

**SIÇANLARDA TOLÜEN TOKSİSİTESİNİN
ASETİLKOLİNESTERAZ, Na⁺/K⁺ ATPaz,
FOSFOFRUKTOKİNAZ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN POST-MORTEM ARAŞTIRILMASI**

Abdelazim Adil MOHAMMED

**SIÇANLARDA TOLÜEN TOKSİSİTESİNİN
ASETİLKOLİNESTERAZ, Na⁺/K⁺ ATPaz,
FOSFOFRUKTOKİNAZ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN POST-MORTEM ARAŞTIRILMASI**

Abdelazim MOHAMMED



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA TOLÜEN TOKSİSİTESİNİN ASETİLKOLİNESTERAZ,
Na⁺/K⁺ ATPaz, FOSFOFRUKTOKİNAZ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN POST-MORTEM ARAŞTIRILMASI**

Abdelazim Adil MOHAMMED

Dr. Öğr. Üyesi. Egemen DERE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2018

TEZ ONAYI

Abdelazim Adil MOHAMMED tarafından hazırlanan “Sıçanlarda Tolüen Toksisitesinin Asetilkolinesteraz, Na⁺/K⁺ ATPaz, Fosfofruktokinaz Aktiviteleri Üzerine Etkisinin Post-mortem Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bi-limleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Egemen DERE

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi. Egemen DERE
Uludağ Üniversitesi Fen
Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Engin Ulukaya
İstinye / Tıp / Tıbbi Biyokimya

Üye : Prof. Dr. Belgin İzgi
Uludağ / Fen-Edebiyat / Kimya

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

06/07/2018

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

06/07/2018

Abdelazim Adil MOHAMMED

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIÇANLARDA TOLÜEN TOKSİSİTESİNİN ASETİLKOLİNESTERAZ, Na⁺/K⁺ ATPaz, FOSFOFRUKTOKİNAZ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN POST-MORTEM ARAŞTIRILMASI

Abdelazim Adil MOHAMMED

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Egemen DERE

Planlanan bu çalışmada, sıçanlarda tolüen maruziyetine bağlı gerçekleşen ölümlerde asetilkolinesteraz, Na⁺/K⁺ ATPaz ve fosfofruktokinaz enzimlerinin kalp kanı ve beyin dokusunda post-mortem düzeylerinin incelenmesi, ölüm sonrası geçen zamana bağlı olarak aktivite değişimlerinin hesaplanması amaçlanmaktadır. Tolüen maruziyeti sebebiyle gerçekleşen ani ölümlerde enzimlerin (asetilkolinesteraz, Na⁺/K⁺ ATPaz, fosfofruktokinaz) nasıl etkilendiği incelenerek ölüm zamanı ile ilişkisi araştırılacaktır. Organik çözücüler günlük yaşamda sık kullanılan sıvı maddelerdir. Çeşitli alanlarda kullanılır (tiner, boyalar, boya incelticiler, vernik, pas önleyiciler, yapıştırıcılar, solvent tabanlı temizleyiciler, kozmetik ürünleri vb.) ve insanlar bu çözücülere inhalasyon, cilt teması, oral yol gibi çeşitli şekillerde maruz kalırlar. Bu kimyasallar arasında özellikle toplumun düşük sosyoekonomik grubundaki gençler tarafından narkotik olarak kullanılan uçucu maddeler bulunmaktadır. Türkiye’de orta öğrenim gören öğrencilerin, uçucu madde kullanım sıklığının %5,1 civarında olduğunu ileri sürmektedir. Tolüen; renksiz, berrak, keskin ve hoş kokusu olan uçucu bir sıvı hidrokarbondur. Ham petrolden benzin ve diğer yakıtların ayrıştırılması sırasında ortaya çıkmaktadır. Endüstride sık kullanılan bir maddedir, tolüenin başlıca; boyalar, vernik, pas önleyiciler, yapıştırıcılar, solvent tabanlı temizleyicilerde, boya incelticiler ve ayrıca kozmetik ürünlerde kullanması yaygındır. Çok yaygın bir kullanıma sahip olan tolüene maruz kalan canlılarda kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, sinir sistemi ve beyin üzerinde hasar bırakır. Tolüen, absorpsiyonu sonrası sitokrom p-450 enzim ailesi tarafından okside olur ve sonuçta reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Bu reaktif oksijen türleri birçok doku ve organda hücresel toksisiteye neden olur. Organik solventlerin hücre hasarındaki toksik etkilerini ROS oluşumu yolu ile gösterdikleri belirlenmiştir. Süperoksit anyonu, ferril ve hidroksil iyonları gibi reaktif oksijen ürünlerinin lipid peroksidasyonlarını başlattığı bilinmektedir. ROS'un zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Oksidatif stres ile birlikte oluşan ve ROS olarak bilinen moleküller, özellikle lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir.

Anahtar Kelimeler: Tolüen, postmortem Asetilkolinesteraz, Na⁺/K⁺ ATPaz, Fosfofruktokinaz

2018, ix+ 81 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

POST-MORTEM INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TOLUENE TOXICITY ON ACETYLCHOLINESTERASE, Na + / K + ATPase, PHOSPHOFRUCTOKINASE ACTIVITY IN RATS

Abdelazim Adil MOHAMMED

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Egemen DERE

In this study, it is aimed to investigate the post-mortem levels of acetylcholinesterase, Na + / K+ ATPase and phosphofructokinase enzymes in the blood of the heart and brain tissues, and to calculate the activity changes depending on the time after death in deaths due to toluene exposure in rats. In addition to how the enzymes (acetylcholinesterase, Na + / K + ATPase, phosphofructokinase) are affected by sudden deaths due to toluene exposure, and the relationship with the time of death will be investigated. Organic solvents are frequently used liquids in everyday life. It is used in various areas (thinner, dyes, paint thinners, varnishes, rust inhibitors, adhesives, solvent-based cleaners, cosmetics etc.) and people are exposed to these solvents in various forms such as inhalation, skin contact, oral route. These chemicals are in particular volatile substances used as narcotics by young people in the low socioeconomic group of the society. There is a continuous increase of 5.1% in the prevalence of this volatile substance, especially among secondary students in Turkey. Toluene; a volatile liquid hydrocarbone with colorless, bright, strong and pleasant odor. This liquid is shown during the decomposition of gasoline and other fuels from crude oil. In the industry it is a commonly used material, toluene is mainly used in; paints, varnishes, rust inhibitors, adhesives, solvent-based cleaners, paint thinners and also cosmetic products, And other common uses. Exposure to toluene causes damage to the heart, lungs, liver, kidney, nervous system and brain. Toluene is oxidized by the cytochrome p450 enzyme family after absorption, resulting in reactive oxygen species (ROS), these ROS cause cellular toxicity in many tissues and organs. It has been determined that organic solvents show toxic effects of cell damage through the formation of ROS. Superoxide anion is known to initiate lipid peroxidation of ROS such as ferric and hydroxyl ions. Antioxidant defense systems have been developed to prevent the harmful effects of ROS. However, in some cases, the available antioxidant defense system can not completely inhibit the action of free radicals and the condition called oxidative stress occurs. Molecules that are formed by oxidative stress and are known as ROS, it damages especially cell components such as lipids, proteins, and DNA.

Keywords: Toluene, post-mortem, Acetylcholinesterase, Na + / K + ATPase and Phosphofructokinase

2018, ix + 81 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarında danışmanlığımı yapan, tez konumun bulunması, planlanması ve çalışmamın yürütülmesi süresince her adımda tecrübe ve bilgilerini benimle seve seve paylaşan ve her konuda hem maddi hem manevi desteğini benden esirgemeyen, geleceğime yön veren ve mesleki bakımından iyi bir bilim insanı olabilmek için büyük emek harcayan, onunla çalışmaktan guru duyduğum ve her zaman ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm, değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Egemen DERE'ya,

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan, benden moral ve desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan çok büyük zevk, haz, eğlence ve keyif aldığım laboratuvar arkadaşlarım Oğuzhan AKGÜN, İmren ALIOĞLU ve Buse CEVATEMRE'ye,

Çalışmamın her aşamasında bana güç ve motivasyon veren, çalışmamın zor aşamasında beni cesaretlendiren, her zaman manevi ve maddi desteğini, sabrını ve güler yüzünü benden hiç esirgemeyen kıymetli arkadaşım Emine Gonca PEKEL'a,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve aldığım her kararda beni destekleyen, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi ve başarılarımın ilham kaynağı sevgili aile efratlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Uludağ Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (UAP(F)-2017/6) numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ..	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Tolüen	3
2.1.1. Tolüen Kimyası	3
2.1.2. Tolüen Maruziyeti	4
2.1.3. Toksikokinetik	4
2.1.4. Tolüen Metabolizması	6
2.1.5. Atılımı	7
2.2. Post-mortem	8
2.2.1. Post-mortem Biyokimyasal Belirteçler	8
2.2.2. Post-mortem Değişimleri	18
2.3. Çalışmada Araştırılan Enzimler	21
2.3.1. Asetilkolinesteraz Enzimi	21
2.3.2. Na ⁺ -K ⁺ ATPaz Enzimi	29
2.3.3. Fosfofruktokinaz Enzimi	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM	41
3.1. Materyal	41
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Kitler	41
3.1.2. Sarf Malzemeler	42
3.1.3. Cihazlar	42
3.2. Yöntem	43
3.2.1. Asetilkolinesteraz Enzimi	43
3.2.2. Na ⁺ -K ⁺ ATPaz Enzimi	47
3.2.3. Fosfofruktokinaz Enzimi	51
3.2.4. İstatistiksel Analiz	53
4. BULGULAR	54
4.1. AChE Enziminin Bulguları	54
4.1.1. Beyin Bulguları	54
4.1.2. Kan Bulguları	56
4.2. Na ⁺ /K ⁺ ATPaz Enzimin Bulguları	57
4.2.1. Beyin Bulguları	57
4.2.2. Kan Bulguları	59
4.3. PFK Enzimin Bulguları	60
4.3.1. Beyin Bulguları	60
4.2.2. Plazma Bulguları	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR	70

ÖZGEÇMİŞ	81
----------------	----

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
σ	Varyans
nmol	Nanomol
μ mol	Mikromol
mmol	Milimol
pmol	Pikomol
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
g	Gram
kg	Kilogram
nm	Nanometre
cm	Santimetre
m	Metre
μ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
mV	Millivolt
dL	Desilitre
L	Litre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
h	Saat
kDa	Kilo dalton
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki devir sayısı
ϵ	Molar absorpsiyon katsayısı
ppm	Milyonda bir birim
mmHg	Milimetre civa
Cc	Kübik santimetre
Kısaltmalar	Açıklama
ATP	Adenozin Trifosfat (Adenosine triphosphate)
DTNB	5,5' ditio bis (2-nitro benzoik asit)
ADP	Adenozin Difosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
Hb	Hemoglobin
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
AChE	Asetilkolinesteraz
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
Pi	İnorganik Fosfat
BSA	Bovine sığır albümin
KM	Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
mRNA	Haberci ribonükleik asit
V _{max}	Maksimum Hız
PFK	Fosfofruktokinaz

CYP	Sitokrom p450
3HB	3-hidroksibütirat
GIS	Gastrointestinal sistem
DKA	Diabetik Ketoasidoz
PMİ	Post-Mortem İnterval
CDT	Karbonhidrat-eksikliği transferrin
EtG	Etil glukuronid
EtS	Etil sülfat
Tf	Transferrin izoformları
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
Anp	Atrial natriüretik peptid
BNP	B-tipi natriüretik peptid
CK	Kreatin kinaz
CK-MB	Kreatin kinaz-MB
C(TnC), T(TnT)	Kardiyak spesifik troponin
PCT	Serum procalcitonin
CRP	C-reaktif protein
ACh	Asetilkolin
ChAT	Kolin asetiltransferaz
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
Phe	Fenilalanin
OAD	Oksi-Anyon Deliği
Ser	Serin
His	Histidin
Glu	Glutamin
NEM	N-etil malelmid
EC	Enzim sınıflaması

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Tolüenin kimyasal yapısı	3
Şekil 2.2. Tolüen Metabolizması.....	7
Şekil 2.3. Asetilkolinin asetilkolinesteraz enzimi ile hidrolizine ait tepkime ve oluşan ürünler.....	21
Şekil 2.4. ACh'in salınım, sentez, inaktivasyon ve presinaptik nörona geri alınmasının şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.5. ACh sentez ve transfer mekanizması.....	23
Şekil 2.6. E2020 ligandı ile kompleks yapmış asetilkolinesteraz.....	25
Şekil 2.7. İnsan AChE geninin genel yapısı ve gene ait alternatif RNA'lar.....	27
Şekil 2.8. Na ⁺ -K ⁺ ATPaz enziminin yapısı.....	29
Şekil 2.9. Na ⁺ ve K ⁺ iyonlarının taşınması.....	31
Şekil 2.10. Glukoz transferi.....	32
Şekil 2.11. Ouabainin yapısı.....	34
Şekil 2.12. Ouabainin Na ⁺ -K ⁺ ATPaz'a bağlanıp inhibe etmesinin olayı.....	35
Şekil 3.1. Tipik bir AChE standart eğrisi.....	47
Şekil 4.1. Beyin AChE aktiviteleri.....	55
Şekil 4.2. Kan AChE aktiviteleri.....	57
Şekil 4.3. Beyin Na ⁺ K ⁺ ATPaseaktiviteleri.....	58
Şekil 4.4. Kan Na ⁺ K ⁺ ATPaseaktiviteleri.....	60
Şekil 4.5. Beyin PFK aktiviteleri.....	61
Şekil 4.6. Plazma PFK aktiviteleri.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Tolüenin fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıdaki.....	3
Çizelge 2.2. Postmortem biyokimyasal belirteçler (Dicle Tıp Dergisi 2014).....	14
Çizelge 2.3. Postmortem biyokimyasal belirteçler (Dicle Tıp Dergisi 2014).....	15
Çizelge 2.4. Postmortem biyokimyasal belirteçler (Dicle Tıp Dergisi 2014).....	16
Çizelge 2.5. Postmortem biyokimyasal belirteçler (Dicle Tıp Dergisi 2014).....	17
Çizelge 2.6. Serin hidrolaz süper ailesi ait bazı enzim grupları (Long ve ark. 2011).....	24
Çizelge 2.7. PFK'in türleri.....	38
Çizelge 3.1. AChE'ye ait tepkime karışımı (Abcam' Kiti.....	45
Çizelge 3.2. 96 kuyulu microplate üstüne gösterilen AChE standartlarının (AS), test numunelerinin (TS) ve boş kontrolün (BL) düzeni.....	46
Çizelge 3.3. Her kuyu için kullanılan reaktif içerikleri bileşimi.....	46
Çizelge 3.4. Enzimatik tepkime tablosu.....	49
Çizelge 3.5. Fosfor'a ait saptanma tablosu.....	50
Çizelge 3.6. Deney prosedürü.....	52
Çizelge 4.1. Beyin, AChE aktiviteleri.....	55
Çizelge 4.2. Kan, AChE aktiviteleri.....	56
Çizelge 4.3. Beyin, Na ⁺ -K ⁺ ATPaz aktiviteleri.....	58
Çizelge 4.4. Kan, Na ⁺ -K ⁺ ATPaz.....	59
Çizelge 4.5. Beyin, PFK aktiviteleri.....	61
Çizelge 4.6. Plazma, PFK aktiviteleri.....	62

1. GİRİŞ

Tolüen; renksiz, berrak, keskin ve hoş kokusu olan uçucu bir sıvı hidrokarbondur. Tolüen (metilbenzen) aromatik bir çözücüdür. taşıdığı metil grubundan dolayı metabolizması benzenden farklı olmaktadır (Anonim 1980). Ham petrolden benzin ve diğer yakıtların ayrıştırılması sırasında ortaya çıkmaktadır (Taş 2008, Anonim 2009). Çok yaygın bir kullanıma sahiptir. Rafineri ve deri sanayisi çalışanları, ayakkabı işçileri, benzin istasyonu, matbaacılar, boyacılar, oto sanayi çalışanları, kaportacılar, vb. meslek gruplarında çalışan kişileri etkilemektedir (Anonim 2009). Endüstride sık kullanılan bir maddedir, tolüenin başlıca; boyalar, vernik, önleyiciler, pas yapıştırıcılar, solvent tabanlı temizleyicilerde, boya incelticiler ve ayrıca kozmetik ürünlerde kullanması yaygındır (Faust 1994, Jones 1997). Gerek uçucu çözücü bağımlılarının kullandıkları çözücülerin içeriğinin büyük bir kısmında yer alması, gerekse değişik alanlardaki işyerlerinde maruz kalma sonucu ortaya çıkabilecek toksik etkilerden dolayı analizi adli toksikolojinin ilgi alanında yer alır (Anonim 1980). Tolüenin lokal ve sistemik zararlı etkilerine sahip olduğu bilinmektedir. Gözlerde, solunum sisteminde ve deride iritatif etkileri vardır. Kronik ya da akut olarak düşük dozda maruziyetinde santral sinir sisteminde baskılanma ve bellek azalmasının nedeni olur. Genellikle baş ağrısı, yorgunluk, kaslarda zayıflık, baş dönmesi, güçsüzlük, parestezi, karın ağrısı, yürüme bozuklukları, hematemez, distal renal tübüler asidoz, kollaps ve koma şeklinde belirtileri gözlenmektedir (Streicher ve ark. 1981, Kamijima ve ark. 1994). Akciğerler tarafından tolüen kolayca absorblanmaktadır, inhale edilen dozlar %40'la %80 arasında alveollere geçmektedir (Carlsson ve Ljungquist 1982). Absorblanan tolüenin %20'si akciğerlerde değişikliğe uğramadan atılmaktadır. Kalan kısmı ise öncelikle hippürik asit haline dönüp metabolize olmaktadır, daha küçük oranda da kresola metabolize olmaktadır (Şekil 2.2), normal olarak insan idrarında o-kresol bulunmadığından, idrarda o-kresol varlığı tolüen maruziyetinin belirteçlerinden birisi olarak kabul edilmektedir (Angerer 1979). Maruz kalınan tolüen kanda belirlenebilir ve havadaki derişimin bir göstergesi olarak kabul edilir (Angerer 1979, Carlsson ve Ljungquist 1982). Maruziyet bittikten sonra kandaki düzey hızla düşmeye başlar, 2-3 saat kadar yarılanma ömrü olarak belirlenmiştir, venöz kanda izin verilen tolüen düzeyi 1mg/L'dir (Lauwerys 1983). Tolüen maruziyetinin düzeyinin belirlenmesi amacı için, idrarda metabolitlerinin ölçülmesi genelde uygulanan yöntemken idrarda tolüenin kendisinin belirlenmesinin daha uygun olduğu araştırmacılar tarafından belirlenmektedir (Kawai ve ark 1996).

Planlanan bu çalışmada, sıçanlarda tolüen maruziyetine bağlı gerçekleşen ölümlerde asetilkolinesteraz, Na⁺/K⁺ ATPaz ve fosfofruktokinaz enzimlerinin kalp kanı ve beyin dokusunda post-mortem düzeylerinin incelenmesi, ölüm sonrası geçen zamana bağlı olarak aktivite değişimlerinin hesaplanması amaçlanmaktadır. Tolüen maruziyeti sebebiyle gerçekleşen ani ölümlerde enzimlerin (asetilkolinesteraz, Na⁺/K⁺ ATPaz, fosfofruktokinaz) nasıl etkilendiği incelenerek ölüm zamanı ile ilişkisi araştırılacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tolüen

2.1.1. Tolüen Kimyası

Tolüen (metil benzen) aromatik yapıda, korozif olmayan ayırt edici kokusu olan bir çözücüdür. Fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.1'de açık molekül yapısı şekil 2.1'de gösteriştir (Anonim 2005).

Çizelge 2.1. Tolüenin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Anonim 2005)

CAS numarası	Yapısal formülü	Molekül ağırlığı	Yoğunluk	Buhar basıncı	Sudaki çözünürlüğü	Dağılma katsayısı	Dönüşüm faktörü
108-88-3	C ₆ H ₅ CH ₃	92,14	0.867 g/mL	28,4 mm Hg (25°C)	0,59 mg/mL(25°C)	Log Kow: 2.72	1 ppm = 3.77 mg/m ³ , 1 mg/m ³ = 0.265 ppm (25°C, 760 mmHg)



Şekil 2.1. Tolüenin kimyasal yapısı (Anonim 2005)

2.1.2. Tolüen Maruziyeti

Hava

Motorlu araçların egzoz dumanlarından dolayı hava kirliliği başlıca maruziyet kaynağı olarak kabul edilmektedir. Tolüen veya ilgili madde üretiminde veya tolüen içeren maddelerin kullanıldığı iş alanlarında çalışanlar genel popülasyondan belirgin şekilde yüksek seviyelere maruz kalmaya devam etmektedir. Ayrıca, petrol istasyonlarına veya endüstriyel alanlara yakın bölgelerde havada tolüen varlığından dolayı çalışanlara ve bölge sakinlerine ek bir zarara da neden olmaktadır (Meek ve Chan 1994, Angerer ve Kramer. 1997, Bieniek ve ark. 2004, Ana-Lilia ve ark. 2005).

Tütün içimi

Tolüen, sigaradan sigaraya büyük oranda değişmekle birlikte tütün dumanının başlıca bileşenidir. Filtresiz sigaranın dumanında tolüen miktarı 100-200µg aralığındadır. Sigara içicilerinin kandaki tolüen seviyeleri, içmeyenlere göre belirgin olarak yüksek bir orandadır (Wang ve ark. 1993).

İçme suyu

İçme suyu yoluyla maruziyet, yoğun kontaminasyon vakaları dışında önemli değildir. ABD’de yapılmış olan çalışmalar içme suyunda 10µg/L’den az olduğunu göstermiştir (Anonim 1990a).

Besinler

Beslenme yoluyla maruziyet de önemsiz olarak kabul edilmektedir (Meek ve Chan 1994).

2.1.3. Toksikokinetik

Absorpsiyon

Oral absorpsiyonu

Tolüenin oral absorpsiyonu çok az çalışılmıştır. Yapılan bir çalışmada tek bir doz oral maruziyetten sonra yaklaşık %100 absorpsiyon gerçekleştiği görülmüştür. 3 saat boyunca gastrik bir tüp aracılığıyla 2mg tolüen/dak infüzyona maruz kalan gönüllülerde absorpsiyonun tam olduğu gözlenmiştir (Baelum ve ark. 1993, Anonim 2005).

Solunum yolu

Tolüen absorpsiyonu solunum yoluyla esas olarak gerçekleşir. Maruziyet koşullarına bağlı olarak alınma oranı 0,16-1,6mg/dak olarak hesaplanmıştır. Solunum olayı gerçekleştikten sonra vücutta kalan tolüen miktarının ortalaması %36-85 olduğu tespit edilmemiştir. Maruziyet süresi arttığı zaman alıkonma azalmaktadır. Fiziksel aktivite toplam alınmayı artırıp alıkonmayı azaltmaktadır. Kan tolüen seviyeleri, çalışma ortamında tolüene maruziyetine kalmayan çalışanlarda 3 µg/L'den az olarak hesaplanmıştır (Molhave ve Pedersen. 1984, Pezzagno ve ark. 1988) .

Dermal

Tolüen, insan derisinden 14-23mg/cm² 2 saat arasında hızla absorblanmaktadır (Dutkiewicz ve Tyras 1968, Sato ve Nakajima 1978). Perkütan absorpsiyonu solunuma kıyasla %1 oranındadır (Anonim 1990).

Dağılım

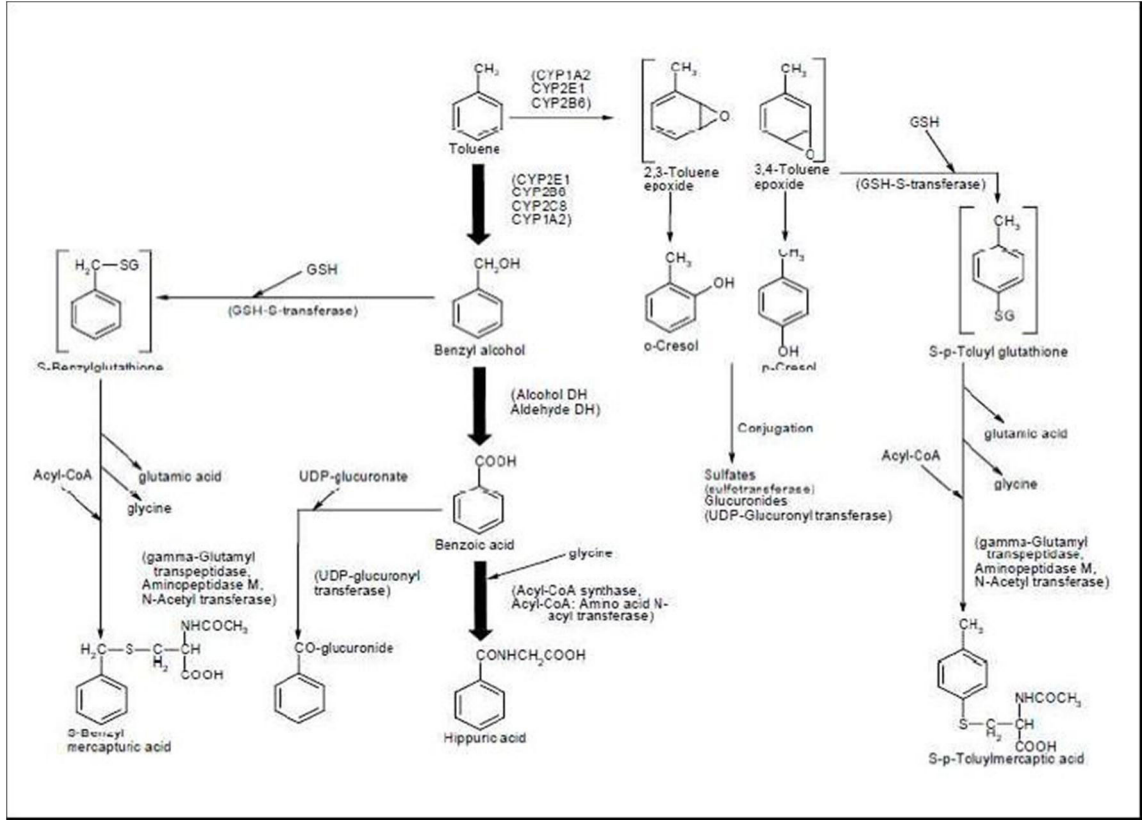
625mg/kg tolüen yuttuktan 30 dakika sonra ölen kişide, en yüksek tolüen derişimi karaciğerde 433,5µg/g görülürken diğer organlarda, pankreasta 88,2µg/g, beyinde 85,3µg/g, kalpte 27,6µg/g, vücut yağlarında 12,2µg/g ve omurilik sıvısında 11,1µg/g görülmüştür. Tolüen maruziyeti ve ölüm arasındaki çok az zaman tolüenin çevresel vücut dokularına dağılımı sınırlamaktadır (Ameno ve ark. 1989). Sıçanlar oral olarak 400mg/kg tolüene maruz kaldıklarında, maruz kalma anından itibaren 1,5 saat sonra, kandaki tolüen seviyesi en yüksek derişimine ulaşmaktadır. Oral ve inhalasyon maruziyet arasında, beyindeki tolüen dağılımı açısından bir benzerlik bulunmaktadır (Ameno ve ark. 1992).

Alveolar hava ve kandaki tolüen seviyelerine göre, hayvanlarla insanlar arasında pozitif bir korelasyon görülmektedir. İnsanlarda 4 saat boyunca 80ppm tolüen maruziyetinden sonra, kandaki tolüen tutarı 2 saat kadar 6-7µmol/L düzeyinde plato yaptığı düşünülmektedir (Hjelm ve ark. 1988).

Hayvanlarda ve insanlarda dermal maruziyet sonrası dağıtımla ilgili olan bir çalışma tanımlanmıştır. Dermal maruziyetin diğer maruziyet yollarına göre çok küçük miktarda olması bu durumun geçerli bir nedeni olarak ölçümlendirilmektedir (Hjelm ve ark. 1988).

2.1.4. Tolüen Metabolizması

Tolüene ait metabolizma yolları Sekil 2.2’de gösterilmiştir (Nakajima ve Wang 1994, Tassaneeyakul ve ark. 1996, Nakajima ve ark. 1997, Angerer ve ark. 1998, Anonim 2000). Tolüen metabolizmasında birincil etkin olan organ karaciğerdir (Wallen ve ark. 1985, Wilkins-Haug 1997, Voss ve ark. 2005). Tolüen seri hidroksilasyon ve benzoik asit oksidasyonu ile metabolize olmaktadır. Glisinin benzoik asitle konjugasyonu sonucu hippürik asit meydana gelmektedir, bu yol tolüen detoksifikasyonu ve atılımında ana yol olarak kabul edilmektedir (Andersen ve ark. 1983, Inoue ve ark. 1986, Angerer ve ark. 1998, Alvarez-Leite ve ark. 1999, Kongtip ve ark. 2001, Raikhlin-Eisenkraft ve ark. 2001, Pierce ve ark. 2002, Cok ve ark. 2003). Tolüen metabolizmasında temel basamak, karaciğerde gerçekleşen sitokrom P-450 (CYP) enzimleriyle transformasyon olayıdır. En dikkat çekici şeylerden biri metil grubudur, bu grubun hidroksilasyonunda alkol oluşumuna yol açmaktadır. Benzil alkol öncelikle benzoik aside okside olur ve sonra glisinle konjuge olarak hippürik asit oluşumu meydana gelmektedir. Daha ikincil CYP, ilişkili bir yolda aromatik halkanın geçici epoksidasyonundan dolayı, orto- veya para-kresol oluşmaktadır. Bu kresoller çeşitli konjugasyon tepkilerine girdiği zaman, temel ürün olarak sülfat ve glukuronidler oluşturmaktadır. Glutasyon’un benzil alkolla konjugasyonu sonucu (S-benzilglutasyon ve S benzilmerkapturik asit) veya Glutasyon’un epokside olmuş halkayla konjugasyonu sonucu (S-p-toluolglutasyon ve S-p-toluolmerkapturik asit) oluşturmaktadır (Nakajima ve Wang 1994, Tassaneeyakul ve ark. 1996, Nakajima ve ark. 1997, Dills ve ark. 1997, Angerer ve ark. 1998, Inoue ve ark. 2002, Inoue ve ark. 2004, Boatto ve ark. 2004, Fustinoni ve ark. 2005).



Şekil 2.2. Tolüen Metabolizması (Nakajima ve Wang 1994, Tassaneeyakul ve ark. 1996, Nakajima ve ark. 1997, Angerer ve ark. 1998, Anonim 2000)

2.1.5. Atılımı

Tolüenin solunumla atılımı, maruziyetinde ve maruziyetten kısa bir zaman sonra en fazla olmaktadır, zaman geçtikçe hızlı bir şekilde azalmaya başlamaktadır (Benoit ve ark. 1985). Absorblanan tolüenin %60-70 kadarı hippurik asit ve benzoik aside metabolize olmaktadır (Anonim 1991). Bu formu böbreklerden atılır. absorblanan tolüenin %10-20 kadarı benzoil glukuronid oluşturur. Tolüenin küçük bir miktarı ise halka hidroksilasyonu ile o- ve p- kresol formlarına dönüşerek idrar ile atılır (CARLSSON 1982). Kostrzewski ve Piotrowski (1991) tolüen atılımındaki görüşlerini “tolüenin maruziyetin bitiminden itibaren kandan atılımının çok hızlı, birkaç dakika içinde olduğunu göstermişlerdir. 34 mg/L maruziyet düzeyinde, maruziyetten 16 saat sonraki kan tolüen seviyesi kandaki maksimum düzey %2 olmuştur ” şeklinde ifade etmektedirler.

2.2. Post-mortem

Post-mortem ölümden sonra demektir (Fincancı 1997, Yorulmaz ve ark. 2006, Soysal ve Eke. 1999). Ölümden sonra geçen sürenin belirlenmesinin (Post-Mortem Interval), kıyası (PMI), bu sürenin önemi, ölüm anının kesin olarak bilinmediği hadiselerde ölümden sonra geçmiş olan müddetin tahmin etmesi adli bakımından önemlidir (Jason ve ark. 2011).

2.2.1. Post-mortem Biyokimyasal Belirteçler

Post-mortem biyokimyasal belirteçler aşağıdaki ana başlıklar altında toplamak mümkündür (Çizelge 2.2, Çizelge 2.3, Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5).

1. Karbohidrat metabolizması ile ilgili belirteçler.
2. Böbrek fonksiyonu ile ilgili belirteçler.
3. Karaciğer fonksiyonu ile ilgili belirteçler.
4. Kalp fonksiyonu ile ilgili belirteçler.
5. Sepsis, enflamasyon ve enfeksiyon belirteçleri.
6. Anafilaksi ile ilgili belirteçler.
7. Hormonlar.
8. Diğer testler.

Karbohidrat Metabolizması İle İlgili Belirteçler

- İzopropil alkol (IPA) (biyolojik sıvılarda).
- C peptid ve İnsülin.
- Keton cisimleri (kan / GİS).
- Laktat (kan, GİS).
- Glukoz (GİS / Beyin-Omurilik Sıvısı, BOS).

- Glikolize hemoglobin (kan).

Göziçi sıvısı ya da beyin omurilik sıvısı (BOS) glukozunun 20mmol/L (360 mg/dL) ve üzeri, laktatın 23,4mmol/L (422 mg/dL) den yüksek, 3HB (3-hidroksibütirat)'ın 1000µmol/L (10,4mg/dL) üzerinde olması yanında yükselmiş glikolize Hb, aseton ve 3HB değerleri DM veya DKA (Diabetik Ketoasidoz) lehine olmaktadır (Traub 1969, Palmiere ve Mangin. 2012). Ketozise bağlı artmış olan aseton, yüksek NADH varlığında IPA'e dönüşümektedir. Hipotermi ve ani alkolik ölümlerde de IPA yararlı bir belirteç olmaktadır (Davis ve ark. 1984). Kanda yüksek keton cisimleri bulunan olaylar "ketoalkolik ölüm" olarak tanımlanmaktadır (Thomsen ve ark. 1995). Kanda 10,000 µmol/L ve GİS'da 5,000 µmol/L üstünde bulunan keton cisimleri düzeyi alkolik ketoasidoz için manalıdır (Pounder ve ark. 1998). Alkolik laktik asidoz için bazı kriterler sınırlanmıştır. Bunlar; glukoz ve laktatın toplam seviyesinin 300 mg/dL (16,6 mmol/L) ve üstünde olması, olayında diyabetin bulunmaması ve ağır zehirlenme de dahil bilinen başka ölüm nedeninin olmamasıdır. İnsülinle birlikte C peptid ölçümü hipoglisemi teşhisi bakımından önemlidir. I/C>1 ise eksojen insülin, I/C<1 ise insulinoma veya sulfonilure aşırı dozu bahis konusudur. Analiz için periferik kan örneği daha münasiptir çünkü kalp kanı yüksek değerler göstermektedir. Perikard sıvısının da uygun bir örnek olabileceği açıklamıştır (Palmiere ve Mangin. 2012). Ayrıca enjeksiyon bölgesinden alınan doku örneğinde insülin varlığını göstermek de önemli bir bulgu olmaktadır. Postmortem serum insülin değerlerinin letal dozunu belirlemek zor bir olaydır. Bir çalışmada normal açlık (5-75 µUI/mL-35-521 pmol/L) ve fetal insülin (800-3,200 µIU/mL-556-22,224 pmol/L) değerleri rapor edilmiştir. Başka bir araştırmaya göre en düşük letal insülin düzeyi 100 µIU/mL olmaktadır (Kernbach ve ark. 1998).

Böbrek Fonksiyonu İle İlgili Belirteçler

Üre azotu (serum ve biyolojik sıvılar), kreatinin (serum, idrar), ürik asit (serum, perikard sıvısı) ve elektrolitlerin (Na, K, Cl, Ca, Mg, Sr) değerlendirilmesi olarak sıralanmaktadır.

Dehidratasyon olaylarında yüksek postmortem serum ve GİS üre azotu, yüksek GİS Na ve Cl ve normal serum ve GİS kreatinin değerleri temin edilir. Ürik asidin postmortem serumda özellikle de sağ kalp kanında artışı mekanik asfiksi ve boğulmayı göstermektedir. Agonal konvülsiyon veya hiperaktiviteye bağlı hipoksik iskelet kası hasarında da hiperürisemi görülmektedir. Ağır ölümcül hipertermili olaylarda kreatinin (2 mg/dL üzeri) değerleri yüksek bir şekilde bulunmaktadır (Maeda ve ark. 2008). DKA'da postmortem serum ve GİS'da üre azotu yüksek, kreatinin ise normal bir seviyededir (Palmiere ve Mangin. 2012). Üre azotu için bir farklılık gözlenmezken, kreatinin için en iyi örnek sol kalp kanı olmaktadır (Uemura ve ark. 2008). Postmortem ATP'nin olmaması hücre zarı geçirgenliğini yükseltir. Hücre içi ve dışı arasındaki elektrolit ve sıvı dengesi bozulur, hücrede otoliz olayı meydana çıkar. Hipernatremide GİS Na değeri 155-210mmol/L, GİS Cl değeri 139-147mmol/L seviyelerinde olmaktadır (Coe 1993, Whitehead ve ark. 1996, Byard 2002). Postmortem 120mmol/L Na değeri hiponatremiyi gösterir (Chen ve Huang. 1995). Anlamli olmayan yüksek K değerine nazaran düşük GİS K değeri teorik olarak hipokalemi lehine olmaktadır (Coe 1993). Kalp kanı ve periferik kan örneklerinde özellikle de sağ kalp kanı serumunda Ca ve Mg değerleri tuzlu suda boğulmalarda anlamlı ölçüde yüksek olduğunu göstermektedir (Zhu ve ark. 2005, Li ve ark. 2009). Hipotermide perikardial Ca, tatlı su boğulmaları ve yangınlarda ise serum Ca' u artmaktadır (Zhu ve ark. 2005). Tuzlu suda boğulmalarda sol ve sağ kalp Sr oranının 75µg/L'den fazla olması anlamlı bir olaydır. Özellikle 72 saatten az zamanda suda kalmış olan cesetlerde kalp kanında Sr bakılması teşhiste daha yararlı olmaktadır (Azparren ve ark. 1998, Perez-Carceles ve ark. 2012).

Karaciğer Fonksiyonu İle İlgili Belirteçler

Kolesterol (sağ kalp kanı), Bilirubin (femoral ven kanı) ve Protein. Alkol bağımlılığı ve alkol alımı ile ilgili belirteçler: Karbohidrat eksik transferrin (Carbohydratedeficient transferrin, CDT), Etil glukuronid (EtG) ve Etil sülfat (EtS). CDT terminal oligosakkarit eksikliği gösteren transferrin (Tf) izoformlarıdır (asialo/disialo Tf). 1-2 hafta süreyle, günde 50-80g üzerinde alkol alımı CDT'yi artırmaktadır. Yarılanma ömrü yarım aydır, serum veya GİS'da incelenebilmektedir. EtG'nin vücut sıvı ve dokularında uzun zaman hatta saçta bir aya kadar tespiti mümkün bir olaydır. Bağımlılıktan çok alkol alınımının bir göstergesidir. İdrar EtG değerlerinin örnekler 5 hafta boyunca 4 derecede

saklandığında stabil kaldığı, yüksek sıcaklıkta ise değiştiği gözlenmiştir (Schloegl ve ark. 2006). Örnek alındıktan sonra içinde etanol ve *Escherichia coli* bulunan idrarda EtG'nin üreyebildiği tespit edilmiştir (Helander ve ark. 2007). EtG, β -glukuronidaz aktivitesi gösteren bakterilerce 3-4 gün içinde tamamen parçalanırken, EtS 11 güne kadar parçalanmadan kalabilmiştir (Baranowski ve ark. 2008). Çürümüş olan cesetlerde ölümden birkaç saat önceki alkol alınımları uzaklaştırılmak isteniyorsa EtS parçalanma süresi gereğini düşünmelidir (Halter ve ark. 2009).

Kalp Fonksiyonu İle İlgili Belirteçler

Atriyal natriüretik peptit (ANP), beyin natriüretik peptidi (BNP) ve N-terminal propeptidler Miyokart iskemisinin biyokimyasal belirteçleri (cTnI, cTnT, myosin, myoglobin, CK ve CK-MB). ANP ve BNP sırasıyla atrial ve ventriküler miyokarttan sentezlenen ve salgılanan, 28 ve 32 amino asit içeren, küçük peptidlerdir. ProANP ve proBNP olarak üretilmektedirler, parçalanarak aktif ANP, BNP ve amino-terminal (NT-proANP ve NT-proBNP) parçalarına ayrılmaktadırlar. Dolaşımda ANP ve NT-proANP artışı artmış önyükü (preload), BNP ve NTproBNP artışı ise artmış ardyükü (afterload) göstermektedir. Ağır miyokart hasarında perikard sıvısındaki ANP ve BNP seviyeleri ile TroponinT (TnT) arasında negatif bir korelasyon vardır. Boğulmalarda anlamlı ölçüde ANP, orta derecede BNP belli bir artışı görülebilmektedir. BNP düzeyi ventriküler dilatasyonun derecesi ve kalp ve akciğerin ağırlıkları ile doğru orantılı olmaktadır. En yüksek NT proBNP seviyelerine kronikkardiak iske mi ile ilişkili akut koroner tromboembolizm olaylarında görülmüş (Zhu ve ark. 2007). Akut miyokart iskemisinde perikard sıvısı veya kalp kanında cTnI ve cTnT değerlerinin miyokart hasarının derecesine bağlı olarak artış gösterdiği, CK-MB'nin ise uyumsuz değerler gösterdiği gözlenmemiş (Zhu ve ark. 2006, Zhu ve ark. 2007).

Sepsis, İnflamasyon Ve Enfeksiyon Belirteçleri

Serum prokalsitonin (PCT), Akut faz proteinleri ve sitokinler, Neopterin. Sepsiste PCT'in kesin orijini ve patofizyolojik rolü net olmamakla beraber PCT'nin ağır sistemik bakteri, mantar ve parazit enfeksiyonlarında yüksek değerleri bulunmaktadır. Yarılanma ömrü uzundur (24-36 saattir). PCT sepsiste daha hassas ve kan-GİS bariyerini daha iyi geçen bir belirteç olarak sayılmaktadır. Hipertermiye bağlı olan ölümlerde toksikolojik ve patolojik kanıtların bulunamadığı hallere serum üre azotu, CRP ve kreatinin

düzeylerinin birlikte değerlendirilmesi yararlı olmaktadır (Maeda ve ark. 2008, Whitehead ve ark. 1996, Ishikawa ve ark. 2008). Sepsise bağlı olan ölümlerde sIL-2R ve LBP (lipopolisakkarit bağlayıcı protein) artışı görülmektedir (Reichelt ve ark. 2005). IL-6 ve IL-8 travmatik nontravmatik ölümlerin ayırıcı tanısında faydalıdır, travma teşhisini kolaylaştırmaktadır (Mimasaka ve ark. 2001, Mimasaka ve ark. 2007). Neopterin, monosit/makrofajlarda interferonların (Th1-type cytokine IFN- γ) indüklemesi ile üretilir. Bakteriyal, viral, parazitik, protozoik veya mantar enfeksiyonlarının görüldüğü sistemik enflamatuvar cevap sendromunda (SIRS), romatoid artrit, insüline bağlı olan diabetes mellitus, multipl sklerozis, sistemik lupus eritematozis, çölyak hastalığı ve romatizmal ateşte bir neopterin artışı görülebilmektedir. Malign hastalıklarda tümörün başlaması, gelişimi, metastazı ve mortalitesi neopterin düzeyleri ile ilişkili olduğu düşünülür. SIRS gelişmiş, travmaya bağlı olan geç ölüm olaylarında neopterin düzeyleri 500ng/mL üzerinde olmaktadır (Ambach ve ark. 1991, Schrag ve ark. 2012).

Anaflaksi İle İlgili Belirteçler

Triptaz ve şimaz; mast hücrelerinin granüllerinde histamin ve heparinin yanında şimaz ve triptaz gibi birçok proteaz bulunmaktadır. Anaflaksi (IgE bağımlı reaksiyonlar) ve anaflaktoid reaksiyon (IgE bağımsız ama benzer klinik reaksiyon) sonucu hücre dışına salınırlar. Normal kişilerin dolaşımında bulunan major triptaz formu α -triptaz olmaktadır ve bu form depolanmaz. β II-triptaz formunun ise mast hücre granüllerinde depolanması ve salınması olur. Ani bebek ölüm sendromu, eroin enjeksiyonuna bağlı olan ani ölüm, aterosklerotik kardiovasküler hastalık ve travmatik ölümlerde triptaz yüksek bir haldedir (Edston ve ark. 2001, Buckley ve ark. 2001). Postmortem femoral ven kan serumunda 45 μ g/L triptaz değeri referans değer olarak sayılır (Edston ve ark. 1996). Triptaz ile şimaz arasında pozitif bir korelasyonun var olduğu bilinmektedir (Nishio ve ark. 2005).

Hormonlar

Adrenokortikotropik hormon (ACTH): BOS'da görülen düşük ACTH düzeyleri; uzun süre soğuğa maruz kalmaya bağlı olan azalmış hipofiz fonksiyonunun göstergesi olmaktadır (Ishikawa ve ark. 2008, Ishikawa ve ark. 2004). Tiroid stimulan hormon (TSH), tiroglobulin (Tg), ve tiroid hormonları (TH): Postmortem kandaki T3 ve T4

değerleri antemortem referans değerlerle uyumlu olmaktadır. Soğukta düşük TSH değerleri gözlenir (Edston ve ark. 2001, Ishikawa ve ark. 2009). Katekolaminler: Adrenalin ve noradrenalinin (NA) GİS'daki değerleri kardiopulmoner resüsitasyon uygulananlarda anlamlı farklılık gösterdiği, uzun ve kısa agoniye açıkça ayırt ettirici olmaktadır. Hipotermide serum ve BOS katekolamin değerleri düşük bir haldedir. BOS NA değerleri ile adrenal medulla NA-immünpozitifliği arasında pozitif korelasyon vardır. Ölümcül derecede soğuğa maruziyetin sistemik ve ilerleyici sempatikoadrenomeduller sistemde bozukluğa neden olduğu belirlenmiştir (Wilke ve ark. 2007).

Kortizol: Postmortem idrar ve serumda kortizol değerlerinde 18 saat geçtikten sonra hafif bir düşüş gözlenmiştir. Canlı örneklerden çok ta farklı değerlere rastlanılmamış (Quan ve ark. 2008). Koryonik gonadotropin (HCG): Postmortemde gebe olanlarda pozitif, olmayanlarda negatif değerlere ulaşılmış (Fanton ve ark. 2010). Eritropoietin (EPO): EPO, anemi veya hipoksiden 2 saat geçtikten sonra bir yükselme görülebilir. Yarılanma ömrü 5-9 saat olmaktadır. Postmortem EPO akut ve masif kanamalı yaralanmalara bağlı ve gelişen olan ölümlerde yaralanmadan sonraki yaşam süresini (ilk 6 saat içindeki) tahmin etmede kullanılabilecek bir belirteç olarak kabul edilebilmektedir (Quan ve ark. 2008).

Diğer Belirteçler

Kromogranin A (Chromogranin A, CgA): Hipotermide serumda düşük, BOS'da yüksek, terminal dönemde ise düşük BOS değerleri ile uyumlu olarak düşük hipotalamus nöronal CgA immunpozitifliği gözlenilir (Yoshida ve ark. 2011). S100B: Klinikte, beyin hasarında (yaralanma, hipoksi/iskemi) prognozu tahmin etmek amacıyla kullanılan bir belirteç olarak kabul edilir. Kafa yaralanmalarına bağlı olan beyin hasarı/hipoksi/iskemide serum ve BOS'da yükselir (Li ve ark. 2006, Ondruschka ve ark. 2013). Serotonin (5-HT): BOS ve perikardial sıvıda 5-HT değerleri sedatif-hipnotik ilaç zehirlenmesi ve hipertermi olaylarında yüksek, hipotermi olayında ise düşük bulunmaktadır (Quan ve ark. 2011, Musshoff ve ark. 2004). Miyogloblin: Sıcak şoku, ağır kas hasarı ve ağır yanıklar, kas hiperaktivitesi veya ölümden hemen önce gelişen hipoksi ile ilgili konvülsiv bozukluklar durumlarında idrarda artmış myoglobin

değerlerine rastlanmaktadır (Çizelge 2.2, Çizelge 2.3, Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5) (Puschel ve ark. 1995, Zhu ve ark. 2001).

Çizelge 2.2. Postmortem biyokimyasal belirteçler (Dicle Tıp Dergisi 2014)

Belirteç	Örnek tipi	Postmortem süre	Yöntem	Değer	İlgili durum
Glukoz	GİS BOS	3-72 saat	Glukoz Peroksid az	≥ 20 mmol/L veya ≥ 13 mmol/L (GİS)	Antemortem hiperglisemi
Glikolize hemoglobin	Tam kan	0-72 saat	HPLC Latex	%3,5-6,2 (referans değer)	DM
			Enzimat ik	3HB >1000 μ mol/L (Serumda- Ketoasidozda)	
			HS-GC	>531 μ mol/L (Kan)	
Keton cisimleri	GİS, idrar serum, kan	0-96 saat		10000 μ mol/L (femoral kan) ve 5000 μ mol/L (GİS)	Alkolik ketoasidoz
			GC-MS	3HB >2400 μ mol/L (kan, idrar)	Patolojik
			GC-FID	Aseton>2400 μ mol/ L (kan)	Fatal ketoasidoz
İnsülin	Periferik kan serumu	En kısa sürede çalışılmalı ve dondurulmalı		800-3200 μ IU/ml (55622,224 pmol/L) veya 100 μ UI/mL	Letal hipoglisemi
Peptid C	Periferik kan serumu	En kısa sürede çalışılmalı ve dondurulmalı		I/C >1 ise eksojen insulin , I/C<1 ise insulinoma veya sulfonilure aşırı dozu	Eksojen insülin alımının ayırıcı tanısı
Laktat	GİS, BOS	0-72 saat	Enzimat ik	23,4mmol/L	DKA
Üre azotu, ürik asit, kreatinin	Serum	0-72 saat	Enzimat ik	Klinik referans değerler Ürik asidin sağ kalb kanında mekanik asfiksi ve boğulma artışı kreatinin >2mg/dL	Ölümcül hipertermi
Na, Cl	Serum, GİS, BOS			Klinik referans değerler Na ≤ 120 mmol/L	Hiponatremi

Çizelge 2.3. Postmortem biyokimyasal belirteçler (Dicle Tıp Dergisi 2014)

Belirteç	Örnek tipi	Postmortem süre	Yöntem	Değer	İlgili durum
Ca, Mg	Serum, perikard sıvısı (PF)	5-48 saat		Klinik referans değerler (Ca 8,7-10,1 mg/dl, Mg 1,8-2,6 mg/dl)	Tuzlu suda boğulma, hipote
Stronsiyum	Sol/sağ ventrikül kanı, Kalb ve femoral kan	0-48 saat 30 saat	AAS	Sol ve Sağ kalp Sr farkı 75µg/L, Sol ventrikül kanında 172µg/L	Tuzlu suda boğulma
Total kolesterol (TK), bilirubin, protein	Sağ kalb kanı (TK), Femoral kan	0-72 saat	EO Biüre	Klinik referans değerler	Hiperkolesterolemi, hepatit
CDT	Femoral ve kalb kanı, GİS	6-96 saat (1-6 gün)	RIA	CDT >17 U/l erkek ve >25 U/L kadın 4,7-24,5 U/l	Alkol kullanımı
EtG	İdrar, kan, karaciğer, iskelet kası, kaburga kemik iliği	1-4 gün (değişken)	LC-MS/MS LC-MS		İdrarda 40 de stabildir Antemortem etanol alımı
EtS	İdrar, kan, GİS	1-7 gün (değişken)	LC-MS/MS		Antemortem etanol alımı

Çizelge 2.4. Postmortem biyokimyasal belirteçler (Dicle Tıp Dergisi 2014)

Belirteç	Örnek tipi	Postmortem süre	Yöntem	Değer	İlgili durum
ANP, BNP, NT-proANP, NT-proBNP	Femoral kan ve serumu, GİS, PF		Kemilüminesan immünoassey (IA)	Klinik referans değerler	Kalp fonksiyon boz. MI
cTnT, cTnI, CK-MB	Serum ve PF	48 saat	Elektrokelimüminesan IA ve diğerleri	Klinik referans değerler cTnT'nin otopsi referans değeri daha yüksek	Kalp krizi, myokard hasarı
Prokalsitonin	Serum, femoral kan, GİS, BOS,	96 saat	İmmünoölüminometri k ve semikantitatif	Klinik referans değerler (Tespit limiti 0,25-0,3ng/mL)	Sistemik bakteri, parazit ve mantar enfeksiyonları
CRP	Periferik kan, serum	24-264 saat	İmmünotürbidimetri k	Klinik referans değeri (10g/ ml)	Hipertermi
IL6 IL8	Kalb kanı serumu	2 gün	ELİSA	Klinik referans değeri	Travmatik ölümlerin ayırıcı tanısı
sIL-2R ve LBP	Kalb kanı serumu	48 saat	Kemilüminesan IA	Klinik referans değeri	Sepsis

Çizelge 2.5. Postmortem biyokimyasal belirteçler (Dicle Tıp Dergisi 2014)

Belirteç	Örnek tipi	Postmortem süre	Yöntem	Değer	İlgili durum
Neopterin	İdrar, serum	3saat-3 gün	HPLC	Klinik değerlerden genellikle yüksek	İnfeksiyonlar, kanser, SIRS, enflamasyonlar
Triptaz, şimaz	Femoral kan serumu	3-5 gün, 4-110 saat	Floroenzim IA ve immüno-floroenzim assay	Referans değer 45 µg/L	Anaflaksi,
ACTH	Kalb kan serumu, BOS	4-85 saat	İmmünoradiometrik assay	Klinik referans değer	Hipotermi
TSH	Kalb kan serumu, BOS	24 saat	Elektrokimyoluminiscan IA	Klinik referans değer	Hipotermi
Katekolaminler, CgA	Kalb kan serumu, BOS	3 gün	ELİSA HPLC	Klinik değerlerden daha yüksek	Agoni süresi, hipotermi
Kortizol	Femoral ve sağ kalb kanı	9-29 saat	Floresan metod	Klinik referans değer	
EPO	Serum	48 saat	RIA	Klinik referans değer (<36 mU/ml)	Masif ve akut kanamalı yaralanmalarda ilk 6 saat
S100B	Serum, BOS	48-72 saat	ELİSA	Klinik değerlerden daha yüksek, BOS'daki değeri serumdan daha yüksek	Travmatik beyin hasarı
Serotonin	BOS, PF	48 saat	HPLC	Klinik değerlerden daha yüksek, serum ve PF değerleri eşit	Sedatif-hipnotik ilaç zehirlenmesi ve hipertermi
Miyogloblin	İdrar, kalb kan serumu	5saat-22 gün	RIA	Serum ve idrar değerleri uyumsuz	Ağır kas hasarı

2.2.2. Post-mortem Değişimleri

Fiziksel Değişimler

Ölü Soğuması (Isı Kaybı)

İnsanda normalde koltuk altından ölçülen vücut sıcaklığı ortalama 36-36,5° C arasında değişir. İç organların sıcaklığı ise, örneğin rektal (anal) sıcaklığı; yaklaşık 0,5° C kadar daha yüksektir. Normalde vücutta üretilen ısı ve çevreye aktarılan ısı miktarı arasında denge olduğundan, sıcaklık sağlıklı kişide korunur. Ölümden hemen sonra ısı üretimi durur, fakat ısı kaybı devam eder; ve belli bir süre sonra bulunduğu çevrenin sıcaklığı ile eşitlenir. Cesedin soğuma süresi özellikle bulunduğu ortama bağlı olarak değişmekle birlikte, en geç 24 saatte tam olarak soğur. Etkili faktörler: Ortama ait özellikler: sıcaklık, nem ve hava akımı. Kişiye ait özellikler: ölüm öncesi vücut sıcaklığı, giyinik olma durumu, yaş, beslenme durumu, vücut yüzeyi oranı, deri, yağ dokusu ve hidrasyon. Ölüm şekline ait özellikler: donma, suda boğulma, güneş çarpması ve beyin kanaması, enfeksiyon.

Sıvı Değişiklikleri

Etkili faktörler: Ortama ait faktörler; sıcaklık, nem ve hava akımı. Cesede ait faktörler; vücut yüzey alanı, Cildin geçirgenliği ve vücudun su oranı.

Ölü Lekeleri

Ölümün başlaması ile kan yer çekimi etkisi ile yavaş yavaş büyük damarlardan vücudun yere yakın kısımlarındaki küçük damarlara, kılcal damarlara toplanır. Kandaki eritrositlerin parçalanması ile kan, önce kırmızı bir renk alır, sonra eritrositlerin oksijeni kaybetmesi ile (deoksijenizasyon) koyu mor bir renk alır. Daha sonra bu sıvı damarlardan pasif olarak doku içine yayılarak, dokuları koyu mor renge boyar. Ölümden sonra cesedin yere yakın ve bası görmeyen deri kısımlarında, normal deri renginden farklı; genellikle koyu mor, bazen açık kırmızı, bazen de siyaha yakın renkte oluşan yaygın renkli alanlardır. Ölü lekelerinin genellikle mor renkte olmasından dolayı “ölü sertliği” (rigor mortis) terimi de tercih edilmektedir. Genellikle ölümden 2-3 saat sonra küçük çizgiler halinde başlar ve 8-10 saatte geniş plaklar oluşur. Ölümden sonra cesedin pozisyonunun değiştirilip değiştirilmediği hakkında bilgi verir; İlk 8-10 saat cesedin pozisyonunun değişirse ölü lekelerinin yeri değişebilir. 10-15 saat arasında bazı bölgelerde yer değiştirirken, bazı bölgelerde sabit kalır. 18-20 saat sonra ise son şeklini

almıştır ve yer değıştirmez. Etkileyen faktörler: Cesede ait faktörler; Dolaşımdaki kanın hacmi, Hb oranı ve indirgenmesi, kanın sıvı kalış süresi ve O₂ tüketimi. ortama ait faktörler; sıcaklık ve nem oranı.

Ölü Katılığı

İstemli ve istemsiz kasların ölüm sonrasında katılaşmasıdır. Ölüm sonrası kaslarda olan değışiklikler;

1)primer gevşeme

2)ölü katılığı

3)sekonder gevşeme

Ölü katılığı ölümden sonra kaslardaki ATP'nin tükenmesine bağı olarak gelişir. Fizyolojik olarak kasların ölümden sonraki son gerilme refleksi olarak tanımlanabilir.

Ölü katılığı süreci; Başlama (ATP düzeyi ve kasların ölüm anındaki glikojen miktarı). Tamamlanma (ATP düzeyi). Bitiş (çürüme). Ölü katılığı tam olarak geliştiğinde,tüm eklemler katılaşır. Eklemlerde fleksiyon hakimiyeti mevcuttur. Ölü katılığının muayenesi, eklem hareketleri kontrol edilerek yapılır. Oluşum hızında kasların glikojen miktarı da etkili olduğundan, genel olarak çene kasları gibi küçük kaslardan başladığı kabul edilir. Ortalama koşullarda 3-5 saat içerisinde oluşmaya başlar. 10-15 saat içerisinde iskelet kaslarını maksimum seviyede tutar. 36-48 saat sonra ise çürüme ile birlikte çözülmeye başlar.

Dekompozisyon/Çürüme

Organizmadaki organik materyalin değışim sürecinde gözlenen fiziksel özelliklerdir;

1)Otoliz.

2)Pütrefaksiyon -kokuşma.

Etkili faktörler: Cesede ait özellikler; Yaş, beslenme, hidrasyon, giysi ve ölüm nedeni.

Canlı etkenler; Bakteriler, mantar sporları, ev hayvanları, kemirgenler, vahşı hayvanlar ve adli entomoloji (Sarcosaprophagous) .

Fiziksel etkenler; sıcaklık, nem, hava hareketleri ve cesedin bulunduğu ortamın yapısı (Fincancı 1997, Soysal ve ark. 1999, Yorulmaz ve ark. 2006).

Kimyasal Değişimler

Organizmadaki organik materyalin değişimi ile vücut sıvıları bileşiminde ortaya çıkan değişikliklerdir: Kan serum, BOS, göz içi sıvısı ve sinovyal sıvı (Fincancı 1997, Yorulmaz ve ark. 2006, Soysal ve ark. 1999).

Biyolojik Değişimler

Organizmadaki organik materyalin değişimi ile yumuşak dokular ve hücrelerde ortaya çıkan değişikliklerdir: Otoliz, entomolojik değişiklikler, diğer canlıların meydana getirdiği değişiklikler, sperm değişiklikleri ve mide içeriği (Fincancı 1997, Soysal ve ark. 1999, Yorulmaz ve ark. 2006).

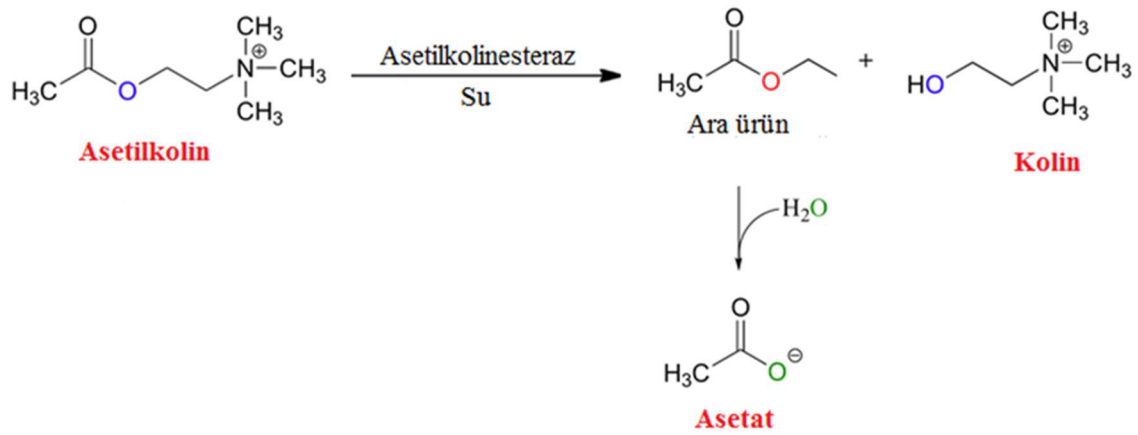
2.3. Çalışmada Araştırılan Enzimler

2.3.1. Asetilkolinesteraz Enzimi

Nörotransmitter olan bir maddedir, asetilkolinin hidrolizini katalizleyebilmektedir, bu enzim asetilkolinesteraz olarak (AChE, EC 3.1.1.7) bilinir (Lehninger ve ark. 1993). Asetilkolinin (Ach) keşfi ve AChE'nin keşfi ile birlikte getirilmiştir (Freeman ve ark. 1976).

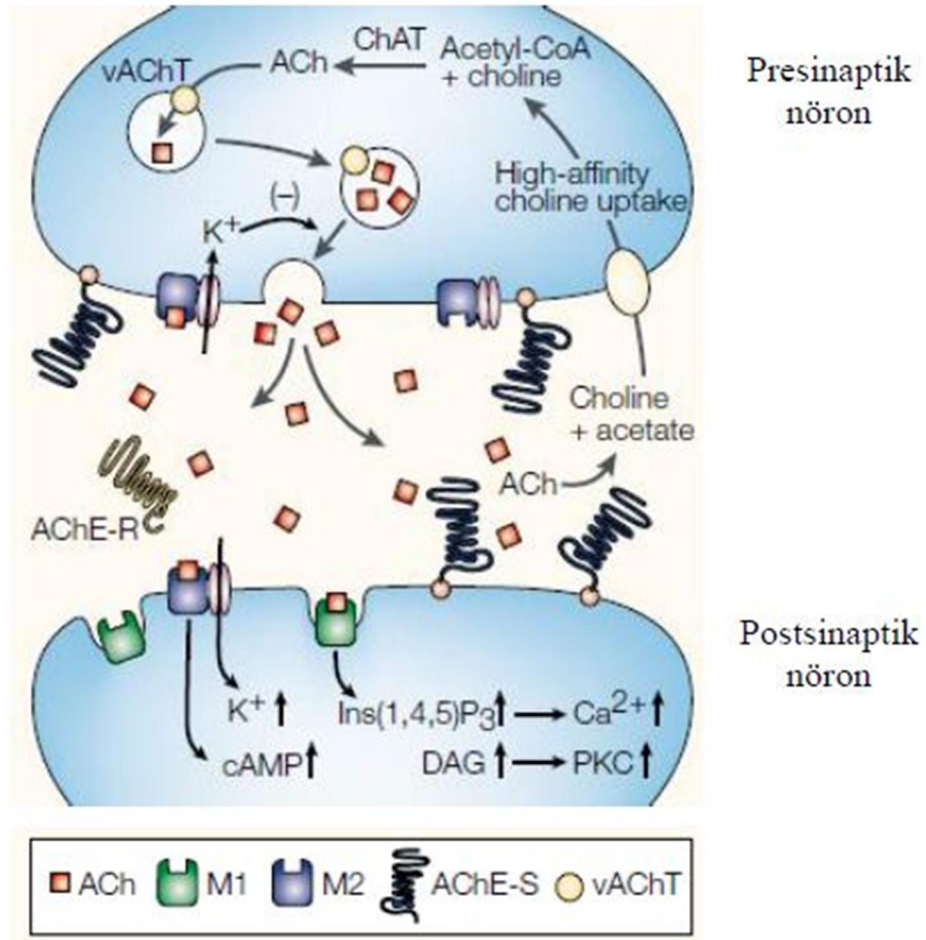
Enzim Mekanizması

Nörotransmitter madde, bir uyarılmış sinir hücresinden sinaps içerisine salınarak sonraki sinir hücresinin reseptör bölgesine bağlanıp sinir impulsunun diğer hücreye geçmesinde rol oynamaktadır. Bir sonraki impulstan önce Ach'in AChE tarafından hidrolize edilmesinin gerçekleştirmesi gerekir. Ach'in hidrolize edilmesiyle asetat ve kolin oluşurlar (Şekil 2.3). İşte bu enzimin aktivitesini bozan maddeler sinir impuls iletiminin bozulmasına ve bunu takiben belli fonksiyonların aksamasına sebep olurlar (Lehninger ve ark. 1993).



Şekil 2.3. Asetilkolinin asetilkolinesteraz enzimi ile hidrolizine ait tepkime ve oluşan ürünler (Soderberg 2012)

En önemli kolin kaynağı bu tepkime sonucu olmaktadır, oluşan bu kolin daha sonra yapılacak olan Ach sentezlerinde kullanılarak presnaptik nörona geri alınmaktadır (Freeman ve ark. 1976). ACh, presinaptik nöronda olan ChAT tarafından



Şekil 2.5. ACh sentez ve transfer mekanizması (Soreq ve Seidman. 2001).

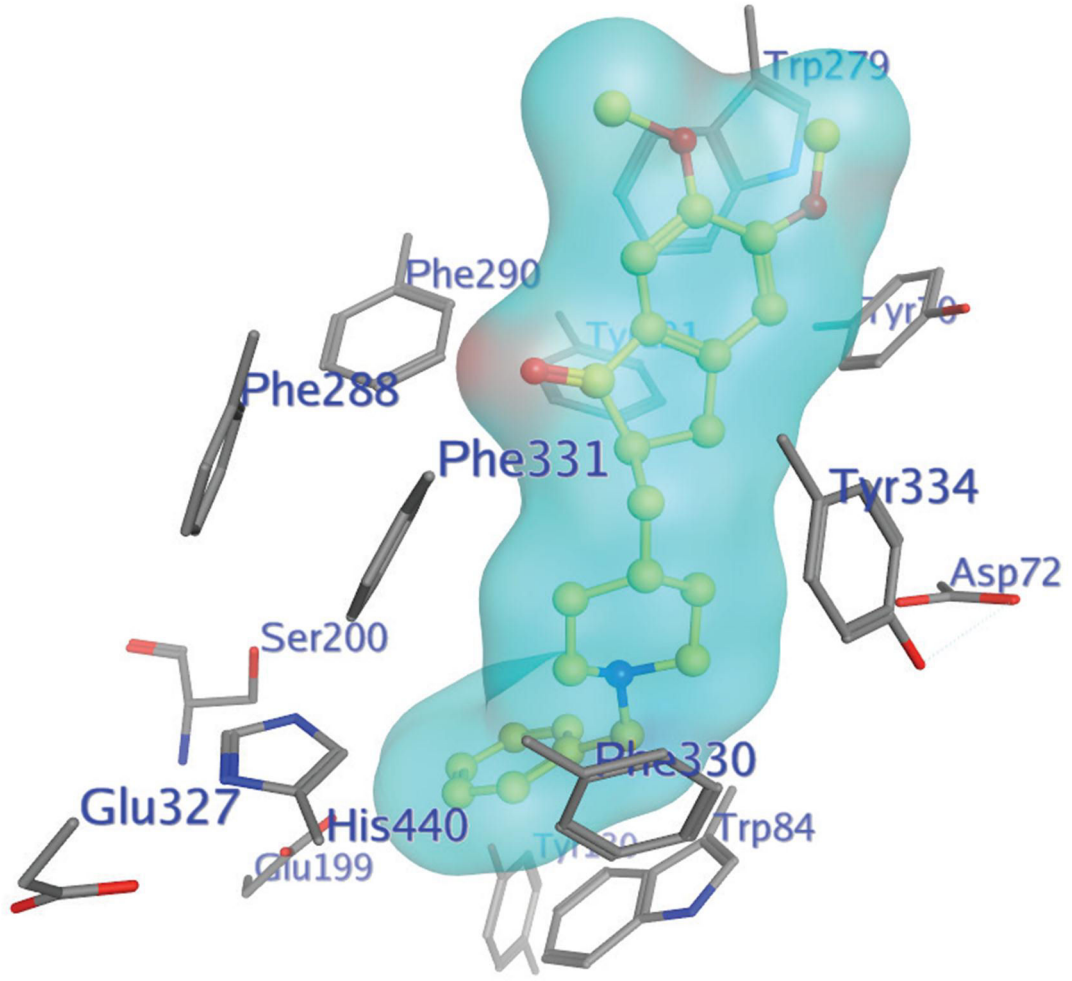
Enzim Yapısı

AChE, serin hidrolaz süper ailesine ait olan bir enzimdir (Çizelge 2.6). Bu enzim ailesi, insan proteomundaki genlerin %1'ini yani yaklaşık 200 enzimi kapsayan bir büyüklükte olmaktadır. Bu grubunun önemli karakteristiklerinden biri; substratların hidrolizi için kullanılan nükleofilik dizine sahip bir aktif bölge bulundurmalarıdır. Diğer nonkatalitik serinlerin aksine bu hidrolazların nükleofilik serini bir bazık (genellikle histidin) veya asidik (aspartat veya glutamat) kalıntı içeren proton çarkıyla etkinleştirilir (Simon ve ark. 2010).

Çizelge 2.6. Serin hidrolaz süper ailesi ait bazı enzim grupları (Long ve ark. 2011)

Enzim	Örnek
Serin proteazlar	Tripsin, kimotripsin ve subtilisin
Ekstraselüler lipazlar	Pankreatik lipaz, gastrik lipaz, hepatik lipaz, endotelial lipaz ve lipoprotein lipaz
İntraselüler lipazlar	Hormon duyarlı lipaz, monoasilgliserol lipaz, adipoz trigliserid lipaz ve diaçilgliserol lipaz
Kolinesterazlar	Asetilkolinesteraz, bütilkolinesteraz
Küçük moleküllü tioesterazlar	Yağ asit sentaz ve açıl-KoA tioesteraz
Bazı fosfolipazlar	Fosfolipaz A2 ve trombosit aktive edici faktör asetilhidrolaz
Protein ve glikojen hidrolazlar	Protein fosfat metilesteraz 1, açiloksiasil hidrolaz ve sialik asit asetilesteraz
Bazı amidazlar	Yağ asit amid hidrolaz
Bazı peptidazlar	Dipeptidil peptidaz 4, fibroblast aktivasyon protein ve prolilendopeptidaz

AChE'in yüksek seviyede bir katalitik aktivitesi (Saniyede 25000 ACh molekülü) vardır (Taylor ve ark. 1994). Asetilkolinesteraz'ın temel yapısal ve katalitik birimi, kütlesi 70-80 kDa aralığında olan bir enzimdir. Enzim bulunduğu dokuya göre bu birimin monomer, dimer veya tetrameri halinde bulunmaktadır (Massoulié ve ark. 1993). Enzimin aktif bölgesi oyuğunda 5 alt-bölge belirlenmiştir (Şeki 2.6) (Sussman ve ark. 1991, Massoulié ve ark. 1993):



Şekil 2.6. E2020 ligandı ile kompleks yapmış asetilkolinesteraz (protein data bank kodu: 1eve)

1. Periferal Anyonik Bölge: Aktif bölge oyuğunun ağzında Trp121, Trp279 ve Tyr70'tan oluşmaktadır. Ligandlar ilk bu bölgeye bağlanır, sonra aktif merkeze gönderilmektedir (Radic ve ark. 1993, Barak ve ark. 1994).
2. Kolin Bağlama Bölgesi: Bu bölgede mevcut Phe330 ve Trp84 rezidülerinin elektron bakımından zengin aromatik halkaları, substrat ve inhibitörlerin katyonik ucu ile katyon-p etkileşimini yaratmaktadırlar.
3. Oksi-Anyon Deliği (OAD): Kolin bağlama bölgesinin yanında mevcut oksi-anyon deliği Ala201, Gly118 ve Gly119 rezidülerini içermektedir. Bu bölgede geçiş durumları sabit tutulur ve aktivasyon enerjisi bariyeri indirir. Substrat dikey pozisyondayken

pozisyona çevirilerek; katalitik Ser200'ün etkisine girmesi sağlanmaktadır (Zhang ve ark. 2002).

4. Açıl Bağlama Cebi: Substrat yatay olarak çevrildiğinde, substratın açıl kısmı açıl bağlama cebine bağlanmaktadır. AChE'nin açıl bağlama cebinde Phe288 ve Phe290'nin fenil halkaları, bağlı substratın hareketini sınırlayıp asetilkolin gibi kısa açıl grubu içeren substratların katalizini acele ettirir (Radic ve ark. 1993, Pezzementi ve ark. 2003).

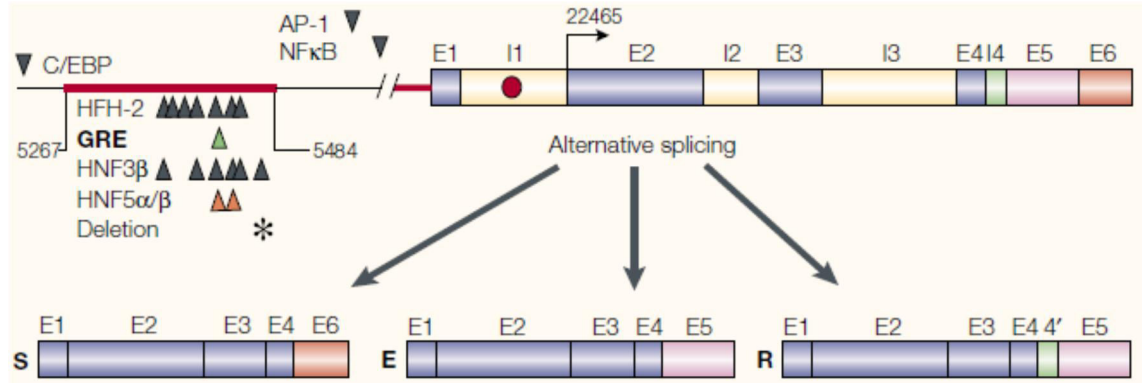
5. Katalitik Triad: OAD ve açıl bağlama cebiyle yaptığı etkileşimlerden dolayı istikrarlı olan substrat, aktif merkezin esteratik bölgesinde yer ayırtan ve Glu327, Ser200 ve His440'ten oluşan katalitik triadın etkisine geçer. Katalitik triad bir yük dağıtım sistemi olup, ilk aşamada Ser200'ün OH grubundan His440-Glu327 ikilisi yönünde proton aktarımı neticesinde Ser200 nükleofilik özelliğe sahip olur. Ser200 oksijeninin substrat asetilkoline atağı neticesinde açıl-enzim ara yapısı meydana gelir. Devamında elektron dağıtımının ters dönmesiyle bu ara yapıdan alkol biriminin uzaklaşması başlar. İkinci ürün olan karboksilik asidin açığa çıkması ve son olarak Ser200'ün His440'den bir proton alarak serbest kalması neticesinde artık enzim başlama noktasına dönmüştür (Koellner ve ark. 2000, Zhang ve ark. 2002).

AChE'nin yapısının özelliği nedeniyle birçok farklı aktiviteye sahip olmaktadır. Enzimin çoklu aktivite fikri önceleri açık ve net bir şekilde bilinmediğinde canlıların farklı gelişim evrelerine ait farklı hücre türlerinde görülmesi bu fikri desteklemektedir (Fitzpatrick-McElligott ve ark. 1981). Değişik karakterde işlev göstermesinin en önemli sebeplerin bir tanesi de enzimi kodlayan genin farklı mRNA işlenme sürecine maruz kalması ve translasyondan sonrası geçirdiği modifikasyonlardır. Bu farklı işlemler nedeniyle AChE bilinen üç formdan oluşup meydana gelmektedir. AChET (tail) beyin, kas ve diğer dokularda bulunan ana formdur. AChEH (hidrofobik) özellikle eritroit dokularda bulunmaktadır. Kesilebilir bir hidrofobik peptidi içermektedir. AChER, Torpedo sp. ve farelerde bulunan form olmaktadır. inflamasyon ve Stres cevabında rol aldığı sanılmaktadır (Massoulie ve ark. 2008).

AChE enziminin farklı özelliklerde aktivite göstermesi doku/hücre farklılığı, canlının bulunduğu ortamdan kaynaklanan etkiler veya canlının fizyolojik durumu gibi etkenlere karşı oluşturulan metabolik cevap nedeniyle translasyonel ve translasyon sonrası,

transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzeylerde farklı şekillerde düzenlenmesinden de oluşmaktadır. Moleküler mekanizmasının bilinmiş olduğu yine de enzimin bir dokudaki miktarı, hücre içi dağılımı, alternatif izoformlarının dağılımı, glikolizasyon ve proteolitik işlenmesi gibi vakaların nasıl bir düzenlemeye maruz kaldığı tam olarak açıklanmamaktadır (Vellom ve ark. 1993). AChE'ye ait pre-mRNA'nın (Şekil 2.7) sekansiyel kesilmesi ile 5' ve 3' ucundaki düzenlemeler doku veya hücre tipine göre hızlı bir fizyolojik düzenleme cevabı oluşmasında son derecede önemlidir. Enzimin transkripsiyonel çeşitliliği proksimal promoter (Li ve ark. 1993, Atanasova ve ark. 1999) ve birinci introndaolan internal enhansıra bağlı olmaktadır (Chan ve ark. 1999).

AChE'ye ait çekirdek bölge üç ekzon ve çeşitli spesifik özelliklere sahip karboksi terminal sekanslarını kodlayan ek bölgelerden meydana gelmektedir. Transkripsiyon E1'de başlar. E2 ise ergin proteinin yapısında görünür olmayan lider sekansı kodlar. Proksimal promotör (E1'e birleşik kırmızı çizgi) ve distal enhansır bölge (daha uzaktaki kırmızı çizgi) zengin düzenleyici bölgeler olmaktadır.



Şekil 2.7. İnsan AChE geninin genel yapısı ve gene ait alternatif RNA'lar (Soreq ve Seidman. 2001)

AChE ekspresyonu bu moleküler düzenlemelerine ilaveten hücre farklılaşması (Rotundo 1990), düşük AChE seviyesi (Galyam ve ark. 2001), anti AChE moleküllerine maruziyet (Kaufer ve ark. 1998) ve çeşitli travmatik etkilere de bağlı olmaktadır (Nordberg ve ark. 1999).

AChE Geni

Memelilerde, AChE tek bir AChE geni tarafından kodlanır ve bazı omurgasızlar çoklu AChE genlerine sahiptir. Tek memeli geninden kopyalanan ürünlerdeki çeşitlilik, alternatif mRNA uçbirleştirme ve katalitik ve yapısal alt birimlerin post-translasyonel kombinasyonlarından kaynaklanmaktadır (Massoulié ve ark. 2008).

AChE Gen Formları

AChE geninin bilinen üç formu vardır: T (kuyruk), R (Okuma sırasında) ve H (hidrofobik) (Massoulié ve ark. 2008).

AChET

Beyin, kas ve diğer dokularda bulunan AChE'in ana biçimi, kolojen veya lipit içeren yapısal alt birimler ile disülfid bağlı oligomerleri oluşturan hidrofilik türler olarak bilinir. AChE, nöromusküler kavşaklarda ColQ veya altbirim ile birleşir asimetric formda görünür. Merkezi sinir sisteminde, simetrik form oluşturabilmek PRiMA ile birleşip Proline-Rich Membran çapası üzerinde duruyor. Nöromusküler kavşaklar için ColQ, Sinapslar için ise PRiMA'dır. Her iki durumda da, ColQ veya PRiMA çapası, hücre içi bağlantıdayken enzimi korumak için hizmet eder.

AChEH

Diğer alternatif olarak ekli form, eritroid dokularında başlıca olarak ortaya çıkmaktadır. C-terminusunda farklı olup bir PI-çapa sitesine sahip olan bölünebilir bir hidrofobik peptidi içerir.

AChER

Üçüncü tip, şimdiye kadar sadece Torpedo sp ve farelerde bulunmuş olmasına rağmen, diğer türlerde hipotezlenmiştir. Stres cevabına ve muhtemelen inflamasyona dahil olduğu düşünülmektedir (Dori ve ark. 2007).

İnhibitörleri

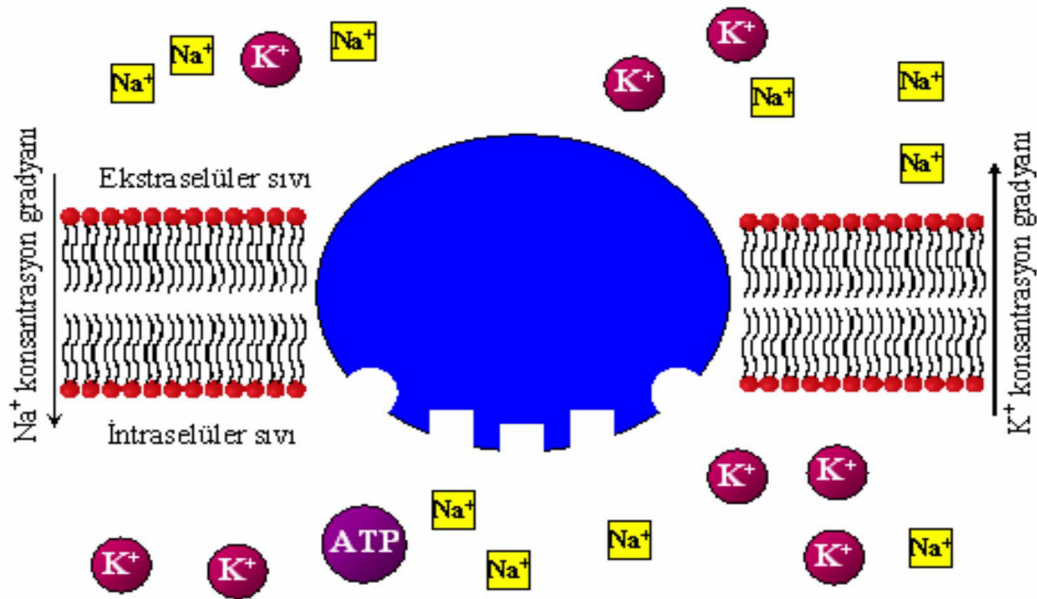
AChE için, geri dönüşümlü inhibitörler AChE'ye geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanıp deaktive etmeyenlerdir (Millary ve ark. 2007). AChE'yi geri dönüşümlü bir şekilde inhibe eden ilaçlar, diğerleri arasında Alzheimer hastalığı ve myastenia gravis için tedavi olarak araştırılmaktadır. Örneğin takrin ve donepezildir (Julien ve ark. 2008).

2.3.2. Na⁺-K⁺ ATPaz Enzimi

Trans membran proteini olan, eritrosit membranı Na⁺-K⁺ ATPaz enzimi üzerinde uzun zaman çalışılmış aktif transport sistemlerinden biridir. Bu enzim Jens Skou tarafından 1957 yılında sinir hücrelerinden ilk defa izole edilmiştir. (Xie ve Askari. 2002). Hücre içi K⁺ iyonu seviyesini yüksek, Na⁺ iyonu seviyesini düşük tutmak için, Na⁺ ve K⁺'un aktif transportundan sorumlu olan bir enzimdir (Robinson ve Flashner. 1979).

Enzim Yapısı

Na⁺-K⁺ ATPaz enzimi, insan eritrositleri dahil hemen hemen her dokuda mevcut ve hücre membranından Na⁺ ile K⁺ transferinin gerçekleşmesinden sorumlu bir proteindir. Hayvansal hücrelerde hücre içi Na⁺ derişimi 12 mM, K⁺ derişimi ise 140'dır. Hücre dışında ise Na⁺ 145mM iken K⁺ iyonu 4 mM'dır. Bu denge ise Na⁺-K⁺ ATPaz enzim sistemi tarafından sağlar (Şekil 2.8), (Gürel ve ark. 2004).



Şekil 2.8. Na⁺-K⁺ ATPaz enziminin yapısı (Dağlar, 2000).

Na⁺-K⁺ ATPaz –Na⁺/K⁺ pompası– tam bir zar proteini olup, alfa (α) ve beta (β) olarak denilen iki alt ünitelerden üretilmiş bir tetramerdir. α alt ünitesi 1020, β alt ünitesi 302 amino asitten meydana gelmektedir. Diğer proteinlerin birçoğu gibi Na⁺/K⁺ pompasının α bileşeni değişik izoform yapıları kullanılarak (α1, α2, α3) açıklanır.

Dokulardaki $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ izoform oranlarının çeşitliliğinin ne anlama geldiği belli değil de ve ne tür bir fonksiyonu olduğu hala aydınlatılmamıştır (Clausen 1998).

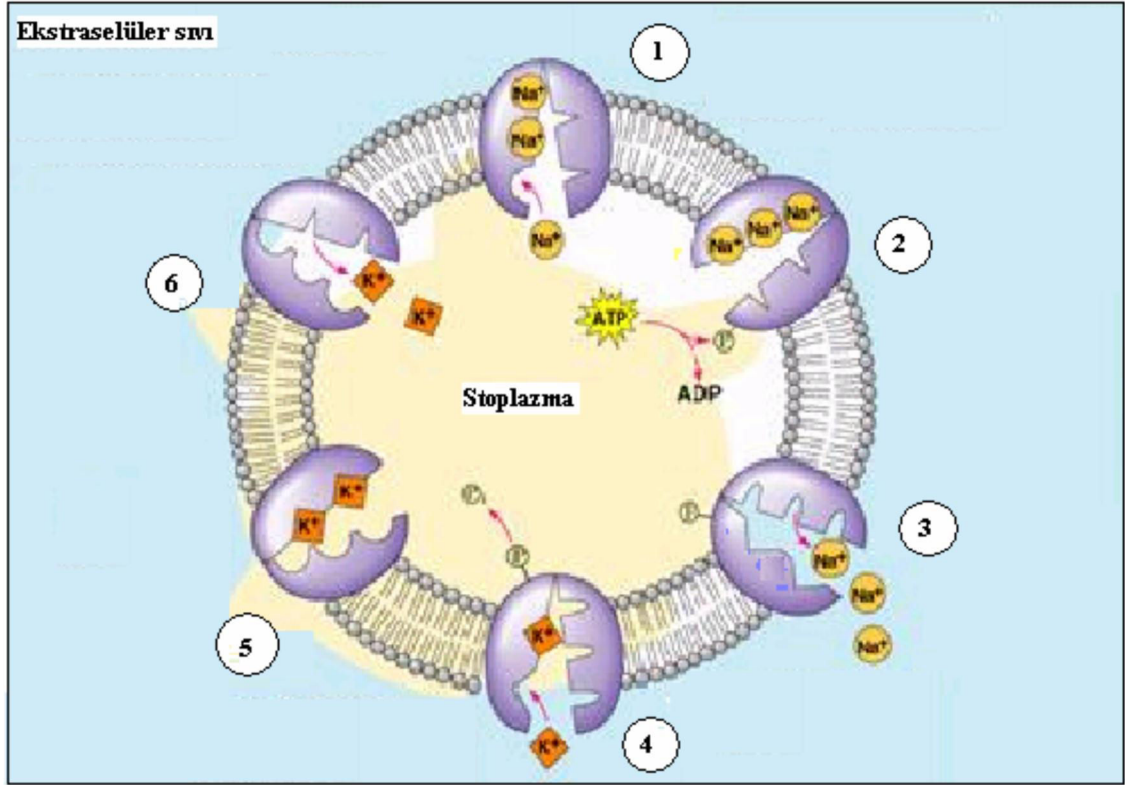
$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz, ATP'nin hidrolizini katalizler ve açığa çıkan enerji ile üç Na^+ iyonunu hücre dışına, iki K^+ iyonunu hücre içine aktarır. Hücre membranı boyunca bu katyonların yer değiştirilmesini sağlayarak membran polaritesinin düzenlenmesi gibi hayati bir göreve sahiptir (Schmidt ve Kjeldsen. 1998).

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz Enziminin Etki Mekanizması

Yaklaşık her hayvan hücresinde mevcut $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz pompasının temel görevi, birçok hücre fonksiyonun gerçekleşebilmesi için hücre içindeki düşük Na^+ ve yüksek K^+ iyonu derişimlerinin korunmasını temin etmektedir. Na^+ / K^+ pompası ile Na^+ çıkışı ve K^+ girişi sırasında membranda elektrik gerilimi oluşup osmotik basınçta değişme ortaya çıkar. Membran potansiyeli 50 mV ile 70 mV arası olup, Na^+ ve Cl^- gibi iyonların hareketlerine tesir ederek osmotik basıncın ayarlanmasında ve böylece hücre kararlılığının temin etmesinde rol oynar (Clausen. 1998).

Na^+ ve K^+ iyonlarının aktarması (Şekil 2.9) 1. basamakta; Na^+ iyonu derişimi düşük olan sitoplazmada üç adet Na^+ iyonu ATPaz'la birleşir. Bu bütünleşme $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz transport proteininin Na^+ iyonuna olan yüksek ilgisinden kaynaklanır. 2. basamakta; transport proteini ATP molekülünü ADP ve fosfat iyonuna paramparçe eder ve fosfat iyonu kendini transport proteinine bağlar. Proteinin fosforilasyonu enerji bakımından proteinin kararsız olmasına sebep olup protein tekrar stabil hale geçebilmek için enzimin yapısal değişikliklere uğraması şart olur. Bu değişim Na^+ iyonunun proteinin diğer ucuna hareket etmesine sebep olur. Proteinin diğer ucuna geçmiş olan Na^+ iyonu buradan hücre dışına terk edilir. Çünkü transport proteini artık Na^+ iyonuna düşük ilgi göstermek zorunda kalmaktadır. 3. basamakta; ortamın K^+ iyonu konsantrasyonu düşük olmasına karşın proteinin yapısal durumu K^+ iyonuna yüksek ilgi göstermesine sebep olur. Böylece protein iki K^+ iyonunu kendisine bağlar. O sırada proteine kovalent bağla bağlı olan fosfat grubu proteinden ayrılır ve bu ayrılış proteinin yapısal değişikliğe uğramasına neden olur. 4. basamakta; yapısındaki değişiklikten dolayı K^+ iyonları proteinin diğer ucuna aktarılmış olurlar. Bu yapısal değişiklik o sırada proteinin K^+ iyonuna karşı olan ilgisinin azalmasına ve buna bağlı olarak K^+ iyonlarının

sitoplazmaya dağılmasına sebep olur. Bu işlemler ilk basamaktan başlayarak sürekli bir şekilde devam eder (Köksoy, 2002).



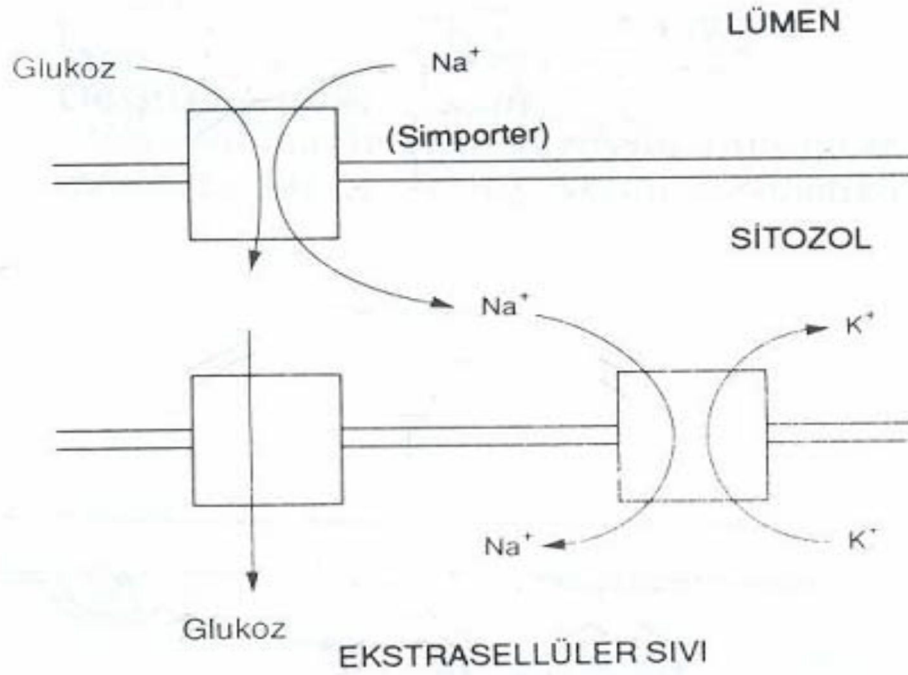
Şekil 2.9. Na⁺ ve K⁺ iyonlarının taşınması (Köksoy, 2002).

Na⁺-K⁺ ATPaz, Na⁺ ve K⁺ iyonlarının derişimlerini kontrol edip hücre dışı sıvı hacminin korunmasını, hücre membranının her iki tarafındaki iyon gradientlerinin düzenlenmesini ve kan basıncının ayarlanmasını sağlarken, kendisi de birçok molekülün kontrolü altında olmaktadır. Na⁺-K⁺ ATPaz aktivitesi üzerinde etkili olan dopamin, aldesteron, angiotensin II ve nitrik oksit gibi birkaç madde vardır (Beltowski ve ark., 2003).

Glukoz Transportu

Enerji kullanımında ilk adım olarak glukoz, hücrelere ulaşmalıdır. Glukoz lipid hücrelerine ve kaslara, insülin tarafından sağlanan spesifik bir taşıma sistemi ile dahil olur. Taşıma ile ilgili değişiklikler başlangıç olarak V_{max}'taki değişikliklere bağlıdır. Ancak K_m'deki değişiklikler de tesirli olabilir. Glukoz transferi Şekil 2.10'te açıklanmıştır. Glukoz ve Na⁺, glukoz vektöründeki farklı konumlarla ilişkilidir. Na⁺

iyon, elektrokimyasal gradyan boyunca hücrenin içinde hareket eder ve aynı zamanda glukozu da çeker. Bu şekilde, Na^+ gradyanı ne kadar yüksekse, hücreye giren glikoz miktarı o kadar fazla olur ve hücre dışı sıvıda Na^+ düşükse, glukoz transferi durur. Dik bir Na^+ gradientinin eldesi için, Dik bir Na^+ gradyanı elde etmek için, söz konusu $\text{Na}^+/\text{glukoz}$ simportu düşük bir hücre içi Na^+ derişimi sağlayan bir Na^+/K^+ pompası tarafından oluşturulan gradyanlara ilişkilidir. Diğer mekanizmalara ek olarak amino asitleri taşımak için benzer mekanizmalar kullanılır. Şekerlerin transsellüler hareketi, hücre içinde biriken glukozun, farklı bir yüzeyden yine bir dengeye doğru hareket etmesini sağlayan bir uniportu, yani ilave bir bileşği kapsar, Örneğin, bağırsak ve böbrek hücrelerinde olur (Murray ve ark., 1996).



Şekil 2.10. Glukoz transferi (Murray ve ark., 1996).

Na^+/K^+ ATPaz Enziminin Aktivatörleri

Na^+/K^+ ATPaz enziminin zara bağlı bir enzim olmasından dolayı aktivitesi için fosfolipidlere muhtaç olur (Kimmelberg ve Papahadjopoulos. 1972). Hücre zarlarının fosfolipidleri tipik olarak, bir bipolar bağa sahip en az bir doymamış yağ asidi taşır. Membran seviyesinde, bir fosfolipit molekülü saniyede birkaç mikrometre içinde hareket edebilir (Murray ve ark., 1996).

Na⁺-K⁺ ATPaz Enziminin İnhibitörleri

Digital Glikozidler

Digital glikozidler, membran Na⁺ + -K⁺ + ATPase enzimini inhibe ederek etki eden faktörlerdir. Digital glikozitler bu etkiyi enzimin alfa alt birimine bağlanarak yapar. Na⁺-K⁺ ATPaz pompasını inhibe eden bu faktörler, hücre dışına transfer edilen Na⁺ iyonunda azalmaya ve dolayısıyla hücre içi sodyum derişiminin yükselmesine, potasyumun ise azalmasına sebep olurlar (Clausen, 1998).

Sülfidril Reaktifleri

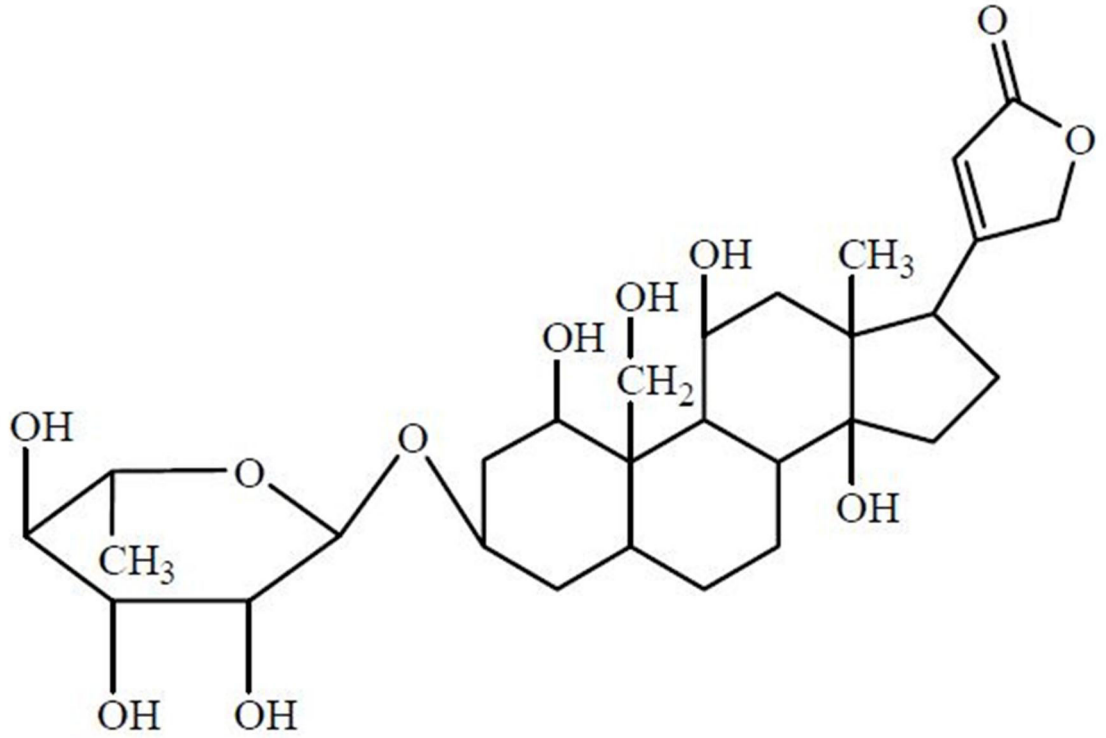
Na⁺-K⁺ ATPaz enziminin sülfidril gruplarına etkileyen maddelerle olan tepkimeleri enzim aktivitesine engel olurlar. Değişik sülfidril reaktiflerinin çeşitli enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri farklıdır. Bunlardan bazıları Kloropromazin, ethakrinik asit, 5,5' ditio bis (2-nitro benzoik asit (DTNB) ve N-etil maleimid (NEM) 'dir. Bu bileşikler enzimin zorunlu ve zorunlu olmayan gruplarıyla tepki yaparak enzim aktivitesini etkiler (Bilgin, 1995).

Oligomisin

Oligomisin mitokondriyal ATPazlar için toksik ve dönüşümlü bir inhibitördür. Oligomisin A, B, C olmak üzere 3 üç tipi vardır. ATP ve Na⁺ ile aktive olan Na⁺-K⁺ ATPaz enzimi oligomisin ile rekabetçi olmayan bir şekilde inhibe olur. Oligomisin Na⁺ ve ATP bağlı fosforilasyon ve ADP-ATP değişimi tepkimelerini engellemez, Ancak fosfo enzimin Na⁺ ve ATP varlığında oluşan K⁺ bağlı defosforilasyonu engeller (Bilgin, 1995).

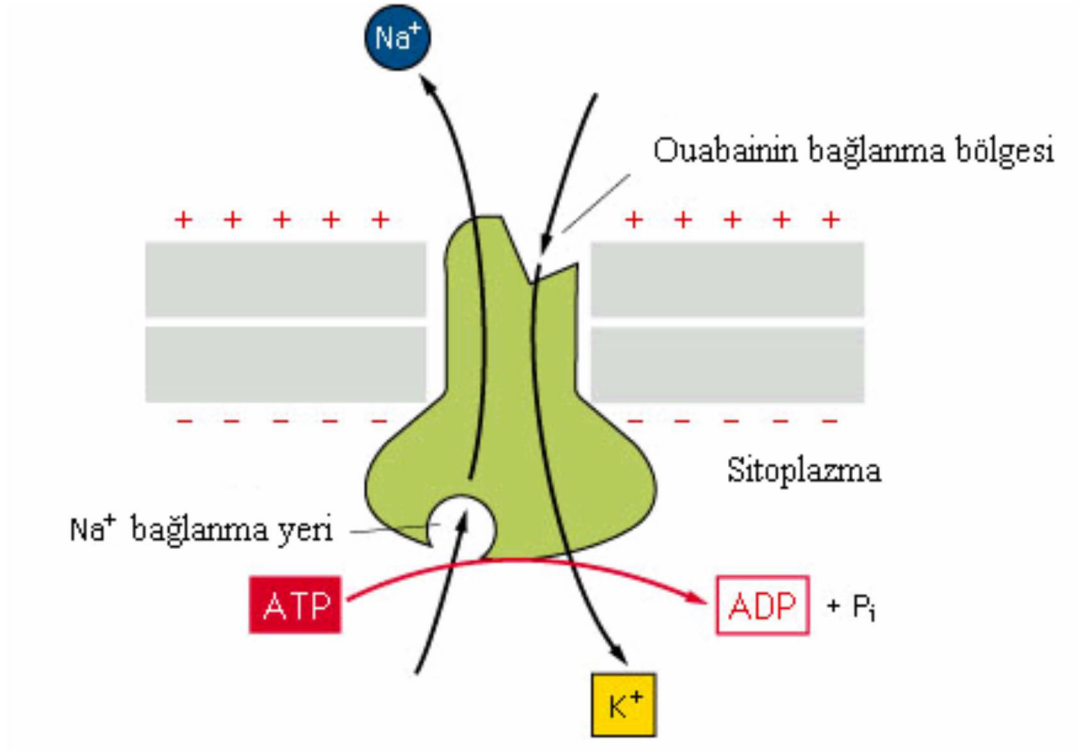
Ouabain

Na⁺ + -K⁺ + ATPaz, kardiyak glikozitler tarafından inhibe edilir. Kimyasal yapısı (Şekil 2.11). Ouabain; Kalp glikozitlerinin içinde en önemli olanıdır. Na⁺ + -K⁺ + ATPaz, çok hassas bir inhibitördür ve suda kolaylıkla çözülebilir. Ouabainin Na⁺-K⁺ ATPaz'a bağlanarak onu inhibe eder (Şekil 2.12). Na⁺-K⁺ ATPaz'ın ekstraselüler yüzeyinde ouabain için spesifik bir bağlanma yeri vardır. Ouabain bu bağlanma yerine bağlanarak enzimin tüm fonksiyonlarını dönüşümlü olarak engeller (Robinson ve Flashner, 1979; Seiler ve ark., 1985; Pauw ve ark., 2000; Köksoy, 2002).



Şekil 2.11. Ouabainin yapısı (Seiler ve ark., 1985).

Serbest radikaller $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ aktivitesinin potansiyel inhibitörleridir. Serbest radikaller lipid peroksidasyonuna sebep olup $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPaz}$ etkinliğini olumsuz yönde etkili olmaktadır (Petronijevic ve ark., 2003).



Şekil 2.12. Ouabainin Na⁺-K⁺ ATPaz'a bağlanıp inhibe etmesinin olayı (Köksoy, 2002).

2.3.3. Fosfofruktokinaz Enzimi

Fosfofruktokinaz Enzimi Hakkında Genel Bilgi

Glikoliz, tüm organizmalarda bulunan merkezi bir metabolik yoldur. Enerji üretimini ve canlı hücrelerin anabolik süreçlerini başlatabilmek için substratları sağlar. Glikoliz, besin sınırlamaları, soğuk, kuraklık veya oksijen eksikliği gibi stres koşulları ve adaptasyon için önemlidir. Glikolitik sürecin düzenlenmesi tüm hücre tipleri için gereklidir. Bitki glikolizinde anahtar düzenleyici enzimler piruvat kinaz ve fosfofruktokinazdır (Plaxton. 1996).

Fosfofruktokinaz (PFK; ATP: D-fruktoz-6-fosfat 1-fosforiltransferaz, EC 2.7.1.11), fruktoz-6-fosfat (Fru6P) ve fruktoz-1,6-bisfosfatın ara dönüşümünü katalize eder. Glikoliz regülasyonunda anahtar bir enzimdir (Uyeda. 1979, Paetkau ve Lardy. 1967, Schirmer ve Evans. 1990). Çoğu glikolitik enzim farklı organizmalar arasında dikkat çekici bir şekilde korunurken, çok çeşitli evrimsel geçmişe sahip çeşitli fosforozokakinler mevcuttur (Baptiste ve ark. 2003).

Memeli PFK'in bir ata prokaryotik gen duplikasyonundan, tandem füzyonundan ve diverjansından elde edildiğine dair kanıtlar vardır. Böylece bakteriyel PFK, memeli PFK' enziminin yaklaşık yarısı kadardır (Li ve ark. 1999). Memeli PFK, ATP tarafından allosterik olarak inhibe edilir ve AMP tarafından allosterik olarak aktive edilir, böylece glikolitik yola girdiğinde hücrenin enerji ihtiyaçlarını gösterir (Garrett ve ark. 2012).

Enzimin Yapısı ve Mekanizması

PFK, yaklaşık 300 amino asit uzunluğundadır ve bakteri enziminin yapısal çalışmaları, PFK'nin iki benzer (alfa / beta) loba oluştuğunu göstermiştir. Birincisi, ATP bağlanmasında yer alan ve ikincisi hem substrat bağlanma sitesi hem de allosterik siteyi (enzim aktivitesini etkileyen ve aktif bölgeden farklı olan bir düzenleyici bağlanma bölgesi) barındırmaktadır. Aynı tetramer alt birimleri 2 farklı uyum sağlar: 'kapalı' durumda, bağlı magnezyum iyonu enzim ürünlerinin fosforil gruplarının boşluğunu (ADP ve fruktoz-1,6-bisfosfat) doldurmaktadır; ve bir 'açık' durumda ise, magnezyum iyonu sadece ADP'ye bağlanır ve 2 ürün artık daha ayrı olmaktadır. Bu konformasyonların, reaksiyona yetecek kadar yakın olan 2 molekülü getirmek için alt birim kapatılmasını gerektiren bir reaksiyon yolunun ardışık aşamaları olduğu düşünülmektedir (Shirakihara ve ark. 1988).

PFK, şeker kinazların fosforotokkinaz B (PfkB) familyasına aittir (Park ve ark. 2008). Bu ailenin diğer üyeleri (Ribokinaz ailesi olarak da bilinir) ribokinaz (RK) adenosin kinaz (AK), inosin kinaz ve 1-fosfokrutokkinaz gibi vardır (Bork ve ark. 1993, Spsychala ve ark. 1996, Park ve Gupta. 2008). PfkB / RK ailesinin üyeleri, üç korunmuş dizi motifinin varlığı ile tanımlanmaktadır (Bork ve ark. 1993, Maj ve ark. 2002, Park ve Gupta. 2008). Birkaç Pfk protein ailesinin yapıları, birtakım organizmalardan belirlenmiştir ve bu protein familyasının enzimatik aktivitesi, pentavalent iyonların varlığına bağlı olduğunu göstermektedir (Sigrell ve ark. 1998, Maj ve ark. 2002, Park ve ark. 2008).

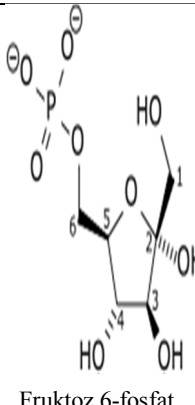
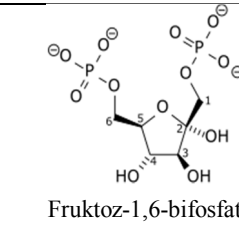
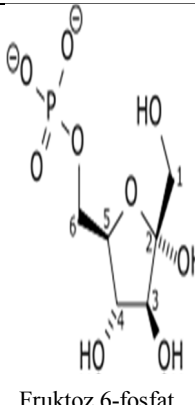
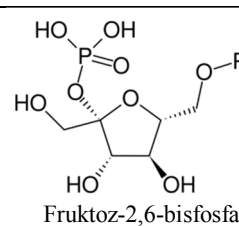
PFK'in İzofomları

Memelilerde, PFK-M, PFK-L ve PFK-P (PFK-C olarak da adlandırılır) olarak adlandırılan üç farklı PFK izoformu vardır; bunlar sırasıyla kas, karaciğer ve trombosit (veya serebrum) 'da ana ekspresyonlarıdır. İnsanlarda M, L ve P izoformları 85.2, 85.0 ve 85.6 kDa'dır ve genleri sırasıyla 1, 21 ve 10 kromozomlarına atanır (Vora ve Francke 1981). Buna ek olarak, PFK-M ve PFK-L'nin %68.6, PFK-M ve PFK-P 'nin %70.3, PFK-L ve PFK-P 'nin %66.6' aynı amino asit sekans özdeşliğini paylaştıkları gösterilmiştir. Bu izoformların ifade seviyesi dokuya spesifiktir (özeldir); İskelet kası sadece bir izoformu (PFK-M) ifade eden tek doku iken, diğer tüm dokular üç izoformun farklı düzeylerini ifade ederler (Dunaway ve ark. 1988). Bu nedenle, PFK-M, değerlendirilen tüm memeli hücrelerinde ifade edilen tek izoform olarak kabul edilir. Dokular arasında ifade edilen PFK izoformlarının farklı modelleri, spesifik glikolitik oranlarına katkıda bulunabilir. Örnek olarak, bazı insan meme tümörü hücre dizilerinin glikolitik veriminin (tüketilen glikoz başına oluşturulan laktatın) daha agresif hücrelerde arttığını göstermiştir ki ve diğer iki izoform üzerinde daha yüksek bir PFK-L ekspresyonuna atfedilmiştir (Zancan ve ark. 2010).

PFK'in Türleri ve Düzenlenmesi

İnsanlarda iki farklı fosfofruktokinaz enzimi vardır (Çizelge 2.7) (Dunaway ve ark. 1988).

Çizelge 2.7. PFK'in türleri (Dunaway ve ark. 1988)

Tip	Eş anlamlı	EC numarası	Substrat	Ürün	Alt birim genleri
Fosfositotokinaz 1	6-fosfofruktokinaz Fosfohekzokinaz	EC 2.7.1.11		 Fruktoz-1,6-bisfosfat	PFKL, PFKM, PFKP
Fosfositotokinaz 2	6-fosfofrukto-2-kinazı	EC 2.7.1.105	 Fruktoz 6-fosfat	 Fruktoz-2,6-bisfosfat	PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3, PFKFB4

PFK1, memeli glikolitik yolağındaki en önemli kontrol bölgesidir. Bu adım, sadece fizyolojik koşullar altında yüksek oranda ekserji olduğu için değil, aynı zamanda kararlı bir adım olduğu ve glikolitik yola özgü bir tersine çevrilemez ilk tepkime olduğu için kapsamlı düzenlemeye tabidir. Bu olay, glikoz ve diğer monosakkaritlerin galaktoz ve fruktozun glikolitik yoldan aşağı inmesine kesin bir kontrol sağlar. Bu enzimin tepkimesinden önce, glikoz-6-fosfat potansiyel olarak pentoz fosfat yolunda inebilir veya glikojenez için glikoz-1-fosfata dönüştürülebilir. PFK1, yüksek seviyede ATP ile allosterik olarak inhibe edilir, ancak AMP, ATP'nin inhibitör etkisini tersine çevirir. Bu nedenle, hücresel ATP / AMP oranı düştüğünde enzimin aktivitesi artar ve böylece glikoliz enerji yükü düştüğünde uyarılır. PFK1, hem bir substrat hem de bir inhibitör olan ATP için farklı afinitelere sahip iki alana sahiptir (Stryer ve ark. 2007). Ayrıca PFK1, ATP'nin inhibitör etkisini artıran düşük pH seviyeleri tarafından inhibe edilir.

Kas, anaerobik olarak çalıştığı ve aşırı miktarlarda laktik asit ürettiği zaman pH düşer (her ne kadar laktik asit, pH'taki düşüşün sebebi değildir) (Lindinger ve ark. 2005). Bu inhibitör etkisi, kasın çok fazla asit birikiminden kaynaklanan hasardan korunmasına hizmet eder (Stryer ve ark. 2007). Son olarak, PFK1, Phosphoenolpyruvate (2-phosphoenolpyruvate) PEP, sitrat ve ATP tarafından allosterik olarak inhibe edilir. Fosfoenolpirüvik asit, glikolitik yolağın aşağı akışındaki bir üründür. Krebs Döngüsü enzimleri maksimum hızlarına yaklaştıklarında ve sitratın ortaya çıkmasına rağmen, sitratın normal fizyolojik koşullar altında PFK-1'i inhibe etmek için yeterli bir derişime sahip olup olmadığı sorgulanabilir. ATP birikimi, enerjide bir artışa işaret eder ve PFK1 üzerinde bir allosterik modülasyon bölgesine sahiptir, bu allosterik modülasyon bölgesi, PFK1'in substratı için afinitesini azaltır.

PFK1, yüksek bir AMP derişimi ile allosterik olarak aktive edilir, ancak PFK2 tarafından fruktoz-6-fosfattan üretilen fruktoz 2,6-bisfosfat en güçlü aktivatör olmaktadır. Bu nedenle, F6P'nin bir bolluğu daha yüksek bir fruktoz 2,6-bisfosfat derişimine (F-2,6-BP) yol açar. F-2,6-BP'nin bağlanması, F6P için PFK1'in afinitesini artırır ve ATP'nin inhibitör etkisini azaltır. Glikoz bol bol olduğunda glikoliz hızlanır ve hızlandığı için ileriye dönük uyarımın bir örneği olmaktadır (Stryer ve ark. 2007).

PFK, sentez baskısı yoluyla glukagon tarafından inhibe edilir. Glukagon, protein kinaz A'yı aktive eder ve bu da PFK2'nin kinaz aktivitesini durdurur. Böylece F-2,6-BP'nin F6P'den sentezini tersine çevirip PFK1 aktivitesini inhibe eder.

PFK1'in hassas regülasyonu, glikoliz ve glukoneogenezin eşzamanlı olarak meydana gelmesini önler. Bununla birlikte, F6P ve F-1,6-BP arasında substrat döngüsü vardır. Fruktoz-1,6-bisfosfataz (FBPaz) F-1,6-BP'nin F6P'ye geri hidrolizini katalize eder, bu tepkimeye 'reverse reaction' denir, PFK1 ile bu tepkime katalize edilir. Glikoliz sırasında az bir miktarda FBPaz aktivitesi ve glukoneojenez sırasında da bazı PFK1 aktivitesi vardır. Bu döngü, ATP hidroliziyle ısı oluşumunun yanı sıra metabolik sinyallerin çoğalmasını sağlar.

Serotonin (5-HT), 5-HT (2A) reseptörüne bağlanarak PFK'nin derişimini artırır, bu da PFK'nın tirozin kalıntısının fosfolipaz C üzerinden fosforile olmasına neden olur. Bu da,

PFK'yi iskelet kas hücreleri içinde yeniden dağıtır. PFK glikolitik akışı düzenlediği için, glikolizde serotonin düzenleyici bir rol oynar (Coelho ve Sola-Penna 2013).

PFK'in Eksikliği

PFK'in Eksikliği, glikojenoz tip VII'ye (Tarui's hastalığı) yol açar. Tarui's hastalığı otozomal resesif bir bozukluktur. Şiddetli ve yoğun egzersize cevap olarak şiddetli bulantı, kusma, kas spazmları ve miyogloblin tepkimesi ile tanımlanır. Hastalar genellikle aktivite seviyelerini ayarlamayı öğrenerek makul ve normal bir yaşam sürdürebilirler (Raben ve ark. 1995).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan sıçanlar Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden 30 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan temin edilip çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca verilen 2016-11/03 nolu etik kurul kararı ile gerçekleştirildi. Deney grubu hayvanları, Ölüm sonrası ölçümler; Grup 1: 0.an, Grup 2: 6 saat, Grup 3: 12 saat, Grup 4: 24 saat, Grup : 48 saat olacak şekilde ve her grupta 4 sıçan olmak üzere 5 gruba ayrıldı. ancak kontrol grubu ise 15 adet hayvandan oluşturuldu. Deney grubu hayvanların tolüen maruziyeti enjeksiyon ile gerçekleştirildi, letal dozda intraperitoneal tolüen enjeksiyonu (1,64 g/kg) ile ölüm sağlandı. Kontrol grubu hayvanlar ise servikal dislokasyon ile öldürüldü. Ölüm gerçekleştikten sonra (0, 6, 12, 24, 48 saat) belirlenen zaman dilimlerine ait kontrol ve deney grubu hayvanlarının kalp kanı örnekleri toplanıp beyin dokuları çıkarıldı.

3.1.Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Kitler

- Asetilkolinesteraz aktivite ölçüm kiti, abcam
- Na⁺-K⁺ ATPaz aktivite ölçüm kiti, MyBiosource
- Fosfofruktokinaz aktivite ölçüm kiti, MyBiosource
- Tolüen, %97 saflıkta, Tekkim
- di-Potasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), Merck
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), Merck
- Etilendiamintetra asetik asit (EDTA), Merck
- Sodyum hidroksit (NaOH), Merck
- Polifleks %9 izotonik sodyum klorür çözeltisi, Polifarma İlaç San.
- Thermo Scientific Pierce BCA Protein ölçüm Kiti

3.1.2. Sarf Malzemeler

- 96 kuyulu microplate, NEST Biotechnology
- 24 kuyulu microplate, NEST Biotechnology
- 2 mL hacimli santrifüj tüpleri, ISOLAB
- 2 mL hacimli EDTA'lı tüpler, Vacutest
- 1000 µl'lik pipet uçları, ISOLAB
- 200 µl'lik pipet uçları, ISOLAB
- 10 µl'lik pipet uçları, SSIBio
- 5 Cc enjektörler.

3.1.3. Cihazlar

- Hassas terazi, Sartorius
- Homojenizatör, Schuett homgen^{plus}, yarı otomatik homojenizatör
- Santrifüj, HERMLE Z 326 K soğutmalı santrifüj
- Santrifüj, Sigma-2-16PK soğutmalı santrifüj
- Mikropleyt okuyucu, BioTek ELx800
- Mikropleyt çalkalayıcı, bioSan PSU-2T
- Vorteks, VELP Scientifica
- pH metre, Sartorius PP-15
- Derin dondurucu, Arçelik
- 10 µl otomatik pipet, Eppendorf
- 20-200 µl otomatik pipet, ISOLAB
- 100-1000 µl otomatik pipet, ISOLAB

3.2.Yöntem

3.2.1. Asetilkolinesteraz Enzimi

AChE aktivitesi tayini yapabilmek için Abcam' Kiti (Kolorimetrik) (ab138871) kullanıldı.

Kan Hücrelerinin Hazırlanması

Hayvanların kalplerinden kan alındıktan sonra hiç bekletilmeden mor kapaklı EDTA'lı tüplere konuldu ardından 2000g'de 5 dk boyunca 4°C'de santrifüjlenip plazma ve beyaz kan hücreleri uzaklaştırıldı. Sonra (pH7,4. 0,15M KH₂PO₄ fosfat tamponu) çözültisi ile 3 kere yıkanıp tekrar 2000g'de 5dk boyunca 4°C'de santrifüjlendi, süpernatant kısmı uzaklaştırılarak tüpün dibindeki kalan kısmı toplandı. Toplanmış kan kısmından 150µL alıp kan örneklerinin hacmi 2850 µL ddH₂O + 0,9µL Triton X-100 ile 3 ml'ye tamamlanıp hazırlandı.

Beyin Dokusunun Hazırlanması

Beyin dokuları çıkarıldıktan sonra pH 7,4. 0,15M KH₂PO₄ fosfat tamponu ile yıkandı. Soğuk bir ortamda 1mg'lik doku tartılıp pH 7,0. 50mM KH₂PO₄, 1mM EDTA içiren fosfat tamponu içerisinde Schuett homgenplus, yarı otomatik olan homojenizatörü kullanarak 3000rpm'de 15 saniye 3kere homojenize edilip süpernatant kısmı alındı. Elde edilen süpernatant 2500 rpm'de 5-10dk boyunca 4°C'de santrifüjlenip -80°C'de muhafaza edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

-Bileşen A: DTNB

-Bileşen B: Deney Tamponu

-Bileşen C: Asetiltiokolin

-Bileşen D: Asetilkolinesteraz.

-% 0,1 BSA (Sığır Serum Albümini)

-Triton X-100.

Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Kullanılan kit ile enzim aktivitesi için kolorimetrik olarak ölçüldü. Hücre ekstraktlarında ve diğer çözeltilerde, AChE etkisiyle hidrolizlenen asetiltioekolin tarafından üretilen tiokolini ölçmek için DTNB'yi kullanıldı. DTNB, oluşan tiokolin miktarını ölçmek için kullanıldı ve bu da AChE etkinliği ile orantılı bulundu. Bu kit ile 100 mcL analiz hacminde (1mU/ml) 0.1mU'a kadar bile AChE'nin miktarı tayini yapılmaktadır. 50µL kadar AChE tepkime karışımı hazırlandı ve AChE test numunelerinin 50µL kadar da mikroplyt üstüne eklendi, AChE tepkime karışımının eklenmesi gerçekleştirildi. Son adım olan oda sıcaklığında 10-30 dakika inkübe etme ve OD 410 ± 5 nm'daki okuma işlemleri gerçekleştirildi.

Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinin Aşamaları

Deneye başlamadan önce oda sıcaklığında tüm kit bileşenlerini çözöldü.

20X DTNB stok çözeltisi hazırlaması: DTNB'nin şişesine (Bileşen A), 0,6mL'lik kadar Assay Buffer'den (Bileşen B) eklenerek hazırlandı.

20X Asetiltiyoklolin stok çözeltisi hazırlaması: AChE'nin şişesine (Bileşen C), 0,6mL'lik kadar ddH₂O'den eklenip hazırlandı.

AChE'nin stok çözeltisi hazırlaması: 50ünite/mL Asetilkolinesteraz stok solüsyonu yapmak için asetilkolinesteraz flakonuna (Bileşen D)%0,1 BSA ile 100µL'lik kadar ddH₂O'den eklendi.

AChE'in Hazırlanması (Tepkime Karışımı)

AChE'ye ait tepkime karışımı Çizelge 3.1 tablosuna göre hazırlandı (Abcam' Kiti).

Çizelge 3.1. AChE'ye ait tepkime karışımı (Abcam' Kiti)

Bileşenler	Hacim
Deney Tamponu (Bileşen B)	4,5 mL
20X DTNB Stok Çözeltilisi	250 µL
20X Asetiltiyokololin Stok Çözeltilisi	250 µL
Toplam hacim	5 mL

AChE Standardı Hazırlaması (0-1000 mU/ mL)

- 1- 1000mU/mL AChE standardını hazırlamak için, 50µl/mL olan AChE stok solüsyonundan 20µL'sini alıp deney Tamponunun 980 µL'sine (Bileşen B) eklendi.
- 2- AChE standardının 600, 200, 60, 20, 6, 2 ve 0 mU / ml seri seyreltilerini seyreltmek amacıyla 1000 mU / ml AChE standardı kullanıldı.
- 3- Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te açıklandığı gibi AChE standardı ve AChE içeren test numunelerinin seri seyreltmelerini bir 96 kuyulu microplate üstüne aktarıldı.

Çizelge 3.2. 96 kuyulu microplate üstüne gösterilen AChE standartlarının (AS), test numunelerinin (TS) ve boş kontrolün (BL) düzeni

BL	BL	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
AS1	AS1	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
AS2	AS2	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
AS3	AS3	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
AS4	AS4	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
AS5	AS5	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
AS6	AS6	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
AS7	AS7	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS

Çizelge 3.3. Her kuyu için kullanılan reaktif içerikleri bileşimi

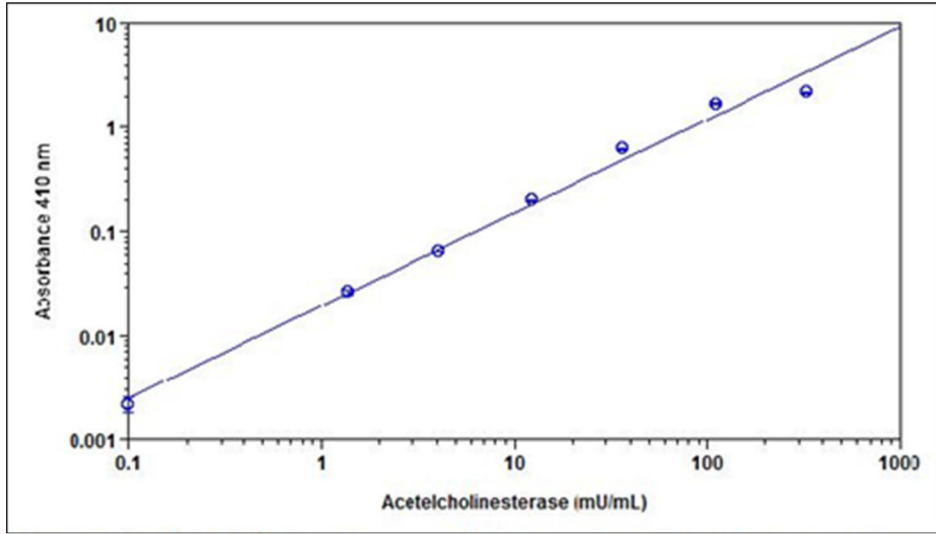
AChE standardı	Boş Kontrol	Test örneği
Seri Seyreltme : 50 µL	Deney Tamponu: 50 µL	50 µL

AChE Testini Yürütme İşlemi

- 1- AChE standardının, boş kontrolün ve test numunelerinin kuyularına, 50µL'lik kadar AChE tepkime karışımından eklenip AChE toplam hacmi 100µL'ye kadar tamamlandı.
- 2- numuneler ışıktan koruyarak oda sıcaklığında 10-30 dakika kadar inkübe edildi.
- 3- OD = 410 ± 5 nm'de bir mikrolept okuyucu ile okuma yaparak absorban değerleri okundu.

Verilerin Analizi

Her kopyalanan standardın ortalama absorbanısını belirlenip boş kuyuların absorban değerini kendinden ve diğer tüm standartlar ve numunelerden çıkartıldı. AChE miktarının bir fonksiyonu olarak, her bir standardın düzeltilmiş okuma değerleri çizildi (Şekil 3.1). Standart eğri verilerine dayanarak kalibrasyon grafiği çizilerek denklemi hesaplandı.



Şekil 3.1. Tipik bir AChE standart eğrisi (Abcam' Kiti)

3.2.2. Na⁺-K⁺ ATPaz Enzimi

Na⁺-K⁺ ATPaz aktivitesi tayini yapabilmek amacıyla MyBiosource' Kiti (Kolorimetrik) (ab138871) kullanıldı.

Kan Hücrelerinin Hazırlanması (RBC)

Hayvanların kalplerinden kan alındıktan sonra hiç bekletilmeden mor kapaklı EDTA'lı tüplere konuldu ardından 2000g'de 5dk boyunca 4°C'de santrifüjlenip plazma ve beyaz kan hücreleri uzaklaştırıldı. sonra yıkama (pH7,4. 0,15M KH₂PO₄ fosfat tamponu) çözültisi ile 3 kere yıkanıp tekrar 2000g'de 5dk boyunca 4°C'de santrifüjlendi, süpernatant kısmı uzaklaştırılarak tüpün dibindeki kalan kısmı toplandı. Daha sonra hücreleri parçalamak amacıyla mekanik homojen metodu kullanıp doku örneklerinde toplam protein miktarı BSA ile hesaplandı ve böylece kan hücreleri hazırlandı.

Beyin dokusunun Hazırlanması

Beyin dokuları çıkarıldıktan sonra pH 7,4. 0,15M KH₂PO₄ fosfat tamponu ile yıkandı. Soğuk bir ortamda 1mg'lik doku tartılıp pH 7,0. 50mM KH₂PO₄, 1mM EDTA içeren fosfat tamponu içerisinde Schuett homgenplus, yarı otomatik olan homojenizatörü kullanarak 3000rpm'de 15 saniye 3kere homojenize edilip süpernatant kısmı alındı.

Elde edilen süpernatant 8000g'de 10dk boyunca 4°C'de santrifüjlenip -80°C'de muhafaza edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Reagent1 (Sıvı).

Reagent2 (Sıvı).

Reagent3 (Toz).

Reagent4 (Sıvı).

Reagent5 (A Çözeltisi+ B Çözeltisi).

Reagent6 (Sıvı).

Reagent7 (10mmol / L Standart fosfor Stok Çözeltisi).

Reagent8 (Stok çözeltisi + Seyreltici).

Na⁺-K⁺ ATPaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Abcam Kitine göre Na⁺-K⁺ ATPaz aktivitesi tayini yapıldı.

Reagent3'ün hazırlanması: 1mL'lik kadar ddH₂O'den alıp reagent3 tozu 1 şişesinde çözülüp -20°C'de saklandı.

Reagent8'in hazırlanması: seyreltici 1 şişesinde stok çözeltisi 1 şişesi çözülüp 4°C'de saklandı.

0.1µmol/ml Standart uygulama çözeltisinin hazırlanması: 99:1 oranında ddH₂O ile 10mmol/L fosfor stok çözeltisi karıştırıldı.

0.02µmol/ml Standart fosfor çözeltisinin hazırlanması: 1:4 oranında ddH₂O ile 0.1µmol /ml standart fosfor çözeltisi ile karıştırılıp hazırlandı.

Substrat çözeltisinin hazırlanması: 260: 80: 80 oranında reagent 1, reagent 2 ve reagent 3 olan birbirleri ile bu reagentler karıştırıldı.

Renk-geliştirme ajanının hazırlanması: 7:6 oranında reagent 5(A) ile ısıtılmış reagent 5(B) karıştırılıp 4°C'de saklandı.

Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinin Aşamaları

Enzimatik Tepkime

Çizelge 3.4'teki tablonun verilerine dayanarak deneyin ilk aşaması gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4. Enzimatik tepkime tablosu (MyBiosource Kiti)

	Kontrol	Örnek
ddH ₂ O	0,16	0,12
Örnek (mL)		0,1
Reagent 8 (mL)		0,04
Substrat (mL)	0,42	0,42
Tam olarak 10 dakika 37 °C'de karıştırılıp inkübe edildi.		
Reagent 4 (mL)	0,1	0,1
Örnek (mL)	0,1	
Karıştırılıp 10 dakika 3000-4000 rpm'de santrifüjlendi ve fosfor miktarını tespit etmek için süpernatant kısmı alınıp kullandı.		

Fosforun Saptanması (Tespiti)

Çizelge 3.5'teki tablonun verilerine dayanarak fosfor tespit edildi.

Çizelge 3.5. Fosfor'a ait saptanma tablosu (MyBiosource Kiti)

	Boş tüpü	Standard tüpü	Kontrol tüpü	Örnek tüpü
ddH ₂ O (mL)	0,3			
0.02 µmol / ml standart çözeltisi (mL)		0,3		
Supernatant (mL)			0,3	0,3
Reagent5 renk-geliştirme ajanı (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0
2 dakika oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi				
Reagent (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0
Oda sıcaklığında 5 dakika karıştırılıp bekletildi. daha sonra 24 kuyulu mikroyu okuyucu ile 636 nm'de OD okuma yapıldı.				

Total Protein Tayini

Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kiti kullanarak beyin ve kalp kanı örnekleri için protein tayini yapıldı.

Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Aşağıdaki formülü kullanarak enzim aktivitesi hesaplandı. ATPaz tarafından katalize edilen ve bir ATP enzim aktivitesi birimi olarak saatte 1mg doku proteininde ATP'nin katalize edilmesiyle üretilen 1 µmol inorganik fosfor miktarıdır. Bu da µmol P_i/mgprot /saat anlamına gelir (MyBiosource Kiti).

$$\frac{OD_{\text{Örnek}} - OD_{\text{Kontrol}}}{OD_{\text{Standart}} - OD_{\text{Boş}}} \times \text{Standart derişeriş} \left(0,02 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}\right) \times 6 \times 7,8 / \text{Test edilen örneğnprotein derişeriş} \quad (\text{mgprot/ mL})$$

3.2.3. Fosfofruktokinaz Enzimi

Fosfofruktokinaz aktivitesi tayini yapabilmek amacıyla MyBiosource Kiti (#MBS8243182) kullanıldı. PFK, fruktoz-6-fosfat ve ATP'yi fruktoz-difosfat ve ADP'ye dönüştürür. NADH, 340 nm'de bir kolorimetrik olarak tayin edildi.

Plazma Hazırlanması

Hayvanların kalplerinden kan alındıktan sonra hiç bekletilmeden mor kapaklı EDTA'lı tüplere konuldu ardından 2000 g'de 5 dk boyunca 4 °C'de santrifüjlenip kırmızı kan hücreleri ve beyaz kan hücreleri uzaklaştırılıp plazma kısmı alındı. Bu şekilde, plazma numuneleri bir sonraki deneylerde kullanıma hazır hale getirildi

Beyin dokusunun hazırlanması

Beyin dokuları çıkarıldıktan sonra pH 7,4. 0,15M KH₂PO₄ fosfat tamponu ile yıkandı. Soğuk bir ortamda 1mg'lik doku tartılıp pH 7,0. 50mM KH₂PO₄, 1mM EDTA içiren fosfat tamponu içerisinde Schuett homgen^{plus}, yarı otomatik olan homojenizatörü kullanarak 3000rpm'de 15 saniye 3kere homojenize edilip süpernatant kısmı alındı. Elde edilen süpernatant 8000g'de 10dk boyunca 4°C'de santrifüjlenip -80°C'de muhafaza edildi.

Kullanılan kimyasal maddeler

Deney tamponu(Sıvı).

Tepkime tamponu (Sıvı).

Substrate (Toz).

Enzyme I (Sıvı).

Enzyme II (Toz).

PFK Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Çizelge 3.6'deki tablonun verilerine dayanarak deney prosedürü gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6. Deney prosedürü (MyBiosource Kiti)

Reagent	Örnek
Örnek	10 µL
Substrate	170µL
Enzyme I	10µL
Enzyme II	10µL
Deney karışımı Karıştırılıp 340 nm'de 20 saniye ve 320 saniyenin absorbandsının değerleri 96 kuyulu mikropolet okuyucu ile kaydedildi.	

Total Protein Tayini

Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kiti kullanarak plazma örnekleri dışında beyin örnekleri için protein tayini yapıldı.

Enzim Aktivitesine Ait Hesaplama Formülleri

Aşağıdaki formüller kullanarak enzim aktivitesi hesaplandı. Bir birim PFK aktivitesi, dakikada 1nmol ADP üreten enzimdir.

1. Örnek protein derişimine göre enzim aktivitesine ait formül:

$$\text{PFK (U/mg)} = (\text{ODSample}(20\text{S}) - \text{ODSample}(320\text{S})) / (\epsilon \times d) \times V_{\text{Total}} \times 109 / (\text{VSample} \times \text{CProtein}) / T = 1072 \times (\text{ODSample}(20\text{S}) - \text{ODSample}(320\text{S})) / \text{Cprotein}.$$

2. Plazmanın hacmine göre enzim aktivitesine ait formül:

$$\text{HK (U/ml)} = (\text{ODSample}(20\text{S}) - \text{ODSample}(320\text{S})) / (\epsilon \times d) \times V_{\text{Total}} \times 109 / \text{VSample} / T = 1072 \times (\text{ODSample}(20\text{S}) - \text{ODSample}(320\text{S}))$$

ϵ : molar sönüm katsayısı= $6,22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$.

d: 96 kuyulu mikropoletin optik yolu=0,6 cm.

CProtein: protein derişimi= mg/mL.

W: örnek kütlesi (g).

VTotall: enzimatik tepkimenin toplam hacm= 0,2 mL.

VSample:örnek hacmi= 0,01 mL.

T: tepkime zamanı= 5 dakika.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verileri istatiksels olarak değerdendirilmeden önce aritmetik ortalamalar (X) ve standart sapmalar (SD) elde edilmiştir. Post-mortem zaman dilimlerine göre gruplar arasında anlamlı ya da anlamsız bir farkın olup olmadığını tesbit edebilmek için T (bağımsız-örnek T testi; independent-sample T test) testi ve (kontrol ve deney) grupların kendi aralarında karşılaştırılması için ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi yapılmıştır. Anlamlılık sınırını temsil eden $p<0,05$ değeri kabul edilmiştir. IBM SPSS statistics 24 programı kullanılarak bu istatiksels işlemler gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda her enzim için beyin ve kan örneklerinde tolüen maruziyetinin ve post-mortem zamanın AChE, Na⁺/K⁺ATPaz ve PFK enzimleri üzerine etkisi incelendi. Belirlenen her zaman diliminde (0, 6, 12, 24, 48 saat) kontrol grubu n=2, deney grubu ise n=4 hayvan kullanıldı. Aktivite ölçümleri sırasında her örnek en az iki tekrar olacak şekilde çalışıldı, sonuçlar ortalama ve standart sapmalar şeklinde verildi.

4.1. AChE Enziminin Bulguları

4.1.1. Beyin Bulguları

Deneyler sonucunda elde edilen beyin AChE bulguları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir. 0, 6 ve 24 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktivitelerde belirgin birer azalma olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsızken ($p>0,05$), 12 ve 48 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı gözlenmiştir ($p<0,05$).

Kontrol grubunda, AChE aktivitelerinde 0, 6, 12, 24 ve 48 saat post-mortem zaman dilimleri arasında azalış ve artışlar olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). Deney grubunda 0, 12, 48 saatlerde belirgin birer azalış ve artışlar gözlenmesine rağmen aktiviteler arasındaki fark anlamsızken ($p>0,05$), 6 ve 24 saatlerde aktiviteler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Deney periyodun sonunda 48 saatte elde edilen aktivite kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $221,66\pm 22,74$ aktivitenin %59,52 azalma gösterdiği saptanmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

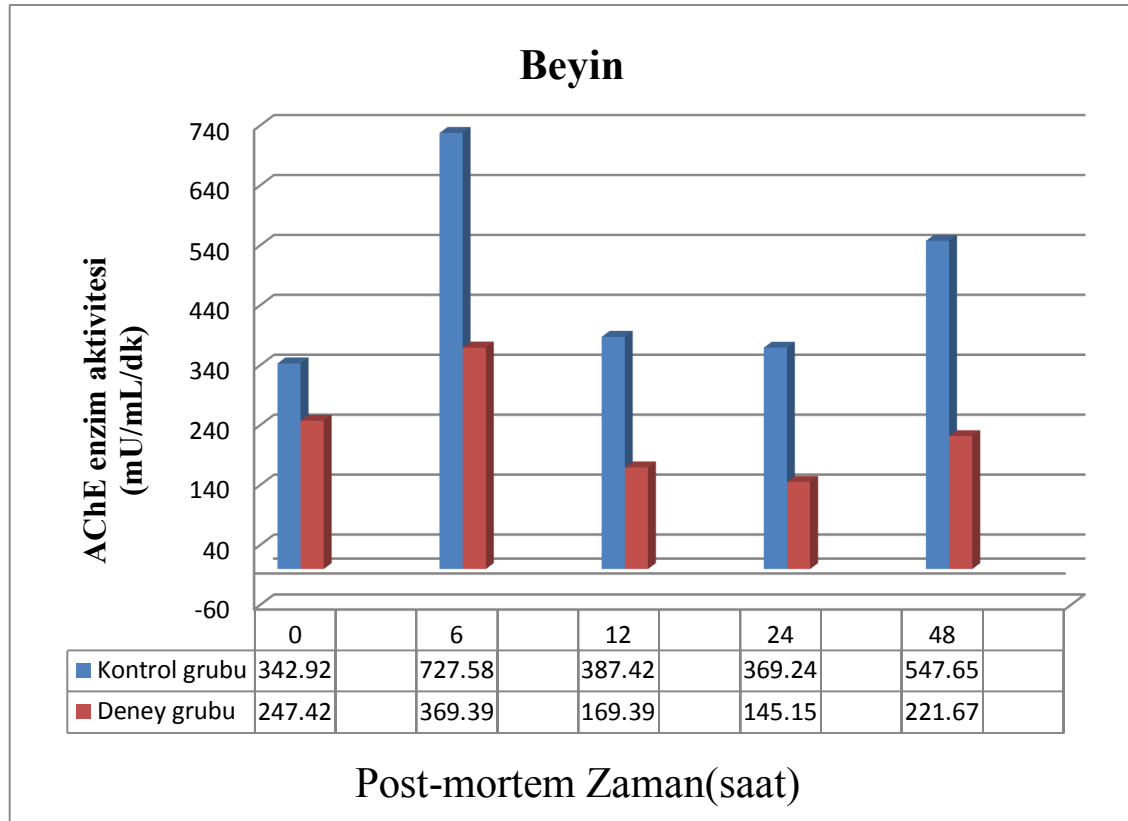
Çizelge 4.1. Beyin, AChE aktiviteleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Post-mortem zaman (Saat)	0	6	12	24	48
Kontrol grubu	342,91 $\pm$ 156,95a,x	727,57 $\pm$ 262,75a,x	387,42 $\pm$ 10,44a,x	369,24 $\pm$ 5,08a,x	547,65 $\pm$ 33,48a,x
Deney grubu	247,42 $\pm$ 125,87ab,x	369,39 $\pm$ 131,77b,x	169,39 $\pm$ 21,86ab,y	145,15 $\pm$ 136,27a,x	221,66 $\pm$ 22,74ab,y

Yatay sütunlarda aynı harfler ile (a, b ve c) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

Dikey sütunda aynı harfler ile (x,y) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

Tablodaki her veri mU/mL/dk olarak hacimsel aktiviteyi göstermektedir.



Şekil 4.1. Beyin AChE aktiviteleri

4.1.2. Kan Bulguları

Deneyler sonucunda elde edilen Kan AChE bulguları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. 0, 6, 12, 24 ve 48 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktivitelerde belirgin birer yükselme olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$).

Kontrol grubunda, AChE aktivitelerinde 0, 6, 12, 24 ve 48 saat post-mortem zaman dilimleri arasında azalış ve artışlar olmakla beraber aktiviteler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Deney grubunda da 0, 6, 12, 24 ve 48 saat post-mortem zaman dilimleri arasında azalış ve artışlar olmakla beraber aktiviteler arasında istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). Deney periyodun sonunda 48 saatte elde edilen aktivite kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $1440,35\pm630,06$ aktivitenin %34,74 yükselme gösterdiği saptanmıştır ve bu yükselme istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$).

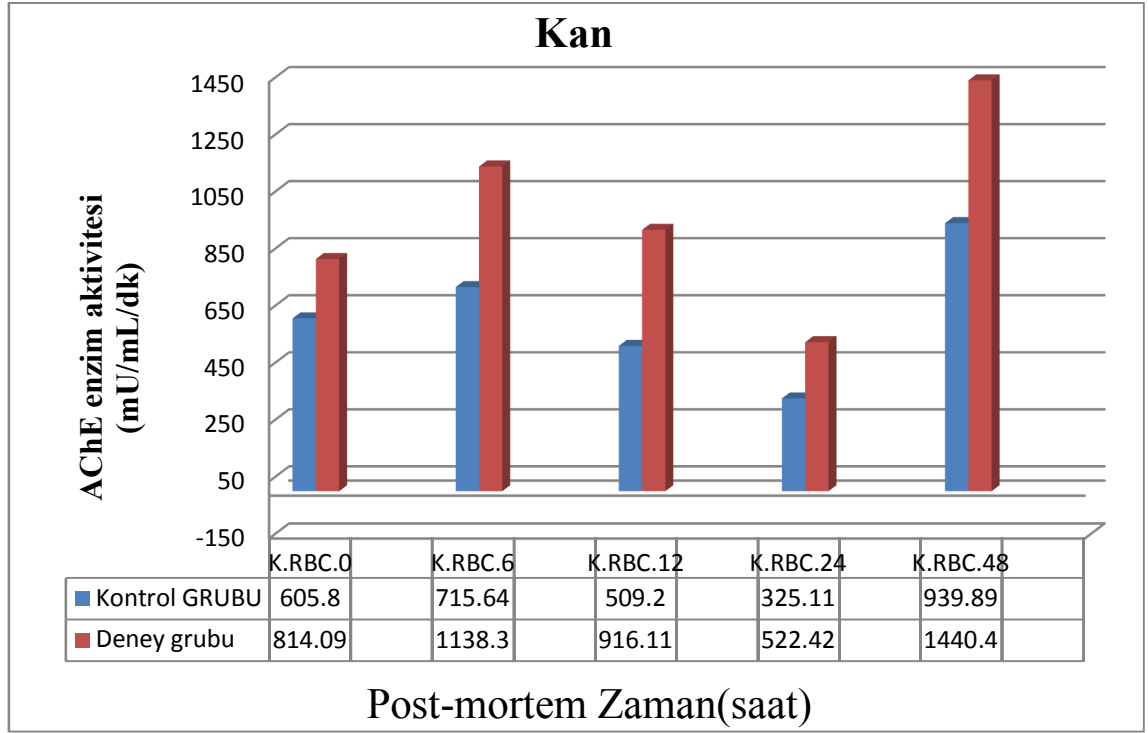
Çizelge 4.2. Kan, AChE aktiviteleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Post-mortem zaman (Saat)	0	6	12	24	48
Kontrol grubu	605,79 $\pm$ 479,43a,x	715,64 $\pm$ 79,81a,x	509,20 $\pm$ 325,16a,x	325,11 $\pm$ 61,60a,x	939,88 $\pm$ 326,76a,x
Deney grubu	814,09 $\pm$ 217,95b,x	1138,33 $\pm$ 555,49b,x	916,11 $\pm$ 505,48b,x	522,42 $\pm$ 345,53b,x	1440,35 $\pm$ 630,06b,x

Yatay sütunlarda aynı harfler ile (a, b ve c) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

Dikey sütunda aynı harfler ile (x,y) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

Tablodaki her veri mU/mL/dk olarak hacimsel aktiviteyi göstermektedir.



Şekil 4.2. Kan AChE aktiviteleri

4.2. Na⁺/K⁺ATPaz Enzimin Bulguları

4.2.1. Beyin Bulguları

Beyinden elde edilen Na⁺/K⁺ATPaz bulguları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. 12 ve 24 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktivitelerde belirgin birer yükselme olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsızken ($p>0,05$), 0, 6 ve 48 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktivitelerde belirgin birer yükselme olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı gözlenmiştir ($p<0,05$).

Kontrol grubunda 0, 6, 24 saatlerde belirgin birer yükselme gözlenmesine rağmen aktiviteler arasındaki fark anlamsızken ($p>0,05$), 12 ve 48 saatlerde aktiviteler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Deney grubunda 12, 24 ve 48 saatlerde belirgin birer azalış ve artışlar gözlenmesine rağmen aktiviteler arasındaki fark anlamsızken ($p>0,05$), 0 ve 24 saatlerde aktiviteler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Deney periyodunun sonunda 48 saatte elde edilen aktivite kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında $0,051 \pm 0,004$ aktivitenin %49 yükselme gösterdiği saptanmıştır ve bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$).

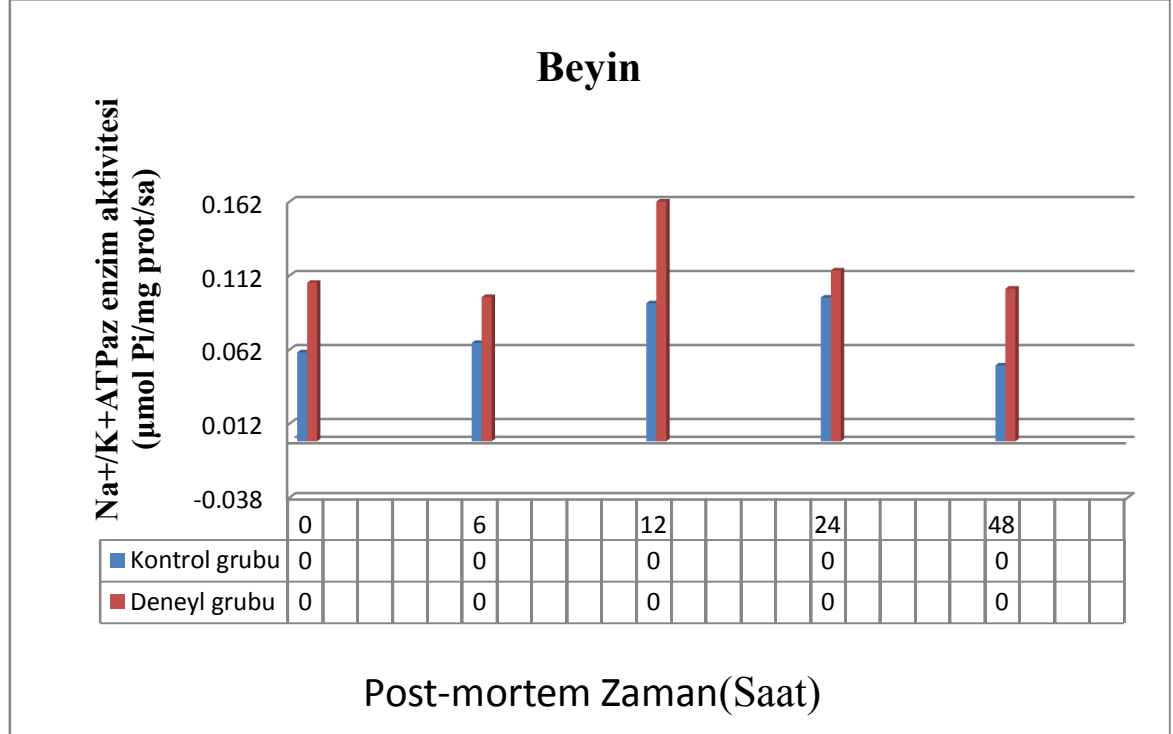
Çizelge 4.3. Beyin, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz aktiviteleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Post-mortem zaman (Saat)	0	6	12	24	48
Kontrol grubu	$0,060 \pm 0,010_{ab,x}$	$0,066 \pm 0,015_{ab,x}$	$0,093 \pm 0,004_{a,x}$	$0,097 \pm 0,071_{ab,x}$	$0,051 \pm 0,004_{b,x}$
Deney grubu	$0,10 \pm 0_{a,y}$	$0,097 \pm 0_{b,y}$	$0,19 \pm 0,11_{ab,x}$	$0,11 \pm 0,03_{ab,x}$	$0,10 \pm 0,006_{ab,y}$

Yatay sütunlarda aynı harfler ile (a, b ve c) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p > 0,05$).

Dikey sütunda aynı harfler ile (x,y) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p > 0,05$).

Tablodaki her veri mU/mL/dk olarak hacimsel aktiviteyi göstermektedir.



Şekil 4.3. Beyin $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase aktiviteleri

4.2.2. Kan Bulguları

Deneyler sonucunda elde edilen elde kan Na^+/K^+ ATPaz bulguları Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. 0, 6, 24 ve 48 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktivitelerde birer yükselme olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsızken ($p>0,05$), 12 saatte elde edilen aktiviteler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktivitede bir yükselme olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı gözlenmiştir ($p<0,05$).

Kontrol grubunda, AChE aktivitelerinde 0, 6, 12, 24 ve 48 saat post-mortem zaman dilimleri arasında azalış ve artışlar olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). Deney grubunda 0, 6 ve 48 saatlerde belirgin birer azalış ve artışlar gözlenmesine rağmen aktiviteler arasındaki fark anlamsızken ($p>0,05$), 12 ve 24 saatlerde aktiviteler arasındaki fark anlamlı gözlenmiştir ($p<0,05$). Deney periyodunun sonunda 48 saatte elde edilen aktivite kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $0,045\pm0,044$ aktivitenin %17,7 yükselme gösterdiği saptanmıştır ve bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

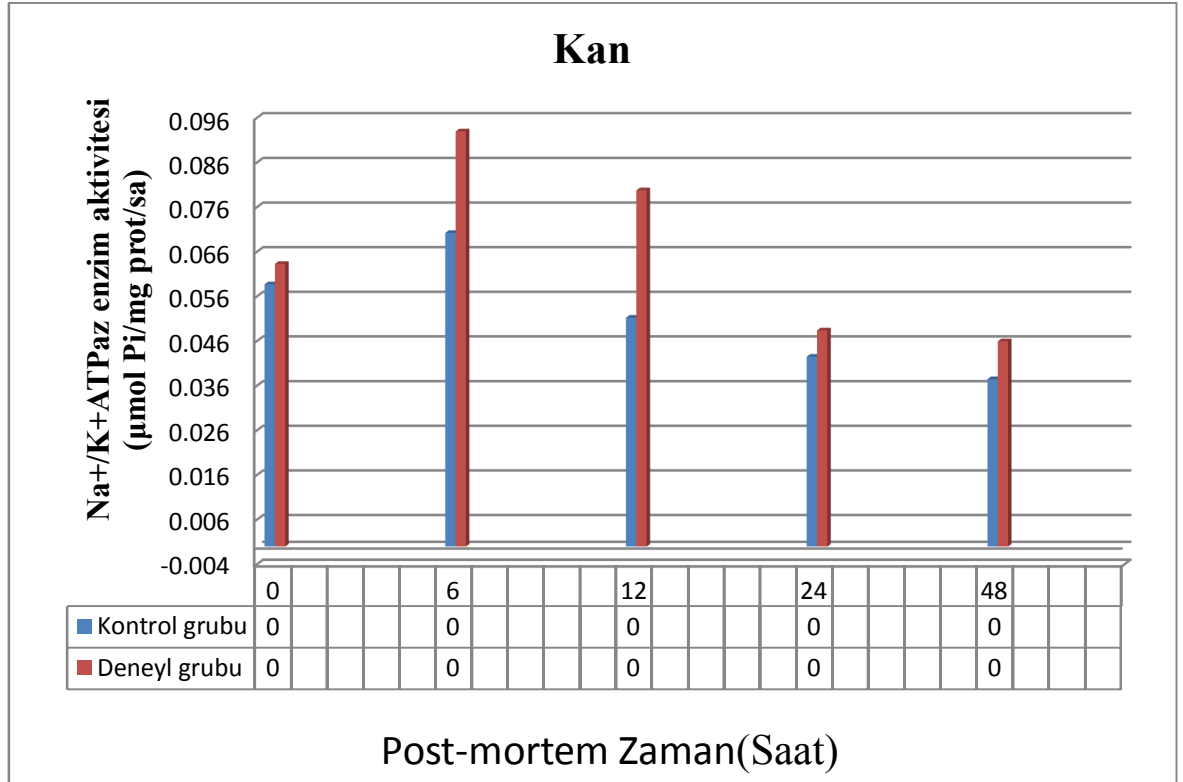
Çizelge 4.4. Kan, Na^+/K^+ ATPaz aktiviteleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Post-mortem zaman (Saat)	0	6	12	24	48
Kontrol grubu	$0,058\pm0,065_{a,x}$	$0,070\pm0,016_{a,x}$	$0,05\pm 0_{a,x}$	$0,042\pm0,039_{a,x}$	$0,037\pm0_{a,x}$
Deney grubu	$0,063\pm0,040_{ab,x}$	$0,092\pm0,041_{ab,x}$	$0,079\pm0,005_{a,y}$	$0,048\pm0,006_{b,x}$	$0,045\pm0,044_{ab,x}$

Yatay sütunlarda aynı harfler ile (a, b ve c) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

Dikey sütunda aynı harfler ile (x,y) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

Tablodaki her veri mU/mL/dk olarak hacimsel aktiviteyi göstermektedir.



Şekil 4.4. Kan Na+K+ ATPaseaktiviteleri

4.3. PFK Enzimin Bulguları

4.3.1. Beyin Bulguları

Deneyler sonucunda elde edilen beyin PFK bulguları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir. 6 saatte elde edilen aktiviteler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktivitede belirgin bir azalma olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsızken ($p>0,05$), 0, 12, 24 ve 48 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktivitelere belirgin birer azalma olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı gözlenmiştir ($p<0,05$).

Kontrol grubunda , PFK aktivitelerinde, 0 ve 6 saatler arasında belirgin bir yükselme olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenirken ($p<0,05$), 0 ve 48 saatler arasında belirgin bir azalma olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). 12 ve 24 saatler arasında ise belirgin bir azalma olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). Deney grubunda 0 saatten 6 saate anlamsız bir artış varken 12, 24 ve 48 saatlerde aktivitede gittikçe bir azalma olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). Deney

periyodun sonunda 48 saatte elde edilen aktivite kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $3,43 \pm 22,74$ aktivitenin %55,33 azalma gösterdiği saptanmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$).

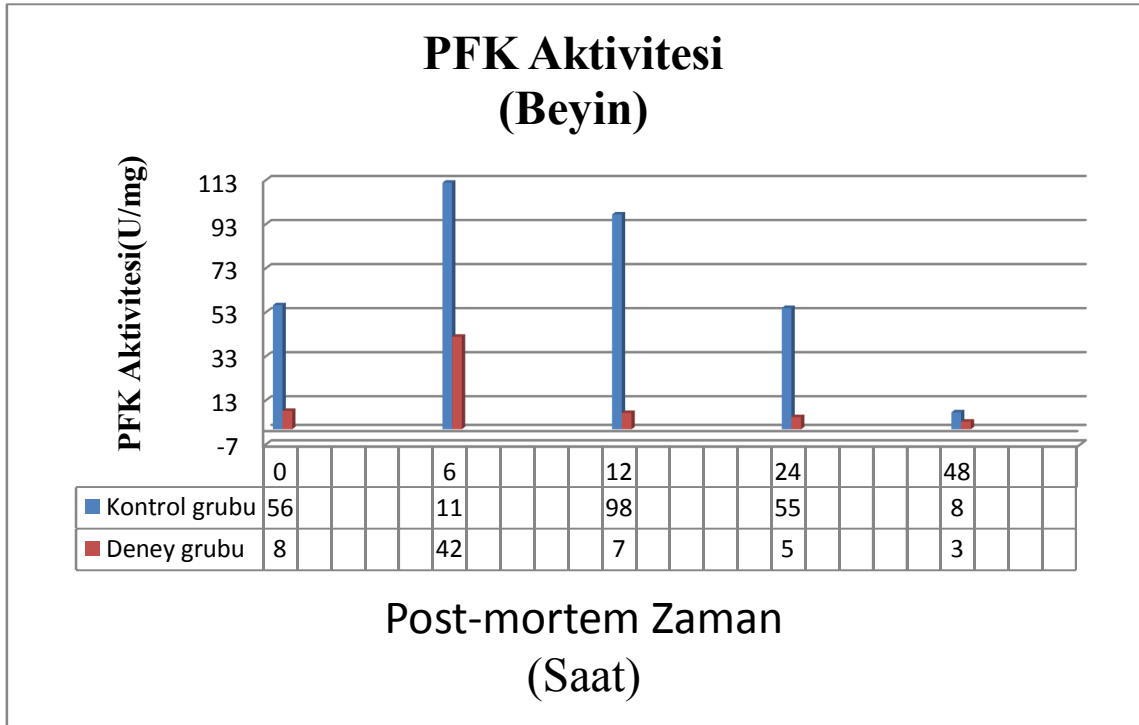
Çizelge 4.5. Beyin, PFK aktiviteleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Post-mortem zaman (Saat)	0	6	12	24	48
Kontrol grubu	$56,31 \pm 0,00a,x$	$111,98 \pm 0,00a,x$	$97,55 \pm 68,98ab,x$	$55,02 \pm 38,91ab,x$	$7,68 \pm 0,40b,x$
Deney grubu	$8,34 \pm 3,4a,y$	$41,98 \pm 45,45a,x$	$7,41 \pm 3,0a,y$	$5,49 \pm 2,24a,y$	$3,43 \pm 0,94a,y$

Yatay sütunlarda aynı harfler ile (a, b ve c) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p > 0,05$).

Dikey sütunda aynı harfler ile (x,y) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p > 0,05$).

Tablodaki her veri mU/mL/dk olarak hacimsel aktiviteyi göstermektedir.



Şekil 4.5. Beyin PFK aktiviteleri

4.2.2. Plazma Bulguları

Deneyler sonucunda elde edilen plazma PFK bulguları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'de gösterilmiştir. 6, 12 ve 24 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol gubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamsızken ($p>0,05$), 0 ve 48 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol gubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı gözlenmiştir ($p<0,05$). 12 ve 48 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol gubu ile karşılaştırıldığında aktivitelerin ciddi bir şekilde düştüğü bulunurken, 0, 6 ve 24 saatlerde elde edilen aktiviteler kontrol gubu ile karşılaştırıldığında aktivitelerin ciddi bir şekilde yükseldiği saptanmıştır.

Kontrol grubunda 0, 6, 12 saatlerde belirgin birer yükselme gözlenmesine rağmen aktiviteler arasındaki fark anlamsızken ($p>0,05$), 0, 24, 48 saatlerde aktiviteler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Deney grubunda 0 saatten 6 saate anlamsız bir azalış varken 12, 24 ve 48 saatlerde aktivitede gittikçe bir azalma gözlenmiş deney periyodun sonunda $83,25\pm31,92$ aktivitenin 4,38 kat azaldığını gözlenmiştir. 6 saatten 24 saate kadar aktivitede azalma olmakla beraber istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir.

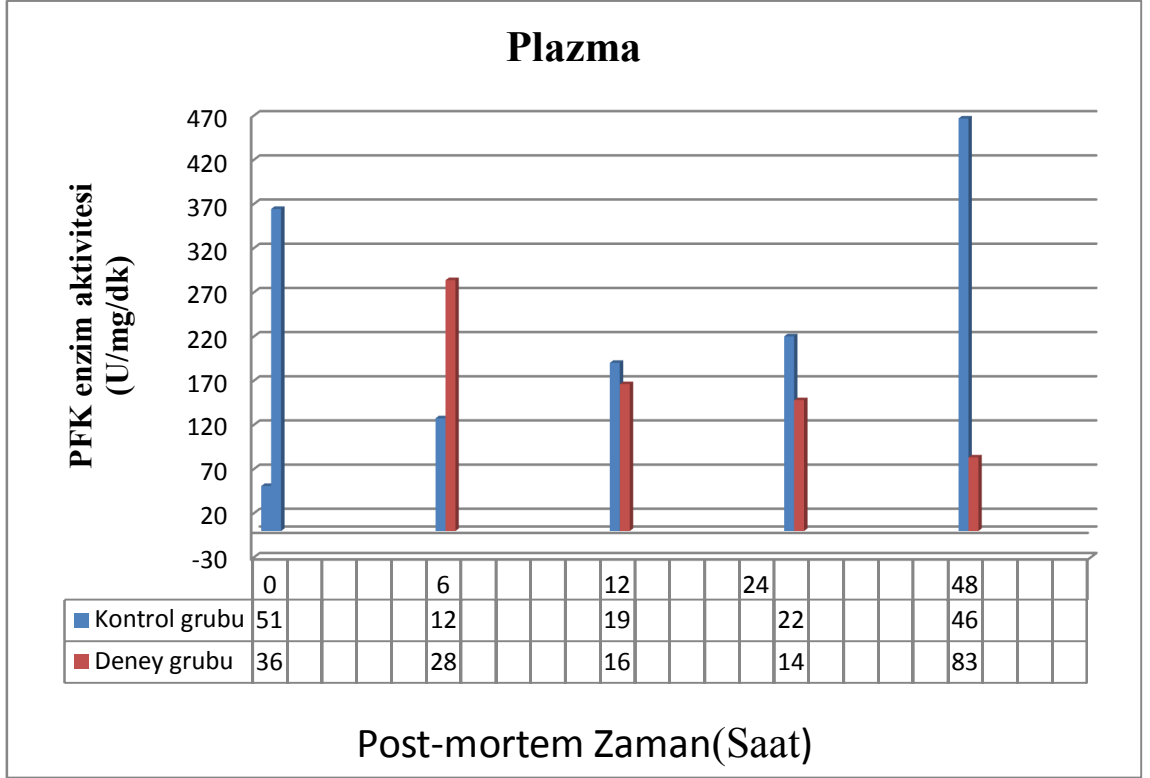
Çizelge 4.6. Plazma, PFK aktiviteleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Post-mortem zaman (Saat)	0	6	12	24	48
Kontrol grubu	50,92 $\pm$ 5,30a,x	127,56 $\pm$ 90,20ab,x	190,28 $\pm$ 20,46ab,x	220,29 $\pm$ 162,97b,x	466,85 $\pm$ 11,37c,x
Deney grubu	364,48 $\pm$ 42,08a,y	283,81 $\pm$ 119,37ab,x	166,16 $\pm$ 115,75bc,x	147,93 $\pm$ 68,01bc,x	83,25 $\pm$ 31,92c,y

Yatay sütunlarda aynı harfler ile (a, b ve c) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

Dikey sütunda aynı harfler ile (x,y) gösterilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

Tablodaki her veri mU/mL/dk olarak hacimsel aktiviteyi göstermektedir.



Şekil 4.6. Plazma PFK aktiviteleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada ölüme neden olan tolüen dozuna i.p. olarak maruz kalan sıçanların beyin ve kalp kanı dokusundaki enzimler olan AChE, Na⁺/K⁺ATPaz ve PFK aktivitelerindeki değişiklikler post-mortem zamana bağlı olarak araştırılmıştır.

Yaşamımız boyunca pek çok kimyasalın toksik etkisine maruz kalırız. Sanayide kullanılan organik uçucu maddelerden olan tolüen de bu kimyasalların içinde en önemlilerinden birisidir. Sanayide boya, inceltici, yapıştırıcı ve çözücü olarak kullanılan tolüen, madde bağımlılığı içerisinde alkol ve sigaradan sonra sayabileceğimiz uyuşturucu maddeler içerisindeki en önemli maddedir.

Çalışmamızda tolüen maruziyeti sonrasında, kanda AChE aktiviteleri incelendi fakat gruplar arasında artış ve azalmalar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak beyin dokusuna bakıldığında tolüenin beyinde AChE aktivitesinin düşmesine neden olduğu tespit edildi. 12 ve 48 saatlerde deney grubu aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunurken ($p<0,05$), 12. saatte %56 ve 48. saatte %59'luk aktivite azalma gözlemlendi. 0, 24 ve 48 saatlerdeki azalma ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Yapılan çalışmalara göre, tolüen beyin ve merkezi sinir sistemi (CNS) üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır (Wood ve ark. 1995). inhalasyon yolu ile ilgili çoğu çalışmada, kronik olarak tolüene maruz kalan hayvanlarda beyin ağırlıklarının azalması, nörotransmitterlerin konsantrasyonlarındaki değişiklikler ve nörodavranışsal performanstaki defisitler gibi nörolojik etkiler bildirilmiştir (Anonim 1986, Anonim 2000).

Benzer şekilde sıçanlarla ilgili çalışmada (Anonim 1981), beyin bileşenleri, morfolojik ve biyokimyasal parametreler üzerinde tolüen inhalasyonunun etkileri tespit edilmiştir. Çalışmanın sonunda, 7 gün boyunca 2000 ppm'ye yaklaşan doz seviyelerine maruz kalan sıçanlarda ataksi, prostrasyon ve titremeye neden olmuştur.

Korpela ve Tahti. (1988) tarafından yapılan çalışmada, tolüenin merkezi sinir sistemi (CNS) üzerinde anestezi etkisinin mekanizması, hem in vitro hem de in vivo olarak , sinaptoz membranları araştırılmıştır. 2000 ppm'ye kısa süreli tolüen dozlarına maruz kalan sıçanlarda, AChE enzim aktivitesinde inhibitör etkisi gösterilmiştir. Çalışmanın

sonunda, tolüenin, sinir hücresi membranlarında benzer enzim inhibisyonlarına neden olduğu belirlenmiştir.

Bir diğer çalışmanın sonucunda akut tolüen oral maruziyeti sonucu, 3,915 ve 5,220 mg/kg tolüen dozlarına maruz kalan dişi sıçanlarda hareket bozukluğu, tüm dozlarda erkek sıçanlar için 1. günde hareket bozukluğunda bir artış görülmüştür. Tüm dozlarda ve birinci günde, hem erkek hem de dişi sıçanlarda lakrimasyon ve tükürük salgılamasında artış görülmüştür (Mehta ve ark. 1998) .

Naalsund (1985) tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar gösterilmiştir. Sıçanların 5 haftaya kadar 8-16 saat/gün süreyle 500 ppm'lik tolüene maruz kaldığı durumda hippocampus bölgesinde, anormal elektriksel aktivitenin eşlik ettiği, hücrelerin bölgesel kaybı gözlenmiştir. Tolüenin beynin bu bölgesinde geri dönüşü olmayan etkilere neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Katekolamin kullanımı ve sentezindeki değişiklikler, fareler üzerinde yapılan bir çok çalışmaya göre tutarlı sonuçlar göstermektedir (von Euler 1989). Tolüenin, dopamin ve hidroksitriptamin reseptörlerinde yapısal değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Yetişkin sıçanların düşük seviyeli tolüen maruziyetine yanıtlarında değişikliklere neden olan beyin spesifik bölgelerinde katekolamin sentezinde ve salınımında kalıcı değişimlere neden olduğu bulunmuştur (Celani 1983).

Tolüen akut dozları ile yapılan çalışmalarda, beyin siyah maddesi ve striatumdaki dopamin metabolizmasında değişiklikler gözlenmiştir ve bu etkilerin dozla ilişkili olduğu görünmektedir. Yetişkin erkek sıçanların 4 hafta boyunca 80 ppm'lik bir derişimde tolüene maruz bırakılmaları, maruz kalma sırasında serum prolaktin seviyelerinde bir artışa neden olmuştur. Prolaktin seviyelerinin değişmiş dopamin reseptörü ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Kiriü 1990, Stengard ve ark. 1994, von Euler 1994).

İnhalasyonu sonucu sıçanlarda tolüenin klinik ve deneysel nörotoksitesitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, sıçanlar tarafından inhale edilen tolüenin beyinin tüm bölgelerinde bulunduğu tespit edilmiş, beyin sapı bölgesi en yüksek tolüen derişimine sahip olmakla beraber tolüen kullanıcılarında nörolojik sekel ile ilişkisi bulunmuştur (Gospe ve Calaban. 1988).

Buna benzer bir başka çalışmada, tolüen emilimi, beynin her bölgesinde yağ içeriği ile açık bir korelasyon göstermiştir. Enzim aktiviteleri ve reseptör bağlanması, subkronik ve kronik olarak tolüene maruz kalan sıçanların beyin sapında en fazla etkilenenler olduğu bulunmuştur. Nörolojik davranışsal performanstaki eksikliğin, beyindeki tolüenin toksik etkilerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Bjornaes ve Naalsund. 1988).

Na⁺/K⁺ATPaz bakıldığında hem beyin dokusunda hem de kan örneklerinde deney grubu aktiviteleri kontrol grubundan daha yüksek bulunmuş. Beyinde 0, 6 ve 48 saatlerde, kanda 12 saatte anlamlı olarak deney grubu aktiviteleri kontrol grubundan daha yüksek bulunurken ($p < 0,05$), beyinde 0. saatte %40, 6. saatte %32 ve 48. saatte %49, kanda 12. saatte %36'lık aktivite artış gözlemlendi. Beyinde 12 ve 24 saatlerde, kanda 0, 6, 24 ve 48 saatlerdeki artış ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Beyinde 0, 6 ve 48 saatlerde, kanda 12 saatte Na⁺/K⁺ATPaz aktivitelerinde gerçekleşen artışlar, bazı çalışmalara göre, tolüen kan üzerinde toksik etkilere neden olduğu tespit edilmemiştir, çünkü tolüene maruz kalan kırmızı kan hücreleri zarlarının, lizise karşı değişik davranışlar gösterdiğini tespit edilmiştir (Wood ve ark. 1995).

Korpela ve ark. (1983) sıçanlarda yaptıkları tolüen inhalasyonu maruziyeti çalışması sonucunda, deney grubuna ait kırmızı kan hücreleri zarları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 2,000 ppm tolüene maruz kalan sıçanlarda lizise karşı daha güçlü ve daha az duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Korpela ve Tahti'nin (1984) sıçanlar üzerinde tolüen inhalasyonu etkileriyle ilgili yaptıkları çalışmadan elde ettikleri verilere göre kırmızı kan hücreleri zarlarının kazandığı özelliklerin tersine çevrilebilen bir durum olduğu gösterilmiştir. Çünkü tolüenin etkisi sistemden uzaklaştıktan sonra membran gücünün normal haline döndüğü tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada, 15 hafta boyunca 3.000 ppm'ye kadar akut tolüene inhalasyon yoluyla maruz kalan erkek sıçanlar veya 14 hafta boyunca 1.200 ppm'ye kadar tolüene maruz kalan erkek veya dişi farelerde herhangi bir hematolojik etki bildirilmemiştir (Anonim 1990b). Buna benzer diğer çalışmalarda da aynı sonuçların elde edildiği bildirilmiştir (Ono ve ark. 1996, Poon ve ark. 1994).

Tolüene oral maruziyetin etkileriyle ilgili akut çalışmada 20 adet sıçan üzerinde yüksek doz tolüenin akut kardiyotoksik etkileri ve hasar mekanizmaları kalp dokusunda araştırılmıştır, troponin T'nin kan seviyelerinde bir artış olmakla beraber, deney hayvanları ile kontrol hayvanları karşılaştırıldığında 14 kat artmış olduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen kalp tansiyonunda belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (Tas ve ark. 2013).

Yapılan başka bir çalışmada, tolüenin merkezi sinir sistemi (CNS) üzerinde anestezi etkisinin mekanizması, sıçan kırmızı kan hücreleri ve sinaptoz membranları kullanılarak araştırılmıştır. 2000 ppm'ye kısa süreli tolüen dozlarına maruz kalan sıçanlarda, bizim sonuçlarımızın aksine, Total ATPase ve Mg²⁺ + -ATPase enzim aktivitelerinde inhibitör etkisi tespit edilmiştir. Çalışmanın sonunda, tolüenin, kırmızı kan hücreleri membranlarında benzer enzim inhibisyonlarına neden olduğu belirlenmiştir (Korpela ve Tahti.1988).

PFK bakıldığında, beyin dokusunda, tolüenin PFK aktivitesinin düşmesine neden olduğu tespit edildi. Beyinde 0, 12, 24 ve 48 saatlerde deney grubu aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunurken ($p<0,05$), 0.saatte %73, 12. saatte %92, 24. saatte %90 ve 48. saatte %55'lik azalma gözlemlendi. 6 saatte azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Plazma örneklerinde 0. saatte deney grubu aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunurken ($p<0,05$), 48. saatte deney grubu aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0,05$). 0. saatte %86 aktivite artışı gözlenirken, 48. saatte %82'lik azalma gözlemlendi. 6, 12 ve 24 saatlerdeki artış ve azalmalar ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Bunun sebebinin de tolüenin kan ve beyinde yarattığı etkiler olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çoğu çalışmaya göre, tolüenin kan üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir. Burns ve ark.(1994) tarafından yapılan çalışmada, 14 gün boyunca gavaj yoluyla 600 mg/kg /gün tolüene maruz kalan dişi farelerde, kontrol grubu ile deney grubu karşılaştırıldığında, eritrositler, hemoglobin, hematokrit, lökositler, RBC ortalama hacmi (MCV) ve hemoglobin ortalama hacminde (MCH) herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir.

Benzer şekilde, Tahti ve ark. (1983) sıçanlar üzerinde tolüen akut inhalasyonunun etkilerini inceledikleri çalışmada, 48 saat boyunca 2.000 ppm tolüene maruz kalan 16 erkek sıçanda kan şekeri ve serum ALAT ve ASAT düzeylerinde bir artış olmakla beraber hematokrit kısmının hafifçe arttığı tespit etmişlerdir.

Enzim aktivitelerinin post-mortem zamana göre değişimi incelendiğinde AChE aktivitesinin beyin deney grubunda 6-24 saat arasında azaldığı ($p<0,05$) bulunurken, kalp kanı hem deney hem kontrol grubunda AChE aktivitesinde post-mortem zamana göre istatistiksel olarak anlamlı sayılacak değişimler gözlenmedi. Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin beyin kontrol grubunda 12-48 saat arasında, deney grubunda 0-6 saat arasında anlamlı azalma gösterdiği gözlemlendi, ancak Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde kalp kanı deney grubunda 12-24 saat arasında ($p<0,05$) bulunurken, kontrol grubunda post-mortem zamana göre istatistiksel olarak anlamlı sayılacak değişimler gözlenmedi. PFK aktivitesinin beyin kontrol grubunda 0-48 saat arasında azaldığı ($p<0,05$) bulunurken, deney grubunda post-mortem zamana göre istatistiksel olarak anlamlı sayılacak herhangi bir değişim gözlenmedi. ancak PFK aktivitesinin plazma kontrol grubunda 0-24 ve 0-48 saatler arasında, deney grubunda 0-12 ve 0-48 saatler arasında anlamlı azalma gösterdiği gözlemlendi.

Ölüm gerçekleşikten sonra dolaşımın oksijen eksikliği, enzimatik reaksiyonlar, hücresel bozulma ve metabolitlerin anabolik üretiminin kesilmesi nedeniyle tüm vücut dokularında çok kapsamlı biyokimyasal değişikliklere yol açabilir (<http://www.journals.plos.org>, 2018). 1-2 saat içinde doku ve hücrelerin ölümü gerçekleşir (<http://www.forensicpathologyonline.com>, 2018). Çalışmaya göre, hayvan cesetlerinden (sıçan ve domuz) alınan kan örnekleri 96 saat boyunca incelenerek, kan pH'sı ve altı metabolitin (laktik asit, hipoksantin, ürik asit, amonyak, NADH ve formik asit) konsantrasyonlarında değişiklikler araştırılmıştı, çalışmanın sonunda tüm altı metabolitin pH'sı ve konsantrasyonu post-mortem zaman dilimlerine göre değişmişti, fakat değişim derecesi ve oranı birbirlerine farklıydı (Donaldson ve Lamont. 2013). Oksijen eksikliği, enzimatik reaksiyonlar, hücresel bozulma, kan pH'sı ve altı metabolitin (laktik asit, hipoksantin, ürik asit, amonyak, NADH ve formik asit) konsantrasyonları gibi olayların gerçekleşmesinin sonucu olarak, plazma dışındaki beyin ve kan dokularında, ölümün gerçekleştiği zaman dilimlerinde AChE,

Na⁺/K⁺ATPaz ve PFK enzimleri aktivitesinin post-mortem zaman dilimlerine göre düşmesine neden olduğu düşünülebilir.

Bazı serum enzimlerinin aktivitesinde gerçekleşen artışların, kan hemolizinin etkisine olduğu düşünülebilir. Bu nedenle, Plazmadaki PFK aktivitesinde özellikle post-mortem 0-24 ve 0-48 saatlerde gözlene artışların hemoliz sonucu olabileceğini düşünüyoruz.

Garg ve Vidya Garg (2010) tarafından yapılan çalışmada çeşitli serum enzimlerinin seviyelerinde seri niceliksel değişiklikler postmortem zaman dilimlerine göre incelenmiştir, deney sonucunda glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve asit fosfatazlar (APs) aktivitelerinde artışlar gözlenmiştir, bu artışların hemoliz sonucu olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen veriler, ölüme neden olacak doz akut tolüen maruziyetinin, AChE ve PFK enzimlerinin aktivitelerinde azalmalar ve Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesinde artışa neden olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Ambach E., Tributsch W., Fuchs D., et al. 1991.** Postmortem evaluation of serum and urine neopterin concentrations. *J Forensic Sci.*, 36:1089-1093.
- Ameno K., Fuke C., Ameno S. 1989.** A fatal case of oral ingestion of toluene. *Forensic Sci. Int.* 41:255-260.
- Ameno K., Kiriu T., Fuke C. 1992.** Regional brain distribution of toluene in rats and in a human autopsy. *Arch. Toxicol.* 66:153-156.
- Ana Lilia G.Y., Carlos K., Kazimiers W., Elva Leticia P.L., Katarzina W., Gloria B. 2005.** Occupational exposure to toluene and its possible causative role in renal damage development in shoe workers. *Int. Arch. Occup. Environ., Health.*, 79(3):259-264.
- Andersen I., Lundqvist. G.R., Molhave L. 1983.** Human response to controlled levels of toluene in six-hour exposures. *Scand j work environ health.* 9:405-418.
- Angerer J. 1979.** Occupational chronic exposure to organic solvents. VII. Metabolism of toluene in man. *Int. Arch. Occup. Environ., Health.* 43:63-67.
- Angerer J., Kramer K. 1997.** Occupational chronic exposure to organic solvents XVI. Ambient and biological monitoring of workers exposed to toluene. *Int. Arch. Occup. Environ., Health.* 69:91-96.
- Angerer J., Schildbach M., Kramer A. 1998.** Sp-toluymercapturic acid in the urine of workers exposed to toluene: a new biomarker for toluene exposure. *Arch. Toxicol.* 72:119-123.
- Anonim, 1980.** Toluene, Health and Environmental Effects Profile No. 160, Washington, D.C., Office of Solid Waste.
- Anonim, 1981.** Twenty-six-week inhalation toxicity study of toluene in the rat. American Petroleum Institute, No: 28-31210, Washington, DC, Amerika.
- Anonim, 1986.** Toluene. Environmental Health Criteria 52. WHO: Geneva.
- Anonim, 1990a.** Drinking water criteria document for toluene. EPA Report No. ECAO-CIN-408. Final Draft.
- Anonim, 1990b.** National Toxicology Program technical report series toxicology and carcinogenesis studies of toluene in F344/N rats and 86C3F mice. Environmental Protection Agency, Department of Health and Human Services. No: 371. PB90256371. Research Triangle Park, NC: Amerika.
- Anonim, 1991.** Notice of intended changes – toluene, trimethylamine, and vinyl acetate. Applied occupational and environmental hygiene, 6: 966–977.
- Anonim, 2000.** Toxicological profile for toluene. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/>-(Eriřim tarihi:10 Mayıs 20118).
- Anonim, 2005.** Toxicological Review For Toluene. Washington, D.C.
- Anonim, 2009.** Case studies in enviromental medicine; toluene toxicity. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/toluene/>-(Eriřim tarihi:12 Mayıs 20118).
- Alvarez-leite E.M., Duarte A., Barroca M.M., Silveira J. N. 1999.** Possible effects of drinking and smoking habits on hippuric acid levels in urine of adults with no occupational toluene exposure. *J. Occup. Health.* 41:112-114.
- Atanasova, E., Chiappa, S., Wieben, E., ve Brimijoin, S., 1999.** Novel messenger RNA and alternative promoter for murine acetylcholinesterase. *J Biol Chem*, 274(30), 21078-21084.

- Azparren JE., Vallejo G., Reyes E., et al. 1998.** Study of the diagnostic value of strontium, chloride, hemoglobin and diatoms in immersion cases. *Forensic Sci Int.*, 91:123-132.
- Baelum J., Molhave L., Honore Hansen S., Dossing M. 1993.** Hepatic metabolism of toluene after gastrointestinal uptake in humans. *Scand. J. Work. Environ., Health.* 191:55-62.
- Baptiste, E., Moreira, D. ve Philippe, H. 2003.** Rampant horizontal gene transfer and phospho-donor change in the evolution of the phosphofructokinase. *Gene* 318, 185–191.
- Barak D., Kronman C., Ordentlich A., Ariel N., Bromberg A., et al. 1994.** Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J Biol Chem.*, 269(9):6296-6305.
- Baranowski S., Serr A., Thierauf A., et al. 2008.** In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate. *J Forensic Legal Med.*, 122:389-393.
- Beltowski, J., Marciniak, A., Wojcicka, G., Gorny, D. 2003.** Regulation of renal Na⁺, K⁺-ATPase and ouabain-sensitive H⁺, K⁺-ATPase by the cyclic AMP-protein kinase A signal transduction pathway. *Acta Bio Polonica*, 50:103-114.
- Benoit F.M., Davidson W.R., Lovett A.M. 1985.** Breath analysis by api/ms human exposure to volatile organic solvents. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 55:113-120.
- Bieniek G., Kurkiewicz S., Wilczok T., Klimek K., Swiatkowska L., Lusiak A. 2004.** Occupational exposure to aromatic hydrocarbons at a coke plant: Part II. Exposure assessment of volatile organic compounds. *J. Occup., Health.* 46:181-186.
- Bilgin, R. 1995.** Glukozun Eritrosit Zarlarmda Bulunan Na⁺-K⁺ ATPaz ve Ca⁺⁺ ATPaz Enzim Aktivitelerine Etkisinin İn Vitro ve İn Vivo Koşullarda Araştırılması. *Doktora Tezi, ÇÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Bjornaes., S. ve Naalsund., L.U. 1988.** Biochemical changes in different brain areas after toluene inhalation. *Toxicology*, 49: 367–374 .
- Boatto G., Nieddu M., Carta A., Pau A., Lorenzoni S., Manconi P., Serra D. 2004.** determination of phenol and o-cresol by gc/ms in a fatal poisoning case. *Forensic science international.*, 139:191-194.
- Bork P., Sander C., Valencia A. 1993.** Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci.*, 2: 31-40.
- Buckley MG., Variend S., Walls AF. 2001.** Elevated serum concentrations of beta-tryptase, but not alpha-tryptase, in sudden infant death syndrome (sids). An investigation of anaphylactic mechanisms. *Clin Exp allergy.*, 31(11):1696-704.
- Burns., LA. Bradley., SG. White., KL. et al. 1994.** Immunotoxicity of mono-nitrotoluenes in female B6C3F1 mice: I. Para-nitrotoluene. *Drug Chem Toxicol.*, 17(3):317-358.
- Byard RW. 2002.** Incapacitation or death of a socially isolated parent or carer could result in the death of dependent children. *J Paediatr Child Health.*, 38:417-418.
- Clausen, T. 1998.** Clinical and therapeutic significance of the Na⁺, K⁺ pump. *Clinical Science*, 95:3-17.
- Carlsson, A. 1982.** Exposure to toluene: Uptake distribution and elimination in man. *Scandinavian journal of work & environmental., health.* 8: 43– 55.
- Carlsson A., Ljungquist E. 1982.** Exposure to toluene concentration in subcutaneous adipose tissue, *Scand. J. Work Environ., Health.* 8:56-62.

- Celani, M.F. et al. 1983.** Effects of subacute treatment with toluene on central monoamine receptors in the rat. Reduced affinity in 3H 5-hydroxytryptamine binding sites and in [3H]spiperone binding sites linked to dopamine receptors. *Toxicology letters*, 17: 275–281.
- Chan, R. Y., Boudreau-Larivière, C., Angus, L. M., Mankal, F. A., Jasmin, B. J., 1999.** An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse-and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4627-4632.
- Chen X, Huang G. 1995.** Autopsy case report of a rare acute iatrogenic water intoxication with a review of the literature. *Forensic Sci Int.*, 76:27-34.
- Coelho, WS., Sola-Penna, M. 2013.** Serotonin regulates 6-phosphofructo-1-kinase activity in a PLC-PKC-CaMK II- and Janus kinase-dependent signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 372 (1–2): 211–20. doi:10.1007/s11010-012-1462-0. PMID 23010892.
- Coe JL. 1993.** Postmortem chemistry update. Emphasis on forensic application. *Am J Forensic Med Pathol.*, 14:91-117.
- Cok I., Dagdelen A., Gökçe E. 2003.** Determination of urinary hippuric acid and o-cresol levels as biological indicators of toluene exposure in shoe-workers and glue sniffers. *Biomarkers*. Vol8-No2:119-127.
- Davis PL., Dal Cortivo LA., Maturo J. 1984.** Endogenous isopropanol: Forensic and biochemical implications. *J Analytic Toxicol.*, 8:209-212.
- Dills R.L., Bellamy G.M., Kalman D.A. 1997.** Quantitation of o-, m- and p-cresol and deuterated analogs in human urine by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of chromatography b.* 703:105-113.
- Donaldson., A.E. Lamont., I.L. 2013.** Biochemistry Changes That Occur after Death: Potential Markers for Determining Post-Mortem Interval. *PLoS One.*, 8(11): e82011.
- Dori A., Ifergane G., Saar-Levy T., Bersudsky M., Mor I., Soreq H., Wirguin I. 2007.** Readthrough acetylcholinesterase in inflammation-associated neuropathies. *Life Sci.* 80 (24–25): 2369–74. doi:10.1016/j.lfs.2007.02.011. PMID 17379257.
- Dunaway, GA., Kasten, TP., Sebo, T., Trapp, R. 1988.** Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem. J.* 251 (3): 677–83. PMC 1149058 Freely accessible. PMID 2970843.
- Dutkiewicz T., Tyras H. 1968.** Skin absorption of toluene, styrene, and xylene by man. *Br. J. Ind. Med.* 25:243.
- Edston E., Druid H., Holmgren P., Ostrom M. 2001.** Postmortem measurements of thyroid hormones in blood and vitreous humor combined with histology. *Am J Forensic Med Pathol.*, 22:78-83.
- Edston E., van Hage-Hamsten M. 2001.** Mast cell tryptase and hemolysis after trauma. *Forensic Sci Int.*, 2003;131:8-13.
- Edston E., van Hage-Hamsten M., Johansson SG. 1996.** Tryptase-at last a useful diagnostic marker for anaphylactic death. *Allergy.*, 51:443-445.
- Fanton L., Bevalot F., Cartiser N., et al. 2010.** Postmortem measurement of human chorionic gonadotropin in vitreous humor and bile. *J Forensic Sci.*, 55:792-794.
- Faust RA. 1994.** Toxicity Summary for Toluene. Chemical Hazard Evaluation Group, Biomedical and Environmental Information Analysis Section, Health Sciences Research Division, Tennessee: Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program.
- Fincancı Korur Ş. 1997.** Tanatoloji ders notları adli tıp enstitüsü.

- Fitzpatrick-McElligott, S., ve Stent, G. S. 1981.** Appearance and localization of acetylcholinesterase in embryos of the leech *Helobdella triserialis*. *J Neurosci.*, 1(8), 901-907.
- Freeman, J.J., & Jenden, D. J. 1976.** The source of choline for acetylcholine synthesis in brain. *Life sciences.*, 19(7), 949-961.
- Fustinoni S., Mercadante r., Campo L., Scibetta L., Valla C., Foa V. 2005.** determination of urinary ortho- and meta-cresol in humans by headspace spme gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of chromatography b.* 817:309-317.
- Galyam, N., Grisaru, D., Grifman, M., Melamed-Book, N., Eckstein, F., Seidman, S., Eldor, A., Soreq, H. 2001.** Complex host cell responses to antisense suppression of ACHE gene expression. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11(1), 51-57. doi: 10.1089/108729001750072128.
- Garg., S.P. Garg.,V. 2010.** Serum Enzymes Changes after Death & Its Correlation with Time since Death. *J Indian Acad Forensic Med.*, 32(4).
- Garrett, Reginald., Grisham, Reginald. 2012.** Biochemistry. Cengage Learning. p. 585. ISBN 978 1133106296.
- Gospe., S.M. ve Calaban., M.J. 1988.** Central nervous system distribution of inhaled toluene. *Fundamental and applied toxicology*, 11: 540–545.
- Gürel, A., Armutçu, F., Damatoğlu, Ş., Unalacak, M., Demircan, N. 2004.** Evaluation of erythrocyte Na⁺, K⁺ - ATPase, and superoxide dismutase activities and malondialdehyde level alteration in coal miners. *Eur J Gen Med*, 1(4):22-28.
- Halter CC., Laengin A., Al-Ahmad A., et al. 2009.** Assessment of the stability of the ethanol metabolite ethyl sulfate in standardized degradation tests. *Forensic Sci Int.*, 186:52-55.
- Helander A., Olsson I., Dahl H. 2007.** Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem.*, 53:1855-1857.
- Hjelm E.W., Naslund P.H., Wallen M.. 1988.** Influence of cigarette smoking on the toxicokinetics of toluene in humans. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 25:155-163.
- Ishikawa T., Hamel M., Zhu BL., et al. 2008.** Comparative evaluation of postmortem serum concentrations of neopterin and c-reactive protein. *Forensic Sci Int.*, 179:135-143.
- Inoue O., Seiji K., Watanabe T. 1986.** Possible ethnic difference in toluene metabolism: a comparative study among chinese, turkish and japanese solvent workers. *Toxicol. Lett.* 34:167-174.
- Inoue O., Kanno E., Yusa T., Kakizaki M., Ukai H., Okamoto S., Higashikawa k., Ikeda M. 2002.** Urinary benzylmercapturic acid as a marker of occupational exposure to toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 75:341-347.
- Inoue O., Kanno E., Kasai K., Ukai H., Okamoto S., Ikeda M. 2004.** benzylmercapturic acid is superior to hippuric acid and o-cresol as a urinary marker of occupational exposure to toluene. *Toxicology letters.* 147:177-186.
- Ishikawa T., Quan L., Li DR., et al. 2008.** Postmortem biochemistry and immunohistochemistry of adrenocorticotrophic hormone with special regard to fatal hypothermia. *Forensic Sci Int.*, 179:147-151.
- Ishikawa T., Michiue T., Zhao D., et al. 2009.** Evaluation of postmortem serum and cerebrospinal fluid levels of thyroidstimulating hormone with special regard to fatal hypothermia. *Leg Med (Tokyo).*, 11 Suppl 1:S228-230.

- Ishikawa T., Miyaishi S., Tachibana T., et al. 2004.** Fatal hypothermia related vacuolation of hormone-producing cells in the anterior pituitary. *Leg Med (Tokyo)*., 6:157-163.
- Jason Payne-James., Richard Jones. 2011.** *Simpson's Forensic Medicine*, 13th Edition. Hardback.
- Jones HE. 1997.** Neurobehavioral consequences of intermittent prenatal exposure to high concentrations of toluene. *Neurotoxicol Teratol.*, 4: 305-313.
- Julien, Robert. A. 2008.** Primer of drug action (Eleventh ed.). Worth Publishers. p. 50. ISBN 978-1-4292-0679-2.
- Kamijima M., Nakazawa Y., Yamakawa M., Shibata E., Hisanaga N., Ono Y., Toida M., Takeuchi Y. 1994.** Metabolic acidosis and renal tubular injury due to pure toluene inhalation. *Arch Environ., Health.* 49 (5): 410-3.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., ve Soreq, H., 1998.** Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, 393(6683), 373 377. doi: 10.1038/30741.
- Kawai T., Mizunuma K., Okada Y., Horiguchi S., Ikeda M. 1996.** Toluene itself as the best urinary marker of toluene exposure. *Int. Arch. Occup., Health.* 68:289-297.
- Kernbach-Wighton G., Puschel K. 1998.** On the phenomenology of lethal applications of insulin. *Forensic Sci Int.*, 93:61-73.
- Koellner G, Kryger G, Millard CB, Silman I, Sussman JL., et al. 2000.** Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *J Mol Biol.*, 296(2):713-735.
- Kimelberg, H.K., Papahadjopoulos, D. 1972.** *Biocim. Biophys. Acta.* 282:277-292.
- Knowles, R. 2003.** Alzheimer's Disease (Booklet). Benjamin Cummings, 48 pp.
- Kongtip P., Vararussami J., Pruktharathikul V. 2001.** Modified method for determination of hippuric acid and methylhippuric acid in urine by gas chromatography. *Journal of chromatography b.* 751:199-203.
- Korpela., M. Tahti., H. 1984.** Follow-up of the antihemolytic effect of toluene inhalation in rats. *Toxicol Lett* 21:15-19.
- Korpela., M. Tahti., H. 1988.** The effect of in vitro and in vivo toluene exposure on rat erythrocyte and synaptosome membrane integral enzymes. *Pharmacol Toxicol* 63:30-32.
- Korpela., M. Vapaatalo., H. Tahti., H. 1983.** Effect of toluene on the hemolytic resistance of rat erythrocytes. *Toxicol Lett* 17:253-257.
- Kostrzewski P., Piotrowski J.K. 1991.** Toluene determination in capillary blood as a biological indicator of exposure to low levels of toluene. *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health.* 4:249-259.
- Köksoy, A.A. 2002.** Na⁺, K⁺-ATPase: A review. *Journal of Ankara Medical School*, 24(2):73-82.
- Kiriü., T. et al. 1990.** The distribution of toluene in the brain and its effects on the brain catecholamines in acute toluene poisoning. *Japanese journal of legal medicine*, 44: 25 33.
- Kryger, G., Silman, I., Sussman, J.L., 1991.** Three Dimensional Structure of The anti Alzheimer Drug, E2020 (Aricept), Complexed with ITS Target Acetylcholinesterase. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). <http://www.rcsb.org/structure/1EVE>(14 Mayıs 2018'de erişildi).
- Lauwerys RR. 1983.** Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring. Biomedical Publications, Davis.

- Lehninger., A., Nelson. D., Cox, M.M. 1993.** Principles of biochemistry. Second Edition, Worth Publishers, Inc., 1013s.
- Li DR., Zhu BL., Ishikawa T., et al. 2006.** Immunohistochemical distribution of s-100 protein in the cerebral cortex with regard to the cause of death in forensic autopsy. *Leg Med (Tokyo).*, 8:78-85.
- Li DR., Quan L., Zhu BL., et al. 2009.** Evaluation of postmortem calcium and magnesium levels in the pericardial fluid with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo).*, 11 Suppl 1:S276-278.
- Li, Y., Camp, S., Rachinsky, T. L., Bongiorno, C., ve Taylor, P. 1993.** Promoter elements and transcriptional control of the mouse acetylcholinesterase gene. *J Biol Chem*, 268(5), 3563-3572.
- Li, Y., Rivera, D., Ru, W., Gunasekera, D., ve Kemp, R. G. 1999.** Identification of allosteric sites in rabbit phosphofructo-1-kinase. *Biochemistry* 38, 16407–16412.
- Lindinger, Michael I., Kowalchuk, John M., Heigenhauser, George J. F. 2005.** Applying physicochemical principles to skeletal muscle acid-base status. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 289 (3): R891–R894. doi:10.1152/ajpregu.00225.2005. ISSN 0363-6119. PMID 16105823.
- Long, J. Z., ve Cravatt, B. F., 2011.** The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chemical reviews*, 111(10), 6022-6063.
- Maeda H., Zhu BL., Bessho Y., et al. 2008.** Postmortem serum nitrogen compounds and c-reactive protein levels with special regard to the investigation of fatal hyperthermia. *Forensic Sci Med Pathol.*, 4:175-180.
- Maj MC., Singh B., Gupta RS. 2002.** Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition. *Biochemistry.*, 41: 4059-4069.
- Massoulié J., Perrier N., Noureddine H., Liang D., Bon S. 2008.** Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact.* 175 (1–3): 30–44. doi:10.1016/j.cbi.2008.04.039. PMID 18541228.
- Massoulié J., Pezzementi L., Bon S, Krejci E., Vallette F M. 1993.** Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology.*, 41(1):31-91.
- Mattia., C.J. Ali S.F., Bondy., S.C. 1993.** Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Mol Chem Neuropathol*, 18, 313-28.
- Meek M.E., Chan P.K.L. 1994.** Toluene evaluation of risks to human health from environmental exposure in canada. *Env. Carc. and Ecotox. Rev.*, C12:507-515.
- Mehta., C.S. Sun., P.N. Zikarge., A. et al. 1998.** Acute toxicity of toluene in male and female rats: A single oral dose exposure 2-week study. *Toxic Subst Mech* 17:43-55.
- Millary, CB., Kryger, G. 2007.** Crystal structures of aged phosphorylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level". *Biochemistry. Weizmann Institute of Science.* 38 (22): 7032–7039. doi:10.1021/bi982678l. PMID 10353814.
- Mimasaka S., Funayama M., Hashiyada M., et al. 2007.** Significance of levels of il-6 and il-8 after trauma: A study of 11 cytokines post-mortem using multiplex immunoassay. *Injury.*, 38:1047-1051.
- Mimasaka S., Hashiyada M., Nata M., Funayama M. 2001.** Correlation between serum il-6 levels and death: Usefulness in diagnosis of “traumatic shock”? *Tohoku J Exp Med.*, 193:319-324.

- Molhave L., Pedersen O.F. 1984.** Measurements of alveolar concentrations of toluene. *Int. Arch. Occup. Environ., Health.*, 54: 65–71.
- Mukaddes Gürler., Aynur Altuntaş. 1014.** Postmortem biyokimya. Cilt / Vol 41, No 4, 773-780.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W. 1996.** Fizyolojik öneme sahip lipidler. N. DİKMEN, T. ÖZGÜNEN. Harper'ın Biyokimyası, Yirmi dördüncü baskı, Barış Kitabevi, İstanbul, 913s.
- Musshoff F., Menting T., Madea B. 2004.** Postmortem serotonin (5- ht) concentrations in the cerebrospinal fluid of medicolegal cases. *Forensic Sci Int.*, 142:211-219.
- Naalsund., L.U. 1985.** Changes in neurobiological parameters in the brain after toluene inhalation. Second Nordic Neurochemical Symposium, Copenhagen, August 21–25.
- Nakajima T., Wang R.S. 1994.** Induction of cytochrome P450 by toluene. *Int. J. Biochem.* 26:1333 1340.
- Nakajima T., Wang R.S., Elovaara E. 1997.** Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* 53:271-277.
- Nishio H., Takai S., Miyazaki M., et al. 2005.** Usefulness of serum mast cell-specific chymase levels for postmortem diagnosis of anaphylaxis. *Int J Legal Med.*, 119:331-334.
- Nordberg, A., Hellstrom-Lindahl, E., Almkvist, O., ve Meurling, L. 1999.** Activity of acetylcholinesterase in CSF increases in Alzheimer's patients after treatment with tacrine. *Alzheimers Reports*, 2(6), 347-352.
- Ondruschka B., Pohlers D., Sommer G., et al. 2013.** S100b and nse as useful postmortem biochemical markers of traumatic brain injury in autopsy cases. *J Neurotrauma.*, 30:1862-1871.
- Ono., A. Sekita., K. Ogawa., Y. et al. 1996.** Reproductive and developmental toxicity studies of toluene: II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.*, 15(1):9-20.
- Paetkau, V., ve Lardy, H. 1967.** Phosphofructokinase – Correlation of physical and enzymatic properties. *J Biol Chem* 242: 2035–2042.
- Palmiere C., Mangin P. 2012.** Postmortem chemistry update part i. *Int J Legal Med.*, 126:187-198.
- Park J., ve Gupta RS. 2008.** Adenosine kinase and ribokinase--the RK family of proteins. *Cell Mol Life Sci.*, 65: 2875-2896.
- Pauw, P.G., Kaffer, C.R., Petersen, R.J., Semerad, S.A., Williams, D.C. 2000.** Inhibition of myogenesis by ouabain: effect on protein synthesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 36(2):133-138.
- Perez-Carceles MD., del Pozo S., Sibon A., et al. 2012.** Serum biochemical markers in drowning: Diagnostic efficacy of strontium and other trace elements. *Forensic Sci Int.*, 214:159-166.
- Petronijevic, N.D., Micic, D.V., Duricic, B., Marinkovic, D., Paunovic, V.R. 2003.** Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophreina. *Progress in Neuro-Psychopharmacology&Biological Psychiatry*, 27:431-440.
- Pezzagno G., Imbriani M., Ghittori S., Capodaglio E. 1988.** Urinary concentration, environmental concentration, and respiratory uptake of some solvents: Effect of the workload. *Am. Ind. Hyg.*
- Pezzementi L., Johnson K., Tsigelny I., Cotney J., Manning E., et al. 2003.** Amino acids defining the acyl pocket of an invertebrate cholinesterase. *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology., 136(4):813-832.

Pierce C.H., Chen Y., Dills R.L., Kalman D.A., Morgan M.S. 2002. Toluene metabolites as biological indicators of exposure. *Toxicology letters*. 129:65-76.

Plaxton, W.C. 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 185–214.

Poon., R. Chu., I. Bjarnason., S. et al. 1994. Inhalation toxicity study of methanol, toluene, and methanol/toluene mixtures in rats: Effects of 28-day exposure. *Toxicol Ind Health* 10(3):231-245.

Pounder DJ., Stevenson RJ., Taylor KK. 1998. Alcoholic ketoacidosis at autopsy. *J Forensic Sci.*, 43:812-816.

Puschel K., Lockemann U., Bartel J. 1995. Postmortem investigation of serum myoglobin levels with special reference to electrical fatalities. *Forensic Sci Int.*, 72:171-177.

Quan L., Ishikawa T., Hara J., et al. 2011. Postmortem serotonin levels in cerebrospinal and pericardial fluids with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo).*, 13:75-78.

Quan L., Zhu BL., Ishikawa T., et al. 2008. Postmortem serum erythropoietin levels in establishing the cause of death and survival time at medicolegal autopsy. *Int J Legal Med.*, 122:481-487.

Raben, N., Exelbert, R., Spiegel, R., Sherman, JB., Nakajima, H., Plotz, P., Heinisch, J. 1995. Functional expression of human mutant phosphofructokinase in yeast: genetic defects in French Canadian and Swiss patients with phosphofructokinase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 56 (1): 131–141. PMC 1801305 Freely accessible. PMID 7825568.

Radic Z., Pickering NA., Vellom DC., Camp S., Taylor P. 1993. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry.*, 32(45):12074-12084.

Raikhlin-Eisenkraft B., Hoffer E., Baum Y., Bentur Y. 2001. Determination of urinary hippuric acid in toluene abuse. *Clinical toxicology*. 39(1):73-76.

Reichelt U., Jung R., Nierhaus A., Tsokos M. 2005. Serial monitoring of interleukin-1beta, soluble interleukin-2 receptor and lipopolysaccharide binding protein levels after death a comparative evaluation of potential postmortem markers of sepsis. *Int J Legal Med.*, 119:80-87.

Robinson, J.D., Flashner, M.S. 1979. The na-k atpase, enzymatic and transport properties. *Biochem. Biophys. Acta*, 549: 145-176.

Rotundo, R. L. 1990. Nucleus-specific translation and assembly of acetylcholinesterase in multinucleated muscle cells. *J Cell Biol.*, 110(3), 715-719.

Sato A., Nakajima T. 1978. Differences following skin or inhalation exposure in the absorption and excretion kinetics of trichloroethylene and toluene. *Br. J. Ind. Med.*, 35:43-49.

Schirmer, T., ve Evans, PR. 1990. Structural basis of the allosteric behavior of phosphofructokinase. *Nature* 343: 140–145.

Schloegl H., Dresen S., Spaczynski K., et al. 2006. Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. *Int J Legal Med.*, 120:83-88.

Schrag B., Roux-Lombard P., Schneiter D., et al. 2012. Evaluation of c-reactive protein, procalcitonin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 as diagnostic parameters in sepsis-related fatalities. *J Forensic Legal Med.*, 126:505-512.

- Schmidt, T.A., Kjeldsen, K. 1998.** Human myocardial Na, K-ATPase – quantification, regulation and relation to Ca. *Cardiovascular Research*, 37:335-345.
- Seiler, N., Bolkenius, F.N., Knödgen, B. 1985.** The influence of catabolic reactions on polyamine excretion. *Biochem J.*, 225: 219-226.
- Shirakihara Y., Evans PR.1988.** Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.*, 204 (4): 973–994.
- Sigrell JA., Cameron AD., Jones TA., Mowbray SL. 1998.** Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: insights into a new family of kinase structures. *Structure.*, 6: 183-193.
- Simon, G. M., ve Cravatt, B. F., 2010.** Activity-based proteomics of enzyme superfamilies: serine hydrolases as a case study. *Journal of Biological Chemistry.*, 285(15), 11051-11055.
- Soderberg, T. 2012.** Organic Chemistry With a Biological Emphasis USA: University of Minnesota.
- Soreq, H., ve Seidman, S. 2001.** Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*, 2(4), 294-302. doi: 10.1038/35067589.
- Soysal Z., Eke M. 1999.** Dünyada adli tıbbın tarihi ve gelişimi/Gök Ş. Adli tıbbın Türkiye’de geçirdiği tarih ve evreler, Adli Tıp Cilt I. (Ed. Soysal Z, Cakalır C), İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul. 1-44.
- Stengard., K. Hoglund., G. ve Ungerstedt, U. 1994.** Extracellular dopamine levels within the striatum increase during inhalation exposure to toluene: a microdialysis study in awake, freely moving rats. *Toxicology letters*, 71: 245–255.
- Streicher HZ., Gabow PA., Moss AH., Kono D., Kaehny WD. 1981.** Syndromes of toluene sniffing in adults. *Ann Intern Med.*, 94 (6): 758-62.
- Stryer, L., Berg, JM., Tymoczko, JL. 2007.** Biochemistry (Sixth ed.). San Francisco: W.H. Freeman. ISBN 0-7167-8724-5.
- Spychala J., Datta NS., Takabayashi K., Datta M., Fox IH., Gribbin T., Mitchell BS. 1996.** Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 93: 1232-1237.
- Sussman JL., Harel M, Frolow F., Oefner C., Goldman A et al. 1991.** Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.*, 253(5022):872-879.
- Tassaneeyakul W., Birkett D.J., Edwards J.W. 1996.** Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m-, and p-xylene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 276:101-108.
- Taş U. 2008.** Tolüen soluyan sıçanlarda oluşabilecek karaciğer hasarı ve melatoninin koruyucu etkisinin araştırılması. *Uzmanlık Tezi*, Fırat üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı.
- Tas., U. Ekici., F. Koc., F. et al. 2013.** Acute cardiotoxic effects of high dose toluene: An experimental study. *Anadolu Kardiyol Derg.*, 13(1):3-8.
- Taylor, P., ve Radic, Z. 1994.** The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 34, 281-320. doi: 10.1146/annurev.pa.34.040194.001433.
- Thomsen JL., Felby S., Theilade P., Nielsen E. 1995.** Alcoholic ketoacidosis as a cause of death in forensic cases. *Forensic Sci Int.*, 75:163-171.
- Tahti., H. Aaran., R.K. Vapaatalo., H. 1983.** An inhalation method for testing the toxicity of volatile compounds in small laboratory animals. A study on short-term and long-term toluene inhalation in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 5(10):667-671.

- Traub F. 1969.** Method for the detection of lethal glucose metabolism disorders in the corpse (diabetes mellitus and hypoglycemia). *Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie.*, 112:390-399.
- Uemura K., Shintani-Ishida K., Saka K., et al. 2008.** Biochemical blood markers and sampling sites in forensic autopsy. *J Forensic Legal Med.*, 15:312-317.
- Uyeda K. 1979.** Phosphofructokinase. *Adv Enzymol* 48: 193–244.
- Vellom, D. C., Radic, Z., Li, Y., Pickering, N. A., Camp, S., ve Taylor, P. 1993.** Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, 32(1), 12-17.
- von Euler., G. et al. 1989.** Persistent effects of neonatal toluene exposure on regional brain catecholamine levels and turnover in the adult male rat. *Toxicology*, 54: 1–16.
- von Euler., G. et al. 1994.** Persistent effects of 80 ppm toluene on dopamine-regulated locomotor activity and prolactin secretion in the male rat. *Neurotoxicology*, 15: 621–624.
- Vora, S., ve Francke, U. 1981.** Assignment of the human gene for liver-type 6-phosphofructokinase isozyme (PFKL) to chromosome 21 by using somatic cell hybrids and monoclonal anti-L antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3738–3742.
- Voss j.U., Roller M., Brinkmann E., mangelsdorf I. 2005.** Nephrotoxicity of organic solvents: biomarkers for early detection. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 78:475-485.
- Wallen M., Holm S., Nordqvist M.B. 1985.** Coexposure to toluene and paraxylene-Uptake and elimination in man, *Br. J. Ind. Med.*, 42(2):111-116.
- Wang G., Maranelli G., Perbellini L., Guglielmi G., Brugnone F. 1993.** Reference values for blood toluene in the occupationally nonexposed general population. *Int. Arch. Occup. Environ., Health.* 65(3):201-203.
- Whitehead FJ., Couper RT., Moore L., et al. 1996.** Dehydration deaths in infants and young children. *Am J Forensic Med Pathol.*, 17:73-78.
- Wilke N., Janssen H., Fahrenhorst C., et al. 2007.** Postmortem determination of concentrations of stress hormones in various body fluids--is there a dependency between adrenaline/ noradrenaline quotient, cause of death and agony time? *Int J Legal Med.*, 121:385-394.
- Wilkins-Haug L. 1997.** Teratogen update: Toluene. *Teratology* 55:145-151.
- Xie, Z., Askari, A. 2002.** Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem.*, 269:2434-2439.
- Wood., R.W. ve Cox., C. 1995.** A repeated measures approach to the detection of the acute behavioral effects of toluene at low concentrations. *Fundamental and applied toxicology*, 25: 293–301.
- Yorulmaz A.C., Şanyüz Ö., Ketenci H.Ç., Cinsel Saldırıları. 2006.** Yeni yasalar çerçevesinde hekimlerin hukuki ve cezai sorumluluğu, Tıbbi malpraktis ve adli rapor düzenlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi Yayın Kurulu. No:48, sf:193-213, İstanbul.
- Yoshida C., Ishikawa T., Michiue T., et al. 2011.** Postmortem biochemistry and immunohistochemistry of chromogranin a as a stress marker with special regard to fatal hypothermia and hyperthermia. *Int J Legal Med.*, 125:11-20.
- Zancan, P., Sola-Penna, M., Furtado, C. M., ve Da Silva, D. 2010.** Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. *Mol. Genet. Metab.* 100, 372–378.

- Zhang Y., Kua J., McCammon JA. 2002.** Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio QM/MM Study. *J Am Chem Soc.*, 124(35):10572-10577.
- Zhu BL., Ishikawa T., Michiue T., et al. 2006.** Postmortem cardiac troponin t levels in the blood and pericardial fluid. Part 1. Analysis with special regard to traumatic causes of death. *Leg Med (Tokyo).*, 8:86-93.
- Zhu BL., Ishikawa T., Michiue T., et al. 2007.** Postmortem cardiac troponin i and creatine kinase mb levels in the blood and pericardial fluid as markers of myocardial damage in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo).*, 9:241-250.
- Zhu BL., Ishikawa T., Michiue T., et al. 2007.** Postmortem pericardial natriuretic peptides as markers of cardiac function in medico-legal autopsies. *Int J Legal Med.*, 121:28-35.
- Zhu BL., Ishida K., Quan L., et al. 2001.** Post-mortem urinary myoglobin levels with reference to the causes of death. *Forensic Sci Int.*, 115:183-188.
- Zhu BL., Ishikawa T., Quan L., et al. 2005.** Evaluation of postmortem serum calcium and magnesium levels in relation to the causes of death in forensic autopsy. *Forensic Sci Int.*, 155:18-23.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Abdelazim Adil Mohammed

Doğum Yeri ve Tarihi: Musul, 9 Mart 1991

Yabancı Dili: Türkçe

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Doğu Erkek Lisesi (2006-2009)

Lisans: Musul Üniversitesi, Temel Eğitim Fakültesi, Bilim Bölümü, Biyoloji Bilim Dalı (2009-2013)

Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2015-2018)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : -

İletişim (e-posta): ggafcsrdea1991@yahoo.com

Yayımları: -