

Formaldehit Nörotoksitesine Bağlı Hipokampusta Gelişen Oksidatif Hasar ve Melatonin Hormonunun Koruyucu Etkisi: Deneysel Bir Çalışma

İlter KUŞ^{a1}, İsmail ZARARSIZ¹, Murat ÖGETÜRK¹, H. Ramazan YILMAZ²

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, ELAZIĞ

² Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, ISPARTA

ÖZET

Giriş: Bu çalışma, formaldehitin hipokampus üzerindeki nörotoksitesinin ve bu toksisiteye karşı melatonin hormonunun koruyucu etkilerinin araştırılması amacıyla yapıldı.

Gereç ve Yöntem: 21 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan üç eşit gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar kontrol olarak kullanıldı. Grup II'deki hayvanlara gün aşırı olarak formaldehit enjeksiyonu yapıldı. Grup III'deki sıçanlara ise, formaldehit uygulaması ile birlikte günlük olarak melatonin enjekte edildi. İki haftalık deney süresi sonunda bütün sıçanlar dekapitasyon yöntemi ile öldürüldü. Daha sonra sıçanların beyin dokuları çıkartılarak, hipokampus doku örneklerinde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) seviyeleri spektrofotometrik olarak belirlendi.

Bulgular: Formaldehit enjeksiyonu yapılan sıçanlara ait hipokampus doku örneklerindeki SOD ve GSH-Px aktivitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı, MDA düzeylerinin ise arttığı tespit edildi. Formaldehit enjeksiyonu ile birlikte melatonin uygulanan hayvanlarda, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde bir artışın meydana geldiği, MDA değerlerinde ise anlamlı bir düşüşün olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Deneysel olarak yapılan bu çalışmada, formaldehitin hipokampus dokusunda oksidatif hasara neden olduğu ve bu hasarın melatonin uygulaması ile baskılandığı tespit edildi. ©2007, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Anahtar kelimeler: Formaldehit, Melatonin, Hipokampus, Nörotoksitesite, Oksidatif Hasar

ABSTRACT

Hippocampal Oxidative Damage Due To Formaldehyde Neurotoxicity and Protective Effect of Melatonin Hormone: An Experimental Study

Objectives: In this study, neurotoxicity of formaldehyde on hippocampus and protective effects of melatonin hormone against these toxic effects were investigated.

Materials and Methods: Twenty one adult male Wistar-Albino rats were divided into three equal groups. Rats in group I were used as control. Rats in group II were injected with formaldehyde every other day. Rats in group III were received melatonin daily with administration of formaldehyde. At the end of two-week experimental period, all rats were killed by decapitation. Then the brain tissues of rats were removed. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme activities and malondialdehyde (MDA) levels were determined in the hippocampus specimens by using spectrophotometric methods.

Results: The hippocampal tissue activities of SOD and GSH-Px were significantly decreased in formaldehyde-exposed rats compared to controls, while MDA contents were significantly increased. It was observed an increase in activities of SOD and GSH-Px enzymes and a decrease of MDA levels in animals treated with formaldehyde plus melatonin.

Conclusion: In this experimental study, it was determined that exposure of formaldehyde caused oxidative damage in hippocampus and this damage was suppressed by administration of melatonin. ©2007, Fırat University, Medical Faculty

Key words: Formaldehyde, Melatonin, Hippocampus, Neurotoxicity, Oxidative Damage

Filogenetik olarak en eski beyin kısımlarından birisi olan hipokampus, insanda lateral ventrikül alt boynuzunun tabanında bulunur. Kesitlerde C harfi şeklinde olan bu yapı ortalama 5 cm uzunluğundadır. Görünümü itibariyle denizatına benzetildiğinden hipokampus adı verilmiştir (1,2). Algı ve bellek sistemleri arasında bağlantı kuran hipokampus, beynin birçok bölgesinden duyu lifleri almaktadır. Aldığı bu duyuları, forniks aracılığıyla hipotalamus, talamus ve septal sahaya iletmektedir. Bunun yanı sıra, hipokampus subkortikal alanlarla olan bağlantısı sayesinde, beynin birçok bölgesi ile iletişim halindedir. Öğrenme ve hafıza fonksiyonları üzerinde önemli

role sahip olan hipokampus, yeni elde edilen bilgilerin depolanması ve anıların kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçirilmesinde görev alır. Bu nedenle hipokampusta meydana gelebilecek bir hasar, belirtilen fonksiyonlarda bozukluklara neden olabilir. Nitekim hipokampus lezyonlarında, anıların kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe alınmasında sorun olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, verbal veya sembolik anıların hafızada tutulmasının da mümkün olamayacağı ifade edilmiştir (2, 3).

^a Yazışma Adresi: Dr. İlter Kuş, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Elazığ
Tel: +90 424 2370000 e-mail: ilterkus@hotmail.com

Formaldehit, birçok endüstriyel alanlarda kullanılan kimyasal bir maddedir. Bunun yanı sıra, tıp alanında da yaygın olarak kullanıldığı için sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Üretildiği ve kullanıldığı endüstriyel alanlardaki meslek grupları ile özellikle tıp laboratuvarlarında çalışan kişiler formaldehite maruz kalmaktadır. Kimyasal formülü CH_2O olan formaldehit; renksiz, keskin kokulu ve suda çok iyi çözünen bir aldehittir. Kuvvetli bir elektrofilik özelliğe sahip olan bu madde oda sıcaklığında rahatlıkla gaz haline geçebilir (4). Formaldehit organizmaya dışarıdan alındığı zaman, formaldehit dehidrogenaz enzimi (FDH) katalizöründe karaciğerde ve eritrositlerde formik asite metabolize olur. FDH enzimi bu reaksiyonu gerçekleştirirken kofaktör olarak glutatyonun ihtiyacı duyar. Formaldehit vücut içerisinde depo edilmez. Formik asite dönüşerek idrar ve gaita yoluyla ya da karbondioksit okside olarak solunum yoluyla atılır (5).

Akut olarak meydana gelen formaldehit maruziyetinde; baş ağrısı, baş dönmesi, keyifsizlik, uykusuzluk ve iştahsızlık gibi semptomlar ortaya çıkarken, uzun süreli maruz kalmalarda; davranış bozuklukları ve epilepsi gibi kalıcı nörotoksite belirtileri ortaya çıkmaktadır. Yüksek konsantrasyonlardaki formaldehit maruziyeti ise salivasyon, dispne, konvülsiyon ve hatta ölüme neden olmaktadır (6-8). Daha önce, deneysel olarak gerçekleştirilmiş çalışmalarda da, formaldehitin nörotoksik etkileri ortaya konmuştur. Formaldehite maruz kalan sıçanlarda davranış bozuklukları, ruhsal dengesizlik ve öğrenme ile ilgili testlerde bozuklukların olduğu tespit edilmiştir (9).

Pineal bez tarafından salgılanan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) 232 molekül ağırlığında bir hormon olup, endokrin sistemin düzenlenmesi, immün fonksiyonun artırılması, düz kas tonusunun ayarlanması ve gonadal fonksiyonların baskılanması gibi bir çok fizyolojik işlevlerde görev alır (10-13). Aynı zamanda melatoninin güçlü bir antioksidan karakterde olduğu (14,15) ve dokularda lipid peroksidasyon sonucu oluşan oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir (16,17). Bu hormon hem yağda hem de suda çözünebilir özelliğe sahiptir ve bu yüzden çekirdek dahil hücrenin her organeline rahatlıkla ulaşabilir. Bu özellik, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır (10). Bunun yanı sıra, kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen, dolayısıyla beyin dokularında da antioksidan özelliğini gösteren bir hormondur (18,19).

Biyokimyasal düzeyde yapmış olduğumuz bu çalışmada, formaldehit maruziyetinin hipokampus üzerindeki nörotoksik etkileri ve aynı zamanda bu toksik etkilere karşı melatonin hormonunun koruyucu rolü araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, 21 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan üç gruba ayrıldı. Grup I (n=7)'deki kontrol sıçanlara gün aşırı olarak ve intraperitoneal (i.p) yolla sadece serum fizyolojik enjekte edildi. Grup II (n=7)'deki sıçanlara ise, yine gün aşırı olarak ve serum fizyolojik ile 1/10 oranında sulandırılmış 10 mg/kg dozundaki formaldehit i.p olarak uygulandı. Grup III (n=7)'deki sıçanlara da gün aşırı olarak uygulanan formaldehitin yanı sıra, serum fizyolojik ile 1/10 oranında sulandırılmış 25 mg/kg dozundaki melatonin (Sigma Chemical Co.) yine intraperitoneal yolla günlük olarak enjekte edildi. İki haftalık deney süresi sonunda tüm sıçanlar dekapitasyon yöntemiyle öldürüldü. Sıçanların beyin dokuları hızla çıkartılarak hipokampus doku örnekleri soğuk (+4 °C) 0.15 M'lık potasyum klorür (KCl) ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile

kurutuldu. Daha sonra dokular homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lık KCl çözeltisi içinde 16000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000 g'de 1 saat (+4°C'de) santrifüjlenerek süpernatant elde edildi ve analiz zamanına kadar (1 hafta) -40 °C'de bekletildi. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri süpernatanda, malondialdehit (MDA) aktiviteleri ise homojenatta spektrofotometrik olarak tayin edildi.

SOD tayini: Süperoksit dismutaz enzim değerleri Sun ve ark. (20)'nin modifiye ettiği metotla belirlendi. Bu metodun prensibi nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Çalışmamızda SOD aktivitesi ünite/gram (U/g) doku proteini olarak ifade edildi.

GSH-Px tayini: Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve ark. (21)'nin metoduna göre çalışıldı. GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redukte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon reduktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi, NADPH'nin NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorpsiyon azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı ve ünite/gram (U/g) doku proteini şeklinde belirlendi.

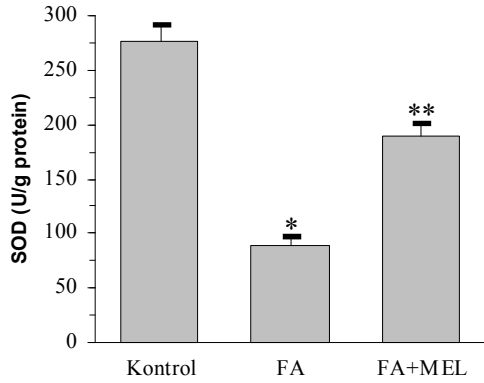
MDA tayini: Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu uygulanarak yapıldı (22). Tiyobarbitirik asit ile 90-95°C'de reaksiyona giren malondialdehit, pembe renkli kromojen oluşturmaktadır. On beş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorpsiyonları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Sonuçlar nmol/g doku proteini olarak ifade edildi. Doku protein tayini: Doku örneklerine ait homojenatlardaki protein düzeyi Lowry ve ark. (23)'nin belirlemiş olduğu yöntemle gerçekleştirildi.

İstatistiksel analiz: Biyokimyasal parametre sonuçlarının analizi için "SPSS 11.0 for Windows" istatistik programı kullanıldı. Grupların dağılımları, non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Test ile değerlendirildi. Gruplar normal dağılım gösterdiğinden değerlerin karşılaştırılmasında parametrik testlerden one-way ANOVA ve Post Hoc testlerden LSD kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için p<0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

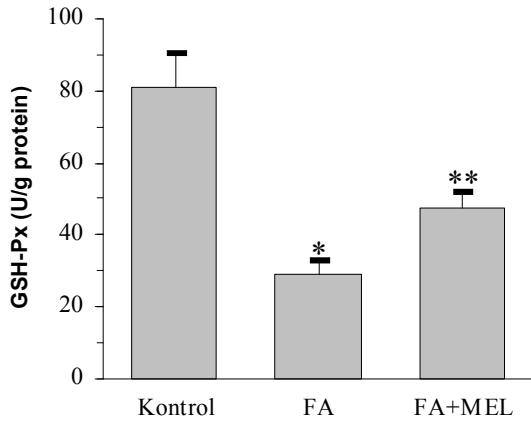
BULGULAR

Çalışmamızda, antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ile oksidatif hasarın ortaya konmasında önemli bir parametre olarak kullanılan ve aynı zamanda dokudaki lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlendi.

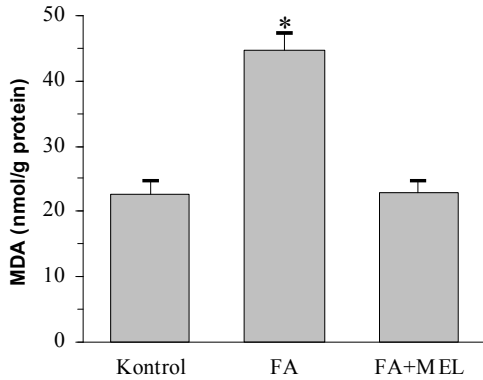
Formaldehit enjeksiyonu yapılan sıçanlara ait hipokampus doku örneklerindeki SOD ve GSH-Px değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olduğu görüldü (p<0.05). Bu gruba ait MDA düzeylerinin ise yine kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi (p<0.05). Diğer taraftan, formaldehit enjeksiyonu ile birlikte melatonin verilen sıçanlarda, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttığı, MDA seviyelerinin de azaldığı görüldü (p<0.05) (Şekil 1, 2, 3).



Şekil 1. Kontrol, formaldehit (FA) ve formaldehit + melatonin (FA +MEL) uygulanan gruplara ait süperoksit dismutaz enzim aktivasyon değerleri. *: $p<0.001$ (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında); **: $p<0.01$ (kontrol ve FA grupları ile karşılaştırıldığında).



Şekil 2. Kontrol ve deney gruplarına ait hipokampus doku örneklerindeki glutatyon peroksidaz enzim seviyeleri. FA: formaldehit, MEL: melatonin. *: $p<0.001$ (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında); **: $p<0.01$ (kontrol ve FA grupları ile karşılaştırıldığında).



Şekil 3. Formaldehit (FA) hipokampustaki malondialdehit seviyesini anlamlı şekilde yükseltirken, melatonin (MEL) bu değeri kontrol seviyesine düşürdü. *: $p<0.001$ (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).

TARTIŞMA

Deneyssel olarak mutajenik ve kanserojenik olduğu belirlenen formaldehit, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, göz, deri, testis ve menstrüel fonksiyonlar gibi birçok sistem üzerinde olumsuz etkilere sahiptir (24-27). Formaldehit nonenzimatik yolla protein, DNA, RNA ve doymamış yağ asitleri ile güçlü bir şekilde birleşme eğilimindedir. Bu birleşme sonucunda ise formaldehitin toksik etkileri ortaya çıkmaktadır (4,5).

Formaldehit toksisitesinden etkilenen sistemlerden birisi de merkezi sinir sistemi bölümleridir. Mesleki olarak formaldehite maruz kalanlarda; halsizlik, baş ağrısı, hazımsızlık, denge ve uyku bozukluğu ile ruhsal durum ve hafıza bozukluklarının görüldüğü ifade edilmiştir (6,24,28). Ayrıca formaldehitin kullanıldığı endüstriyel alanlarda çalışan kişilerde, aşırı yorgunluk ve susuzluk hissi, iritabilite, letarji, davranış ve duygu-durum bozukluğu gibi belirtilerin olması nörotoksitesiteyi düşündürmektedir (6,7).

Formaldehitin nörotoksik etkileri yapılan deneyssel çalışmalarla da ortaya konmuştur. Formaldehit uygulanan sıçanlarda davranış bozuklukları, ruhsal dengesizlik ve öğrenme ile ilgili testlerde bozuklukların oluştuğu görülmüş ve formaldehitin beyin kanseri (astrozitoma -glioblastoma multiforme) oluşturma potansiyelinin de mevcut olduğu bildirilmiştir (8). Yine sıçanlarda formaldehit maruziyeti sonucu motor aktivitede yavaşlamanın olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, formaldehitin 2.6-4.6 ppm dozlarının sıçanlarda öğrenmeyi inhibe ettiği ve nörotoksitesite oluşturduğu ortaya konmuştur (5,9,29-31).

Organizmada normal fizyolojik şartlarda veya herhangi bir patolojik olay sonucunda oluşan serbest radikaller ile bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi gösterir. Canlılar oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korunur. Hücre seviyesinde etkili olan enzimatik antioksidan sistemler içerisinde süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz yer alır (32).

Daha önce yapmış olduğumuz deneyssel çalışmalarda, formaldehite maruz kalmış sıçanlara ait prefrontal korteks doku örneklerinde oksidatif hasarın meydana geldiğini ve doku antioksidan enzim seviyelerinin düştüğünü tespit ettik (33,34). Benzer şekilde, Teng ve ark. (35) da izole sıçan hepatositlerinde yaptıkları deneyssel çalışmada, formaldehit maruziyetinin oksidatif hasara yol açtığını bildirmişlerdir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada da, formaldehit enjeksiyonu yapılan sıçanlarda hipokampus doku örneklerindeki SOD ve GSH-Px aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını ortaya koyduk. SOD ve GSH-Px enzimlerindeki bu azalma, formaldehitin hipokampus dokusundaki antioksidan defans mekanizmasını bozarak oksidatif hasara neden olduğunu göstermektedir.

MDA, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir (36). Çalışmamızda da, formaldehit uygulanan grupta MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. MDA düzeyindeki bu artış, formaldehitin hipokampusta lipid peroksidasyonuna ve doğal olarak oksidatif hasara yol açtığını ortaya koymuştur. Benzer şekilde, Teng ve arkadaşları da sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında formaldehit uygulamasının lipid peroksidasyona neden olduğunu bildirmişlerdir (35).

Vücutta birçok fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan melatonin hormonunun güçlü bir antioksidan olduğu (14, 15) ve dokularda lipid peroksidasyon sonucu oluşan oksidatif hasarı önlediği ifade edilmiştir (16, 17). Bu hormonun güçlü antioksidan etkisinin yanı sıra, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini de stimüle ettiği bildirilmiştir (18).

Melatonin hormonunun antioksidan özelliği sinir sistemine ait dokular üzerinde yapılan araştırmalarda da belirtilmiş ve melatoninin oksidatif strese bağlı olarak gelişen nöronal hasara karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (18,19,37-41). Kabuto ve ark. (37) deneysel olarak yapmış oldukları çalışmalarında, beyin korteksinde demirle indüklenmiş oksidatif hasarın melatonin uygulaması ile engellendiğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde Tan ve ark. (38), sıçan hipokampusunda siyanik asitle oluşturulmuş nöronal hasara karşı melatoninin koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Mason ve ark. (39) ise, sıçanlar üzerinde gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarında, cerebellum granuloza hücrelerinde oksidatif strese bağlı olarak oluşan apoptozisin melatonin uygulaması ile inhibe olduğunu ifade etmişlerdir. Skaper ve ark. (19) da, yaşlanmaya bağlı olarak meydana gelen nöronal hasarın melatonin ile engellendiğini göstermişlerdir. Yine sıçanlar üzerinde deneysel olarak yapılan başka bir araştırmada, beyin korteksinde gama-radyasyona bağlı olarak

gelişen MDA düzeylerindeki artışın, melatonin uygulaması ile azaldığını ve lipid peroksidasyonun engellendiği gösterilmiştir (41).

Biyokimyasal düzeyde gerçekleştirmiş olduğumuz bu araştırmada da, formaldehit enjeksiyonuna bağlı olarak hipokampusta meydana gelen oksidatif hasarın melatonin uygulamasıyla baskılandığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Bir başka ifadeyle, formaldehit uygulamasıyla birlikte melatonin hormonu enjekte edilen sıçanlarda, hipokampus doku örneklerine ait SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttığı, MDA düzeylerinin ise azaldığı tespit edilmiştir.

Sistemik olarak sıçanlara vermiş olduğumuz formaldehit, serbest oksijen radikallerini (SOR) aşırı derecede artırmıştır. SOR'daki bu artışı kompanse etmek için antioksidan enzimler aşırı derecede kullanılmış ve yıkılmış olabilir. Yani, sadece formaldehit enjekte edilen gruptaki SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerindeki azalmanın muhtemel sebebi bu olabilir. Diğer yandan, formaldehit maruziyetinin yanı sıra uyguladığımız melatonin, ya direkt olarak SOR üzerinde süpürücü etki göstererek ya da indirekt bir şekilde antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak, SOR'un beyin dokusu üzerinde göstermiş olduğu hasarı önleyici bir etki göstermiştir. Bu nedenle, formaldehit üretiminin yapıldığı ya da kullanıldığı ortamlarda çalışan kişilerin antioksidan içeriği yüksek olan gıdalarla beslenmelerinin faydalı olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2001: 318-321.
- Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipocampus. J Med Sci 2001; 21: 427-431.
- Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H (Çev. Ed.). 1. Baskı, İstanbul: Nobel, 2001.
- Smith AE. Formaldehyde. Occup Med 1992; 42: 83-88.
- Usanmaz SE, Akarsu ES, Vural N. Neurotoxic effects of acute and subacute formaldehyde exposures in mice. Envir Toxicol Pharmacol 2002; 11: 93-100.
- Kilburn KH, Warshaw R, Thornton JC. Formaldehyde impairs memory, equilibrium, and dexterity in histology technicians: effects which persist for days after exposure. Arch Environ Health 1987; 42: 117-120.
- Kilburn KH. Neurobehavioral impairment and seizures from formaldehyde. Arch Environ Health 1994; 49: 37-44.
- Stroup NE, Blair A, Erikson GE. Brain cancer and other causes of deaths in anatomists. J Natl Cancer Inst 1986; 77: 1217-1224.
- Pitten FA, Kramer A, Herrmann K, Bremer J, Koch S. Formaldehyde neurotoxicity in animal experiments. Pathol Res Pract 2000; 196: 193-198.
- Kuş İ, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. T Klin J Med Sci 2002; 22: 221-226.
- Kus I, Akpolat N, Ozen OA, et al. Effects of melatonin on Leydig cells in pinealectomized rat: an immunohistochemical study. Acta Histochem 2002; 104: 93-97.
- Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. Endocr Res 1992; 18: 91-113.
- Ayar A, Kutlu S, Yilmaz B, Kelestimur H. Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. Neuroendocrinol Lett 2001; 22: 301-306.
- Stastica P, Ulanski P, Rosiak JM. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. J Pineal Res 1998; 25: 65-66.
- Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. Biochim Biophys Acta 1998; 1425: 469-477.
- Longoni B, Salgo MG, Pryor WA, Marchiafava PL. Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. Life Sci 1998; 62: 853-859.
- Sewerynek E, Melchiorri DA, Chen L, Reiter RJ. Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. Free Radic Biol Med 1995; 19: 903-909.
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. Horm Metab Res 1997; 29: 363-372.
- Skaper SD, Floreani M, Cecon M, Facci L, Giusti P. Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin. Ann N Y Acad Sci 1999; 890: 107-118.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34: 497-500.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70: 158-169.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 1990; 186: 407-421.
- Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Rondall R. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951; 183: 265-275.
- Kim H, Kim YD, Cho SH. Formaldehyde exposure levels and serum antibodies to formaldehyde- human serum albumin of Korean medical students. Arch Environ Health 1999; 54: 115-118.

25. Sarsılmaz M, Özen OA. Subkronik dönem boyunca formaldehit soluyan sıçanların leydig hücrelerindeki histopatolojik değişiklikler. *Fırat Tıp Dergisi* 2000; 2: 1-5.
26. Nilsson JA, Zheng X, Sundqvist K, et al. Toxicity of formaldehyde to human oral fibroblasts and epithelial cells: influences of culture conditions and role of thiol status. *J Dent Res* 1998; 77: 1896-1903.
27. Thrasher JD, Kilburn KH. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Arch Environ Health* 2001; 56: 300-311.
28. Kuo H, Jian G, Chen C, Liu C, Lai J. White blood cell count as an indicator of formaldehyde exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* 1997; 59: 261-267.
29. Reiter L. Behavioral toxicology: effects of early postnatal exposure to neurotoxins on development of locomotor activity in the rat. *J Occup Med* 1977; 19: 200-204.
30. Sorg BA, Bailie TM, Tschirgi ML, Li N, Wu WR. Exposure to repeated low-level formaldehyde in rats increases basal corticosteron levels and enhances the corticosterone response to subsequent formaldehyde. *Brain Res* 2001; 898: 314-320.
31. Sorg BA, Hochstatter T. Behavioral sensitization after repeated formaldehyde exposure in rats. *Toxicol Ind Health* 1999; 15: 346-355.
32. Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri. Uzmanlık tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Ankara 1994.
33. Zararsız I, Kus I, Akpolat N, et al. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. *Cell Biochem. Funct* 2006; 24: 237-244.
34. Kuş İ, Zararsız İ, Yılmaz HR., ve ark. Sıçan prefrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2004; 13: 1-7.
35. Teng S, Beard K, Pourahmad J, et al. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 2001; 130-132: 285-296.
36. Kamal AA, Gomaa A, el Khafif M, Hammad AS. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dust. *Environ Res* 1989; 49: 173-180.
37. Kabuto H, Yokoi I, Ogawa N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. *Epilepsia* 1998; 39: 237-243.
38. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, et al. Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid-induced damage in mice. *J Neurosci Res* 1998; 54: 382-389.
39. Mason RP, Leeds PR, Jacob RF, et al. Inhibition of excessive neuronal apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1999; 72: 1448-1456.
40. Kaptanoglu E, Palaoglu S, Demirpence E, et al. Different responsiveness of central nervous system tissues to oxidative conditions and to the antioxidant effect of melatonin. *J Pineal Res* 2003; 34: 32-35.
41. Erol FS, Topsakal C, Ozveren MF, et al. Protective effects of melatonin and vitamin E in brain damage due to gamma radiation: an experimental study. *Neurosurg Rev* 2004; 27: 65-69.

Kabul Tarihi: 17.05.2007