'ın biyosentezi hızla meydana gelir. Bu yolda DHLA'in indirekt antioksidan aktivitesi gözlenmiştir. Bu durum rat karaciğer mikrozomları kullanılarak açıklanmıştır. Elangovan ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, siklofosfamidin rat spermelerinde meydana getirdiği değişikliklerde α - Lipoik asidin 35 mg/kg/gün dozunda *ip.* verildiğinde GSH düzeylerini yükselttiğini bulmuşlardır. Şahin ve ark. (2006) kronik stres durumunda rat periferik organlarında α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda antioksidan enzim aktivitesinde etkili olduğunu bulmuşlardır. Amudha et al. (2006) ratlarda siklosporin A ile oluşturdukları oksidatif strese α - Lipoik asidin 20 mg/kg/gün dozunda oral yolla 21 günde GSH seviyelerini yükselttiğini bildirmişlerdir. Maritim ve ark. (2003) streptozotosinle diyabet oluşturdukları ratlarda *ip.* olarak ve 14 gün verdikleri α - Lipoik asidin 10 mg/kg/gün dozunda GSH seviyelerini değiştiremediğini, 50 mg/kg/gün dozunda ise GSH seviyelerini düşürdüğünü göstermişlerdir. Çalışmamızda grupların antioksidan direncinin göstergesi olarak ölçülen total antioksidan kapasite düzeyleri LAT ve T gruplarında kontrol grubuna oranla düşük bulunmuştur. Diğer yandan LAT grubunda TAK düzeyleri, T grubuna oranla anlamlı olarak artmıştır. Diğer yandan GSH düzeyleri Z ve L gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, LAT ve T gruplarında GSH düzeyleri diğer gruplara göre istatistiksel önemlilikte azalmıştır. Bu bulgularımız literatür bilgilerle uyumludur. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi Toluol seviyeleri ile GSH ve total antioksidan

kapasite seviyeleri ile negatif bir ilişki, MetHb ile total antioksidan kapasite arasında negatif bir ilişki bulunmuştur. Yine kan MDA ve Protein oksidasyonu seviyeleri ile GSH ve total antioksidan kapasite seviyeleri arasında negatif bir ilişki gözlenmektedir. Artan Toluol miktarı, LP, MetHb düzeyi ve protein oksidasyonu ile GSH ve total antioksidan kapasite seviyeleri arasındaki negatif ilişki subkronik tiner inhalasyonuna bağlı GSH ve TAK düzeylerindeki düşüşün, artmış toluol düzeyi, methemoglobinemi ve artan oksidatif stresin sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Ancak çalışmamızda deneme süresi olan 8 hafta sonunda elde edilen veriler, lipoik asitin subkronik tiner inhalasyonunun neden olduğu GSH düzeyindeki azalışını engelleyemediğini ortaya koymaktadır.

NO'nun lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve enzim fonksiyonlarının bozulması gibi zararlı etkilerinin yanı sıra antioksidan ve oksidatif hasarı azaltma gibi koruyucu ve düzenleme etkilerinin de bulunduğu bildirilmektedir (Matthew et al. 1999). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir. NO bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksid Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. NOS'ın birçok izoformu tanımlanmıştır. NO.'ın yarı ömrü 10–20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz (GC) enziminin “hem” demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır (Çelik 2005). Maniscalco et al. (2004), bu çalışmada toluen, ksilen ve metil-etil keton gibi organik çözücülerini teneffüs eden ayakkabı ve deri işçilerinin kanında NO düzeyini ölçmüşlerdir. Her iki işçi grubunda da NO konsantrasyonu kontrol grubuna kıyasla daha fazla çıkmıştır. Çalışmamızda deneme gruplarını oluşturan ratlarda nitrik oksit metabolitlerinin Z ve T gruplarında kontrol grubuna göre yüksek, L ve LAT gruplarında ise kontrol grubuna oranla düşük bulunmuş, fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir

SONUÇ

Subkronik tiner inhalasyonunun ratlarda DNA hasarı, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ile bazı biyokimyasal parametrelerdeki değişimleri ve bunlara α -lipoikasitin etkisinin araştırıldığı bu çalışmada;

- Deneme süresi olan 8 hafta sonunda lipoik asitin subkronik tiner inhalasyonunun neden olduğu canlı ağırlık kaybına karşı ratları koruyamadığını,
- Subkronik tiner inhalasyonunun glikoz düzeyini artırmasının yanında α -LA'nın kan glikoz düzeyini hem tinerli hemde sağlıklı kontrol grubunda dahada arttırdığını,
- Tüm deneme gruplarında LDL-kolesterol düzeyinin ayrıca LAT grubunda LDL düzeyi L ve T gruplarına göre anlamlı olarak arttığı,
- Subkronik tiner inhalasyonunun AST düzeylerini artırdığı, ancak α -LA'nın subkronik tiner inhalasyonunun neden AST düzeyindeki artışa karşı koruyucu özellik gösterdiği ancak ALT düzeylerinde gruplar arasında farklılık gözlenmediği ortaya konulmuştur.
- Subkronik tiner inhalasyonunun lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA, anlamlı olarak artırıp, Lipoik asitin oksidasyon reaksiyonlarının yıkımlayıcı etkilerine karşı koruyucu etki sağladığını ve α -Lipoik asit'in lipid peroksidasyonunu önlemede güçlü bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu,
- Subkronik tiner inhalasyonuna bağlı gelişen methemoglobinemi ve artan oksidatif stresin inhale olunan toluolün bir sonucu olabileceğini,
- Subkronik tiner inhalasyonunda bağlı gelişen mononuklear lökosit DNA hasarını önlemede α -Lipoik asitin güçlü bir potansiyele sahip olduğu ve tiner inhalasyonuna bağlı olarak gelişen DNA hasarının baskılanmasında koruyucu olarak kullanabileceğini
- Subkronik tiner inhalasyonunun neden olduğu protein oksidasyonuna karşı α -Lipoik asitin güçlü bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu,

- Subkronik tiner inhalasyonunda bağı artan toluol seviyeleri ile GSH ve total antioksidan kapasite seviyeleri ile negatif bir ilişki yine MetHb ile total antioksidan kapasite arasında negatif bir ilişki olduğunu, subkronik tiner inhalasyonuna bağı GSH ve TAK düzeylerindeki düşüşün, artmış toluol düzeyi, methemoglobinemi ve artan oksidatif stresin sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Ancak deneme süresi olan 8 hafta sonunda elde edilen verilerin, lipoik asitin subkronik tiner inhalasyonunun neden olduğu GSH düzeyindeki azalışını engelliyemediğini,
- Subkronik tiner inhalasyonunun ve koruyucu olarak uygulanan lipoik asitin NO düzeyleri arasında anlamlı bir değişime neden olmadığını ortaya koymaktadır.

Elde ettiğimiz veriler dikkate alındığında, tiner inhalasyonunun; hem meslekleri gereği maruz kalanlarda hem de uyuşturucu amaçlı kullanımda sağlığı olumsuz yönde etkileyebileceğini ortaya koymuştur. Yaptığımız çalışmada, lipoik asitin subkronik tiner inhalasyonuna maruz kalan ratlarda gerek metabolik parametrelerin gerekse artmış oksidatif stresin düzenlenmesinde klasik tedavilere destek olarak kullanılabileceğini, ayrıca tartışma bölümünde değindimiz bazı parametreler üzerine daha fazla çalışma yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, lipoik asitin tiner maruziyetine bağı olarak artan oksidatif stresin olumsuz etkilerinin tamponlaması, komplikasyonlarının önlenmesi veya hafifletilmesinde etkili olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aaalt, B. and Haenen, G.R.M.M., 2002, "The toxicity of antioxidants and their metabolites", *Environmental toxicology and Pharmacology*, 11,3-4, pp.251-258.
- Akkuş, İ., 1995, "Serbest radikaller ve Fizyopatolojik etkileri". 1.Baskı, Mimoza Yayınları, pp. 13-31, 32-37, 42- 61.
- Aksoy, Y., 2002, "Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü, The role of glutathione in antioxidant mechanism". *T.Clin. J.Med*, 22, pp. 442-448.
- Al-Alousi, L.M., 1989, "Pathology of volatile substance abuse: a case report and a literature review". *Med Sci Law*, 29, pp.189-20.
- Al-Majed, A.A., Gado, A.M., Al-Shabanah, O.A., Mansour, M.A., 2002, "Alpha-Lipoic acid ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin". *Pharmacol Res*, 46(6), pp. 499-503.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles. R.G., 2001, "Nitric oxide synthesis: structure, function and inhibition". *Biochem J* 357, pp. 593–615.
- Alfaro, M.M., Palma, T.L., Sandoval, Z.F. and Carabez,T.A., 2005, Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione during long exposure to thinner inhalation.
- Allen, R., Kidd, H., Lyons, G.,Templer, S., Hannat, M., 1992, Solvents. In: Walsh D, Editör. *Chemical Safety Data Sheets*. Athenaeum Press, Newcastle-UK, 1-4, 1990-5, pp. 303-5.

- Altındağ, A., Özkan, M., Oto, R., 2001, “İnhalanla ilişkili bozukluklar”. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, 11, pp. 143-148.
- Ames, B.N., Shigenara, M.K., 1992, “DNA damage by Endogenous oxidants and mithogenesis As Causes of Aging and Cancer”. Molecular Biology of free radical scavenging systems, ed, scandalios, J.G, Cold Spring Harbor Laboratuary Pres, Plainview, pp. 1-21.
- Amudha, G., Josephine, A., Varalakshmi, P., 2006, “Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine”. A, Clinica Chimica Acta, 372, 1-2, pp. 134-139.
- Andican, G., Burçak, G., 2004, “Oksidatif DNA Hasarı Ve HPLC İle Analizi”. II. Ulusal HPLC ve Diğer seperasyon Teknikleri sempozyumu, Özet kitabı, 110p.
- Archer, S., 1993, “Measurement of nitric-oxide in biological models”. FASEB J 7, pp. 349–60.
- Arivazhagan, P., Juliet, P., Panneerselvam, C., 1999, “Effect of DL- α -lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aged rats”. Pharmacological Research. 41, 3p.
- Babior, B.M., 2000, “Phagocytes and oxidative stress”. The American Journal of Medicine 109(1), pp. 33-44.
- Baydas, G., Reiter, R.J., Nedzvetskii, V.S. et al. 2003, “Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis”. Toxicol Lett, 137, pp.169-74.

- Bergendi, L., Benes, L., Durackov, Z., Ferencik, M., 1999, "Chemistry, physiology and pathology of free radicals". Life Sciences 65, pp. 1865-74.
- Berkow, R., 1982, "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy". Merck&Co. Inc. Rahway, N.J,II 11, pp. 1024-1026.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997, "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress". J. Biol Chem, 272, pp. 20313-16
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, BM., 1963, "Improved method for the determination of blood glutathione". J.Lab: Clin. Med,61, pp. 882-888.
- Biewenga, G., Haenen, G.R., Bast, A., 1997, "The pharmacology of the antioxidant lipoic acid". Gen Pharmacy, 29, pp. 315-331.
- Boewer, C., Enderlein, G., Wollgast, U., Nawka, S., Palowski, H., and Bleiber, R.,1988, "Epidemiological study on the hepatotoxicity of occupational toluene exposure". Int. Arch. Occup. Environ. Health, 60, pp. 181-186.
- Borges, F., Fernandes, E., Roleira, F., 2002, "Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors". Curr Med Chem 9, pp. 195-217.
- Bozic, T., Stevanovic, J., Kovacevic, J. et al., 2003, "Toluene Mediated Oxidative Stres and Granulo-Monocytopoiesis". Acta Veterinaria (Beograd), 53 4, pp. 201-10.
- Bölükbaşı S., 2005, "Sıçanlarda Tiner İnhalasyonunun Larenks ve Burun Mukozası Üzerine Etkileri". Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

- Brent, J.A., Rumack, B.H., 1993, "Role of free radicals in toxic hepatic injury. I. Free radical biochemistry". J Toxicol Clin Toxicol, 31(1), pp. 139-71.
- Bullock, M.W., Brockamann, J.A., Patterson, E.L., Pierce, J.V., Macchi, M.E., 1954. "Proposed structures for protogen-A and protogen-B.J.Am. Chem Soc". 76, pp. 1827-1828.
- Busse, E., Zimmer, G., Schopohl, B., Kornhuber, B., 1992, "Influence of α -lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo". Arzneim-Forsch/Drug Res, 42, pp. 829-832.
- Bülbül A., 2003, "Mastitisli İnek Sütlerinde Nitrik Oksit Düzeyi İle Somatik Hücre Sayısı Arasındaki İlişki". Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Cadenas, E., 2001, "Handbook of antioxidants (2nd ed)". Marcel Dekker Incorporated, Newyork, 23, 473p.
- Canbas, A., 1994, Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Ç.Ü Ziraat Fakültesi Ders kitabı. Adana, 78p.
- Carabez, A., Sandavol, F., Palma L., 1998, "Ultrastructural changes of tissues produced by inhalation of thinner in rats". Microsc Res Tech, 40, 56-62.
- Ceylan, E., Kocyigit, A., Gencer, M., Aksoy, N., Selek S., 2006, "Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass". Respiratory Medicine, 100, pp. 1270-1276.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993, "An introduction to free radical biochemistry". British Medical Bulletin, 49, pp. 481-493.

- Cheng, K.C., Cahil, D.S., Nishimura, S. et al. 1992, “8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G to T and A to C substitutions”. J. Biol. Chem, 267, pp. 166-172.
- Collins, A.R., 2004, “The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations. Molecular Biotechnology”. 26, pp. 249-261.
- Cremer, D.R., Rabeler, R., Roberts, A., Lynch, B., 2006, “Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA)”. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 46, 1, pp. 29-41.
- Cross, CE., Halliwell, B., Borish, ET., Pryor, WA., Ames, BN., Saul, RL., McCord, JM., Harman, D., 1987, “Oxygen radicals and human disease”. Ann Intern Med, 107, pp. 526-45.
- Çakatay, A., Telci, R., Kayali, A., Sivas, T., 2000, “Akçay Effect of α -lipoic acid supplementation on oxidative protein damage in the streptozotocin-diabetic rat, Research in Experimental Medicine”. 199(4), 243-251.
- Çakatay, U., 2006, “Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid”. Med Hypotheses, 66(1), pp. 110-7.
- Çelik H., 2005, “Malarya (Sıtma) Hastalarında Oksidatif stres ve Mononükleer Lenfosit DNA Hasarının Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- Çelik, M., Gülcü, F., Ozan, M.G., Gürsu., 2005, Organik Solventler ile Çalışan İşçilerde Paraoksonaz 1 ve Arilesteraz Aktivite Düzeyleri Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem], 30 (2), pp. 194-199.

David Wolfson, N. D., 2000, "Lipoic acid: The universal antioxidant". Nutrition Science News.

Dizdaroğlu, M., 1991, "Chemical Determination of free radical-induced damage to DNA". Free. Radic. Biol. Med,10, pp. 225-242.

Dizdaroğlu, M., 1992, "Oxidative Damage to DNA in Mammalian Chromatin.Mutat". Res, 275, pp. 331-342.

Dizdaroğlu, M., Edited by Halliwell, B., and Aruoma, O. I., Horwood, E., 1993, "Chemistry of Free Radical Damage to DNA and Nucleoprotein, in DNA and Free Radicals". London, pp. 19-39.

Draper, H.H., Hadley, M., 1990, "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation". Methods Enzymol, 186, pp. 421-30.

Durmaz, H., Ardıç, M., Aygün, O., Genli, N., 2007, "Şanlıurfa ve Yöresindeki Kuyu Sularında Nitrat ve Nitrik Düzeyleri". YYÜ Vet Fak Derg, 18(1), pp. 51-54.

Dündar, Y., Aslan, R., 2000, "Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar". T.C. A.K.Ü, Yayın no:29, Uyum Ajans Ankara, 1. Basım, pp. 4-6.

Dündaroz, M.R., Türkbay, T., Akay, C., Sarici, S.U., Aydın, A., Denli, M., Gökçay, E., 2003, "Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescents with inhalant abuse". Turk J Pediatr, 45, pp. 43-5.

Eisenberg, D.P., 2003, "Neurotoxicity and mechanism of toluene abuse". Einstein Quart J Biol Med19, pp. 150-9.

- Elangovan, S., Chidambaram, P., Periyasamy, T.S., Palaninathan, V., 2006, "Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm". *Toxicology*, 217,1, pp. 71-78.
- Ellenharn, MJ., Barcelaux, DG.,1988, "Elsevier Science PublishiCompany". Amsterdam, Medical Toxicology. pp. 940-61.
- Ellovaara, E., Savolainen, H., Paffli, V. H., 1979, "Effects of subacute toluene inhalation on its metabolism and disposition in rat". *Arc Toxicol Suppl*, 2, pp. 345-8.
- Ertürk Ş., 2001, "Sevofüloranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening ve Maling Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi". Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı. Ankara.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004, "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance". *Mutation Research Reviews*, 567, pp. 1-61.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995, "The Comet Assay". *A Comprehensive Review. Mutation Res*, 339, pp. 37-59.
- Fidan A.F., 2007, "Deneyisel diyabet oluşturulmuş ratlarda diyet katılan farklı yapılarıdaki saponin içeren bitkilerin dna hasarı, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu ile bazı biyokimyasal parametrelere etkilerinin araştırılması". Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Afyonkarahisar.
- Filley, C.M., Halliday, W., Kleinschmidt-Demasters B, K., 2004, "The Effects of Toluene on the Central Nervous System". *J Neuropathol Exp Neurol*, 63 1, pp. 1-12.

- Flanagan, R.J., Ruprah, M., Meredith, T.J., Ramsey, J.D., 1990, "An introduction to clinical toxicology of volatile substances". *Drug Saf*, 5, pp. 359-83,
- Foote, C.S., Shook, F.C., Abakerli, R.B., 1984, "Characterization of singlet oxygen". *Methods Enzymol* 105, pp. 36-47.
- Fornazzari, L., Wilkinson, D.A., Kapur, B.M., and Carlen, P.L., 1983, "Cerebellar cortical and functional impairment in toluene abusers". *Acta Neurol. Scand*, 67, pp. 319-329.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982, "Biology Of Disease Free Radicals And Tissue Damage". *Laboratory Investigation*, 4 (47), pp. 412-426.
- Frei, B., 1994, "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action". *Am J Med* 26, pp. 5-12.
- Fuchs, J., et al. 1993, "Studies on lipoate effects on blood redox state in human immunodeficiency virus infected patients". *Arzneim-Forsch*, 43(2), pp. 1359-1362.
- Goralska, M., Dackor, R., Holley, B., McGahan, M.C., 2003, "Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells". *Exp Eye Res*, 76(2), pp. 241-8.
- Gözükara, E.M., 1989, *Biyokimya. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları* Malatya, pp. 55,56,705,845-848.
- Gutteridge, J.M.C., 1995, "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage *Clinical chemistry*(Baltimore, Md.)". 41, pp. 1819-1828.
- Guzelian, P., Mills, S., and Fallon, H.J., 1988, "Liver structure and function in print workers exposed to toluene". *J. Occup. Med*, 30(10), pp. 791-796.

- Hagen, T.M., Ingersoll, R.T., Lykkesfeldt, J., Liu, J., Wehr, CM., Vinarsky, V. et al. 1999, "(R)- α -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate". FASEB J, 13(2), pp. 411-18.
- Halifeoğlu, I., Karatas, F., Üstündag, B., Canatan H., İlhan N., 1999, "Tiner ile çalışan kisilerde tiner solumanın antioksidan vitaminler üzerine etkisi". Turk J Biochem, 24, pp. 29-33.
- Halliwell, B., 1984, "Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance ". Med Biol 62, pp. 71-7.
- Halliwell, B., 1987, "Free radicals and metal ions in health and disease". Proc Nutr Soc, 46, pp. 13-26.
- Halliwell, B., 1991, "Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease". Am. J. Me, 91,3, pp. 14-21.
- Halliwell, B., 1995, "Antioxidant characterization. Methodology and mechanism". Biochemical Pharmacology 49(10), pp. 1341-1348.
- Halliwell, B., Dizdaroglu, M., 1992, "The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques", Free Radical Res Commun, 16, pp.75-87.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990, "Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease". An Overview, Methods. Enzymol, 186 p.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2001, "Free Radicals in Biology and Medicine, Third Edition". Oxford Science Publications, pp. 22-24.

- Han, D., Handelman, G., Marcocci, L., Sen, C.K., Roy, S., Kobuchi, H., Flohe, L., Packer, L., 1997, "Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cysteine utilization". *Biofactors*, 6, pp. 321-338.
- Harrison, J.H., Jollow, D.J., 1986, "Role of aniline metabolites in anilineinduced hemolytic anemia. *J Pharmacol. Exper*". *Ther*, 238, pp. 1045-1054.
- Horoz, M., Bolukbası, C., Bolukbas, F., Kocyigit, A. et al. 2006, "Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis". 596, 1-2, pp. 137-142.
- Ilgazlı, A., Sengul, C., Maral, H., Ozden, M., Ercin, 2004, "The effects of thinner inhalation on superoxide dismutase activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs". *Clin Chim Acta*, 343, pp. 141-4.
- Iqbal, N., 2001, "Neurotoxic effects of inhalants". *Annals of Saudi Medicine*, 21, pp. 216-18.
- İnan, Ü.Ü., Serteser M., Ermiş S.S., Demir S., Öztürk F., (2005) Diabetes mellituslu hastalarda serum leptin, VEGF, NO ve ET- 1 düzeyleri ile retinopati derecesi ve tedavisi şekli arasındaki ilişki. AKU BAP 01.TIP.05 No'lu Araştırma Projesi kesin Raporu. Afyonkarahisar.
- Jajob, S., et al. 1996, "Improvement of insulin-stimulated glucose disposal in type 2 diabetes after repeated parenteral administration of thioctic acid. *Exp. Clin. Endocrinal Diabetes*". 104, pp. 284-288.

- Jenkins, L.J., Jones, R.A., Siegel, J., 1970, "Long term inhalation screening studies of benzene, toluene, o-xylene, and cumene on experimental animals". *Toxicol Appl Pharmacol* 16, pp. 818-23.
- Karaca G., 2007, "Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda α -Lipoik Asidin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Karaözler, A.A., Mehmet, N., Batcioglu, K., 2002, "Effects of long-term solvent exposure on blood cytokine levels and antioxidant enzyme activities in house painters". *J Toxicol Environ Health*, 13, 65, pp. 1237-46.
- Kayalı, R., Çakatay, U., 2004, "Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları Cerrahpaşa". *J Med*, 35, pp. 83-89.
- Kılınç, K., Kılınç, A., 2002, "Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri". *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), pp. 110–118.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., et. al. 1995, "A Comparison Between Manual Microscopic Analysis and Computerized Image Analysis In The Single Cell Gel Electrophoresis". *MMS Commun*, 3(2), pp. 103-115.
- Koçyiğit, A., Keles, H., Selek, S., et al. 2005, Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Volume 585, Issues, 1-2, 71-78.
- Kok, A., Berkel, W.J.H., "Lipoamid dehydrogenase", In Patel, M., Roche, T.E., Harris R.A., 1996, "Alpha-keto acid dehydrogenase complexes". *Birkhauser*, pp. 53-67.

- Kokilavani, V., Devi, M.A., Sivarajan, K., Panneerselvam, C., 2005, "Combined efficacies of DL- α -lipoic acid and meso 2,3 dimercaptosuccinic acid against arsenic induced toxicity in antioxidant systems of rats". *Toxicol Lett*, 160(1), pp. 1-7.
- Korkina, L., et al. 1993, "Antioxidant therapy in children affected by irradiation from the Chernobyl nuclear accident". *Biochem. Soc. Trans*, 21, 314p.
- Kramer, K., 2001, "Nutraceuticals in Health and Disease Prevention". Marcel Dekker Incorporated, New York, 8, 113p.
- Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., et al., 1987, "Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues". *Nature*, 327, pp. 77-79.
- Kuyvenhoven, J.P., Meinders, A.E., 1999, "Oxidative stress and diabetes mellitus, Pathogenesis of long-term complications". *European Journal of Internal Medicine* 10(1), pp. 9-19.
- Kuzugüden S., 2007, "Tiner ile Rat Beyninde Oluşturulan Oksidatif Stres Üzerine Melatonin ve Eritropoetinin Etkisi". *Tıpta Uzmanlık Tezi*, Erciyes Üniversitesi Tıp Fak. Anabilim Dalı, KAYSERİ.
- Lancaster, J., Ed, J.R., 1996, "Nitric oxide: Principles and Actions". Academic Press, San Diego.
- Lebel, CP., Schatz RA., 1990, "Altered synaptosomal phospholipid metabolism after toluene. Possible relationship with membrane fluidity, Na⁺, K⁺ - adenosine triphosphate and phospholipid methylation". *J Pharmacol Exp Ther*, 253, pp. 1189-97.

- Levin, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., et al. 1990, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins''. *Methods Enzymol*, 186, pp. 464-478.
- Liu, J., Atanma, H., Kuratsune, H., Ames, B.N., 2002, "Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites''. *Ann NY Acad. Sci*, 959, pp. 133-166.
- Loschen, G., Flohe. B., 1971, "Chance respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria''. *FEBS Lett* 18, pp. 261-3.
- Maitro, J., et al. 1995, "Alpha Lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats''. *Free Rad. Biol. Med*, 18, pp. 823-829.
- Maniscalco, M., Grieco, L., Galdi, A., Lundberg, J.O., Sofia, M., 2004, "Increase in exhaled nitric oxide in shoe and leather workers at the end of the work-shift''. *54(6)*, pp. 404-7.
- Maritm, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B., 2003, "Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stres in streptozotocin-induced diabetic rats''. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, pp. 288-294.
- Marjot, R., and McLeod, A.A., 1989, "Chronic non-neurological toxicity from volatile substance abuse ''. *Human Toxicol*, 8, pp. 301-306.
- Matthew, B.G., Jourd'Heuil, D., Wink, D.A., 1999, "Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation''. *Am. J. Physiol*, 276, pp. 315-321.

- Mattia, C.J., Adams, J.D., Bondy, S.C., 1993a "Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism". *Biochem Pharmacol*, 46, pp. 103-10.
- Mattia, C. J., Ali, S. F., Bondy, S. C., 1993b, "Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs". *Mol Chem Neuropathol*, 3, pp. 313-28.
- Mattia, C.J., LeBel, C.P., Bondy, S.C., 1991, "Effect of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation". *Biochem Pharmacol*, 42, pp. 879-82.
- Mccord, J.M., 1993, "Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance". *Clin Biochem*, 26(4), pp. 351–7.
- Meadows, R., Verghese, A., 1996, "Medical complications of glue sniffing". *South Med J*, 89(5), pp. 455-62.
- Miranda, K.M., Espey, G., Wink, A.D., 2001, "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite". *Nitric Oxide*, 5(1), pp. 62-71.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991, "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology". *Pharmacol Rev*, 43(2), pp.109-42.
- Morris, T.W., Reed, K.E., Cronan, J.E., 1995, "Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *IpIA* and *libB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein". *J.Bacteriol*; 177, pp. 1-10.
- Noyan, T., Yalçinkaya, A.S., Şekeroğlu, M.R., Dülger, H., Balaharoğlu, R., 2004, "Antioxidant Effects Of Pentoxifylline And Melatonin In The

Alloxane-Induced Diabetic Mice''. Turkish Journal of Biochemistry, 2, 29 (4), pp. 268-272.

Ostling, O., Johanson, K, J., 1984, "Microelectrophoretic Study Of Radiation Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells". Biochemical And Biophysical Research Communications, 123, pp. 291–298.

Özdamar, K., 2003, "SPSS ile Biyoistatistik". 5.Baskı. Kaan Kitap Evi. Eskişehir.

Packer, L., 1994, "Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts". Am. NY. Acad. Sci, 738, pp. 257-264.

Packer, L., Witt, E., Tritschler, H.J., 1995, "α-Lipoic acid as a biological antioxidant". Science Direct-Free Radical Biology & Medicine, 19(2), pp. 227-250.

Packer, L., 1998 "Alpha Lipoic acid : a metabolic antioxidant which regulates NF- kappa B signal transduction and protects against oxidative injury". Drug. Metab. Rev, 30(2), pp. 245-275.

Pal, Yu. B., 1994, "Cellular Defenses Against Damage from Reactive Species". Physiological Reviews, 74, 1, pp. 139-162.

Pari, L., Murugavel, P., 2004, "Protective effect of alpha-lipoic acid against chloroquine –induced hepatotoxicity in rats". J. Appl. Toxicol, 24(1), pp. 21-26.

- Perham, N., 1991, "Domains, motifs and linkers in 2-oxo-acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein". *Biochemistry*, 30, pp. 8501-8512.
- Podda, M., Tritschler H.J., Ulrich H., Packer L., 1994, "α-Lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency". *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 204, pp. 98-104.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman. B.A., 1995, "Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. J Biol Chem 1991, 266, 4244-50. as biomarkers of Tissue Damage". *Clin Chem* 41:12, pp. 1819-28.
- Ramsey, J., Anderson, R., Bloor, K., Flanagan, R.J., 1989, "An introduction to the practice, prevalence and Chemical Toxicology of volatile substance abuse". *Human Toxicol*, 8, pp. 261-9.
- Rangan, U., Bulkley ,G.B., 1993, "Prospects for treatment of free radical mediated tissue injury". *Br Med Bull*, 49(3), pp.700-18.
- Reiter, R.J., 1998, "Melatonin and human reproduction". *Ann Med*, 30, pp. 103-113.
- Reiter, R.J., 1991, "Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions". *Endocr Rev* 12, pp.151-80.
- Reznick, A.Z., Cross, C, E., Hu.M.L., et al. 1992, "Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation". *Biochem, J*, 286, pp. 607-0.
- Ripine, J.E., Bast, A., 1997, "Lankharst. Lipids I, and The Oxidative Strees Study Graup: Oxidative strees in chronic obstructive pulmorary disease". *J. Respir Crit Care Med*, 156(26), pp. 341-347.

- Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Khamaisi, M., Bashan, N., 1999, "Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes". *Diabetologia*, 42, pp. 949–957.
- Sen, C.K., Roy, S., Han, D., Packer, L., 1997, "Regulation of cellular thiols on human lymphocytes by alpha-lipoic acid: a flow cytometric analysis". *Free Rad. Biol. Med*, 22, pp. 1241-1257.
- Sen, C.K., Roy, S., Packer, L., 1999, " α -Lipoic acid: cell regulatory function and potential therapeutic implications". San Diego; Academic Pres, pp. 111-119.
- Serafini, M., Del Rio D., 2004, "Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?". *Redox Report* 9(3), pp. 145-152.
- Sethumadhavan, S., Chinnakannu, P., 2006, "Carnitine and lipoic acid alleviates protein oxidation in heart mitochondria during aging process". *Biogerontology*, 7(2), pp. 101-9.
- Shigenaga, M.K., Ames, B.N., 1991, "Assays for 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine: A Biomarker of in vivo Oxidative DNA Damage". *Free Rad. Biol. Med*, 10, pp. 211-216.
- Shih, J.C.H., 1983, "Atherosclerosis in Japanese quail and the effect of lipoic acid". *Fed. Proc*, 42, pp. 2494-2497.
- Sies, H., 1991, "Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application". *Am. J. Med*, 91, 3, pp. 31-38.

- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.Exp". Cell Res, 175, pp. 184-191.
- Stadtman, ER., Levine, RL., 2003, "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins". J. Amino Acids, 25(1), pp. 207-218.
- Stevenson, M.A., Pollock, S.S., Coleman, C.N., 1994, "Calderwood S.K., Xirradiation, phorbol esters, and H₂O₂ stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates". Cancer Res Jan, 1, 54(1), pp. 12-5.
- Stickny, J.A, Roberts, A.E, Silverman, D.M, Schatz, R.A., 1989, "The effect of m-xylene on rat lung benzo [a] pyrene metabolism and microsomal membrane lipids". Comparison with p-xylene. Toxicol, 58, pp. 155-165.
- Streeper, R:S., Henriksen, E.J., Jacob, S., Hokama, J.Y., Donovan, L.F., Tritschler, H.J., 1997, "Differential effects of lipoic acid stereoisomers on glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle". Am. J. Physiol, 273, pp. 185-191.
- Suleiman, S.A., 1987, "Petroleum hydrocarbon toxicity in vitro: Effects of n-alkanes, benzene and toluene on pulmonary alveolar macrophages and lysosomal enzymes of the lung". Arch Toxicol, 59, pp. 402-407.
- Sumathi, R. et al. 1996, "Relationship between glutathion and DL alpha-lipoic acid against cadmium-induced hepatotoxicity". Jpn. J. Med. Sci. Biol, 49(2), pp.39-48.
- Şahin, M., Sağdıç, G., Elmas, O., Akpınar, D., Derin, N., Aslan, M., Ağar, A., Alıcıgüzel, Y., Yargıçoğlu, P., 2006, "Effect of chronic restraint stress and alpha- lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs". Pharmacological Research, 54, 3, pp. 247-252.

- Thirunavukkarasu, V., Anitha Nandhini, AT, Anuradha, CV., 2005, "Lipoic acid improves glucose utilisation and prevents protein glycation and AGE formation". *Pharmazie*. 60(10), pp. 772-5.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D. et al., 2000, "Single Cell Gel/Comet Assay", *Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, pp. 206-221.
- Tiner, 1992, Türk Standartları Enstitüsü, TS 9720/ocak
- Ulakoğlu, E.Z., Saygı, A., Gümüştaş, M.K., Zor, E., Akaya, A., Kökoğlu, E., 1998a, "The effect of chronic thinner inhalation on lipid peroxidation in rat lung and liver". *Cerrahpasa J Med*, 29, pp.75-8.
- Ulakoğlu, E.Z., Saygı, A., Gümüştaş, M.K., Öztekin, İ., Kökoğlu, E., 1998b, "Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lung: relationship between histopathological properties". *Pharmacol. Res*, 38(3), pp. 209-214.
- Ünal, Y., 1998, "Radyoterapi Gören Kanserli Hastalara Ait Kan Lenfositlerinde DNA Hasarının COMET Assay Tekniği İle Araştırılması". Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer". *Chem Biol Interact*, 160(1), pp. 1-40.
- Vural, N., 1996, *Toksikoloji* (1. Baskı). Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, pp. 453-81.

- Weitberg, A.B., Weitzman, S.A., Clark, E.P. et al., 1985, "Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation". J Clin Invest, 75(6), pp. 1835-41.
- WHO 1986, "International Programme on Chemical Safety (IPCS), Chemical". Environmental Health Criteria 52: Toluene. Geneva.
- Wu, D., Cederbaum, A.I., 2003, "Alcohol, oksidative stres and free radical damage". Alcohol Res Health 27, pp. 277-84.
- Yalçın, AS., 1998, "Antioksidanlar. Klinik Gelişim". II, 342-6 p.
- Yamada, K., 1993, "Influence of lacquer thinner and some organic solvent on reproductive and accessory reproductive organs in male rat". Biol Pharm Bull, 16(4), pp. 425-7.
- Yang, M.H., 1996, "Schaich KM. Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes". Free Radic Biol Med 20, pp.225-236.
- Yasuno, R., Wada H., 2002, "The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in arabidopsis Thaliana". FEBS Lett, 517, pp. 110-114.
- Yu, B.P., 1994, "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species". Physiol Rev, 74(1), pp. 139-62.
- Yüksel, N., Dereboy, Ç., 1994, "Üniversite öğrencileri arasında madde kullanımı". Türk Psikiyatri Dergisi. 5(4), pp. 283-286.

İnternet Kaynakları**Erişim Tarihi**

1. http://www.istanbul.gov.tr/%5CPortals%5CProjects%5CSokakCocuklari%5CDocs%5Csokaktayc_aralik04.ppt 18.10.2008
2. <http://www.ctf.istanbul.edu.tr/> 08.11.2008
3. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/SearchResultsPage/PricingAvailability/SIGMA;10771> 03.11.2008

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğba ŞAHİN

Doğum Yeri : ORDU

Doğum Tarihi : 01/09/1983

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ordu Atatürk Lisesi

Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi

Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi