

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**KARBONDİOKSİT VE KARBONMONOKSİTE  
MARUZ BIRAKILAN SIÇANLARDA  
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER GENETİK  
PARAMETRELERİN DEĞİŞİMİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Mustafa Doğan**  
**Adli Tıp Anabilim Dalı**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Osman Celbiş**

**Malatya, 2015**

## TEŞEKKÜRLER

Hayatımın her anında yanımda olan, ilk eğitimi kendilerinden aldığım sevgili babam Hacı Ali ve annem Makbule'ye, hayat arkadaşım, can yoldaşım eşim Filiz ve canım oğlum Selim'e, kardeşlerime ve yeğenlerime,

Uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve beceri edinmemde ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmamda üstün bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam sayın Prof. Dr. Osman Celbiş'e,

Çalışmamızın proje hazırlama, deneyin yapılması ve yazım aşamalarında yardımlarını esirgemeyen hocalarım sayın Prof. Dr. Yılmaz Çiğremiş, Doç.Dr. Osman Çiftçi, Prof. Dr. Saim Yoloğlu, Yrd. Doç. Dr. Aslı Çetin, Prof. Dr. Yunus Karakoç ve Prof. Dr. Elif Özerol'a ve Uzm. Dr. Semih Petekkaya'ya,

Çalışmamızın deneyin yapılması, veri analizleri ve yazımı aşamalarında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım doktora öğrencileri Neşe Başak Türkmen, İdris Ayhan, Merve Durhan, Fuat Karakuş ve İÜTF Deney Hayvanları Araştırma Merkezi çalışanları M. Zafer Bozdağ, Zeynel Sarıkaya, Gamze Karakuş, Onur Özkaya ve Erol Çalığısu'na,

Anabilim Dalında beraber çalıştığım arkadaşlarım Mucahit Oruç, Ahmet Çelebi, Nusret Ayaz, Osman Kule, Ahmet Sedat Dünder ve Özge Erdoğmuş Erdem'e,

sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Mustafa Doğan  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Adli Tıp Anabilim Dalı

*Bu tez, Prof. Dr. Osman Celbiş'in yürütücüsü olduğu ve 15.05.2015 tarihinde onaylanan "Karbondiyoksit ve Karbonmonoksit'e Maruz Bırakılan Sıçanlarda Biyokimyasal ve Moleküler Genetik Parametrelerin Değişimi" başlıklı, 214S625 sayılı TUBİTAK-1002 proje desteğiyle yapılmıştır.*

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
RESİM DİZİNİ.....	iii
TABLO DİZİNİ.....	iv
GRAFİK DİZİNİ.....	v
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	3
1.1. TOKSİKOLOJİ.....	3
1.1.1. Toksikoloji ile İlgili Genel Kavramlar.....	3
1.1.2. Toksikoloji'nin Tarihçesi ve Adli Toksikolojinin Doğuşu.....	3
1.1.3. Toksikoloji Biliminin Alt Dalları, Komşulukları ve Adli Toksikoloji ile İnterdisipliner İlişkileri.....	5
1.1.4. Adli Toksikoloji ve Adli Toksikoloji İlgili Kavramlar.....	5
1.1.5. Adli Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Başlıca Yöntemler ve Teknolojik Gelişimleri Takip Etmenin Gerekliliği.....	7
1.1.5.1. Adli Toksikolojide Başlıca Kullanılan Spektroskopik Yöntemler...8	
1.1.5.1.1. Ultraviyole spektroskopisi (UV spektroskopisi).....	8
1.1.5.1.2. İnfrared spektroskopisi (IR spektroskopisi).....	8
1.1.5.1.3. Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS).....	8
1.1.5.1.4. Co-oximeter.....	9
1.1.5.1.5. CEDIA (Cloned enzyim donor immuno assey).....	9
1.1.5.2. Adli Toksikolojide Başlıca Kullanılan Kromatografik Yöntemler...9	
1.1.5.2.1. İnce tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi.....	10
1.1.5.2.2. Gaz kromatografisi (HS/GC) yöntemi.....	10
1.1.5.2.3. Gaz Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi (GC-MS).....	11
1.1.5.2.4. HPLC (High performance liquid chromatography);.....	11
1.1.5.2.5. Likit kromatografisi – kütle spektrometresi (LC-MS).....	12
1.1.5.2.6. Sıvı Kromatografi/Yüksek Çözünürlüklü Quadrupole- Orbitrap Kütle Spektrometre (LCS/MS/MS).....	13
1.2. ADLİ TIPTA ZEHİRLENMELER VE ÖNEMİ. ....	16
1.2.1. Zehirlenmelere Adli Tıbbı Bakış.....	16
1.2.1.1. Adli Tıpta Zehirlenmelerin Sınıflandırılması.....	16

1.2.1.2.	Zehirlenmelerde Örnek Alımı ve Dikkat Edilecek Hususlar.....	19
1.2.2.	Asfiktik Zehirlenmeler ve Asfiksi Kavramı.....	21
1.2.2.1.	Asfiksilerin Sınıflandırılması.....	22
1.2.2.2.	Yetersiz Oksijen İçeren Havanın ve Boğucu Gazların Solunması...24	
1.2.2.2.1.	Karbondiyoksit Maruziyeti (Zehirlenmesi).....	25
1.2.2.2.2.	Karbonmonoksit Maruziyeti (Zehirlenmesi).....	26
2.	ÇALIŞMA KONUSU ve HİPOTEZ .....	27
2.1.	. Nöroglobin nedir?.....	27
2.2.	Hipotezin Adli Toksikoloji ile İlişkilendirilmesi ve Literatür Bilgisi.....	28
3.	GEREÇ, YÖNTEM ve BULGULAR .....	36
3.1.	Çalışmaya Ait Bilgiler ve Çalışma Sahasının Hazırlanması.....	36
3.2.	Deneyin Yapılışı.....	37
3.3.	Analizlerin Yapılışı ve Analiz Sonuçları.....	40
3.3.1.	Kan Gazı Analizleri ve Analiz Bulguları.....	40
3.3.2.	Histopatolojik Analizler ve Analiz Bulguları.....	47
3.3.2.1.	Histopatolojik Analiz Hazırlıkları.....	47
3.3.2.2.	Histopatolojik Analiz Bulguları.....	47
3.3.3.	Biyokimyasal Analizler .....	51
3.3.3.1.	Homojenatların Hazırlanması.....	51
3.3.3.2.	Biyokimyasal Analiz Bulguları.....	55
3.3.4.	Moleküler Genetik Analizler.....	58
3.3.4.1.	Homojenatların Hazırlanması.....	58
3.3.4.2.	Moleküler Genetik Analiz Bulguları.....	59
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ .....	65
5.	ÖZET.....	69
6.	ÖZETİN İNGİLİZCE ÇEVİRİSİ (SUMMARY).....	71
7.	KAYNAKLAR.....	73

## **RESİM DİZİNİ**

Resim 1. CEDİA cihazı .....	9
Resim 2. İnce tabaka kromatografisi .....	10
Resim 3. HS/GC cihazı .....	11
Resim 4. GC-MS cihazı .....	11
Resim 5. LC-MS cihazı .....	12
Resim 6. Orbitrap LCS/MS/MS cihazı .....	13
Resim 7. Deneyin yapıldığı izole sistem ve sertifikalı CO/ CO <sub>2</sub> tüpleri .....	36
Resim 8. Deneyin yapıldığı alan.....	39
Resim 9. Yapılan kan gazı ölçüm sonuçları çıktısı .....	40
Resim 10. Kan gazı ölçümünün yapıldığı TÖTM kan gazı laboratuvarı .....	40
Resim 11. Kontrol grubunda beyin dokusu histolojik görünümü.....	47
Resim 12. CO grubunda beyin dokusu histolojik görünümü .....	48
Resim 13. CO <sub>2</sub> grubunda beyin dokusu histolojik görünümü ... ..	49
Resim 14. beyincik dokusunda histolojik görünümleri.....	50
Resim 15. Her bir gruba ait beyin doku örneklerinden saflaştırılan RNA'lar .....	58
Resim 16. $\beta$ -aktin/Ngb cDNA'larının PZR'deki çoğalımının agaroz jel elektroforezi.....	61



## **TABLO DİZİNİ**

Tablo 1. Çalışmada kullanılan deney gruplarına uygulanan karbondioksit ve karbonmonoksit dozu, uygulama süresi ve ortam koşullarının gösterilmesi .....	37
Tablo 2. Kan gazı parametrelerine ait sonuçları.....	41
Tablo 3. Biyokimyasal analizlerde kullanılan alet ve cihazlar .....	51
Tablo 4. Biyokimyasal analizlerde kimyasal maddeler .....	52
Tablo 5. CO, CO2 verilen ratlarda beyin dokusu TBARS, GSH, CAT, SOD ve GPx düzeyleri. ....	55
Tablo 6. Gruplarda ölçülen doku RNA spektrofotometrik absorban değerleri ve RNA miktarları.....	59
Tablo 7. Primer dizilimleri (Ek1 ve Ek 2).....	60
Tablo 8. Beyin <i>Ngb</i> gen ifadeleri .....	62



## **GRAFİK DİZİNİ**

Grafik 1. pH seviyesi.....	41
Grafik 2. cHCO <sub>3</sub> seviyesi .....	42
Grafik 3. CO grubundakilerde COHb seviyeleri .....	42
Grafik 4. pCO <sub>2</sub> seviyesi .....	43
Grafik 5. pO <sub>2</sub> seviyesi .....	43
Grafik 6. Hb seviyesi .....	44
Grafik 7. Hct seviyesi .....	44
Grafik 8. fO <sub>2</sub> Hb seviyesi .....	45
Grafik 9. cK seviyesi .....	45
Grafik 10. cNa seviyesi .....	46
Grafik 11. cCl seviyesi .....	46
Grafik 12. TBARS seviyesi .....	55
Grafik 13. GSH seviyesi .....	56
Grafik 14. CAT seviyesi .....	56
Grafik 15. SOD seviyesi .....	57
Grafik 16. GPx seviyesi .....	57
Grafik 17. β aktin/Ngb mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların PZR çoğalım eğrileri.....	61
Grafik 18. Beyin <i>Ngb</i> gen ifadeleri (minimum,maksimum,ortanca değerleri).....	62

## **1. GİRİŞ VE AMAC**

Adli Toksikoloji, adli olayların aydınlatılmasında ölçülebilir sonuçlar vermesi nedeniyle Adli Tıp Bilimlerin pratik uygulamasının önemli bir dalını oluşturmaktadır. Adli Toksikolojik analizlerde bulacağımız sonuçlara göre olayların orjininin belirlenmesine yönelik veri sağlaması ile adli olayların kesin ayrımı netlik kazanır. Gelişen analiz yöntemi ve bu yöntemlerin uygulandığı cihazlarının adli toksikoloji alanında kullanması ile günlük uygulamada karşılaşılan sorunlara çözüm bulunduğu gibi bilimsel ve teknolojik ilerlemeye de katkıda bulunmaktadır. Toksikolojik analizlerin objektif kriterler sağlayarak, çoğu zaman herhangi bir kuşkuya yer vermeden sonuçlanması analizlerin önemini göstermektedir. Örneğin; otopsi esnasında soğuğa bağlı gelişen bir ölü lekesinin karbonmonoksit zehirlenmesinde de benzer şekilde görülebileceği Adli Tıp pratiğinde karşılaşılan bir durumdur. Aynı zaman da açık bir alanda yanan bir cesetten bakılan kanda karboksihemoglobin (COHb) seviyesinin ölümcül sınırlar içerisinde olmaması tanı ve ayırıcı tanılarda problemlere yol açabilmektedir.

Karbonmonoksit (CO) ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>) hemoglobine, oksijenle yarışmalı ve geri dönüşümlü bir biçimde bağlanarak dokuya oksijen sunumunu azaltmanın yanı sıra enzimleri etkileyerek oksidasyon basamaklarında kimyasal tepkimeler aracılığıyla dokuda hücresel oksijen kullanımını azaltmaktadır. Etki mekanizmalarındaki farklılıklar nedeniyle uç organlarda farklı şekillerde ve derecelerde hasar oluşturdukları görülmektedir.

Karbonmonoksit (CO) zehirlenmesi beyin, kalp, böbrek, iskelet kası, deri, periferik sinir gibi hemen hemen bütün organları etkiler. Ülkemiz dahil gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, özellikle kış aylarında, karbonmonoksit zehirlenmelerine bağlı ölümler sıkça görüldüğü bildirilmektedir. Organik maddelerin tam olarak yanmaması nedeniyle karbonmonoksit oluşur. Zehirlenme nedenleri soba, şöfben vs gibi organik maddelerin ısınma amacı ile kullanımının yanı sıra; son zamanlarda medyadan da takip edildiği üzere maden ocaklarında karbonmonokside maruz kalmaya bağlı oluşmaktadır. Bu durumda tanı ve tedavi amacıyla karbonmonoksit zehirlenmesinin insan vücudunda yaptığı değişiklikleri açıklamak önem arz etmektedir. Klinik olarak tanı ve tedavi takibinde karboksihemoglobin (CO-Hb) düzeyi kullanılmakla birlikte, oluşan toksisite durumunun her insanda farklılık göstermesi ve ağırlık derecesinin her zaman için COHb düzeyi ile korale olmaması nedeniyle farklı mekanizmaların da toksisitede yer aldığı düşünülmektedir. Bu durumun

açıklanması için karboksihemoglobinden daha spesifik belirteçler bulmaya yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Karbondioksit ve karbonmonoksitin neden olduğu asfiksini ayırmasını yapabilmek kimyasal veya mekanik asfiksi arasında oluşacak farklılıkların saptanmasını kolaylaştıracaktır. Adli Tıp pratiğinde COHb düzeylerinin çok farklı düzeylerinde farklı klinik tablolara ve otopsilerde de farklı bulgulara neden olduğu görülmektedir.

Asfiksi olgularının ayırımında klasik bilgi olarak globin türevi olan hemoglobin ve miyoglobin üzerinden teoriler öne sürülmektedir. Neuroglobin (Nöroglobin) ise globin türevleri içerisinde bulunan yeni tanımlanmış bir monomerik globin türevidir. Nöro-endokrin dokularda nöroprotektif rolü olduğu yönünde çalışmalar yapılan ve nöroglobin, 2000'li yılların başında tanımlanmıştır. Nöroglobinin; hemoglobin ve myoglobin gibi hem-türevi içeren, insan ve omurgalılarda bulunan solunumsal bir protein olduğu belirtilmektedir. Çalışmalarda Merkezi sinir sisteminde (MSS) ve Çevresel Sinir Sistemi (ÇSS) en yüksek ifade düzeyine sahip olduğu, retinada yüksek olmakla birlikte esas olarak beyinde sentezlendiği bildirilmiştir. Adenohipofiz, böbrek üstü bezi, testisler gibi endokrin dokularda sentezlendiği yönünde görüşler mevcuttur. Beyinde hasar nedeniyle oluşan durumlarda, arsenik gibi nörotoksik ajanlara bağlı oluşan durumlarda nöroglobin sentezi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ancak; nöroglobin ile ilgili çalışmalarda oluşan hipoksik durumların nedenleri arasındaki farklılık olup olmadığı, karbonmonoksit veya karbondioksite maruziyet neticesinde oluşabilecek durumların ve kan biyokimyasındaki değişikliğin sentez üzerinde etkisi hususunda literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Bu araştırmada karbondioksit ve karbonmonoksite maruz kalan ratların beyin ve kan dokusunda biyokimyasal parametrelerin değişimi, beyin dokusunda nöroglobin gen ifade seviyeleri ve histopatolojik olarak beyin dokusundaki değişimlerin belirlenmesi amaçlandı. Karbonmonoksit ve karbondioksitin oluşturdukları asfiksi mekanizmalarının birbirinden farklı olması nedeniyle, maruz kalan sıçanlarda nöroglobin mRNA seviyelerinin birbirinden farklı olabileceği hipotezi kuruldu.

# **1. GENEL BİLGİLER**

## **1.1. TOKSİKOLOJİ**

### **1.1.1. Toksikoloji ile İlgili Genel Kavramlar**

Organizmalar yabancı birçok kimyasal maddelere maruz kalmaktadırlar. Organizmanın normal metabolizması için gerekli olmayan yabancı kimyasal maddeler *ksenobiyotikler* olarak adlandırılır ve toksikolojinin temel konusunu oluşturur. Toksikoloji "zehir bilimi" demektir. Zehrin sözlükte; “canlı organizmaya girdiğinde sağlığında bozulmaya, hatta ölüme yol açan mineral, bitkisel, hayvansal veya sentez yoluyla üretilmiş madde” olarak tanımlanır. Modern toksikolojinin uğraş alanı zehir, zehirlerin kaynakları, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, canlı organizmada uğradığı değişim ve etki mekanizmaları, toksik dozları, zehirlenmelerin tedavileri, zehirlerin izolasyonu, nitel ve nicel analizleri, toksik maddelerin güvenceli kullanımını sağlamayı ve ölçüm metotlarına standardizasyonların yapılmasını içerir (1-3).

### **1.1.2. Toksikoloji'nin Tarihçesi ve Adli Toksikolojinin Doğuşu**

Toksikolojinin konusu olan “zehir” kavramı çok eski bir geçmişe sahiptir. Arkeolojik araştırmalar ilk çağ insanının çeşitli bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklı zehirleri bildiklerini göstermektedir. Örneğin düşmanlarına karşı kendilerini korumak için zehirli glikozitleri içeren *Strophantus hispidus* ve *Strophan-Tuskombe* tohumlarının ekstrelerini ok zehri olarak bazı yerliler tarafından kullanıldığı bildirilmiştir. Tarihin her döneminde zehir, insanların kendilerini korumak ve düşmanlarını yok etmek için başvurdukları bir savaş aracı olmuştur. Tarihte zehirle intihar olaylarına da rastlanmaktadır. Yakın tarihteki zehirlenme olaylarından biri Ukrayna 2004' te meydana gelen Victor Yuşçenko'nun dioksin zehirlenmesi iddiasıdır. Diğer bir örnek olarak; Los Angeles Adli Tıp Kurumu'nun bildirimine göre Michael Jackson'ın ölümüne, uykusuzluk tedavisinde kullandığı çok güçlü anestezi ilacı propofolden zehirlenmenin neden olduğunu açıklanması olabilir. Kalemide saklanmış zehirle hayatına son veren Demosthenes (M.Ö.385-322), zehirli yılan ile intihar eden Kleopatra (M.Ö. 69-30) bu olaylara verilecek tarihsel önemi olan eski örnekler olarak verilebilir.

Toplum içerisinde kişiler sosyal, ekonomik, ahlaki nedenlerle sakatlıklara, hastalıklara hatta ölümlere sebep olurlar. Bireylerin topluma ve başka bireylere zarar

vermelerini yasalar, cezalar ile karşılar. Fransız yazar Montesque "Hiçbir kişi yaşadığı sosyal sisteme kusursuz bir şekilde uyum gösteremez. Devlet hiçbir zaman halktan mucize beklememelidir. Halkı kendine uydurmak için kanuna itaati öğretmelidir" demiştir. O halde toplum bireylerinin sağlıklarını bozma, ölüm ve sakatlıklara sebep olma durumlarında yasalar failleri cezaya çarptırması doğal bir gereklilik olarak yorumlanabilir. Bir suça karşı cezanın takdir ve tespiti yargı organının görevidir. Bir yargıcın ceza verebilmesi için suç ile oluşan zararı bilmesi veya söz konusu hareket ile oluşan zararın ilgisini kurması gerekir. Bu zararı tespit etme işi tıbbın konusudur. Zira organların karmaşık fonksiyonlarını, oluşan hastalık ve sakatlıkları doğru bir şekilde hekimler değerlendirebileceklerdir. Bu sebeple *Adli Tıp* bilimi doğmuş ve gelişmiştir (4-7) .

Adli Tıp biliminin ana kollarından birini oluşturan *Adli Toksikoloji*; zehirlenme olgularını hukuksal boyutta inceler. Zehirlerin kimyasal ve biyolojik özellikleri arasında ilk ilişki kuran İspanyol asıllı Orfila (1787-1853) modern toksikolojinin kurucusu olarak tanınır. Orfila, adli toksikolojinin temellerini atmış ve ölümlü sonuçlanan bir zehirlenme olayında, kimyasal analizden yasal bir delil olarak gerekliliğini belirtmiştir. Rönesans devri bilginlerinden olan Paracelsus (M.S. 1493-1541), "Bütün maddeler zehirdir, zehir olmayan hiçbir madde yoktur, zehirle devayı (ilacı) birbirinden ayıran onun dozudur" şeklindeki görüşü ile ilk kez biyolojik etkide doz-cevap ilişkisinin önemini vurgulamıştır. Paracelsus, böylece kimyasal maddenin biyolojik etkilerinin deneysel araştırmalara dayandırılmasını, kimyasal maddenin "terapötik" ve "toksik" özelliklerinin farklılaştırılması gerekliliğine yönelik, toksikolojide önemli olan prensipleri öne sürmüştür. Uygulanan toksik maddenin miktarı ile biyolojik sistemin yanıt değeri arasında bir ilişkisi olduğu hakkında görüşlerini bildirmiştir. Bu görüşler ilerleyen süreçte toksikolojik analizlerin temel ölçüm parametreleri olan Toksik Doz (TD) ve Letal Doz (LD) terimlerinin tanımlanmasını sağlamıştır. Medyan toksik doz (TD50) uygulananların %50'sinde toksik etkiler gösteren doz anlamında kullanılır. Medyan Letal Doz (LD50) ise belirli bir maddenin tek dozla uygulananların % 50'sini istatistiksel olarak öldürmesi beklenen mg/kg cinsinden miktarı ifade eder. Kimyasal maddelerin,"letal dozları" çok geniş bir sınır içine yayılmıştır. Örneğin, organik fosforlu bir insektisit olan malationun insanlar için öldürücü dozu (MLD: Minimal letal dozu) 60 gram (g) iken, aynı sınıftan olan metil paration için bu değer 100 miligram (mg)'dır (4-6,8).

### **1.1.3. Toksikoloji Biliminin Alt Dalları, Komşulukları ve Adli Toksikoloji ile İnterdisipliner İlişkileri**

Toksikoloji multidisipliner bir bilim dalı olup, kimya, fizik, matematik, biyoloji, farmakoloji, fizyoloji, patoloji, biyokimya, immünoloji ve halk sağlığı gibi bir çok bilim dalları ile iç içedir. Geçmişte yalnız ilaç toksisitesi ve bilinen birkaç zehirden bahseden bir bilgi olarak farmakoloji dersleri içinde anlatılan toksikoloji, bu günkü gelişme devresi içinde ayrı bir bilim dalı haline gelmiştir. XX. yüzyılda toksikoloji hızla bir gelişme göstermiştir. Birçok toksik ve terapötik maddelerin etki mekanizmaları araştırılırken diğer taraftan "antidot" kavramı ve tedavisi ortaya çıkmıştır. Carl Voegtlin ve arkadaşları tarafından (1923) dimerkaprol (BAL)'un organik arsenikli bileşikler üzerindeki etki mekanizmalarını araştırmışlardır ve bunun gibi pek çok örnek vardır. Özellikle I. Dünya Savaşını takip eden yıllardan sonra toksikolojinin alanını genişleten bilimsel olaylar meydana gelmiştir. Organik halojenli bileşiklerin 1920'li yıllardan sonra insektisit olarak kullanımları, 1930'lu yıllarda farmasötik endüstrideki büyük atılım, 1940-1946 arasında organik fosfat esterlerinin savaş gazı, insektisit olarak üretimleri, radyoaktif elementlerin kullanımı toksikolojik araştırmaları hızlandırmıştır. Özellikle sitokrom P-450 proteinlerinin bulunuşu ile ksenobiyotiklerin biyotransformasyon ve detoksikasyon mekanizmaları çalışmaları önem kazanmıştır. İlaç ve kimyasal maddelerin kan ve idrarda incelenmeleri, kan düzeyi ile biyolojik etki (doz-cevap) ilişkisinin araştırılmasını sağlamıştır. Gelişen teknoloji ile birlikte herhangi bir maddenin organizmada oluşturduğu biyokimyasal ve genetik değişikliklerin ölçümü yapılabilmektedir. Dolayısıyla teknolojinin getirdiği yeniliklerle direkt toksik madde analizlerinin yanı sıra, bu maddenin organizmada yaptığı enzimatik tepkimelerde, protein sentezlerinde ve çeşitli biyokimyasal parametrelerin analizine imkan sağlaması adli toksikolojinin çalışma sahasını genişletmektedir (9,10).

Toksikoloji biliminin alt gruplarını; adli toksikoloji, klinik toksikoloji, çevre toksikolojisi, tanımlayıcı toksikolojisi, ekotoksikoloji endüstri toksikolojisi, mesleki toksikoloji, analitik toksikoloji, farmasötik toksikoloji, davranış toksikolojisi, genetik ve biyokimyasal toksikolojisi oluşturur.

### **1.1.4. Adli Toksikoloji ve Adli Toksikoloji İlgili Kavramlar**

Adli toksikoloji, amacı ve toplumsal yönleri itibariyle günümüzde de önemini korumaktadır. Adli toksikoloji zehirlenmenin hukuksal yönünü değerlendirir ve maruz

kalınan kimyasal maddenin doz-etki ilişkisinin yorumunu yapar. Kimyasal maddelerle zehirlenme sonucu oluşan ölüm olaylarını ve zehirlenmelerde etkin olan maddelerin istatistiksel değerlendirilmesindeki analiz sonuçları ile adli tıbbaya yardımcı olur. Adli toksikoloji, halk sağlığı, epidemiyoloji, biyo-istatistik, kromatografi, spektrofotometre, kinetik/dinamik farmakoloji ve analitik kimya bilim dalları ile yakından ilişkilidir.

Adli toksikoloji en genel anlamı ile kimyasal maddelerin canlılarda olumsuz etkilerini araştıran toksikolojinin en eski ve gelişen dalıdır. Adli toksikoloji üç ana başlık altında toplanır: Bunlar; postmortem toksikoloji; doping analizleri; uyuşturucu ve ilaç analizleridir. İncelenecek örneğin alımı, zamanlaması ve alınacak dokunun değişkenlik göstermesine rağmen, adli toksikolojinin ana başlıklarını oluşturan konularda genel yaklaşımlar benzerlik gösterir. Adli toksikoloji zehirlenme teşhisini, zehirlenmenin nedenini, alındığı şüphe edilen, iddia edilen zehrin tipini, ölümdaki etki veya rolünü inceler. Toksik maddelerin analizlerini yapar ve analiz yöntemlerini araştırır. Toksikolojik soruları cevaplandırmaya çalışır.

Güncel bir örnek olarak madde bağımlılığı verilebilir. Madde bağımlılığı tüm dünyada hızla artarak çok önemli bir toplumsal sorun niteliği kazanmıştır. Yasa dışı madde kullanımının yaygın olduğu ülkelerde, madde bağımlılarının hem bireysel hem de toplumsal sorunlarının giderek artması yasal önlemler almayı zorunlu hale getirmiştir. Alkol bağımlılığı ve madde bağımlılığı sadece bağımlıyı değil ailesini, çevresini ve tüm toplumu etkileyen ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Bağımlılık bir süreç içinde gelişir ve tedavide de değişik aşamalardan geçilir. Bu nedenle erken tanı, yani sorun henüz başlangıç aşamasındayken tespit edilmesi, kişinin yaşamında fazla yıkım oluşturmadan müdahale edilmesi önemlidir. Adli toksikolojinin toplumsal anlamda kullanım alanlarını çoğaltmak mümkün olmakla birlikte genel olarak;

***Postmortem adli toksikoloji***, ölüm nedeninin araştırılmasına yönelik analizler,

***Klinik adli toksikoloji***, fail ve kurbanlar ile ilgili toksikolojik analizlerin yapılması, uyuşturucu etkisi altında işlenen suçlara yönelik analizler, uyuşturucu kullanıcıları/kaçakçılarının tespitine yönelik analizler, kötü muamele, iş kazaları, alkollü olarak veya uyuşturucu etkisi altında araç kullanma, işyeri, ordu, hapisane, okul vb. yerlerde uyuşturucu testi, uyuşturucu bağımlılarının tedavisi, çocuk refahı, klinik ve terapötik ilaç doz izlemi, doping kontrolü ve çevresel toksikoloji sayılabilir.

Toplumu ilgilendiren zehirlenme, doping veya madde bağımlılığı gibi olaylarda, önlemlerin alınması için sorunların tespiti ve söz konusu olaya yönelik soruların cevabının net bir şekilde ölçülebilir metotlarla ortaya konulması aşamalarını adli toksikoloji yerine getirir. Bu aşamalarda madde kullanımı sırasında oluşabilecek zehirlenmelerin klinik bulgularının değerlendirilmesi, bunlarla ilişkili vücut biyolojik yapısındaki maddenin saptanması ile ilgili yöntemler ve klinik yorum yapma işlevini de adli toksikoloji yapar (8,11-13).

### **1.1.5. Adli Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Başlıca Yöntemler ve Teknolojik Gelişimleri Takip Etmenin Gerekliği**

Bir örnekte bulunan bileşen ve/veya bileşenlerin (atom, iyon, molekül) tayinine kalitatif (nitel) analiz denir. Bileşenin miktar veya derişiminin tayinine de kantitatif (nicel) analiz denir. Toksikoloji laboratuvarında toksik maddelerin analizleri numunenin özelliği de göz önüne alınarak başlıca spektroskopik (ışının madde ile etkileşimini inceleyen) ve kromatografik (bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde birbirinden ayrılması ve saflaştırılması) analiz yöntemleri ile yapılır. Kullanılan yöntemler;

#### *I. Kalitatif ölçümler,*

- Kimyasal renk testleri,
- İTK (İnce tabaka kromatografisi)

#### *II. Yarı Kantitatif Ölçümler*

- CEDİA (Cloned enzyim donor immuno assey)

#### *III. Kantitatif ölçümler; (Kromatografik yöntemler)*

- Sıvı Kromatografi/Yüksek Çözünürlüklü Quadrupole-Orbitrap Kütle spektrometre (LC/MS/MS)
- Sıvı Kromatografi/Kütle spektrometre (LC/MS)
- Gaz Kromatografi/Kütle spektrometre (GC/MS)
- Gaz Kromatografi (GC/ECD Electiron Capture Detector)
- Gaz Kromatografi (HS -GC) şeklinde sıralanır.

Bu yöntemler ölçüm şekli itibari ile genel olarak spektroskopik ve kromatografik yöntemler olarak iki ana başlık altında incelenir.



### **1.1.5.1.Spektroskopi ve Adli Toksikolojide Kullanılan Spektroskopik Yöntemler**

Spektroskopi, ışının madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve değerlendirilmesi esasına dayanır. UV Görünür Bölge Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi, IR Spektroskopisi, Raman Spektroskopisi, NMR Spektroskopisi, X-Işınları Spektroskopisi, Radyokimya, Kütle Spektroskopisi, Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi, Atomik Emisyon Spektroskopisi gibi türleri vardır (8,13-16).

**1.1.5.1.1.Ultraviyole spektroskopisi (UV spektroskopisi);** 110-1000 nm dalga boyları ışınları yayan cihazlar ultraviyole ve görünür alan spektroskopisi olarak adlandırılır. Kalitatif ve kantitatif analiz için kullanılır. Temel mantığı, hazırlanan çözeltiden belirli spektrumlarda ışık geçirilmesi ve bu ışının ne kadarının çözelti tarafından absorblandığının bulunmasıdır. Çözeltinin içerdiği madde miktarı ne kadar fazla ise daha fazla ışın, çözelti tarafından soğurulur. Spektrofotometre, çözeltinin içinden geçebilen -çözelti tarafından absorblanmayan ışığın yoğunluğunu tespit ederek çözelti içeriğindeki aranan maddenin miktarı hakkında kantitatif bilgi verir.

**1.1.5.1.2.İnfrared spektroskopisi (IR spektroskopisi);** Molekülleri oluşturan atomlar sürekli bir hareket içinde olduklarından, molekülün öteleme hareketleri, bir eksen etrafında dönme hareketleri ve bir kimyasal bağın uzunluğunun periyodik olarak azalıp çoğalmasına veya moleküldeki açıların periyodik olarak değişmesine neden olan titreşim hareketleri meydana gelir. IR bölgesinin 1300 cm<sup>-1</sup>– 650 cm<sup>-1</sup> (7500 – 15000 nm) frekans aralığı tamamen moleküle özgü molekül yapısından etkilendiğinden bu frekans aralığına parmak izi bölgesi denir. Bu bölgede oluşan spektrumlar yorumlanarak maddenin kimyasal yapısı tahmin edilebilir.

**1.1.5.1.3.Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS);** Temel düzeydeki element atomlarının UV-görünür bölgedeki monokromatik ışınları Lambert-Beer yasasına göre absorplaması ilkesine dayanmaktadır. Lambert-Beer yasasına göre, absorplanan ışık miktarı  $A=\epsilon bC$  eşitliğiyle verilmektedir. Atomların absorpladıkları ışığın dalga boyunun element türü için karakteristik olması kalitatif analizi sağlar. Farklı derişimlerdeki bir dizi analit çözeltileri için okunan absorbans değerlerinin derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak da kantitatif analiz yapılır.

**1.1.5.1.4.Co-oximeter;** Karbonmonoksit (soba, şofben, eksoz gazı...) zehirlenmelerinde ortamda oksijen yokluğunda kanda oluşan Karboksihemoglobin (COHb) seviyesini ölçmekte kullanılır. Ölçüm UV-Spektrofotometrik yöntemle yapılır. COHb yüzdesi, toplam hemoglobindeki karboksihemoglobin yüzdesidir. Ölçüm hemoglobin oranına dayandığından kan örneği seyreltilebilir.

**1.1.5.1.5.CEDIA (Cloned enzyim donor immuno assey);** İmmuno denemeler hedef taramalar açısından elverişlidir. Kan serumunda ve idrarda, amfetamin, esrar, opiatlar (morfin, eroin, 6-MAM), benzodiyazepin, TCA (trisiklik bileşikler), kokain, barbituratlar gibi sistematik kapsamda olan ve yoğun olarak kullanılan uyuşturucu ve uyarıcı madde analizlerinde kullanılır. Serum ve idrar cihaza direkt olarak verilebilir. Semi-kantitatif ölçüm yapılır. Reaktiflerin pahalı olması bu yöntem için bir dezavantajdır.



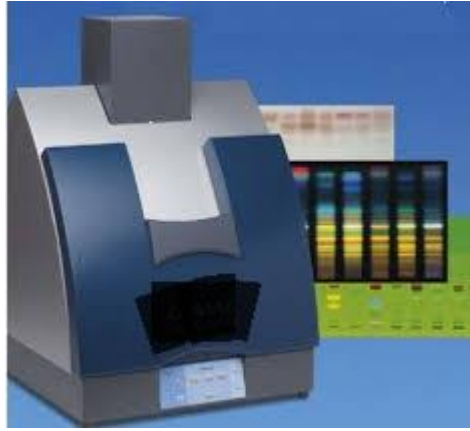
**Resim 1: CEDİA cihazı**

### **1.1.5.2. Kromatografi ve Adli Toksikolojide Kullanılan Kromatografik Yöntemler**

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde birbirinden ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Genellikle belli uzunluktaki bir kolon, bir dolgu maddesi ile doldurulur ve bu madde sabit faz adını alır. Örnek, kolonun bir ucundan bırakılır ve öteki ucuna kadar hareketli bir faz ile taşınır. Dolgu maddesi ile etkileşme nedeniyle örnekteki bileşenler değişik sürelerde kolonu terk ederler. Kolondan çıkan bileşenlerin derişimlerinin uygun bir yöntemle ölçülerek zaman veya hareketli fazın

hacmine karşı çizilen grafik kromatogramı oluşturur. Çeşitli kromatografi türleri vardır. Örneğin, hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türünde sabit faz bir dolgu maddesi üzerine tutturulmuş sıvı film ise bu kromatografi türüne sıvı-sıvı kromatografisi denir. Hareketli ve sabit fazdaki sıvıların polarlıkları farklı olmalıdır. Genellikle hareketli faz olarak hegzan gibi apolar bir sıvı, dolgu maddesi olarak etilen glikol gibi polar bir sıvı kullanılır(8,13-16).

**1.1.5.2.1.İnce tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi;** Bu yöntemde sabit faz olarak silika veya alüminyum kullanılırken hareketli faz olarak solvent veya solvent karışımları kullanılır. Değerlendirme Rf değerine göre yapılır.



**Resim 2:** İnce tabaka kromatografisi

**1.1.5.2.2.Gaz kromatografisi (HS/GC) yöntemi;** Gaz kromatografisinde hareketli faz gazdır. Uçucu özellikteki bütün organik maddeler bu yöntemle belirlenebilmektedir. Mikrolitre ölçeğindeki sıvı numune cihazda buharlaştırılır ve taşıyıcı gaz ile cam veya metal kolondan geçirilir. Kolonda tutulan kimyasal bileşikler cihazın ısınma programı ile tekrar gaz fazına geçerek detektöre ulaşır ve burada fiziksel veya kimyasal reaksiyonlarla cihaza kaydedilir. Numunedeki uçucu toksik bileşiklerin analizlerinde kullanılır. Numune olarak daha çok kan kullanılır. Numunede etanol-metanol seviyelerinin ölçümü yapılır. Ayrıca tiner ve bali bağımlılarında etken maddelerin aranması, Eter-kloroform analizi gibi uçucu toksik analizleri de bu cihazla yapılır. Ölçüm kromatografik yöntemle yapılır. Taşıyıcı gaz olarak azot kullanılır. Oluşan kromatogramda her bileşik için bir pik kaydedilir ve bu pikin alanı kimyasalın miktarı ile doğru orantılıdır. Ölçülmek istenen bileşik veya bileşiklerin standart konsantrasyonları da cihazda okunmak suretiyle konsantrasyonları belirlenir. Klor veya bromür içeren organik bileşikler Electron Capture Detector (ECD) ile analiz edilir. Toksikolojik analizde alkol analizleri cihaz için en sık

kullanım alanıdır. Numunelere belirli konsantrasyondaki iç standart eklenerek analiz yapılır. Daha çok kan kullanılır.



**Resim 3:** HS/GC cihazı

**1.1.5.2.3. Gaz Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi (GC-MS);** Gaz Kromatografisi (GC) - Kütle Spektrometresi (MS) birlikte çalışan iki üniteden oluşan kombine bir cihazdır. Hafızasında bulunan 300.000'in üzerinde farklı kimyasalın kromatografik yolla analizi yapılır. Aranacak madde kapiler kolondan Helyum gazı ile geçirilir. MS dedektöre ulaşır ve iyonlarına ayrışması sağlanır. Aranacak maddenin kütle spektrumları kütüphanedeki standart madde spektrumları ile karşılaştırılır. Tıbbi teşhislerde, bitki ve gıda analizlerinde, ilaç ve uyuşturucu metabolitlerin incelenmesinde, çevre ve pestisit analizlerinde kullanılmaktadır.



**Resim 4:** GC-MS cihazı

**1.1.5.2.4. HPLC (High performance liquid chromatography);** Yüksek performanslı sıvı kromatografidir. Sabit fazlı sıvı olan kromatografi çeşitleri arasında en sık

kullanılanıdır. Kolondan taşıyıcı olarak sıvı faz geçirilir. Kolonda ilerleme yüksek basınç ile sağlanır. Kütüphanesi olmadığından öncelikle aranacak maddelerin standartlarının metot oluşturularak cihaza yüklenmesi gerekmektedir. HPLC ile doğal olarak gaz hale gelemeyen bileşenler (pestisitler, karbonhidratlar, hidrokarbonlar, ilaçlar, nükleik asitler gibi) analiz edilebilir ve aflatoksin tayinleri yapılabilir. Benzodiyazepinler ve trisiklik bileşikler ve amfetamin analizleri için önemli bir cihazdır.

**1.1.5.2.5.Likit kromatografisi – kütle spektrometresi (LC-MS);** HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ve MS (Kütle Spektrometresi) ünitelerinin birlikte çalıştırılarak yapı aydınlatması ve miktar tayininde kullanılan bir cihazdır. Ayrıca HPLC ve MS üniteleri birbirinden bağımsız olarak da çalışabilmektedir. Bu metodla analiz edilen bileşikler; aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, yağ asitleri, karbonhidratlar, fenoller, pestisitler, antibiyotikler, metal-organik bileşikler ve birçok inorganik maddelerdir.



**Resim 5:** LC-MS cihazı

Sıvı Kromatografisi; kararsız bileşikler analiz olanağı, polar bileşikler derivatizasyon olmaksızın analiz olanağı, büyük kütleli bileşikler analiz olanağı, daha kısa örnek temizleme süresi gibi olanaklar sunarken bunun yanında LC-MS; Ek yapısal bilgi, çok daha kısa örnek temizleme süresi, MS/MS ile daha fazla özgünlük, Metabolit analizi gibi avantajlar sağlar. Yüksek fiyat, kullanım zorluğu (operatör eğitimi), yüksek azot gazı tüketimi (hava kompresörü, azot jeneratörü), yüksek bakım maliyeti, hararet ve gürültülü çalışma (havalandırma, özel cihaz tablaları), iyon baskılama özellikleri ise LC-MS'in dezavantajlarıdır.

**1.1.5.2.6.Sıvı Kromatografi/Yüksek Çözünürlüklü Quadrupole-Orbitrap Kütle Spektrometre (LCS/MS/MS);** Klasik LCMSMS cihazları ile cihaza tanıtılan bileşikler ancak ölçülebilir. Her bir analizi cihaza tanıtmak için o analizin referans standardına ihtiyaç vardır. Birçok sentetik uyuşturucunun standartı ya bulunmamakta ya da çok geç temin edilebilmektedir. Sıvı Kromatografi/Yüksek Çözünürlüklü Quadrupole-Orbitrap Kütle Spektrometre (LCS/MS/MS) cihazı son teknolojinin toksikoloji ve dolayısıyla adli toksikoloji pratiğine kazandırdığı bir kromatografik ölçüm cihazıdır. Orbitrap sistemiyle bileşik taraması için standarda gerek yoktur. Böylece laboratuvara gelen numuneler orbitrap cihazıyla standart olmaksızın taranabilir ve sadece pozitif sonuçlar miktar tayini için analiz edilebilir. Bu durum ayrıca cihazda standart ve kimyasal madde kullanımını azalttığından işletim giderlerini düşürmüştür.



**Resim 6:** Orbitrap LCS/MS/MS cihazı

Gelişen teknoloji ve bilimsel yaklaşımlar ile birlikte adli toksikolojiyi ilgilendiren çalışmalarda kullanılan yöntemlerde de ilerleme kaydedilmiştir. Biyokimyasal parametrelerin ve toksik ajanların nitel ve nicel analizlerinin yapılması kullanım açısından geliştirilmiş yöntemler sayesinde hızlanması ile *Biyokimyasal Toksikoloji* kavramı kullanılmaya başlamıştır.

**Biyokimyasal Toksikoloji;** Ksenobiyotiklerin toksikokinetik özelliklerini ve hücresel etkilerinin (enzim, pH değeri vs.) belirlemek için in vitro ve in vivo araştırmaları yapan toksikolojinin alt dalı olarak tanımlanır. Toksikolojinin önemli bir alt dalı olan Adli Toksikoloji ile iç içedir. Adli Toksikolojiyi ilgilendiren bütün olayların biyokimyasal boyutu olması nedeniyle ortak çalışma alanlarının olduğu her vakada görülür.

Bu alanda kullanılan cihaz ve yöntemler teknoloji ile birlikte artmaktadır. Sitotoksisite testleri (LDH, MTT/XTT, NRU), Lipid peroksidasyon ürünlerinin ve antioksidan sistem parametrelerinin spektrofotometrik ve kromatografik tayinleri (MDA, GSH, total glutatyon, methemoglobin ve antioksidan enzimlerin aktivite tayinleri) kullanılan yöntemlere örnek olarak verilebilir (7-8,17-22) .

Toksikolojik ajanların ölçümü kadar, organizmada genetik faktörler (DNA, RNA, protein sentezi) üzerinde olan etkilerini incelenmeye yönelik çalışmalar da artmıştır. Bu çalışmalardaki temel amaçlardan biri, organizmada direkt olarak ölçümü mümkün olmayan veya çeşitli nedenlerle tespit edilemeyen maddelere yönelik organizmanın verdiği varsa özgün cevabın bulunması ve analizlerin verilen cevap üzerinden yapılmasına imkân sağlamaktır. Gelişen teknoloji ile birlikte, genetik anahtarın çözülmeye başlanması, proteinler ve proteınlerin sentezleyen genetik materyallerin tespiti ile toksikoloji biliminin koralasyonu ile *Genotoksisite* kavramı tanımlanmıştır. Böylece toksikolojinin bir alt dalı olan *Genetik Toksikoloji* tanımlaması literatüre kazandırılmıştır(8,13-16).

**Genetik Toksikoloji;** organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin genetik yapılarında (DNA, RNA, protein sentezi vs) meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir. Çeşitli ajanlar aracılığı ile ortaya çıkan genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir. *Genetik toksisite* ya da *genotoksisite*; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploidide gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise *genotoksik etki* olarak tanımlanmaktadır. Genetik etkilere bağlı oluşan değişiklikler mutajeniteye neden olarak genetik yapıyı bozabileceği gibi, transkripsiyon üzerine etkiyerek gen aracılı oluşan ürünün normalden fazla veya az sentezlenmesine de yol açabilir. Biyokimyasal ve genetik toksikoloji alanlarını ilgilendiren çalışmalar literatürde yer almaktadır. Biyokimyasal toksikoloji gibi, genetik toksikolojinin de adli toksikoloji ile olan ortak çalışma alanları mevcut olup, bu çalışma alanları istatistiksel olarak gün geçtikçe artış göstermektedir(23-26).

Toksikolojik analizlerin genetik yönleri gelişen teknolojiyle birlikte daha iyi anlaşılakta ve Adli Toksikoloji açısından sonuçların daha güvenilir ve hızlı bir şekilde

elde edilmesine olanak sağlamaktadır. PCR-RFLP tekniği, genotoksisite testleri (Mikroçekirdek testi, AMES testi, Umu-test, Comet testi), Western blot tekniği ile protein analizleri, epigenetik alışmalar (Global metilasyon tayini, Metilasyona zg PCR (MSP), Kombine bisülfit restriksiyon analizi (COBRA), Bislfit dizileme, DNA immunopresipitasyon (MeDIP) tekniği, çeşitli maddelerin farklı matrikslerde HPLC-PDA/FLD ile analizleri) günümüzde genetik toksikoloji alanında kullanılan yöntemlere örnek olarak verilebilir(7, 15,21, 22, 27, 28).



## **1.2.ADLİ TIP'TA ZEHİRLENMELER VE ÖNEMİ**

### **1.2.1. Zehirlenmelere Adli Tıbbi Bakış**

Zehirlenme herhangi bir kimyasal maddenin dokulara hasar vermesi demektir. Her madde belli bir miktarın üstünde verilirse vücutta zehirlenmeye ve belli başlı semptomlara neden olabilmektedir. Tıbbi tedavide kullanılan ilaçların hemen hepsinde önerilen dozun aşılması zehirlenmelere neden olabilmektedir. Bu noktada tedavi edici dozun üzerinde bir ilaç kullanımı ilacın organizmaya zarar verecek düzeye (toksik doz) ulaşması söz konusudur. Tedavi edici ve toksik doz arasındaki sınır bazı ilaçlar için çok dardır. Terapötik etkinin görüldüğü dozun çok az üstüne çıkılması, istenmeyen yan etkilere neden olabilmektedir. Bazı maddeler ise çok az dozlarda bile zararlı olduklarından zehir olarak adlandırılır. Bazıları için ise bu doz aralığı çok fazladır. Bilinen en toksik maddelerden biri plütonyum, diğeri ise hint yağı tohumundan elde edilen Ricin'dir. Endüstride, kimya sanayiinde, tarımda ve evlerde yaklaşık 80.000 çeşit kimyasal madde kullanılmakta ve her yıl 1000 kadar yeni madde sentetik veya doğal yolla elde edilerek bunlara katılmaktadır. Bu maddelerin her biri değişik organlara etki ederek zehirlenmelere yol açabilme özelliğine sahiptir. Organizmaya her bir maddenin farklı ve özel etkisi bulunmaktadır. Tüm bunları tek tek bilebilmek pratik olarak mümkün değildir. Ülkelerin büyük çoğunluğunda, ulusal zehirlenme merkezlerinin kurulmasındaki temel neden, bu maddelerin tek tek bilebilmenin pratik olarak mümkün olmaması sayılabilir (10,29-31).

Zehirlenme olgularının orijin açısından değerlendirilmesi hukuki süreçler için önem arz etmektedir. Zehirlenmelerin büyük çoğunluğu kaza sonucu oluşmaktadır. İntiharlara da rastlanılmaktadır. Cinayet ise nadirdir. Gelişmiş ülkelerde, gelişen teknolojiye paralel olarak zehirli maddenin tespit edilmesinin kolay olması, cinayetlerde kullanılmamasını açıklayacak önemli noktalar arasında sayılabilir. Çoğu maddenin amacı dışında kaza olarak alımı veya intihar amaçlı kullanımı klinik toksikolojide görüldüğü kadar adli tıp pratiğinde ve otopsilerde de görülmektedir. Ayrıca, klinik toksikolojide oluşan tüm olgularda orjin ne olursa olsun (kaza, intihar, cinayet) hukuki boyutu olacağı için Adli Tıp ve Adli Toksikoloji süreci ile her zaman iç içe incelenmesi gerekmektedir (29,30).

#### **1.2.1.1. Adli Tıpta Zehirlenmelerin Sınıflandırılması**

Adli Tıp pratiği açısından zehirlenmeleri yaygın ve bireysel başlıkları altında, iki ana grupta incelemek mümkündür. Yaygın grup, geniş kitlelerin zehirlendiği olgular (çevresel

zehirlenmeler, endüstriyel zehirlenmeler vs.) olarak tanımlanır. Bireysel grup ise kişilerin tek olarak zehirlendiği olgular (kaza sonucu zehirlenmeler, ilaca bağlı zehirlenmeler, intihar ve cinayet orjinli madde alımları vs.) olarak tanımlanır. Zehirlenmeler, oluş tarzına göre değişiklik gösterebilir. Örneğin; tarımsal ilaçlardan kaynaklanan bir zehirlenme bir kişi ile sınırlı kalabileceği gibi, birden fazla kişiyi etkileyerek geniş kitlelerin zehirlendiği olgular kapsamında da değerlendirilebilir.

Adli Tıp pratiği açısından zehirlenmeleri etiyolojik açıdan sınıflandırmak da mümkündür. Bunlarla ilgili birkaç örnek sıralayacak olursak çevresel, tarım, ilaç vs olarak sınıflandırılır.

*Çevresel zehirlenmeler;* yaygın, geniş kitlelerin zehirlendiği olgular kapsamında değerlendirildiğinde ilk sırada değerlendirilebilir. Temel olarak havada bulunan duman ve benzeri hava kirletici ve çevrede bulunan bazı maddeler, neden olmaktadır. Motor egzozları, kömür dumanı, kurşun, kükürtdioksit gazı, karbonmonoksit gazı vs. gibi yanma ürünleri çevresel zehirlenme etkenleri içerisinde başta gelen örnekler arasındadır. Motorlu araç egzozlarından çıkan gazda da %2-10 arasında karbon monoksit (CO) gazı çıkmakta ve bu nedenle, uzun süreli arabada kullananlarda kronik şekilde kanda CO düzeyinin yükselmesine neden olduğu görülmektedir. İnsan organizmasında yaşamsal süreçte en önemli unsurlar olan sinir sistemi, dolaşım sistemi ve solunum sistemine etki eden maddeler nedeniyle ölüme sebep olabilecek kadar ciddi kazalar görülebilmektedir (32-34).

*Tarım ilacı zehirlenmeleri,* (pestisitler, insektisit, fungusit veya herbisit) gruplarından biri olabilir. Kırsal kesimde yaygın olarak kullanılan organofosfor bileşikler Bunlar içerisinde en sık rastlanılan gruptur. Vücuda geçişleri genellikle hava yolu veya deri ile olur. Kasların uyarıcı sinirlere etki ederek paralizisi (felç) oluştururlar. Bu olaylar genellikle kaza orjinlidir. Kişisel zehirlenmeler olduğu gibi, bazen de toplu olarak zehirlenmeye bağlı ölüm olguları görülebilmektedir (35).

*İlaç (latrojenik) zehirlenmeleri,* bireysel olarak görülen zehirlenmelerin başında gelmektedir. İlaç piyasasının genişlemesi, farklı isimler ile ilaç çeşitliliğinin ve kullanımının artması, söz konusu artış ile birlikte ilaca bağlı zehirlenme olgularının da sayısal olarak artmasına neden olarak sayılabilir. Özellikle ülkemizde, son yıllarda uygulanan sıkı reçete takip sistemine rağmen, reçetesiz ilaç kullanımı yaygın olduğundan ilaç zehirlenmesine bağlı ölümler görülebilmektedir. İlaç kullanımı sonucu ölümler kaza

orijinli olabileceği gibi intihar amaçlı ya da cinayet orijinli de olabilir. Her ilacın (reçete ile kullanılan ya da başkaları) belirli koşulların bir araya gelmesi ile ölüme sebep olabileceği unutulmamalıdır. Örneğin; entelektüel kapasitesi yüksek olmayan ve doktorlar tarafından da yeterli şekilde aydınlatılmayan bir hastanın; aynı içeriklere sahip birisi karışım şeklinde (örn; kalsiyum kanal blokeri+anjyotensin reseptör blokeri) diğeri tek içerikli olan (kalsiyum kanal blokeri) ilacı alarak yüksek doz alıma bağlı, kardiyak atriyoventriküler bloğa girmesi sonucu gelişen ölüm olgusu acil serviste çalışırken gördüğümüz olgular arasındadır. Bu örnekteki olay; hastanın öz geçmişi ve yanında gelenlerin beyan ettiği, her gün düzenli bir şekilde kullandığı ilaçlar incelenince fark edilmiştir. Yeterli araştırma yapılmadığı olgularda bu durum saptanamayabilir. Kanunsuz üretime bağlı ilaç üretimi de önemli bir problemdir. Denetlenmeyen ilaçlara bağlı ölümler sıklıkla gözlenmektedir. Ayrıca bu noktada denetleyicini hangi birim olduğu önem arz etmektedir. Çoğu bitkisel destek ürünü kapsamında üretilen, ancak günlük hayatta ilaçmış gibi kullanılan ürünlerin denetiminin ülkemizde yetkin birimler tarafından yapılmamasının neden olduğu problemler görülebilmektedir. Çünkü içeriğinde söz konusu ürünlerin içerisinde bulunan maddeler, her ne kadar bitkisel kaynaklı olarak değerlendirilse de, hijyen, doz ve farklı kişilerde oluşturacağı zararlar bakımından tehlikeli hal alabilmektedir. Bu konuyla ilgili daha önce yaptığımız bir çalışmada bazı ürünlerin yasaklı ilaçlar (örn; sibutramin) içerdiği, bazı ürünlerde beyan edilen dozun çok üzerinde etken madde (örn; kafein) olduğu ve bazılarında ise hijyen kurallarına uymayan ağır metaller (örn; bakır, kurşun vs) içerdiği anlaşılmıştır. Bu tür kullanımların insanlar üzerinde ciddi hastalıklardan ölüme kadar değişen çeşitli durumlara yol açtığı adli tıpta karşılaşılan durumlardandır (32, 36, 37).

İlaç zehirlenmesine bağlı ölüm iddiası olan durumlarda, ölüm olayının gerçekleştiği yeri, durumu, etrafta var olan bütün ayrıntıları(tüm reçeteler, ilaçları, şişeler, intihar mektubu açısından çöp sepetleri) gözden geçirmek ve kişiye ait karamsarlık hikâyeleri ya da intihara başarısız teşebbüslerin analizini yapmak önem arz etmektedir. Hastaneye yatırıldıktan sonra meydana gelen ölümlerde; aşırı dozdan ölüm olup olmadığı akıldan çıkarılmamalıdır. Midesi yıkanan olgularda örnek bulunmuşsa analizi yapılmalıdır. İlaç düzeyi açısından kayıt ve raporları kontrol etmek gerekmektedir. İntihar amaçlı zehirlenmelerde maddenin alınma biçimlerinin araştırılması gerekmektedir. Alınma yolu damar içi (IV) ya da kasa enjeksiyon (IM), Alınan miktar, ve toksikolojik inceleme için maddenin organ/doku bazında olan dağılımı bize olayın orijini hakkında bilgi verebilir. Örneğin midede emilmeden kalmış ilaç çok miktarda olan maddenin ağızdan alındığını

göstermektedir. Bu da intihar lehine bir bulgu olarak değerlendirilir. Enjeksiyon izler kolda mevcutsa ve enjeksiyon takımı kişinin yanında bulunursa, bu da olayın yüksek olasılıkla intihar olduğunu gösterir. Ama bu tip olaylarda uyuşturucu kullanımında olan yüksek doz alınımına bağlı kaza orijinli olayların olabileceği de unutulmamalıdır. Toksikolojik örnek alımı açısından organ/doku bazında madde dağılımının önemini örnek üzerinde değerlendirdiğimizde; ağızdan alınan ilaca bağlı gelişen ölüm olgularında; karaciğerde ölçülen madde konsantrasyonunun, periferik kanda bulunan madde konsantrasyonundan daha yüksek oranda görülmesi genelde beklenen bir sonuçtur. Bireysel olarak görülen zehirlenme olguları içerisinde kazaya bağlı gelişen zehirlenmeler, cinayete bağlı gelişen zehirlenmeler ve doğal kaynaklı (hastalıkta görülen, yemeklerle birlikte vs.) zehirlenmeler sayılabilir. Botilismus toksini; doğal kaynaklı zehirlenmeler içerisinde yemekle birlikte oluşabilen (örn; konserve) ve ölümlü sonuçlanacak kadar ciddi problemlere yol açabilen bir örnek olarak verilebilir (38,39).

#### **1.2.1.2. Zehirlenmelerde Örnek Alımı ve Dikkat Edilecek Hususlar**

Yaşayanlarda ve ölümlerde zehirlenme olayı benzer ilkeler uygulanarak teşhis edilmektedir. Kuşkulu zehirlenmelerde klinisyen doktorun görevi, zehirlenmenin koşulları ve nedeni ne olursa olsun duruma en etkili şekilde el koyma ve idare etmek olmalıdır. Zehirlenmelerin tanımlanması çok zor olabilir. Her ne kadar spesifitesi az olsa da, ani kusma ve diare, çocuklar başta olmak üzere beklenmedik koma, yetişkinlerde bilinen psikiyatrik hastalık varlığı, kimyasal maddelere maruziyetin söz konusu olduğu işyerlerinde hızlı bir şekilde meydana geldiği anlaşılan gastrointestinal veya nörolojik bozukluklar, çeşitli duyuşsal ve sistemsel yakınmalar zehirlenmelere karşı klinisyen doktoru allert etmelidir. Hastanın yaşamsal tehlike durumu göz önünde bulundurularak teşhis için kullanılacak ileri yöntemlere zaman kaybetmeksizin başvurulması gerekmektedir.

Zehirlenmelerde ölüm sonrası tanı konması, adli tıpta zehirlenme olgularına yaklaşımda en önemli basamağını oluşturmaktadır. Zehirlenme tanısında üç önemli faktör bulunmaktadır. Bunların ilki olayın hikâyesi, ikincisi klinik veya otopsi bulguları, üçüncüsü kesin sonuca götüren basamağı ise laboratuvar analizleri olarak sıralanabilir. Hikâyede elde edilen bilgiler otopsi için yol gösterici olacaktır. Alındığı veya maruz kaldığı iddia olunan maddeye uygun bulgular aranmalıdır. Örneğin intiharlarda kullanılan barbitürat gibi ilaçların büyük çoğunluğu fiziksel olarak bir bulgu vermediği için bu tür zehirlenmelerin tanısı zordur. Dış muayenede gözlemlenen ölü lekeleri karbonmonoksit

zehirlenmelerinde pembe renkte, potasyum klorat ve anilin zehirlenmelerinde kahverengi olması, intihar amacıyla korozif veya benzeri bir madde içilmiş ise dudak çevresinde ve ağız içinde lezyonlar bulunması otopsi esnasında dikkat edilecek hususlar açısından yol gösterici olacaktır. İç muayene esnasında bağırsaklardan açığa çıkacak acıbadem kokusunun siyanür zehirlenmesini düşündürmesi veya alkol, fenol, krozol, eter, kloroform gibi kendine kokuları ile tanınabilen maddelere örnek olarak verilebilir (32,40-42).

Toksikolojik analizlerde kullanılacak örneklerin alınması ve saklanması analiz sonuçlarının doğruluğu açısından dikkat edilmesi gereken en önemli nokta olarak değerlendirilebilir. Toksikolojik analizler için, incelenen veya tedavi edilen klinik olgulardan veya otopsilerden alınan örnekler uygun şekilde alınmalı ve saklanmalıdır. Örneklerin büyük bir titizlikle işaretlenmesi ve tanımlanması sağlanmalıdır. Damardan alınan kan örneği; uygun bir tüpe koymalı ve üzerine hastanın adı, adresi, hastane numarası, tarih ve saat yazarak etiketlemelidir. Örneğin girişi tıbbi kayıtlara işlenmeli, geliş zamanı, alınan örneğin özelliği ve getiren personelin adı yazılmalıdır. Bu işlem "delillerin devamlılığını sağlama" olarak adlandırılır ve zincirdeki her bir adım, damardan laboratuvara kadar, mahkemedeki sonraki delilleri kapsamalı ve analizin sağlıklı olduğunu kanıtlamalıdır (31, 32, 43).

Toksikolojik analiz için gerekli örnekler şüpheli toksik maddenin türüne çok bağlıdır. Analiz yapan laboratuvarın önerileri bazılarında değişiklikler olabileceği bilinmekle birlikte genel kabul gören uygulamada kan, idrar, kusmuk ve mide içeriği, feçes, karaciğer ve diğer organlar, saç/tırnak örnekleri alınması uygun olacaktır (8, 32, 44).

Kriminal bir şüphe olgusunda toksikolojik inceleme önemli bir saptama yöntemi olarak kullanılabilir. Bu tür olgularda alınacak örneklerin titizlikle işaretlenmesi ve uygun koşullarda muhafaza altına alınması, karışıklığa neden olmayacak şekilde ayrıntılı olarak etiketlenmesi gerekir. Elde edilen klinik bilgiler ve varsa şüphelenilen madde mutlaka laboratuvara bildirilmelidir. Ayrıca, dış laboratuvarda analizi yapılacak olan örneklerin zimmetlenerek kim tarafından, hangi tarih ve saatte alındığı ile ilgili kayıt takip bilgilerinin olması ileride oluşabilecek karışıklıkları engeller. Örnekleri laboratuvara gönderirken kullanılacak olan koruma maddeleri şüphe edilen maddeye göre değişiklik gösterdiğinden, incelemeyi yapacak laboratuvarın tavsiyeleri alınmalıdır. Alınacak örnekler ve dikkat edilmesi gereken noktaların başında kontaminasyon gelir. Kontaminasyona uğramış örneklerin kullanımına dikkat etmek gerekir. Kontaminasyona

uğramış örneklerde yapılacak analizlerin negatif veya pozitif olmasının olayın aydınlatılmasını destekleyecek mahiyette olmasına rağmen, analiz sonuçlarının net bilgi niteliğinde olmaması nedeniyle sınırlı bir kullanım alanı olacağı unutulmamalıdır.

Örneklerin elde edildiği çevresel faktörlerin bilinmesi sonuçların değerlendirilmesinde önemli bir basamaktır. Örneğin; iki farklı yanma olayında karboksihemoglobin (COHb) düzeyindeki değişiklikler kişisel farklılıklara bağlı olabileceği gibi, zehirlenme olayında bir kişinin diğerine göre açık veya kapalı ortamda bulunması durumunun da etkili olacağı akıldan çıkarılmamalıdır. İlk kısımlarda da belirtildiği üzere laboratuvar tetkiklerinin, hikâye ve muayene bulguları desteklemesi göz önünde bulundurulmalıdır. Karbonmonoksit zehirlenmesi vakasının dış muayenesinde görülen koyu kırmızılık ile laboratuvar tetkik sonuçlarının korelasyon göstermesi önemlidir. Bu korelasyonun görülmediği vakalarda otopsi pratiğinde görülebilmektedir. Çünkü karbonmonoksit zehirlenmesinde COHb ve kan laktat düzeyi, her hastada klinik ile uyumlu olmamaktadır. Bu nedenle karbonmonoksit zehirlenmesinde klinik ile uyumlu olabilecek yeni bir parametre elde edilmesi yönünde çalışmalar literatürde mevcuttur.

Adli Tıp pratiğinde, incelediğimiz zehirlenme olgularında önemli yer tutan toksik gaz zehirlenmelerinde (karbonmonoksit, siyanür, kükürtdioksit, karbondioksit vs) çeşitli ayırt edici özellikler (örn; karbonmonoksitte görülen kırmızı/pembe ölü lekeleri) görmek mümkündür. Bunun yanı sıra olguların çoğunda non-spesifik asfiksi bulguları mevcuttur (41,45-48).

### **1.2.2. Asfiktik Zehirlenmeler ve Asfiksi Kavramı**

Asfiksi terimi “ havasızlık” ya da “oksijen azlığı ya da yokluğu” anlamında kullanılır. Eşdeğer olarak “anoksi” veya “hipoksi” terimleride kullanılsa da oluş mekanizmalarındaki ve nedenleri göz önüne alındığında farklılıklar olduğu görülmekte ve farklı alt tanımlamalar yapmak gerekmektedir. Siyanoz, peteşi (tardieu lekeleri), konjesyon ve ödem asfiksini dış bulgular içerisinde en önemli genel belirtileri arasında sayılabilir. Bunlar asfiksi tipi için spesifik olmayıp aranması ve yorumlanması asfiksini sınıflandırılması açısından yararlı olacaktır. Asfiksi olgularının ayırımında çeşitli dış muayene bulguları olduğu gibi laboratuvar tetkiklerinden de yararlanır.

### 1.2.2.1.Asfiksilerin Sınıflandırılması

Çok sayıda etken vücutta hipoksi veya anoksiye farklı yollarla neden olabilmektedir. Bu nedenle konunun terminolojisi ve sınıflandırılmasında farklılıklar gözlenmektedir. Asfiksünün, 1920’de Barcrot tarafından yapılan ilk sınıflandırmasında üç başlık altında (anoksik tip, anemik ve staz) incelenmiştir. Peter ve Slyke’ın 1931 yılında yaptığı sınıflandırma dört başlık altında incelenmiş ve önceki sınıflandırmaya histotoksik tip eklenmiştir (26).

Asfiksünün oluşum mekanizmasının anlaşılması açısından Barcrot’un sınıflaması temel alınabilir. Ancak adli tıbbi yaklaşımda önemli olması nedeni ile asfiktik ölümler etiyolojik olarak da sınıflandırılabilir.

Etiyolojilerine göre asfiksiler sınıflandırıldığında 5 ana gruba ayrılır:

- Ası
- Boğma ve Boğulma (bağla boğma, elle boğma, boyun kilidi, otoerotik asfiksiler)
- Tıkama ve Tıkanma(ortamda bulunan havanın içeriğindeki değişimler,havasız yerde kapalı kalma,ağız ve burundan başlayıp alveollere kadar olan solunum pasajının tıkanması,karın ve göğüsün bası altında kalması nedeniyle inspirasyonun sınırlanması,toprak altında kalma, pozisyonel asfiksi)
- Kimyasal asfiksiler(karbonmonoksit (CO) zehirlenmesi (baca gazı),siyanür zehirlenmesi, hidrojen sülfür zehirlenmesi (kuyu, bataklık gazı))
- Suda boğulma şeklinde sınıflandırılabilir.

Bazı yazarlar ise asfiksiyi “dış” ve “iç” asfiksi olmak üzere iki ana gruba ayırmıştır.

- Dış (kapalı, travmatik, mekanik) asfiksilerde; solunum havasının akciğerlere ulaşmaması söz konusudur.
- İç (açık, patolojik) asfiksilerde; akciğerlere gelen solunum havasındaki oksijenin kanla yeterli oranda birleşmemesi söz konusudur. Bu grupta *anoksik, anemik, staz* ve *histotoksik tip asfiksiler* yer almaktadır.

*Anoksik/hipoksik tip;* Ortamdaki oksijenin yetersizliği söz konusudur. Oksijenin akciğerlere ulaşmasında sorun vardır. Bu grubu da kendi içinde 4 alt gruba ayırabiliriz. Bunlar:

- Oksijenin solunan havada yokluğu ya da azlığı
- Solunum yollarının tıkanması
- Göğsün bası altında kalması nedeniyle mekanik kısıtlanmalar
- Solunum kaslarının olumsuz etkilenmesidir.

*Anemik tip (kanın oksijen taşıma kapasitesinde ki azalma sonucu meydana gelen asfiksiler;* Oksijenin akciğerlere kadar ulaşmasında herhangi bir engelin olmadığı ancak dokulara geçtikten sonraki kana geçiş ve/veya kanda taşınması sürecinin etkilendiği durumlardır. Karbonmonoksit (CO) zehirlenmesi bu grupta en sık karşılaşılan örnektir. Kimyasal olarak oksijene göre karbonmonoksitin hemoglobine bağlanma eğiliminin yaklaşık 200 kat fazladır. Ortamda yüksek oranda CO bulunması durumunda hemoglobin CO bağlanarak oksijenin taşınmasını büyük oranda azaltmaktadır.

Daha az bilinen hidrojen sülfür zehirlenmelerinde de, oksijen yardımıyla hücrede enerji elde edilmesi aşamasında sorunlar oluşmaktadır. Sülfür gazı kanalizasyon, kuyu ya da uygun koşullarda kapalı ortamlarda kolayca oluşabilir. Havadan %20 daha ağır olması nedeniyle bu gibi yerlerde tabana yakın yerlerde birikir. Renksiz ve kokusuz olması zehirlenmeleri kolaylaştırmaktadır.

Bu grup altında karşılaşılabilecek diğer bir örnek ise Nitrit bileşiklerinin veya kalın bağırsakta nitrite dönüşen nitratların alınmasıyla meydana gelen zehirlenmelerdir. Bu zehirlenmelerde bulgular, meydana gelecek olan methemoglobinemi sonucu oluşur. Bunun sonucunda da kanda oksijenin taşınmasında yetersizlik meydana gelmektedir.

*Staza bağlı oluşan asfiksiler (belli bir zaman biriminde oksijen dağılımında bir azalma sonucu meydana gelen asfiksiler);* Dolaşım sisteminde kan sirkülasyonunun durması sonucu oluşan şok ve kalp yetmezliği gibi durumlarda meydana gelen asfiksilerdir.



*Histotoksik tip (dokularda ki oksidatif olayların engellenmesine sonucu meydana gelen asfiksiler);* Oksijenin dokulara kadar ulaşmasında herhangi bir engelin bulunmadığı ancak dokudaki oksijenin kullanılarak enerji elde edildiği hücresel düzeydeki süreçlerde sorun vardır. Siyanür zehirlenmesi gibi enzimatik yolların sekteye uğradığı durumlar, kloroform ve halotan gibi anestezi maddelerinin oksijenin hücre içine geçişinde azalmaya neden olduğu durumlar, insülin gibi metabolizmaya çok yönlü etkileri olan maddelerin etkileri ve metabolizma sonucu oluşan atık maddelerin birikimi (üre, karbondioksit... vs) bu tip mekanizmanın sık karşılaşılan örneklerini oluşturmaktadır (49-51).

### **1.2.2.2.Yetersiz Oksijen İçeren Havanın ve/veya Boğucu Gazların Solunması**

Mahzenler, kömür ocağı, bataklıklar, mağara, tahıl depo ve siloları, sığınaklar gibi kapalı yerlerde, mazot benzin vb. kimyasal madde tanklarının içinin temizlenmesi sırasında, yangınlarda ve bazı laboratuvarlarda rastlanılan ve ölüme kadar ilerleyen ciddi zararlı sonuçlar doğurabilen bir durumdur. Yetersiz oksijen iki nedene bağlı oluşabilir. Bunlardan birincisi, havadaki oksijenin azaldığı, yerine diğer gazların arttığı (yangın, duman, vb.) durumlardır. İkincisi ise havanın normal bileşimde eser miktarda olan gazların arttığı (metan, karbonmonoksit, bütan gazı, vb.) durumlardır.

Örneğin; lağım, derin kuyu, bodrum, tekne ve silolarda rastlandığı üzere; karbondioksit, metan ve hidrojen sülfür gibi toksik gazlar organik maddelerin fermantasyonuna bağlı olarak ortaya çıkar. Yetersiz oksijen içeren havayı solumaya bağlı ölümler genellikle birden fazla gazın ortak etkisi ile gelişir. Yetersiz oksijen içeren hava genellikle birden fazla inert ya da toksik gaz içerir. Yetersiz oksijen içeren bu ortamlarda havada yaygın olarak bulunan gazlar karbondioksit, metan, hidrojen sülfür, sülfür dioksit ve karbonmonoksit olarak sıralanabilir. Karbondioksit ve metan, oksijenin yerini alarak "çevresel hipoksi" yaratırken; hidrojen sülfür ve sülfür dioksit, güçlü indirgen etkisiyle hemoglobinin oksijen ile birleşmesini engeller. Karbonmonoksit ise, kan oksijeninin yerini alarak "anemik tipte hipoksi" yol açar. Ayrıca, "histotoksik anoksi" oluşturabildiğine ilişkin veriler de bulunmaktadır.

Bazen özel ortamlarda ise saf ya da özellikle bir tür gaz yoğun olarak bulunabilir. Yetersiz oksijen içeren ve boğucu gazın yoğun olarak bulunduğu bu tip ortamlara giren kişilerde solunan hava, kemoreseptörleri etkileyerek vazo-vagal refleks sonucu kardiyak arreste ve ani ölüme neden olabilir (49, 50, 52).

### 1.2.2.2.1.Karbondioksit Maruziyeti (Zehirlenmesi)

İnert gazlar arasında özel bir yer tutan karbondioksit, atmosfer havasında % 0,4 oranında bulunur. Ek hastalığı olmayan bir kişide akciğer alveol havasında % 5 oranında karbondioksit bulunur. Atmosfer havasında % 3 oranında bulunduğunda baş ağrısı, uyuklama, baş dönmesi ve güçsüzlük ortaya çıkar. Solunum havasında % 8-10 oranında bulunduğunda 10 dakika içinde sıkıntı, fenalık ve baygınlık yapmaktadır. Karbondioksit, kovalent bağlı bir karbon ve iki oksijen atomundan oluşan moleküle sahiptir ve normal koşullarda gaz halinde bulunur. Renk ve kokusu yoktur. Formülü CO<sub>2</sub> şeklinde olup, molekül ağırlığı 44,009 g/mol'dür. Solunumdaki yeri açısından hayati önem arz eder. Oksijen akciğerlere üst hava yollarını geçerek gelir ve alveolde hemoglobin ile taşınarak alveole getirilmiş olan karbondioksit ile yer değiştirir. Daha sonra karbondioksit oksijenin takip ettiği yolla dışarıya verilir. CO<sub>2</sub> kanda belli seviyelerde bulunur ve vücudumuzun tampon sistemlerinden birini meydana getirir. Kanda artması halinde asidoz, azalması halinde ise alkaloz meydana gelir. Bu durumlar dolaylı olarak hidrojen iyonu konsantrasyonunu etkilemesi ile meydana getirir.

Karbondioksit gazının, sanayide soğutucu/yangın söndürücü olarak, volkanik bölgelerden çıkan gazlarda, suda çözülmüş olarak maden suyunda, soğuk zincirde transfer edilecek maddelerde kuru buz haline getirilmiş şekli ve hücre kültür laboratuvarlarında bilimsel çalışmaya yönelik uygun koşulların sağlanması amacıyla kullanımı mevcuttur. Ölüme yol açan en düşük oranın karbondioksit oranının % 25-30, ani ölüme açan yüksek konsantrasyonların ise % 60-80 düzeyinde olduğu kabul edilmektedir. Hasta, anemik, zayıf ve yaşlı kişilerin yaşamı için belirtilen oranların altında karbondioksit içeren ortamlar da yüksek risk oluşturur.

Adli Tıbbi açıdan karbondioksit maruziyetine bağlı ölümlerde yapılan otopsi işleminde spesifik bir bulguya rastlanması beklenmez. Ölü lekeleri koyu mor renktedir. İç organlarda belirgin konjestif değişiklikler gözlenebilir. Post-mortem kapalı kan gazları ölçümü yararsızdır. Çürümeye bağlı olarak da karboksihemoglobin, sülfhemoglobin ve sülfomethemoglobin oluşması nedeniyle çürümüş olgularda bu bulguların değeri yoktur. Karbondioksit gazının çok yoğun olduğu ortamlarda meydana gelen refleks kardiyak arreste bağlı oluşan ani ölümlerde genel asfiksi bulgularına rastlanmaz (49,50, 53-55).

#### 1.2.2.2. Karbonmonoksit Maruziyeti (Zehirlenmesi)

Gaz şeklindeki bir maddenin solunmasıyla oksijenin kanda dolaşımını ya da hücreler tarafından kullanımını engellemesi ile kimyasal asfiksi durumu oluşur. Gaz şeklindeki maddelerin neden olduğu kimyasal asfiksilerin günümüzde en sık rastlanan çeşidi ise karbonmonoksit zehirlenmesidir. Karbonmonoksit (CO) renksiz kokusuz havadan biraz hafif, (0.967 yoğunluğunda) bir gazdır. CO doymamış bir karbon bileşiğidir ve karbon içeren çeşitli maddelerin tam olmayan yanması sonucu oluşur. Buna örnek olarak, kömür yandığında karbondioksit, karbonmonoksit ve hidrojen gazları açığa çıkar. Kömürün oksijeni az bir ortamda yanması ile yalnız bir oksijen bağlandığı zaman CO ortaya çıkar. Kömür dışında maddelerin yanma ürünü olarak bunlardan başka bileşimlerine göre değişik toksik gazlar oluşabilir.

Eskiden kullanılan havagazı ise, doğrudan CO içeren bir madde olup, birçok CO zehirlenmesi sonucu ölüm olgusuna yol açtığı literatürde bildirilmiştir. Havagazı, kentlerde ısınma ve aydınlanma maksadıyla kullanılmak üzere kömürden imal edilen gaz yakıttır. Üretiminde kullanılan yöntemlere göre bileşimi değişkenlik gösterir, ancak genellikle hidrojen, karbonmonoksit, metan ve uçucu hidrokarbonlar gibi kalorili gazlardan ve az miktarda da karbondioksit ve azot gibi kalorisiz gazlardan oluşur. 1970'lerden itibaren dünyada havagazının yerini doğalgazın almaya başlaması ile CO zehirlenmesi olguları sayısında belirgin bir düşüş gözlemlenmesine rağmen halen önemini korumaktadır. Özellikle kış aylarında meydana gelen soba zehirlenmelerinin temel faktörü olarak değerlendirilmektedir. Kömür, LPG (liquid pressuregas), doğal gaz, yangın sonucu oluşan duman, taşıtlarda kullanılan organik yakıtlar, kireç söndürülmesi, havagazı, maden ocaklarındaki patlamalar ve soğuk bir yüzeye temas eden alev karbonmonoksit gazının genel kaynakları olarak sayılabilir.

Adli Tıbbi açıdan karbonmonoksit maruziyetine bağlı ölümlerde yapılan otopsi işleminde spesifik olmasa ölü lekelerinin açık pembe renk alması yararlı bir bulgudur. İç organlarda belirgin konjestif değişiklikler ve kırmızı/pembe renk değişikliği gözlemlenebilir. Gazın çok yoğun olduğu ortamlarda meydana gelen refleks kardiyak arreste bağlı oluşan ani ölümlerde genel asfiksi bulgularına rastlanmayabilir (23, 49, 50, 53, 54, 56).

## **2. ÇALIŞMA KONUSU ve HİPOTEZ**

Karbonmonoksit hemoglobine birleşerek dokulara oksijen taşınmasını engelleyerek bir tür anemik tip asfiksi oluşturmasının yanı sıra, metabolizma üzerine olan etkisiyle dokularda histotoksik tipte bir asfiksi de oluşturur. Bu nedenle bütün karbonmonoksit zehirlenmesi olgularında maruz kalınan miktar, kan karboksihemoglobin değeri ve klinik göstergeler arasında net bir korelasyon yoktur. Bu nedenle bu tür zehirlenme vakalarında ayırım sağlayabilecek yeni belirteç, analiz yöntemi ve literatür bilgisine ihtiyaç vardır. 2000’li yılların başında tanımlanmış olan ve henüz bilimsel olarak üzerinde çalışmaların sürdürüldüğü nöroglobin molekülünün karbonmonoksit zehirlenmeleri ayırıcı tanısında kullanılabilecek önemli bir çalışma olacağını düşündük. Ek olarak çalışmanın özgünlüğünü sağlayan noktalardan biriside akut CO ve CO<sub>2</sub> maruziyetine bağlı oluşan oksidan/antioksidan durumun karşılaştırılması ve çıkacak olan sonuçların değerlendirilmesini amaçladık. Daha önce literatürde hayvan deneyleri yoluyla yapılmış böyle bir karşılaştırma çalışmasına rastlanmamış olması ve araştırmamızın bu konuya ilişkin sonraki çalışmalar içinde yol gösterici olması, konunun bilimsel açıdan gelişimi ve bu konu ile ilgili yeni çalışmalara ışık tutacağı yönündeki gayretimizi artırmıştır (24,57).

### **2.1. Nöroglobin nedir?**

Globinler, geri dönüşümlü olarak oksijen bağlanmayı sağlayan, demir atomu içeren bir porfirin halkası (hem) olan küçük solunum proteinlerdir. Globin yapısında olan proteinler enzimatik fonksiyonlarının yanı sıra, solunum zinciri aerobik metabolizmaya oksijen taşırlar. Myoglobin ve hemoglobin bilinen globin türleridir. 2000’li yılların başında nöroglobin (neuroglobin) ve sitoglobin (cytoglobin) globin türleri altında tanımlanmıştır. İnsan ve diğer omurgalılarda, fonksiyonel yapı ve doku dağılımında farklılıklar olan, dört tip globin türevi (hemoglobin, miyoglobin, nöroglobin ve sitoglobin) tespit edilmiştir (57-62).

Hemoglobin ve miyoglobin, yapısal ve fonksiyonel açıdan iyi karakterize edilmiştir. Günümüz teknolojisi ile son derece ayrıntılı bir şekilde inceleme imkânına sahip olduğumuz bu iki iyi karakterize globin türevi, çeşitli klinik durumlarda farklı özelliklerle tedaviye yön verici olabilmektedir.

Literatürde yeni tanımlanmış olan ve haklarında sınırlı bilgiye sahip olunan nöroglobin ve sitogloblin ile ilgili çalışmalar ise devam etmektedir. Yapısal ve fonksiyonel açıdan oksijen ve diğer solunumsal etmenler ile ilgili oldukları düşünülmektedir. İnsanlarda ve diğer omurgalılarda oksijen taşıma ve depolama işlevinde rol alırlar. Bu proteinler içerisinde anılan Nöroglobin, ağırlıklı olarak beyinde ifade edildiği bilinmektedir(63,64).

Nöroglobin yüksek bir oksijen afinitesine sahip monomerik yapıdadır. Öncelikli görevinin beyin dokusuna oksijen kullanılabilirliğini artırmak alabileceği düşünülmektedir. Kromozom 14q24 üzerinde bulunan insan nöroglobin geni (NGB), özgün bir ekson-intron yapısına sahiptir (65).

Nöroglobin sentezine yönelik yapılan çalışmalarda; in vivo, in vitro ve fokal serebral iskemisindeki nöron hipoksisinin artmış olduğu durumlarda NGB indüksiyonu ve koruyucu etkisinin artığı gösterilmiştir. NGB ifadesinin fokal serebral iskemi sonrası histolojik işlevsel bozukluklarının şiddeti ile uyumlu olarak artmış olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, NGB-aşırı ifade eden transjenik farelerde, orta serebral arter oklüzyonu sonrası serebral infarkt hacmi azaltılmış olduğu bildirilmiştir. Sol ön inen koroner arter oklüzyonu sağlanarak oluşturulan deney modelinde, miyokardiyal enfarktüslerin hacminin NGB-aşırı ifade eden transjenik farelerde azaltılmış olduğu bildirilmiştir. Beynin muhtelif alanlarında eksprese edilen NGB'nin nörodejeneratif hastalıklarda ve yaşlılıkla oluşan nörodejenerasyon alanlarında NGB mRNA ve protein azaldığı bildirilmiştir (66-73).

## **2.2.Hipotezin Adli Toksikoloji ile İlişkilendirilmesi ve Literatür Bilgisi**

Asfiksiler başlığı altında daha önce belirtilen hipoksik, anemik ve stegnant hipoksi tiplerinde temel olarak insanın kendi bünyesinde oluşan hastalık/durum nedeniyle (kronik akciğer hastalıkları, anemi, vasküler yetmezlik vs.) görülür. Histotoksik hipoksi bunlardan farklı olarak çevreden gelen toksik bir madde sonucu oluşur. Hipoksi çeşitlerini birbirinden keskin çizgilerle ayırmak her zaman mümkün değildir. Çünkü hipoksiyi oluşturan madde birkaç mekanizmayı aynı anda etkileyebilir. Örneğin; karbonmonoksit (CO) ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>) hemoglobine, oksijenle yarışmalı ve geri dönüşümlü bağlanarak dokuya oksijen sunumunu azaltmanın yanı sıra, oksidan/antioksidan enzimleri çeşitli

metabolik yollarda etkileyerek histotoksik hipoksi durumu oluşturup oksidatif stresin artmasına neden olurlar (22, 74, 75).

Oksidatif stres, antioksidan kapasitenin azalması ve/veya aşırı oksidana maruz kalma olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküller *oksidan* veya *serbest radikaller* olarak isimlendirilir. Serbest radikaller yaşam süreleri çok kısa olmakla birlikte, yüksek aktiviteleri nedeniyle organizmada buldukları kısa süreç içerisinde ciddi tahribata neden olabilirler. Özellikle deoksiribonükleik asid (DNA), protein ve hücre fosfolipidleri gibi bileşiklerle reaksiyona girerek hücresel hasarlar oluştururlar. Bu radikallerin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta birçok antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Serbest radikallerin oluşum hızı ile bu zararlı etmenlerin ortadan kaldırılma hızı arasında denge olduğu sürece, organizmanın bu süreçten etkilenmemesi beklenir. Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif stres oluşumuna bağlı, bu denge bozulur (74-76).

Oksidan/antioksidan parametrelerin oluşumu; etkene, etkilenen dokuya, maddenin cinsine, maruziyet süresine ve ortam koşullarına göre değişebilir. Bu çalışmada akut CO ve CO<sub>2</sub> maruziyetine bağlı oluşan oksidan/antioksidan durumun karşılaştırılması yapılmıştır. Aynı ayrı yapılan çalışmalarda her iki toksik materyalinde oksidan seviyelerini yükselttiği ve antioksidan seviyelerini düşürdüğü yönünde çalışmalar olmasına rağmen, akut etki edecek dozlarda karşılaştırma çalışmalarına rastlanmamıştır (74, 76, 77).

CO zehirlenmesinde; beyin, kalp, böbrek, iskelet kası, deri, periferik sinir gibi organlarda, hem anemik hem de histotoksik hipoksi mekanizmaları mevcuttur. Kimyasal reaksiyonlar zinciri aracılığı ile hem anemik hem de histotoksik hipoksi oluşturan karbonmonoksit zehirlenmesinde, meydana gelen semptom ve bulgular erken dönemde ortaya çıkabileceği gibi haftalar sonra da görülebilir. Bu süreç organizmanın öz yapısına, maruziyet süresine, karbonmonoksitin ortam ve kandaki yoğunluğuna göre değişiklik gösterir. Yüksek oksijen (O<sub>2</sub>) tüketimi olan beyin ve kalp karbonmonoksit zehirlenmesinden birincil derecede etkilenir ve bu nedenle başlıca semptomlar kardiyovasküler ve nöropsikiyatrik semptomlar olarak kliniğe yansır. Ciddi toksik ve kalıcı etkilenmelere sahip olan karbonmonoksit zehirlenmesi, genellikle akut zehirlenmeler şeklinde görülmektedir. Ülkemiz dahil, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, özellikle kış aylarında, karbonmonoksit zehirlenmelerine bağlı ölümler sıkça görüldüğü

bildirilmektedir. Karbonmonoksit zehirlenmesinin vücutta etkilediği alanların yaygınlığı değerlendirildiğinde, birçok yaşamsal parametreye etki ettiği görülmektedir. Akut zehirlenmeler neticesinde oluşan veya oluşacak olan durumların uzun süreli ve ciddi sekeller bıraktığı yapılan çalışmalarda kayıtlıdır. Literatürde yaptığımız araştırmalarda bu sekellerin oluşumunda hipoksik kalan nöronal dokuda oluşan geri dönüşümsüz hasarlar başta olmak üzere çeşitli mekanizmaların olduğu görülmektedir (75, 76, 78-82).

Vücutta, patolojik durumlara karşı kendini savunma mekanizmaları (self-defense mechanisms) vardır. Bu mekanizmalar vücudun kendi bütünlüğünü ve yaşamsal fonksiyonlarını korumasına yönelik çeşitli korunma mekanizması olarak tarif edilebilir. Örneğin; bir böbreğin fonksiyonunu kaybettiği bir olguda, fonksiyonu sağlam olan böbrek glomeruler filtrasyon miktarının artması ve çeşitli destek mekanizmaları devreye girmesiyle, vücudun sıvı yükü ve asit/baz dengesi korunur. Başka bir örnek, yükseklerde yaşayanlarda parsiyel oksijen basıncının düşmesine bağlı olarak kompanseuar bir mekanizmayla dokuya oksijen sunumunu artırmak için hemoglobin seviyelerinin artmış olması verilebilir. Hemoglobin seviyelerinin göreceli olarak yüksek seyretmesi, aslında organizmanın doku bazında oluşabilecek hipoksik durumu engellemek için gerçekleştirdiği kendini savunma mekanizmaları (self-defense mechanism) arasında sayılabilir (81-85).

Organizmalarda varolan, kendini savunma mekanizmalarının bulunması ve açıklanmasına yönelik çalışmalar anlaşılması çoğu zehirlenme olgusunda hayat kurtarıcı olabilir. Karbonmonoksit ve karbondioksit gibi solunumsal toksik gaz maruziyetlerinin tanı ve tedavisinde de çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Hiperbarik oksijen tedavisi bu konuya örnek olarak verilebilir. Weaver LK ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarının sonucunda, CO zehirlenmesinde hiperbarik oksijen tedavisi kısa ve uzun dönem kognitif fonksiyonlarını iyileştirmede normobarik oksijenden üstün olduğu anlaşılmıştır (74,86).

Günümüzde ilerleyen teknoloji, gelişmiş cihazlar ve ölçüm metodlarıyla birlikte yeni biyokimyasal mekanizmalar bulunmakta ve bu biyokimyasal değişkenler aracılığı ile oluşan moleküler genetik parametreler saptanabilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur. Bu mekanizmalardan birisi olarak öne sürülen ve nöroglobin olarak isimlendirilen bir globin türevi tanımlanmıştır. Nöroglobinin, nöroprotektif rolü olduğu ve nöronal dokuya diğer dokulara göre daha spesifik bir proteoin olduğu bildirilmiştir. 2000'li yılların başında ilk olarak tanımlanan nöroglobin ile ilgili çalışmaların yoğun şekilde devam etmesi ve etkinlik mekanizmasının henüz tam olarak açıklanamamış olması konuyu ilgi çekici hale

getirmektedir. Genel olarak literatürde hipoksi ve çeşitli şekillerde oluşturulan beyin hasarı modellerinde nöroglobin gen ekspresyon düzeyleri çalışıldığı görülmektedir (48, 58-73, 87, 88). Her ne kadar hipoksi başlığı altında değerlendirilen nöroglobin ile ilgili çalışmalarda hipoksiye bağlı artışlardan bahsedilmiş olsada, hipoksik durumların nedenleri arasındaki farklılıklar üzerine her hangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Burmester T ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışma; oksijen metabolizmasında yer alan yeni bir globin türevi olduğunu bildirmişlerdir. Bu globin türevinin insan ve sıçanda var olduğunu, genetik yapısının 14q24 lokalize olduğunu, miyogloblin gibi monomerik yapıda bir globin türevi olduğu ve beyin dokusunda yüksek oranda bulunduğunu bildirmişlerdir. Beyinde yüksek oranda bulunması nedeniyle bu globin türevini Nöroglobin (Neuroglobin) olarak isimlendirdiklerini bildirmişlerdir (87).

Reuss S ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada; nöroglobinin periferik nöronal doku ve aktivitesi yüksek olan sekretuar nöro-endokrin sistem dokularında da sentezlendiğini göstermişlerdir. Nöroglobin sentezinin nöronal somada sentezlendiğini, hücre içi bir oksijen deposu veya nöronlarda taşıyıcı bir protein olabileceğini bildirmişlerdir (89).

Fordel E ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı çalışmada; farklı oksijen oranı içeren hipoksi durumlarında, hücredeki enerji üretiminin hücre solunumundan anaerobik glikolize geçirilmesinde görevi olan bir faktör olan *Hypoxia Inducible Factor 1α (HIF-1α)* seviyesindeki değişime oranla, nöroglobin seviyesinin değişim miktarının sınırlı olduğunu ve nöroglobin sentezi düzenleyen farklı mekanizmaların olabileceğini bildirmişlerdir (90).

Brunori M ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada; nöroglobin molekülünün moleküler genetik yapısı açısından insan ve sıçanlar arasında küçük farklılıklar olduğunu, fonksiyonlarının benzer olduğunu, yapılan analizlere göre yapısında enzimatik olaylar veya serbest radikallerin rol alabileceğini, hücre olarak gerçekleşecek konformasyonel bir değişiklik ile G proteinleri aracılığıyla oluşan bir sinyal aracılığıyla sentezlerinin kontrol edilebileceği hipotezini sunmuşlardır (91).

Picotti P ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada; in vitro olarak globin türevlerinin farklı pH değerlerinde (farklı asidik ortamlarda) fonksiyonel ve yapısal açıdan oluşan değişimler analiz edilmiştir. Nöroglobin ve miyogloblin ile yapılan çalışmada pH



düzeyleri 2 ve 7 olarak seçilmiş olup, nöroglobinin bu iki farklı pH düzeyi için fonksiyonel ve yapısal açıdan, myoglobine göre daha stabil olduğu saptanmıştır (92).

De Marinis E ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada; nöroglobin olası bir endojen modülatörü olabileceğini belirtmişlerdir. Nörotrofik bir nöro-koruyucu olarak bilinen 17 $\beta$  - östradiolün nöroglobin üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma ile ilk defa globin yapısında olan bir protein sentezi üzerinde steroid yapısındaki hormonların etkin olduğunu gösterilmiştir. İnsan ve hayvan hücre serilerinde östrojen etkisiyle nöroglobin seviyesinin %300 arttığını bu çalışmanın sonucunda bulunmuştur (93).

Brittain T ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada; nöroglobin molekülünün diğer hem grupları 5 koordinatında globin türevlerinden farklı olarak hem grubunu 6 koordinatında olduğu, nöroglobinin hücreyi ölümden korumaya yönelik Çok sayıda öneri olduğunu, yaptıkları çalışmada vücutta baskın olarak 6-koordinatında bulunan nöroglobinin hücreyi korumayı sağladığına dair güçlü matematiksel hesaplama ve deneysel deliller bulduklarını, nöroglobinin bağlanma ve redoks aktivitesinin apoptozis esnasında mitokondriden sitokrom-c salınımını azalttığını, detaylı analiz ve sistem düzeylerinin incelenmesinde nöroglobinin apoptozu önlemediğini ancak, apoptotik dönemin aktivasyonu için gerekli süreci değiştirdiğini, nöroglobinin bilinen hücreyi koruyucu faaliyetlerinin bu globin türevinin apoptozisdeki kontrol basamaklarında interaktif rol alabileceği görüşünü desteklediğini belirtmişlerdir (94).

Zhanyang Yu ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları derleme tarzındaki çalışmalarında; nöroglobinin hipoksik durumda olduğu gibi çeşitli maddelerin etkisi altında ve beyin dokusunda oluşan inme (stroke) durumlarında arttığını, oksidatif stres durumunun, hormonların nöroprotektif etkisi olan nöroglobin seviyesi üzerinde etkili olduğunu, nöroglobinin nörodejeneratif hastalıklar ve epileptik nöbetlerde koruyucu etkilerinin deneysel hayvan çalışmaları ile gösterildiğini, retinal ganglion hücrelerinde koruyucu etkisinin yanı sıra göz tansiyonunu ve glokomatöz hasarı düşürdüğünü, yüksek özelleşmiş nöronlarda (örn; görme olayı ile ilgili göz retinası) salınımının fazla olduğunu ve dokuya göre salınım farkı göstererek beyin ve diğer nöronlarda farklı oranlarda bulunduğunu, nöronal doku dışında miktarı çok az olmakla birlikte pankreas, testis ve adrenal bez gibi dokulardan da sentezlendiğini, beyin kanseri çeşitlerinde (glioblastom, astrositom) başta olmak üzere bir çok tümoral dokudan salındığını ve bu çalışmaların artarak devam ettiğini belirtmişlerdir (61).

Fiocchetti M ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları derleme tarzındaki çalışmalarında; hücre ölümünün anormallikler, kanser, otoimmün hastalıklar ve nörodejeneratif rahatsızlıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara ilişkili olduğunu, yetişkin organizmalarda hücre ölümü, hücre çoğalması ve yenilenmesinin dengeli bir şekilde ilerlemesi gerektiğini, nöronal dokuda hücre ölümünün anlaşılmasının nörona ait gelişimsel süreç ve nöron patofizyolojisinin aydınlatılmasında önem arz ettiğini, in vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda nöroglobinin nöronlar üzerinde yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirmeye yönelik koruyucu etkilerinin olduğunu, hormonlar tarafından indüklendiği öne sürülen nöroglobinin anatomik ve subselüler lokalizasyonlarının incelenmesinin yeni bir çalışma alanı oluşturabileceğini (örneğin, apoptozisi mitokondriyal yolaklarla etkilediği düşünülürken, lokalisasyon olarak mitokondrinin direkt içinde bulunması durumunda farklı mekanizmaların ortaya çıkarılmasının sağlanabileceği), tedavide kullanılan ve nöroglobin düzeyinin artışına neden olan ilaçların (örn; valproat) varsa zarar verici etkilerinin saptanması ve zararsız türlerinin üretilmesine imkan sağlayacak çalışmaların yapılabilmesine öncülük edeceği ve nöroglobinin çeşitli tümör hücre serileri üzerinde olan etkinliğine ilişkin laboratuvar çalışmalarının devam ettiğini belirtmişlerdir (59).

Taylor JM ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmalarında; sıçanlarda travmatik beyin hasarı oluşturduklarını ve 1, 3, 7 ve 14'üncü günlerde nöroglobin seviyelerine baktıklarını, nöroglobin mRNA'nda 7. günde anlamlı artış gözlemlendiğini, 7.günde yapılan immünohistokimyasal boyamalarda beyin bütününde nöroglobin ifadesinin yanı sıra yaralı olan doku bölgesi ve ipsilateral hipokampusta nöroglobin ifade düzeyinin diğer kısımlara göre daha fazla artmış olduğunu, subakut süreçte gerçekleşen endojen nöroglobin sentezlenmesinin sensorimotor hasarı azalttığını ve iyileşme sürecine katkı sağlayabileceğini bildirmişlerdir. Akut dönemde yeni tedavi müdahaleleri yoluyla nöroglobin ifadesini arttırmanın travmatik beyin hasarı iyileşme süreciyle ilgili yeni gelişmeler sağlayabileceği fikrini öne sürmüşlerdir (60).

Di Pietro V ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmalarında; iki şiddeti farklı travmatik beyin hasarı modelinde nöroglobin gen ve protein ifade patofizyolojik yanıtı üzerinde çalışmışlardır. Sıçanlar üzerinde hafif ve ağır düzeyde diffüz aksonal hasar oluşturdukları grupların 6, 12, 24, 48 ve 120 saatlerde değerlendirip nöroglobin ve oksidan/antioksidan parametrelere (malondialdehit, nitrit, nitrat, askorbat, glutatyon)

seviyelerine bakmışlardır. Hafif olan beyin hasarında geri dönüşümlü bir oksidatif stres oluşmasına rağmen nöroglobin seviyesinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığı, ağır hasarlı grupta ise oksidan etkilerin belirgin bir şekilde arttığı, antioksidan etkilerinde aynı şekilde azaldığı ve nöroglobin gen seviyesinin belirgin bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Hafif hasarda oluşan oksidan durumda çok etkilenmeyen nöroglobin seviyesinin, ağır hasar oluşan durumda yüksek olarak gözlemlenmesi bilinenin aksine nöroglobinin endojen - nöroprotektif-antioksidan etkinliğine en azından patofizyolojik koşullar altındayken uymadığını belirtmişler (69).

Liu X ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmalarında; su, gıda ve havada bulunan ve giderek çoğalmakla birlikte dünya çapında 30 milyondan fazla insanı etkileyen arseniğin kronik toksisite oluşturan yaygın bir halk sağlığı sorunu olduğunu, 7 günlük Wistar sıçan yavrularının beyinciklerinden hazırlanan serebellar granül nöronların primer kültürleri yapıldığı, arsenik maruziyetine bağlı apoptotik hücrelerin arttığını, bu apoptotik hücrelerde nöroglobin si RNA düzeyinin artmış olduğunu belirtmişlerdir (95).

Liu A ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmalarında; daha önceki çalışmalarda nöroglobinin potansiyel anti-apoptotik rolü olduğu, hipoksik durumlarda ve tümör oluşumu durumlarında yükseldiğini, hücrelerin bu nöroglobin artışını nasıl olduğunun mekanizmasına ilişkin çalışmaların devam ettiğini, yapılan bu çalışmada amaçlarının fizyolojik koşullardaki redoks döngülerinde de nöroglobin rol alabileceğini göstermek olduğunu, fizyolojik koşullarda hücresel nöroglobin toplam konsantrasyonunun yaklaşık% 30 ferröz halde olduğu ve hipoksik durumlarda bu oranın %80'e yükseldiğini, bu değişimin hızlı bir şekilde gerçekleşmesinin nöroglobinin anti-apoptotik mekanizmalarda etkisini desteklediğini, hipoksik ve inme (stroke) gibi durumlarda apoptotik etkinin hızlıca düşürülmesinde bu mekanizmanın etkin olduğunu, nöroglobin üzerinde açıklanan bu mekanizmanın normal koşullarda onkogenik aktiviteyi önlerken hipoksik durumlarda anti-apoptotik mekanizma ile hücresel korumayı sağlayacağını öne sürmüşlerdir (96).

Bu bilgiler ışığında, araştırma konumuz ile ilgili daha önce çalışma yapılmamış olması çalışmamızın özgünlüğünü oluşturmaktadır. Bu çalışmada karbondioksit ve karbonmonoksit maruz kalan ratların beyin ve kan dokusunda antioksidan/oksidan aktivite ve nöroglobin gen ifadesindeki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Histopatolojik örneklerde gruplar arasındaki farklılıkların araştırılması planlanmıştır.

TBARS, SOD, CAT, GPx ve GSH gibi oksidan/antioksidan düzeylerinin belirlenmesi ile karboksihemoglobin ve nöroglobin seviyeleri arasındaki ilişkiyi inceleyerek CO ve CO<sub>2</sub> maruziyetinin organizmada meydana getirdiği patofizyolojik durumun tanısına katkıda bulunacağı ve bahsedilen parametrelerin etkiyen maddelere göre deđiŖeceđi hipotezini kuruldu. Histopatolojik örneklerde gruplar arasında ne tür farklılıklar olduğu ve varsa bu farklılıkların araştırılması planlanmıştır.

### **3. GEREÇ, YÖNTEM ve BULGULAR**

#### **3.1.Çalışmaya Ait Bilgiler ve Çalışma Sahasının Hazırlanması**

*Hipotez:* Karbondioksit ve karbonmonoksite maruz kalan sıçanlarda beyin ve kan dokusunda biyokimyasal aktivitedeki değişimlerin tespiti ve nöroglobin gen ifadesindeki etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

*Araştırma Tipi:* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulununun 2014/ A-90 no'lu kararı ile onaylanmış deneysel hayvan çalışmasıdır.

*Araştırmanın Evreni ve Örneklem Büyüklüğü:* İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinde (İNÜ-DEHÜM) üretilen ortalama 300 gr ( $\pm 50$  gr) ağırlığında 24 adet genç erkek Wistar albino türü rat kullanıldı. Ratlar, İNÜ-DEHÜM'de, 15 gün süreyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamın sağlandığı ve aspiratörlerle sürekli havalandırılan  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 'lik odalarda tutuldular. Ratlar deneyin yapılacağı süreye kadar 15gün boyunca usulüne uygun bir şekilde beslenmeleri sağlandı.

Karbonmonoksit ve karbondioksit maruziyetinin sağlayabileceği cam izolasyon sisteminin işleyişine ilişkin kontroller yapıldı ve problem olmadan sistemin işlediği anlaşıldı. Deneyde kullanılan karbonmonoksit ve karbondioksit tüpleri, özel gaz analiz sertifikaları ile birlikte, HABAŞ AŞ. Elazığ Bölge Müdürlüğü tarafından sağlandı.



**Resim 7:** Deneyin yapıldığı izole sistem ve kalite kontrollü sertifikalı CO/ CO<sub>2</sub> tüpleri

### 3.2. Deneyin Yapılışı

*Deney Grupları:* Çalışmada kullanılan 24 adet rat 3 gruba ayrılmış olup her grupta 8 tane hayvan bulunmaktadır. Yaptığımız bu araştırmada karbonmonksit ( %0,05) ve karbondioksit (%20) gazları kullanıldı. Gaz karışımları kuru hava ile tamponize şekildedir. Oranlara ilişkin kontrol sertifikaları mevcuttur.

Grup No	Sıçan Sayısı	Kullanılan Gaz	Gazın Oranı	Uygulama Süresi	Uygulama hızı
1	8	Kontrol	-----	-----	-----
2	8	Karbondioksit	%20	15 dk	0,1 L/dk
3	8	Karbonmonoksit	%0,05	15 dk	0,1 L/dk

**Tablo 1:** Çalışmada kullanılan deney gruplarına uygulanan karbondioksit ve karbonmonoksit dozu, uygulama süresi ve ortam koşullarının gösterilmesi

*1.Grup;* kontrol grubu için sadece standart takip yapıldı. Deney sonunda analjezik ve anestezi madde uygulandı. Tüm vücut kanı antioksidan enzim aktivitelerinin tayini için kalpten alındı. Bu işlemleri takiben dekapitasyon işlemi uygulanarak beyin dokusu çıkarıldı. Alınan kanların bir kısmı zaman kaybetmeksizin kan gazı ölçümü için İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Kan Gazı Analiz Laboratuvarına yönlendirildi ve analizler yapıldı. Geriye kalan kan ölçüm yapılacak ortamın sağlanması ve uygun şartların oluşturulmasına kadar  $-86^{\circ}\text{C}$ 'lik soğutucuya konuldu. Çıkarılan beyin dokusu yeteri kadar parçası genetik analizler ve biyokimyasal analizler için alındı.

*2.Grup;* Boyutları 90x60x70 cm olan cam izolasyon sistemi kontrol edildi. Deney düzeneği, bağlantı hortumlar, tüpe bağlı düzenleyici manometre ve güvenlik ayarları kontrol edildi. Deney sistemine karbondioksit gazı 0,1L/dk olacak şekilde verilerek karbondioksit (%20 lik) maruz bırakma işlemi yapıldı. Uçucu olan bu gazın, gazların dağılımı ilkesine göre kapalı kabın hacmini alması ve öz kütlesinin havadan ağır olması nedeniyle cam izolasyon sisteminin alt uçtaki borusundan gaz girişi, karşı üst taraftaki borusundan gaz çıkışı olacak şekilde diğer boruların kapatılması sağlandı. Böylece sıçanların ilgili gaza maruz kalacağı deney ortamının her alanında eşit dağılım olması amaçlandı. Sıçanlar ikişerli gruplar halinde kapalı gaz sistemi içerisinde belirtilen gazlara 15 dakika maruz bırakıldı.

Deney sonunda analjezik ve anesteziik madde uygulandı. Tüm vücut kanı antioksidan enzim aktivitelerinin tayini için kalpten alındı. Bu işlemleri takiben dekapitasyon işlemleri uygulanarak beyin dokusu çıkarıldı. Alınan kanların bir kısmı zaman kaybetmeksizin kan gazı ölçümü için İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Kan Gazı Analiz Laboratuvarına yönlendirildi ve analizler yapıldı. Geriye kalan kan ölçüm yapılacak ortamın sağlanması ve uygun şartların oluşturulmasına kadar  $-86^{\circ}\text{C}$ 'lik soğutucuya konuldu. Çıkarılan beyin dokusu yeteri kadar parçası genetik analizler ve biyokimyasal analizler için alındı.

*3.Grup:* Boyutları 90x60x70 cm olan cam izolasyon sistemi kontrol edildi. Deney düzeneği, bağlantı hortumlar, tüpe bağlı düzenleyici manometre ve güvenlik ayarları kontrol edildi. Deney sistemine karbonmonoksit gazı 0,1L/dk olacak şekilde verilerek karbonmonoksit (%0,05 lik) maruz bırakma işlemleri yapıldı. Uçucu olan bu gazın, gazların dağılımı ilkesine göre kapalı kabın hacmini alması ve öz kütlelerinin havadan hafif olması nedeniyle cam izolasyon sisteminin üst uçtaki borusundan gaz girişi, karşı alt taraftaki borusundan gaz çıkışı olacak şekilde diğer boruların kapatılması sağlandı. Böylece sıçanların ilgili gaza maruz kalacağı deney ortamının her alanında eşit dağılım olması amaçlandı. Sıçanlar ikişerli gruplar halinde kapalı gaz sistemi içerisinde belirtilen gazlara 15 dakika maruz bırakıldı.

Deney, yöntemde belirtilen bilgiler ışığında yapıldıktan sonra ratlara analjezik ve anesteziik madde uygulanarak, usulüne uygun bir şekilde dekapite edildi. Kan ve beyin dokuları genetik ve biyokimyasal çalışmalar yapılmak üzere alındı. Alınan beyin dokuları, koronal düzlemde iki parçaya bölünerek bir yarısı çalışmanın genetik basamağı için ayrıldı. Kalan beyin dokusu ve kan ise biyokimyasal analizler için ayrıldı. Alınan örnekler gerekli analizlerin yapılacağı süreye kadar  $-86$  derecede korunmak üzere ilgili laboratuvarlara usulüne uygun olarak iletildi.

Tüm vücut kanı antioksidan enzim aktivitelerinin tayini için kalpten alındı. Bu işlemleri takiben dekapitasyon işlemleri uygulanarak beyin dokusu çıkarıldı. Alınan kanların bir kısmı zaman kaybetmeksizin kan gazı ölçümü için İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Kan Gazı Analiz Laboratuvarına yönlendirildi ve analizler yapıldı. Geriye kalan kan ölçüm yapılacak ortamın sağlanması ve uygun şartların oluşturulmasına kadar  $-86^{\circ}\text{C}$ 'lik soğutucuya konuldu. Çıkarılan beyin dokusu yeteri kadar parçası genetik analizler ve biyokimyasal analizler için alındı.



**Resim 8:** Deneyin yapıldığı alan



### 3.3.Analizlerin Yapılışı ve Analiz Bulguları

#### 3.3.1.Kan Gazı Analizleri ve Analiz Bulguları

Tüm vücut kanı antioksidan enzim aktivitelerinin tayini için kalpten alındı. Alınan kanların bir kısmı zaman kaybetmeksizin kan gazı ölçümü için İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Kan Gazı Analiz Laboratuvarına yönlendirildi ve analizler yapıldı.

The image shows three printed laboratory reports from a Radiometer ABL 700 Series blood gas analyzer. Each report displays a comprehensive set of blood gas and electrolyte parameters. The reports are organized into sections: Blood Gas Values, Chemistry Values, Electrolyte Values, Metabolic Values, and Temperature-Corrected Values. Each section lists the parameter name, its unit, and the measured value. The reports are printed on white paper and are laid out side-by-side.

Resim 9: Yapılan kan gazı ölçüm sonuçları çıktısı



Resim 10: Kan gazı ölçümünün yapıldığı TÖTM kan gazı laboratuvarı.

	pH	pCO2	pO2	Hb	Hct
<b>Kontrol</b>	7,30± 0,05 <sup>a</sup>	56,52±8,87 <sup>a</sup>	13,93±3,91 <sup>a</sup>	12,60±4,42 <sup>a</sup>	38,77±13,39 <sup>a</sup>
<b>CO<sub>2</sub></b>	7,23± 0,05 <sup>b</sup>	70,08±8,48 <sup>b</sup>	11,66±5,56 <sup>ab</sup>	16,26± 0,75 <sup>b</sup>	49,68±2,31 <sup>ab</sup>
<b>CO</b>	7,24± 0,05 <sup>ab</sup>	59,76±4,89 <sup>ab</sup>	7,76± 4,19 <sup>b</sup>	14,91±1,46 <sup>ab</sup>	41,76±11,60 <sup>ab</sup>

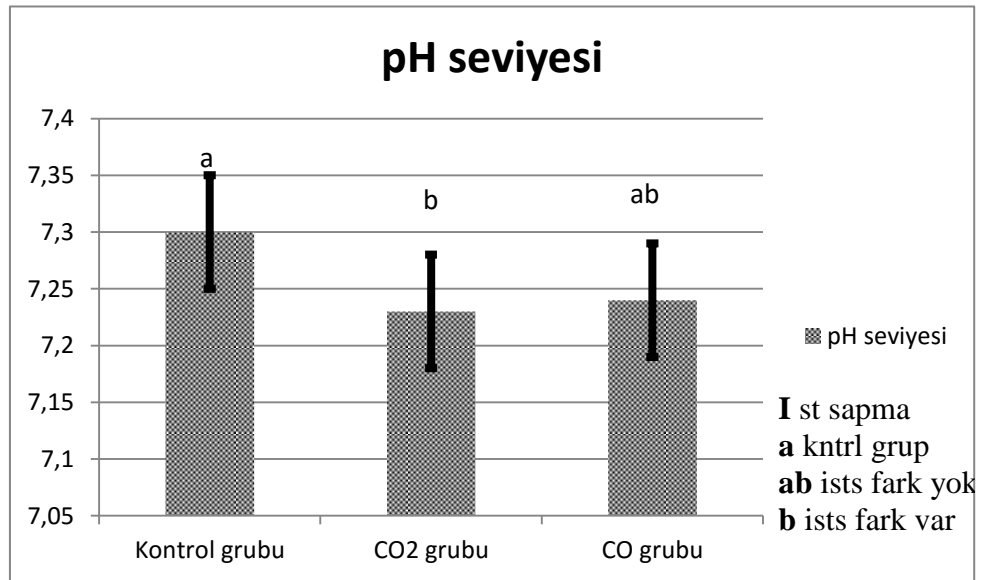
	FO2Hb	cK	cNa	cCl	cHCO3
<b>Kontrol</b>	9,60±5,00 <sup>a</sup>	4,26±0,50 <sup>a</sup>	137,50±2,61 <sup>a</sup>	114,12±7,23 <sup>a</sup>	23,07± 2,01 <sup>a</sup>
<b>CO<sub>2</sub></b>	8,38± 4,78 <sup>ab</sup>	3,55 ±0,64 <sup>b</sup>	138,5± 5,15 <sup>ab</sup>	112,75±5,92 <sup>ab</sup>	21,37± 2,23 <sup>ab</sup>
<b>CO</b>	7,38±5,82 <sup>ab</sup>	3,75± 0,42 <sup>ab</sup>	139,62±3,15 <sup>ab</sup>	116,87±8,33 <sup>ab</sup>	19,87± 2,42 <sup>b</sup>

**Tablo 2:** Kan gazı parametrelerine ait sonuçları

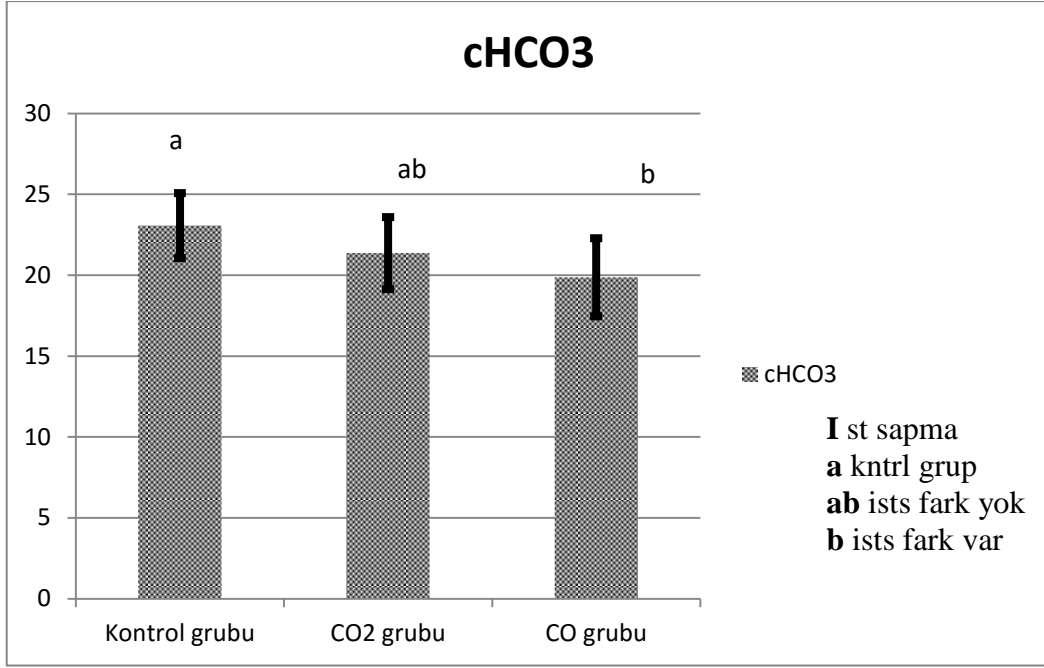
<sup>a</sup> sözkonusu parametre için gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark yok ( $p>0,05$ )

<sup>b</sup> sözkonusu parametre için gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark var ( $p<0,05$ )

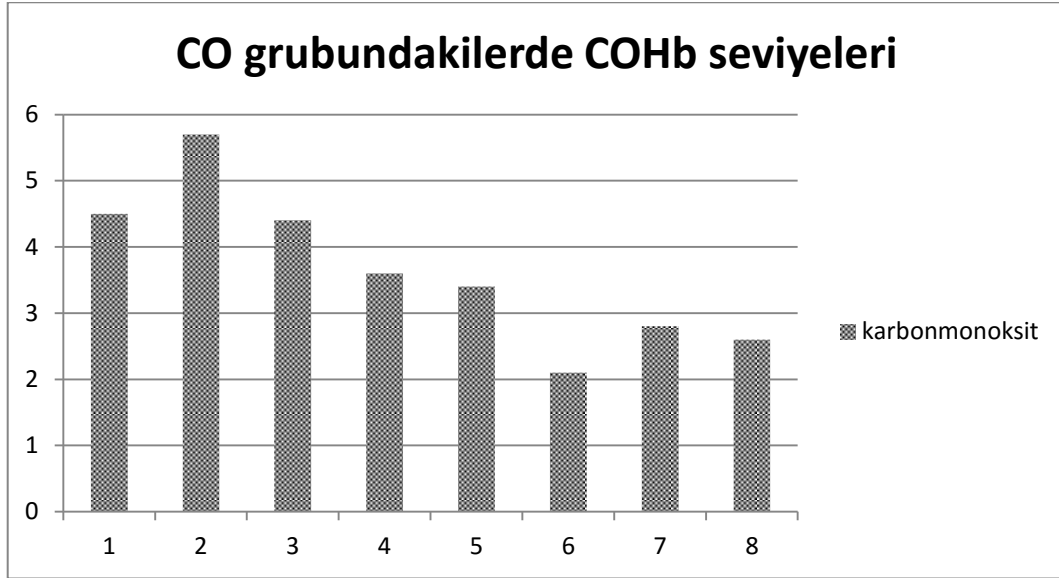
<sup>ab</sup> sözkonusu parametre için gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark yok ama artış ya da azalış var.



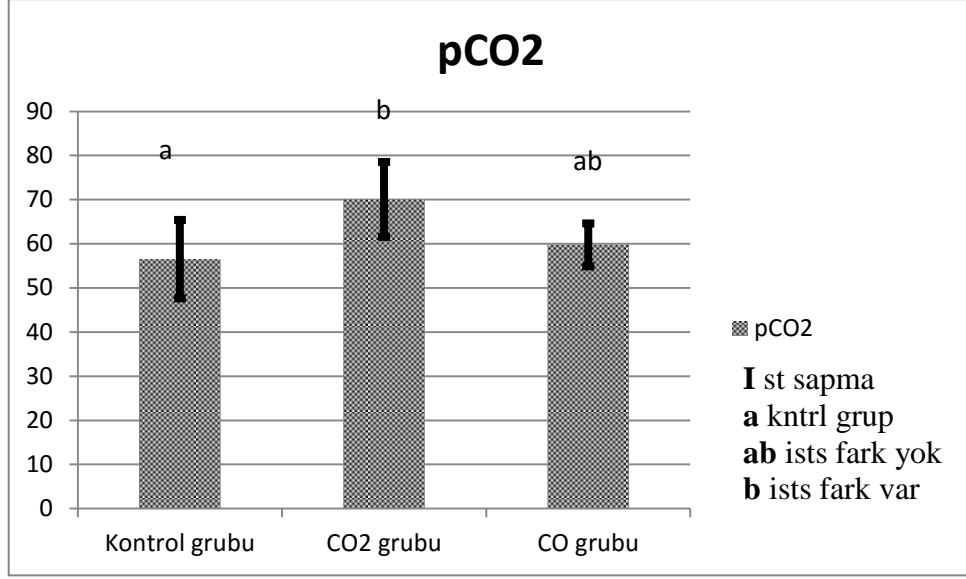
**Grafi 1:** Her iki grupta da etkilenmekle birlikte, CO<sub>2</sub> grubunda anlamlı düzeyde azalmış.



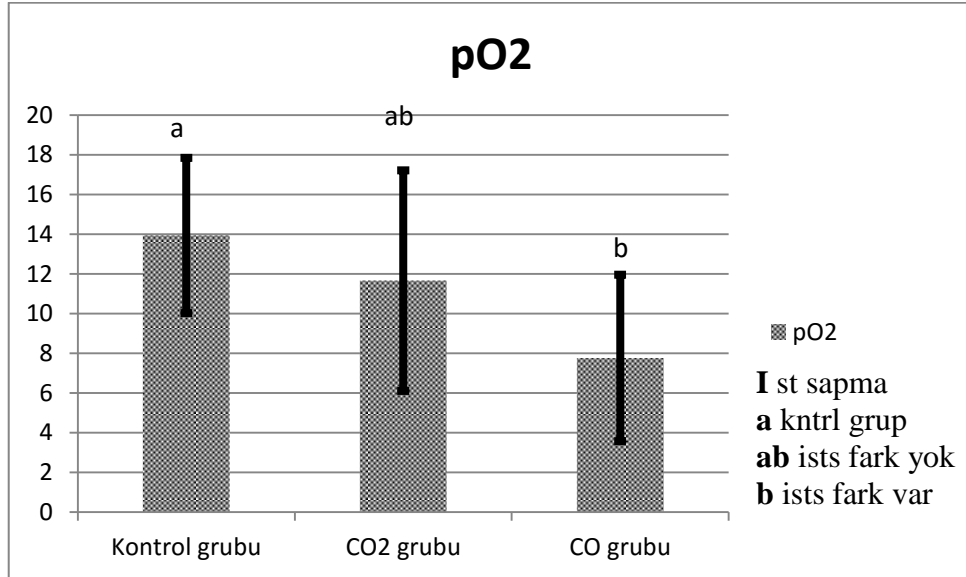
**Grafi 2:** Kontrol grubuna göre, her iki grupta etkilenmekle birlikte, CO grubunda anlamlı düzeyde azalmış.



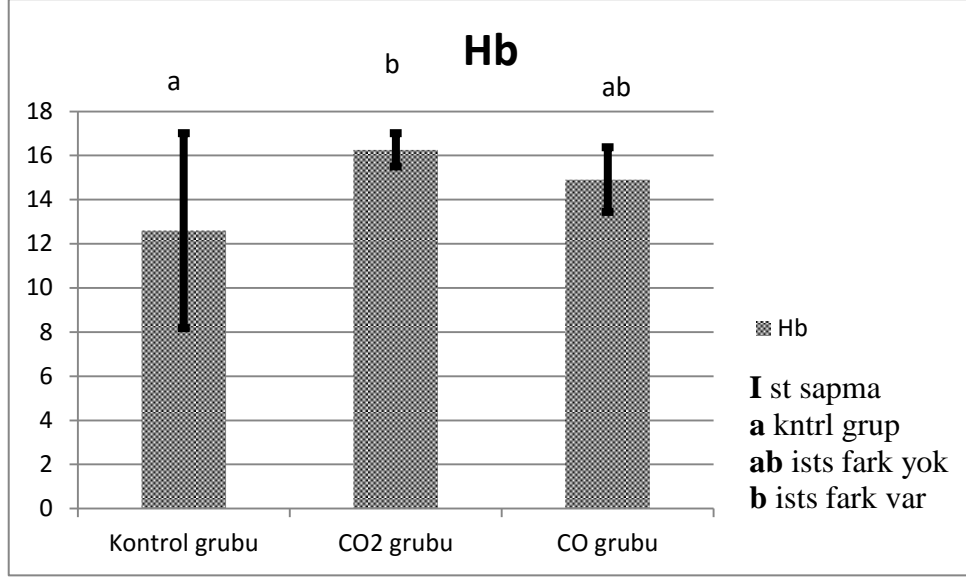
**Grafi 3:** COHb düzeyi diğer grublarda negatif olduğu için sadece karbonmonoksit verilen grupta incelendi, aynı koşullardaki her sıçanda farklı düzeylerde olduğu gözlemlendi.



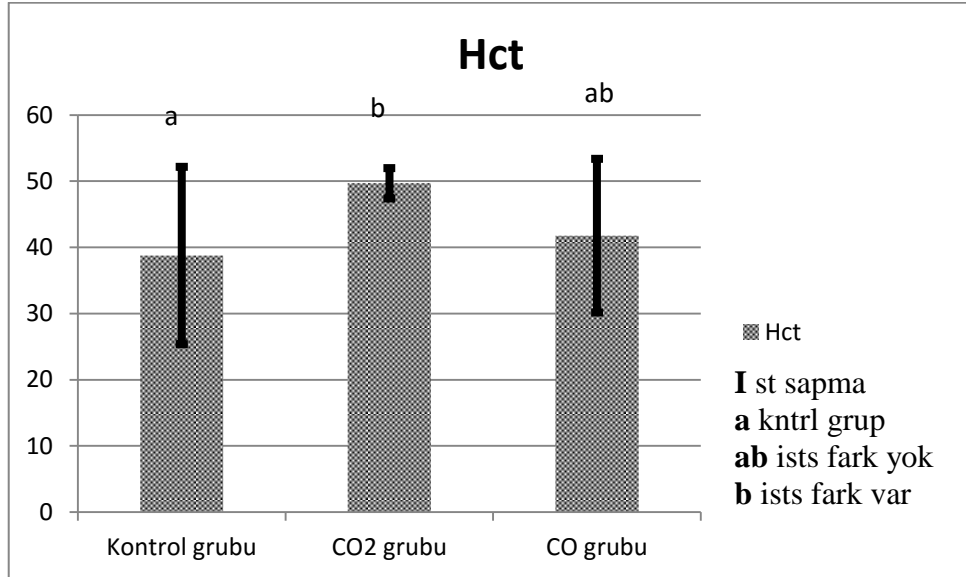
**Grafi 4:** Kontrol grubuna göre, CO2 grubunda anlamlı düzeyde artmış, CO grubunda anlamlı farklılık yok.



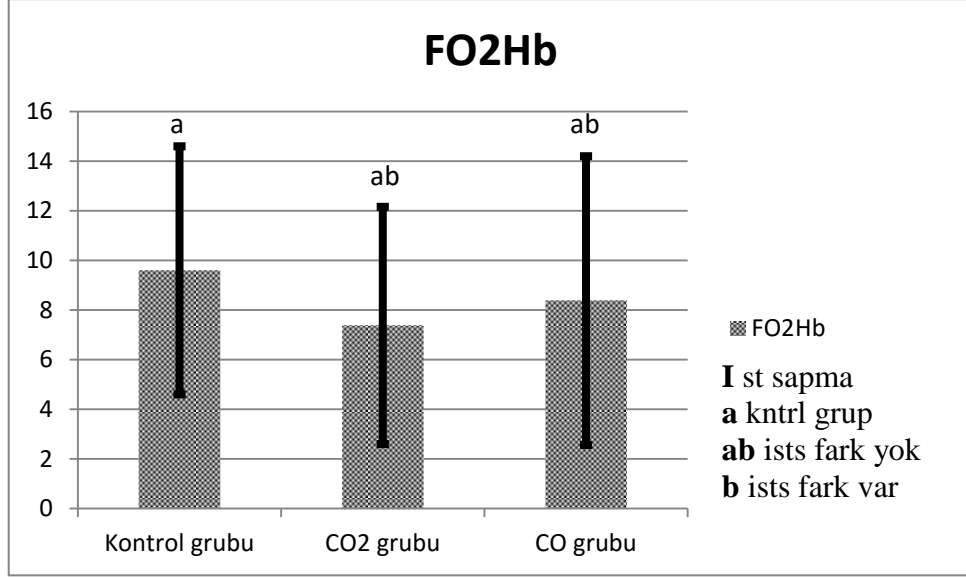
**Grafi 5:** Kontrol grubuna göre, her iki grupta etkilenmekle birlikte, CO<sub>2</sub> grubunda anlamlı düzeyde azalmış.



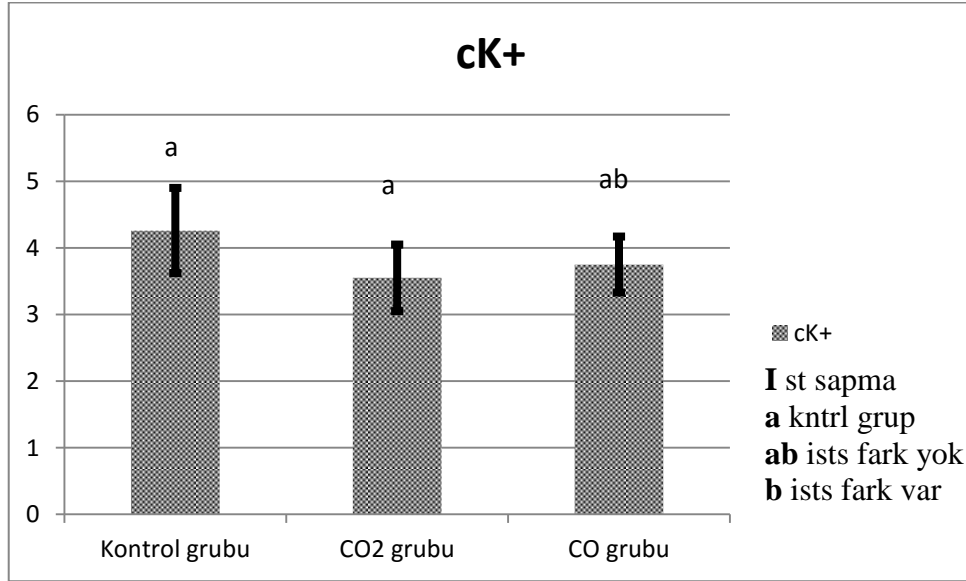
**Grafi 6:** Kontrol grubuna göre, CO2 grubunda anlamlı düzeyde yüksek, CO grubunda anlamlı farklılık yok.



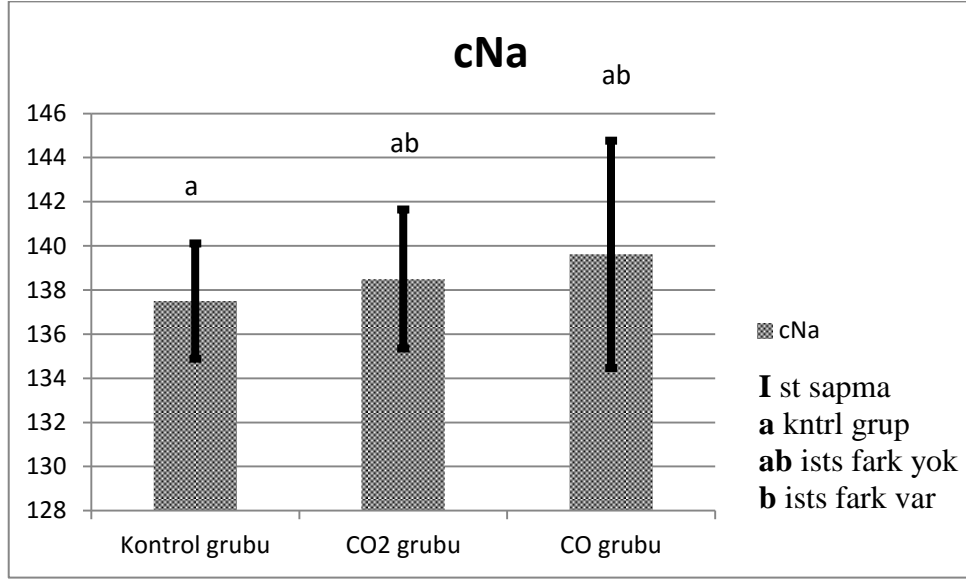
**Grafi 7:** Her iki grupta etkilenmekle birlikte, gruplar arası anlamlı farklılık yok



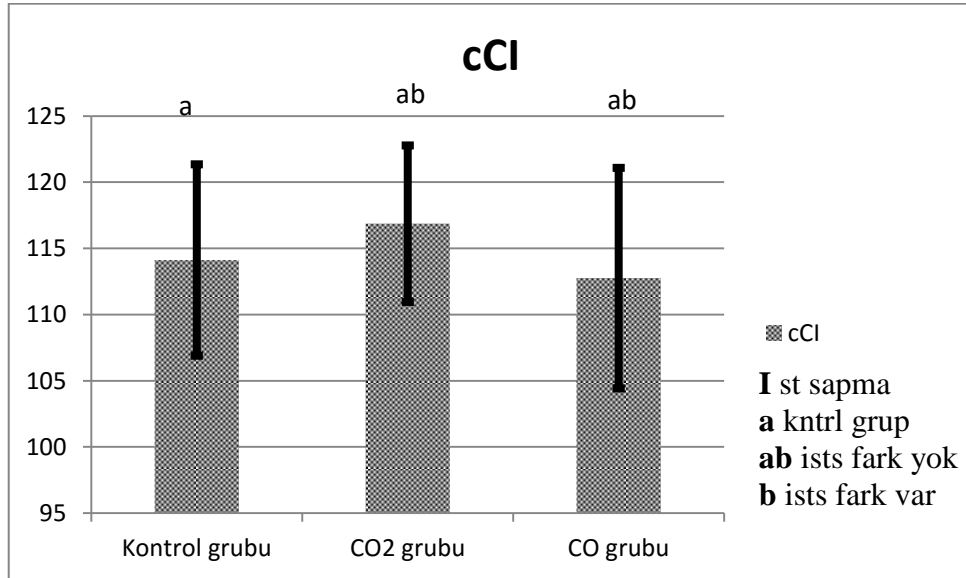
**Grafi 8:** Her iki grupta etkilenmekle birlikte, gruplar arası anlamlı farklılık yok



**Grafi 9:** Kontrol grubuna göre, her iki grupta etkilenmekle birlikte, CO<sub>2</sub> grubunda anlamlı düzeyde azalmış.



**Grafi 10:** Her iki grupta etkilenmekle birlikte, gruplar arası anlamlı farklılık yok



**Grafi 11:** Her iki grupta etkilenmekle birlikte, gruplar arası anlamlı farklılık yok

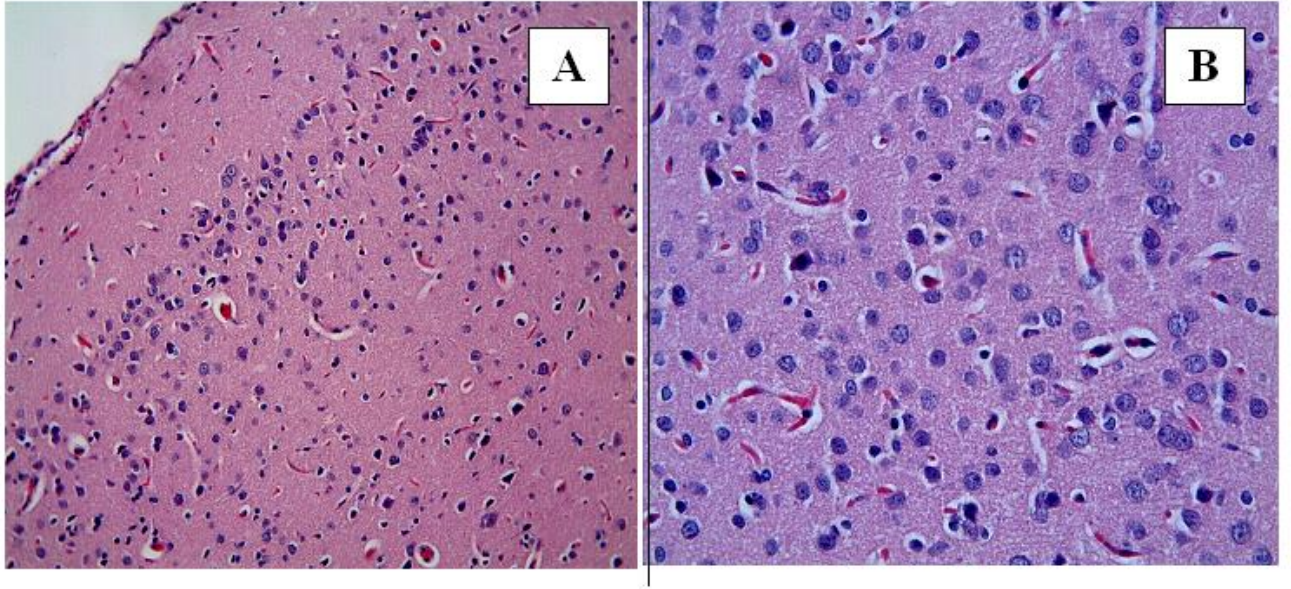
### 3.3.2.Histopatolojik Analizler

#### 3.3.2.1. Histopatolojik Analiz Hazırlıkları

Histopatolojik incelemeler için alınan beyin doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Tespit edilen dokulara rutin doku takip işlemleri uygulandı ve doku örnekleri parafin bloklar içine gömüldü. Hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen- Eozin boya metodu ile boyandı. Kesitler Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz sistemi kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı.

#### 3.3.2.2. Histopatolojik Analiz Bulguları

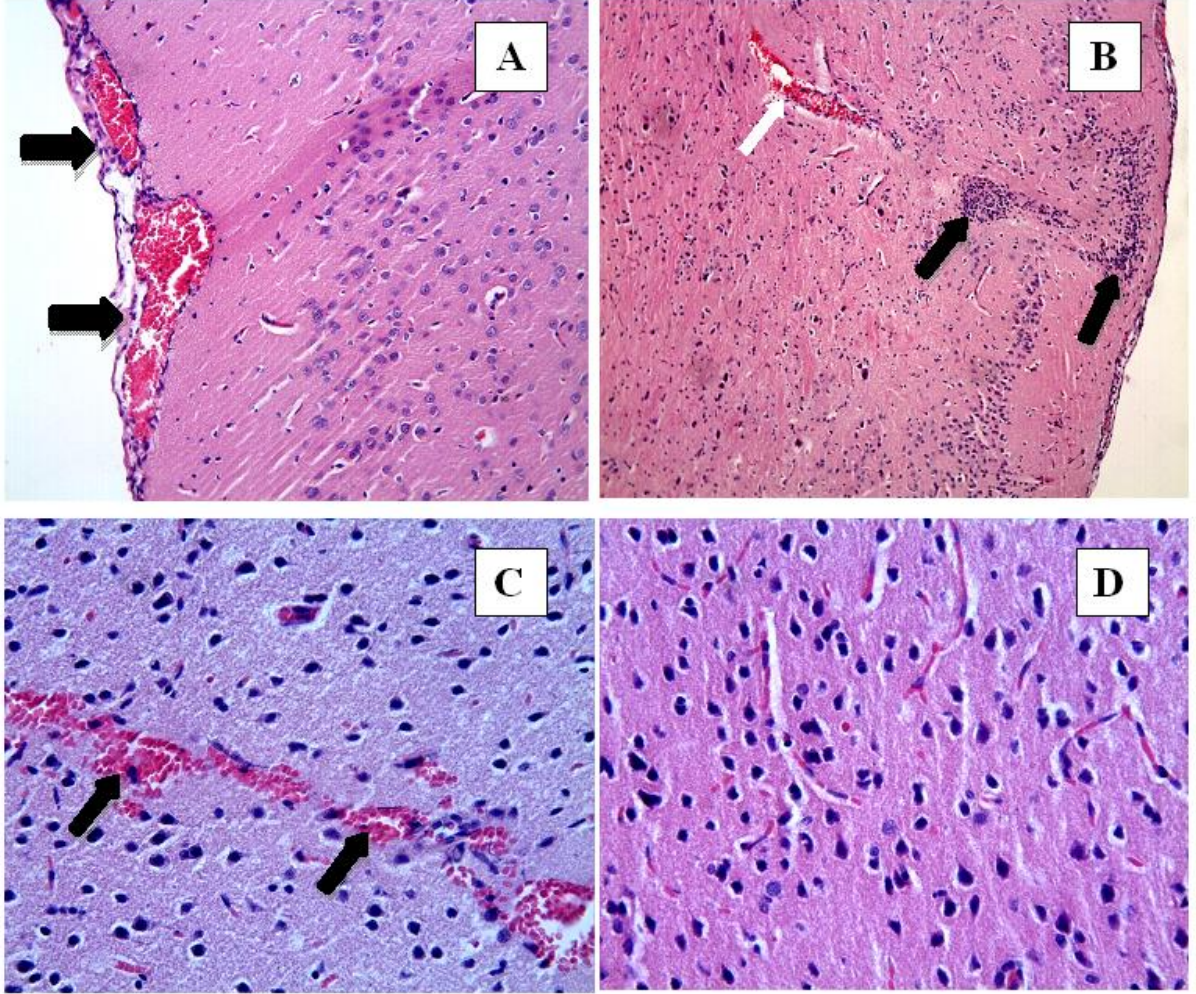
##### KONTROL GRUBU



**Resim 11:** Kontrol grubunda beyin dokusu normal histolojik görünümde izlendi. A:H-E; X20, B: H-E; X40.



CO GRUBU

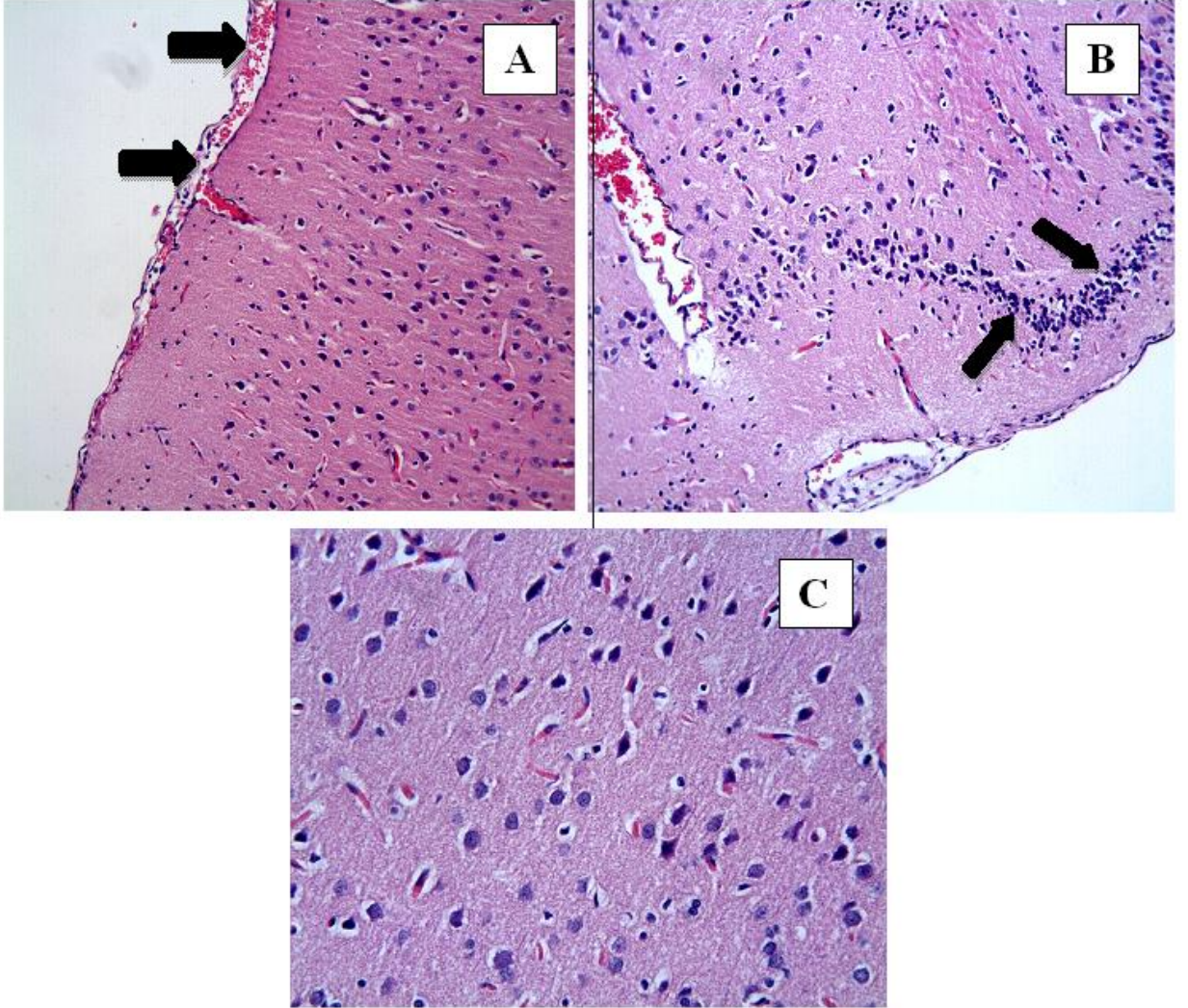


**Resim 12:** CO grubunda ise beyin dokusunda pia materde vasküler konjesyon (oklar) (A), serebral kortekste yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah oklar) ve vasküler konjesyon (beyaz ok) (B), hemoraji (siyah oklar) (C) ve nöron dejenerasyonu (D) gözlemlendi.

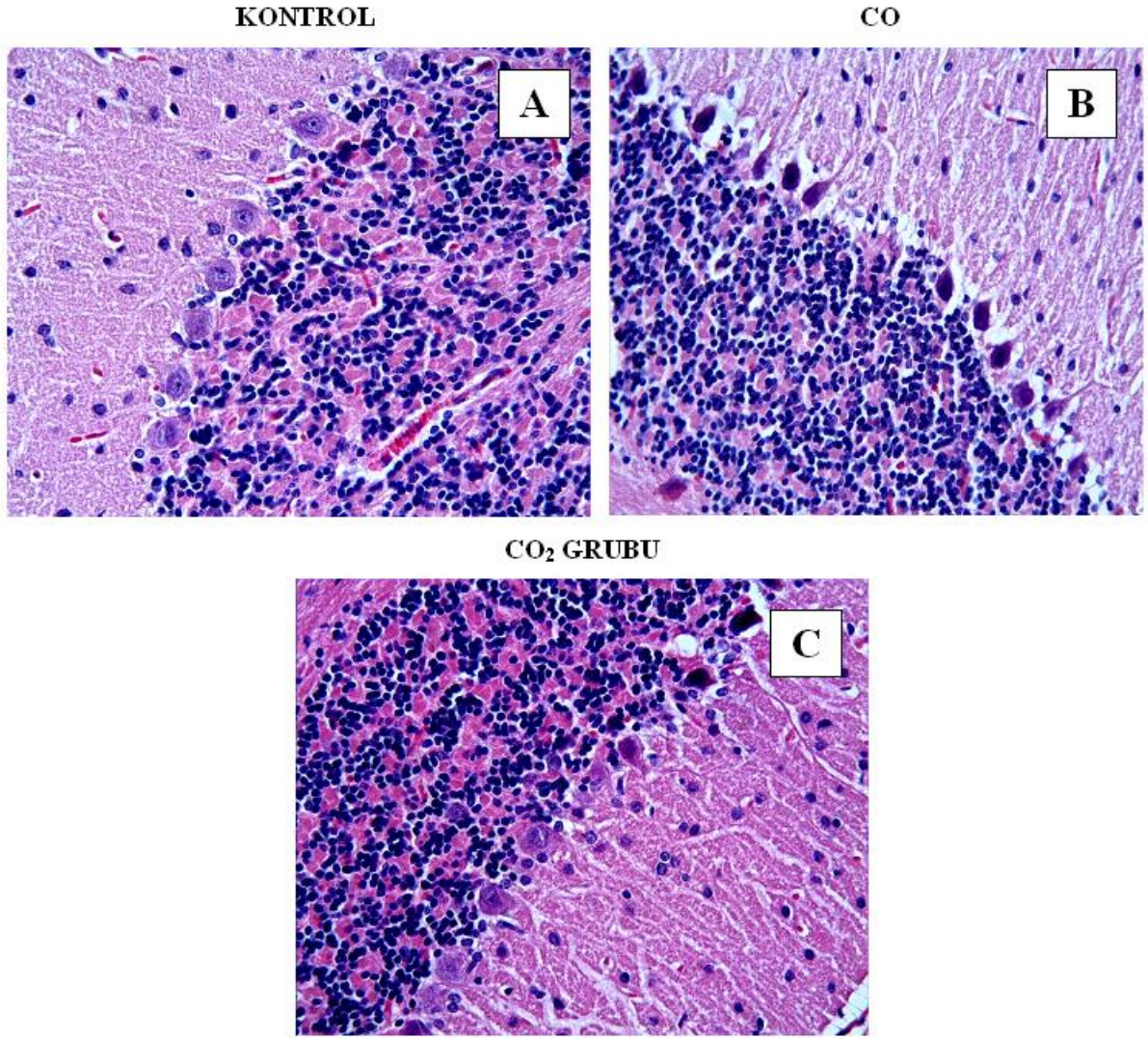
A: H-E; X20, B: H-E; X10, C,D: H-E; X40



CO<sub>2</sub> GRUBU



**Resim 13:** CO<sub>2</sub> grubunda ise pia materde az miktarda konjesyon (oklar) (A), hafif derecede mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar) (B), nöron dejenerasyonunda azalma (C) olduğu tespit edildi. A, B:H-E; X20, C: H-E; X40.



**Resim 14:** Kontrol grubunda beyincik dokusunda normal histolojik görünümde Purkinje hücreleri (A), CO grubunda ise dejenere Purkinje hücreleri (B), CO<sub>2</sub> grubunda ise daha az dejenere Purkinje hücreleri olduğu tespit edildi. A, B, C:H-E; X40.

### 3.3.3.Biyokimyasal Analizler

#### 3.3.3.1. Homojenatların Hazırlanması

Derin dondurucudan alınan dokular tartılarak cam tüplere konuldu. Üzerine 1/10 (g/h) oranında dilüsyon olacak şekilde %1,15'lik potasyum klorür ilave edildikten sonra soğuklukları muhafaza edilerek cam-teflon homojenizatörde 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika homojenize edildi. Hazırlanan bu homojenatlarda doku TBARS(MDA) ve protein tayinleri yapıldı. Geri kalan homojenat +4°C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm' de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Bu süpernatantlarda GSH ve protein düzeyleri ile GSH-Px ve CAT enzim aktiviteleri ölçüldü. Geri kalan süpernatant kısmına kloroform/etanol (3/5, h/h) karışımından oluşan ayıraç 1/1 (h/h) oranında ilave edildi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra 45 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan kloroform/etanol fazında SOD enzim aktivitesi ve protein ölçümleri tekrar yapıldı.

#### *Kullanılan Alet ve Cihazlar*

Balon joje (5, 10, 25, 50 ml)	Isolab
Beher (25, 50, 100 ml)	
Bidistile su cihazı	GFL 2104
Cam tüp (16x100 mm)	Isolab
Erlen (25, 50, 100, 250 ml)	
Hassas terazi	Denver instrument Apx-153
Homojenizatör	B.BRAUN 853022
İnkübatör	Nüve FN500
Manyetik karıştırıcı	Colara Magnetomix
Mavi ve sarı pipet ucu	Isolab
Mikro pipet (10-100, 100-1000 µl)	Thermo Labsystems
pH metre	WTW pH 340i
Sogutmalı santrifüj	Hettich Universal 320R
-20°C soğutucu	Arçelik 2553 D
Spektrofotometre	Techcomp UV 7500
Spektrofotometre küveti	
Su banyosu	Nüve NB9
Vorteks	Velp Scientifica 10.0176

**Tablo 3:** Biyokimyasal analizlerde kullanılan alet ve cihazlar



### ***Kullanılan Kimyasal Maddeler***

Amonyum sülfat	Merck 1216
Bakır-2-klorür	Merck 2733
Bakır-2-sülfat	Merck 1.02787
Disodyum etilendiamintetraasetik asit dihidrat	Sigma E5134
Disodyum hidrojen fosfat-2-hidrat	Merck 6580
5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit	AppliChem 69-78-3
Etanol	Riedel 32221
Folin&ciocalteus-phenol Reaktifi	Sigma F9252
Glutasyon peroksidaz	Sigma G6137
Glutasyon redüktaz	Sigma G3664
Hidrojen peroksit (%35)	Merck 1.08600
Hidroklorik asit (%37)	Merck 1. 00314
İndirgenmiş glutasyon	Sigma G4251
İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat	Sigma N1630
Ksantin	Sigma X7375
Ksantin oksidaz	Sigma X4376
Kloroform	Merck 2431
Likopen FS % 10 FS DSM	redivivoTM 0108
Nitroblu tetrazolyum klorür	Sigma N6639
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck 4873
Potasyum hidroksit	Merck 5032
Potasyum klorür	Merck 4936
Sığır serum albümini	Fluka 05470
Sodyum azid	Riedel 35088
Sodyum hidroksit	Sigma S-0899
Sodyum karbonat	Merck 1. 06398. 1000
Sodyum klorür	Merck 1. 06404. 1000
Sodyum potasyum tartarat	Merck 8085. 1000
1,1',3,3'- Tetraetoksiopropan	Acros Organics 122-31-6
2,3,7,8-Tetraklorodibenzo- <i>p</i> -	AccuStandard D-404N
Trikloroasetik asit	Merck 807
Tris tamponu	Sigma T6066
2-Tiyobarbitürik asit	Merck 1. 08180. 0025

**Tablo 4:** Biyokimyasal analizlerde kimyasal maddeler

*Doku TBARS Düzeylerinin Ölçümü;* Doku TBARS düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark. tarafından önerilen metoda göre yapıldı (97).

Prensip: doku TBARS tayini; aerobik şartlar altında ve pH:3,5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda bir saat inkubasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA (malondialdehit)'nin TBA (tiyobarbitürik asit) ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

*Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü;* Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin ( $O_2$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır.

Dokulardaki SOD enzim aktivitesi Sun ve ark. tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı (98).

Prensip: SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazolium (NBT) indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan süperoksit radikallerinin NBT'yi indirgemesi ile oluşan renkli formazon spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbanans verir. Enzimin olmadığı ortamlarda indirgenme meydana gelerek mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD bulunduğunda ise indirgenme olmayıp mavi-mor renk oluşmaz ve enzim aktivitesine bağlı olarak daha açık bir renk oluşur.

*Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivite Ölçümü;* Glutasyon peroksidaz, redükte glutasyonu kullanarak  $H_2O_2$ 'nin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir.

Dokulardaki GPx aktivitelerinin tayini Beutler tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı (99).

Prensip: glutasyon peroksidaz,  $H_2O_2$  varlığında GSH'yi okside glutasyon (GSSG)'a dönüşmesini katalize eder.  $H_2O_2$ 'nin bulunduğu ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımıyla tekrar GSH'a dönüştürülür. GPx aktivitesi, deney ortamındaki NADPH'nin  $NADP^+$ 'ya çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen absorbanans farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplanır.

*Doku Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü;* katalaz, katalitik aktivitesiyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi dekompoze ederek su ve oksijene dönüştürmektedir.

Dokulardaki CAT enzim aktivitelerinin tayini Aebi tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı (100).

Prensip: Hidrojen peroksit, 240 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir. Deney ortamına ilave edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin CAT enzimi tarafından parçalanması, ultraviyole spektrumda bir absorbans azalması olarak takip edilir. Absorbansta görülen bu azalma enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

*Doku Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü;* Dokulardaki GSH aktiviteleri Ellman tarafından ditiyonitro benzoik asit geri çevirim metodu olarak tanımlanan yöntemle göre tayin edildi(101).

Prensip: 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), sülfhidril bileşikleri tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturur. Bu sarı renkli bileşiğin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülerek GSH aktivitesi saptanır.

*Doku Protein Ölçümü;* Homojenat ve süpernatantlardaki protein miktarı tayinleri Lowry ve ark. tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçüldü(102).

Prensip: Alkali bakır ayırıcındaki Cu<sup>++</sup> peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Folin- Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi bir renk şekillenir. Oluşan bu renk 700 nm'de okunur.

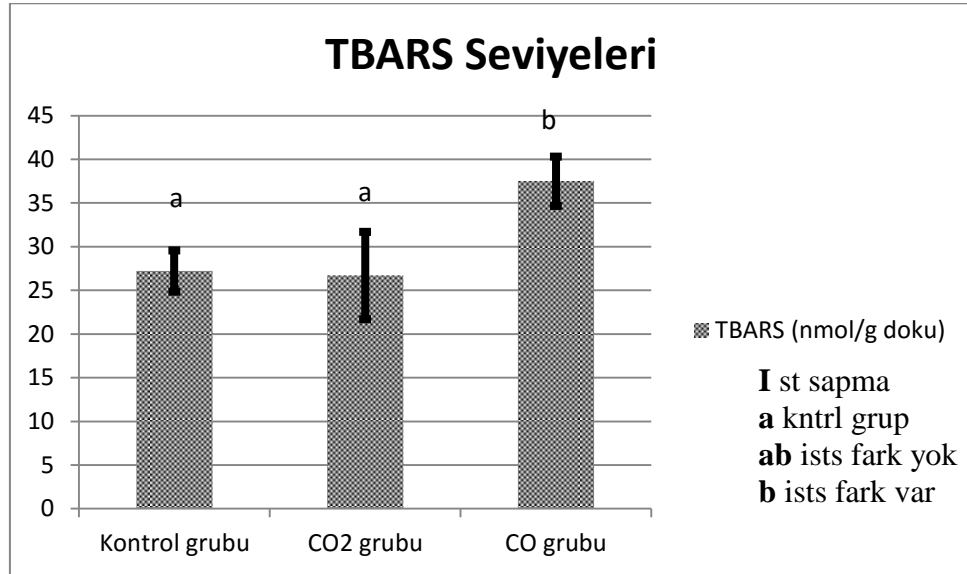
Biyokimyasal değişkenlerdeki istatistiksel analizler; "SPSS for Windows 12.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Normallik testi yapıldıktan sonra tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile gruplar arası farklılıklar karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edildi ve p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3.3.3.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları

	TBARS (nmol/g doku)	GSH nmol/ml	CAT kU/mg protein	SOD (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)
Kontrol	27,2±2,36 <sup>a</sup>	95,8±21,8 <sup>a</sup>	0,0114±0,001 <sup>a</sup>	18,9±3,86 <sup>a</sup>	262,8±88,5 <sup>a</sup>
CO <sub>2</sub>	26,7±5,00 <sup>a</sup>	82,6±16,4 <sup>ab</sup>	0,0047±0,0007 <sup>b</sup>	15,6±3,46 <sup>ab</sup>	243,4±82,0 <sup>a</sup>
CO	37,5±2,82 <sup>b</sup>	75,1±13,1 <sup>b</sup>	0,0026±0,0006 <sup>b</sup>	14,5±2,22 <sup>b</sup>	212,9±29,2 <sup>a</sup>

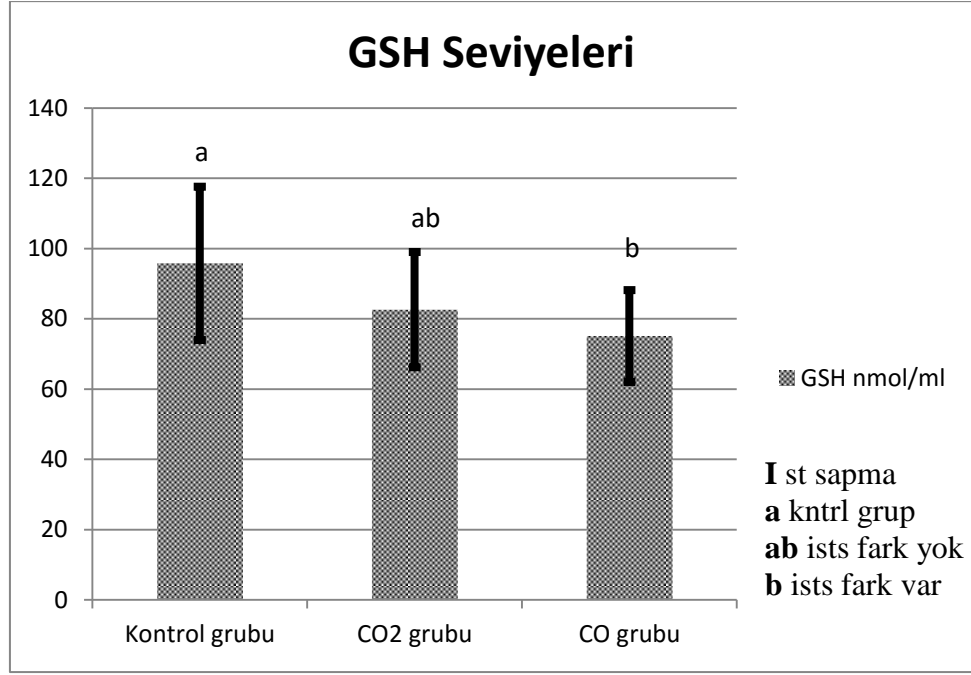
Aynı sütundaki a,b harfleri gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir(p≤0,001).

**Tablo 5:** CO, CO<sub>2</sub> verilen ratlarda beyin dokusu TBARS, GSH, CAT, SOD ve GPx düzeyleri. (n=8, mean±SD)

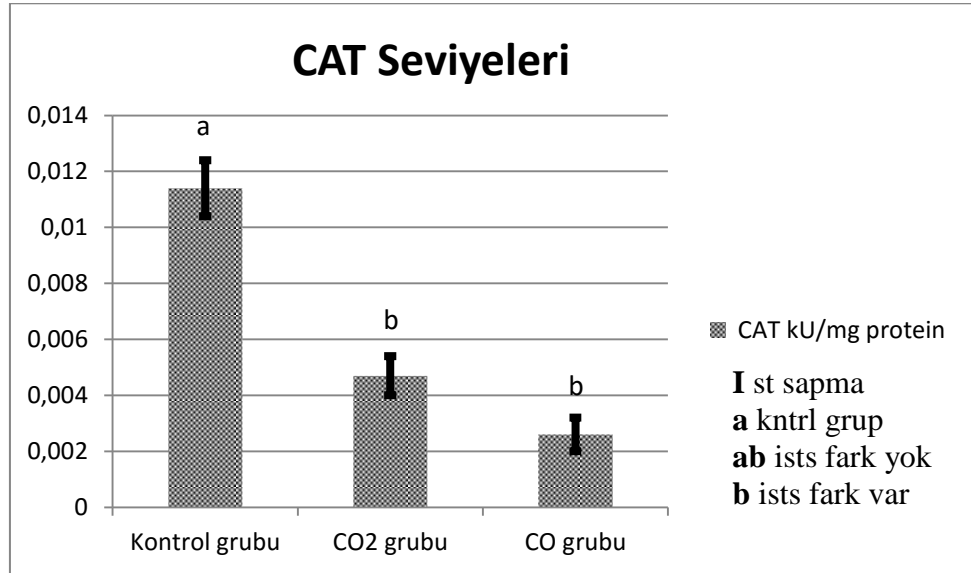


**Grafi 12:**Karbonmonoksit grubunda TBARS düzeyi kontrol ve karbondioksit grubuna göre anlamlı seviyede yüksek.

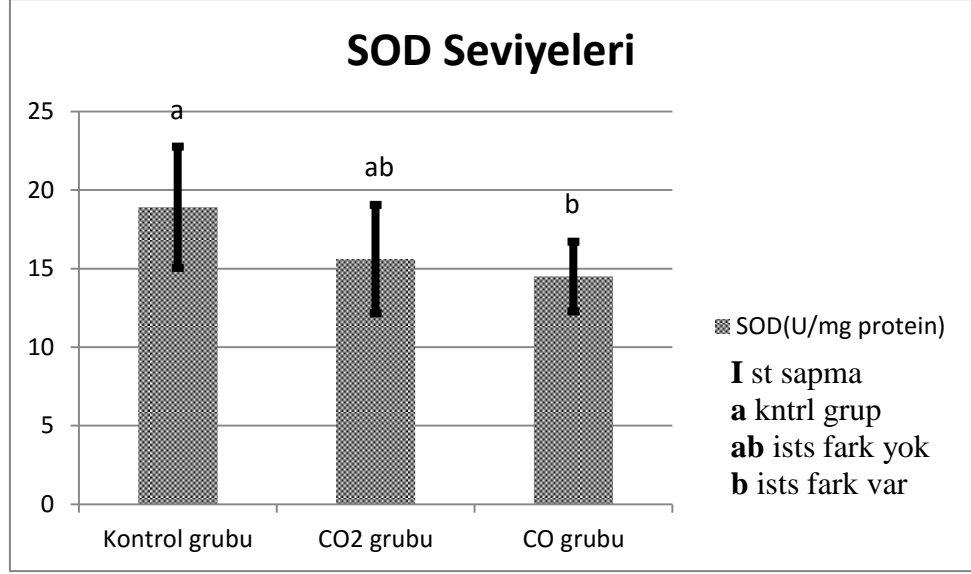




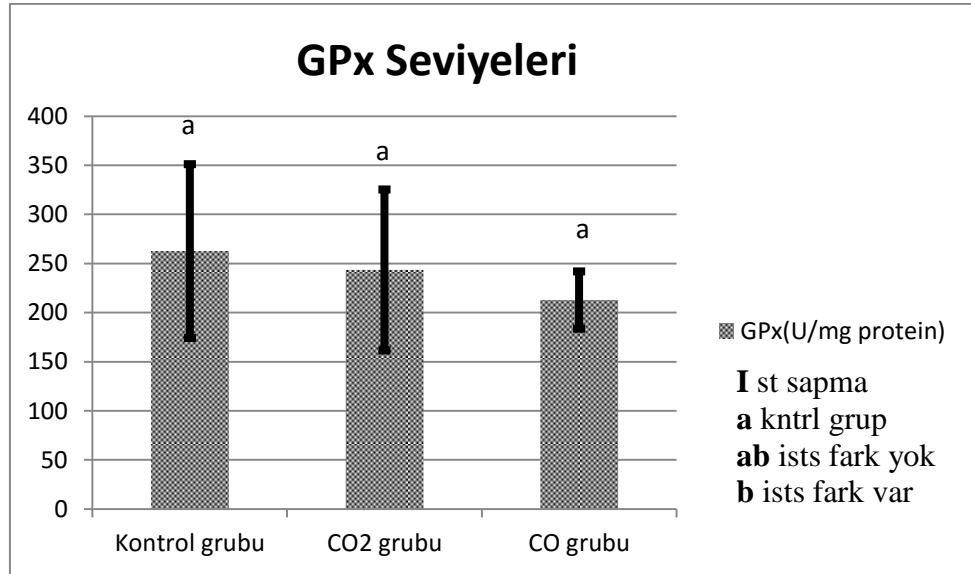
**Grafi 13:** Karbonmonoksit grubunda GSH düzeyi kontrol ve karbondioksit grubuna göre anlamlı seviyede düşük. Karbondioksit grubunda GSH düzeyi kontrol grubuna göre değişmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı seviyede değil.



**Grafi 14:** Karbondioksit ve karbonmonoksit gruplarda CAT düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı seviyede düşük.



**Grafi 15:** Karbonmonoksit grubunda SOD düzeyi kontrol ve karbondioksit grubuna göre anlamlı seviyede düşük. Karbondioksit grubunda SOD düzeyi kontrol grubuna göre değişmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı seviyede değil.



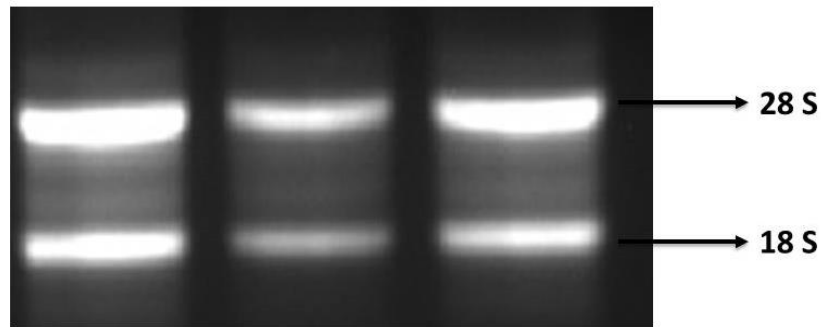
**Grafi 16:** Karbondioksit ve karbonmonoksit gruplarında GPx düzeyi kontrol grubuna göre değişmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı seviyede değil.

### 3.3.4.Moleküler Genetik Analizler

#### 3.3.4.1.Homojenatların Hazırlanması

Beyin dokusu *Ngb* mRNA seviyelerinin tespiti için gruplardan alınan doku örnekleri steril şartlarda buz üzerinde küçük parçalar halinde kesilerek RNA saklama çözeltisi içine konuldu ve bu dokulardan Roche firmasının ürettiği “High Pure RNA Tissue kit” (lot no: 10156400) kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı. Protokole göre önce 25 mg doku tartıldı ve üzerine 350µl “Lysis Buffer” eklendi. Daha sonra homojenizatörde 13,500 rpm hızda yaklaşık 1 dakika buz üzerinde homojenize edildi. Daha sonra homojenatın üzerine hacminin yarısı kadar etanol eklendi bu karışım vortexlendikten sonra 13000xg’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolonun altındaki koleksiyon tüpü döktü ve tekrar takılarak işleme devam edildi, daha sonra kolona 100 µl “Dnase” eklendi ve 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 500 µl Wash buffer I eklenerek ve 8000x g de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi, üzerine 500 µl Wash buffer II eklendi ve 8000x g de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Daha sonra üzerine 300µl Wash buffer II eklendi ve 13000xg’de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpü atıldı ve kolon steril bir ependorf tüpe alındı bu işlemden sonra kolona 100 µl “Elüsyon buffer” eklendi ve 8000xg’de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi tüpte toplanan sıvı total RNA olarak elde edildi.

“High Pure RNA Kit Protokolü” kiti ile beyin dokusu örneklerinden saflaştırılan toplam RNA’larda herhangi bir yıkımın olup olmadığını belirlemek amacıyla örnekler, % 1 agaroz jelinde ve 1X TBE tamponu ile 100 mV’de elektroforez işlemine tabi tutuldu. RNA görüntülemesi UVP marka ChemiDoc it<sup>2</sup> sistemi ile ultraviyole ışık altında gerçekleştirildi Saflaştırılan RNA’larda 28S ve 18S ribozomal bantlarının varlığı ve herhangi bir yıkım olmadığı görüldü (resim 15).



**Resim 15:** Her bir gruba ait beyin doku örneklerinden saflaştırılan RNA’lar.

Ayrıca dokulardan saflaştırılan RNA örneklerinin spektrofotometrik analizleri yapıldı, örneklerin saf RNA içerdiği tespit edildi. Örneklerin RNA'ları miktar ve saflık tayini için "Biotek" marka spektrofotometre cihazı ile "Gen5" programları kullanılarak 260 ve 280 nm UV spektrumunda ölçüldü. RNA miktarı ng/μL cinsinden hesaplandı ve 260/280 oranları yaklaşık 2 olan saf RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanıldı (Tablo 1).

### 3.3.4.2.Moleküler Genetik Analiz Bulguları

	Numune No	Absorbans: 260/280	RNA miktarı: ng/μl
KONTOL	1	2.0	190.4
	2	2.0	219.6
	3	2.0	146.0
	4	2.0	154.9
	5	2.0	221.7
	6	2.0	200.2
	7	2.0	188.9
	8	2.0	146.1
KARBONDİOKSİT	9	2.0	219.1
	10	2.0	165.2
	11	2.0	204.6
	12	2.0	114.0
	13	2.0	200.6
	14	2.0	94.9
	15	2.0	125.7
	16	2.0	122.0
KARBONMONOKSİT	17	2.0	136.7
	18	2.0	137.2
	19	2.1	183.5
	20	2.0	225.9
	21	2.1	170.4
	22	2.1	192.3
	23	2.1	88.9
	24	2.0	130.3

**Tablo 6:** Gruplarda ölçülen doku RNA spektrofotometrik absorbans değerleri ve RNA miktarları.

### ***cDNA Sentez Protokolü***

cDNA sentezi için Roche firmasının ürettiği “Transcriptor First strand cDNA Synthesis” kiti (Lot no:14585924)” kullanıldı. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Kısaca 100 µl’lik PZR tüpüne 220 ng toplam RNA, 1 µl OligodT18 (50 pmol/µl), 1 µl Random Hexamer Primer (600 pmol/µl) ve toplam hacim 13 µl olacak şekilde bidistile su eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 65 °C’de 10 dakika PZR makinesinde ısıtıldı. Bu karışımın üzerine 4 µl “Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer”, 0,5 µl “Protector RNase Inhibitor”, 2 µl Deoxynucleotide Mix (her nükleotid için 10 mM konsantrasyonda), 0,5 µl “Transcriptor Reverse Transcriptase” enzimi eklendi ve böylece toplam hacim 20 µl oldu. Karıştırılan numuneler PZR makinesinde 25 °C’de 10 dakika, 55 °C’de 60 dakika ve 85 °C’de 5 dakika ısıtıldı daha sonra -20 °C’de analize kadar saklandı.

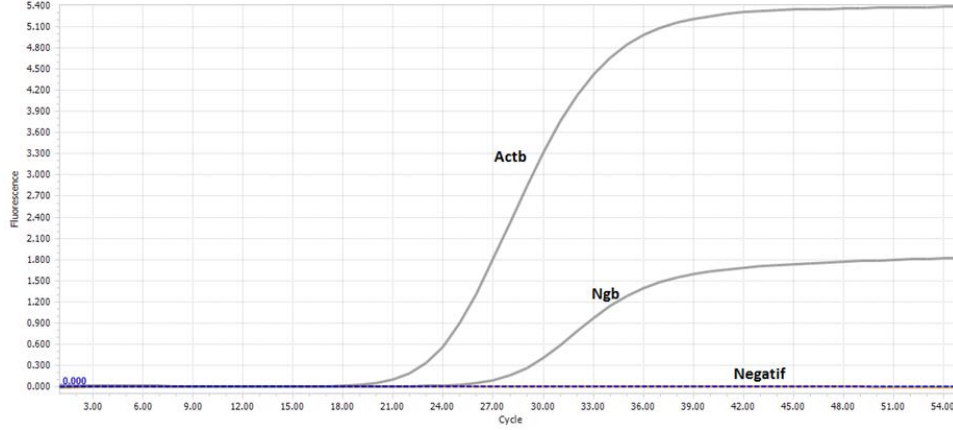
### ***Gerçek Zamanlı PZR Protokolü***

Gerçek zamanlı PZR analizi; Roche Light Cycler 96 gerçek zamanlı PZR cihazı, Roche firmasının ürettiği “Fast Start Essential DNA Probes Master kit (Lot no: 10048800)” ve “Real Time Ready Assay (β-Actin lot no: 90017829, Config no: 100081783 NGB lot no: 90017828, config no: 100099177)” (8 pmol/µl) hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 10 µl toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 5 µl master mix, 0,5 µl real time ready mix, 2 µl PCR kalitesinde su ve 2,5 µl cDNA olacak şekilde hazırlandı. Çalışmada her örnek için 3 tekrar yapıldı. PZR şartları firmanın önerdiği şekilde yapıldı; ilk denaturasyon 95°C’de 10 dakika, ikinci denaturasyon 95°C’de 10 saniye, bağlanma 60°C’de 30 saniye ve polimerizasyon 72°C’de 1 saniye olarak oluşturuldu ve 55 döngü tekrarlandı. Tablo 2’de dizilimleri ve büyüklükleri verilen primerler NGB gen ifadelerinin analizinde kullanıldı.

GEN ADI	Primer dizisi (Forward ve Reverse)	NCBI Reference Sequence Number	111 bp
<i>Actb</i>	F: 5’ CTAAGGCCAACCGTGAAAAG 3’	NM_031144.3	79 bp
<i>Ngb</i>	R: 5’ GCCTGGATGGCTACGTACA 3’	NM_033359	Beklenen Primer PCR ürün büyüklüğü (Amplifikasyon ürünü)

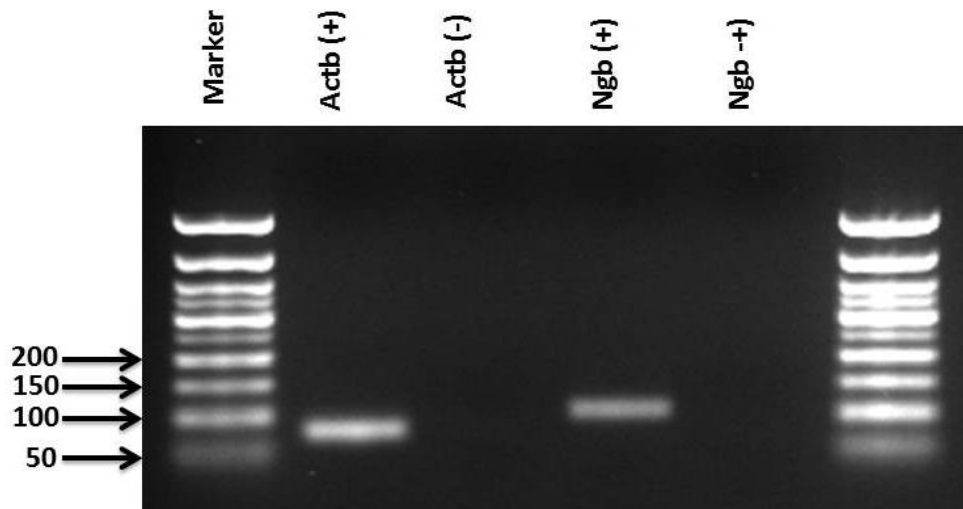
**Tablo 7:** Primer dizilimleri (Ek1 ve Ek 2)

Her bir örnekten saflaştırılan RNA'lardan elde edilen cDNA'lar,  $\beta$ -aktin ve Ngb genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile çoğaltıldı (Şekil ) ve Ngb gen ifadesindeki değişimler  $\beta$ -aktin genine oranla belirlendi.



**Grafi 17:** “Hydrolysis Probe” kimyası kullanılarak  $\beta$  -aktin ve Ngb mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasında oluşan çoğalım eğrileri.

$\beta$  -aktin ve Ngb cDNA'ları kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZR sonrası agaroz jelinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının özgüllüğü kontrol edildi. Analiz sonucunda her iki gen için de tek ve istenilen boyda bir DNA bandı oluştuğu görüldü (Şekil).



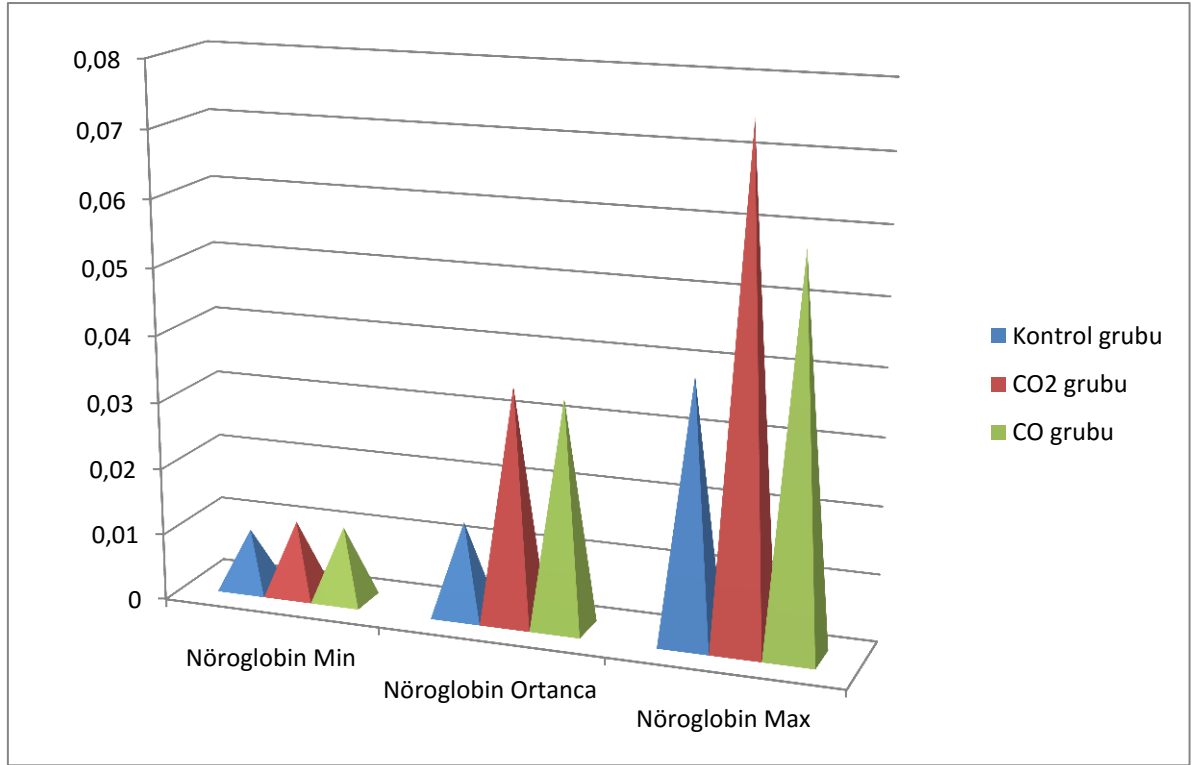
**Resim 16:**  $\beta$  -aktin ve Ngb cDNA'larının PZR'deki çoğalımının agaroz jel (%1.5) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 50 bp DNA Markeri'dir (Bioron, 50 bp, catalog no: 304007).

## İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiki analizinde MedCalc® (11.4.2.0) programı kullanıldı. Beyin dokusu gen ifade değerlerinin Shapiro-Wilk testi ile analizi yapılması sonucunda normal olmayan dağılım gösterdikleri belirlendi ( $p < 0,05$ ) ve veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak gösterildi. Gruplar arasında herhangi bir farkın olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi.

Gruplar (n=8)	Ortanca (Min-Maks)
Kontrol	0,014 (0,0089-0,039)
CO <sub>2</sub>	0,035 (0,011-0,075)
CO	0,034 (0,011-0,058)

**Tablo 8:** Beyin *Ngb* gen ifadeleri



**Grafi 18:** Beyin *Ngb* gen ifadeleri (minimum, maksimum,ortanca değerleri)

Beyin *Ngb* Gen ifadeleri arasında Kruskal-Wallis testi sonrası herhangi bir anlamlı fark tespit edilemedi ( $P=0,143$ )

### Ek 1: $\beta$ -aktin (*Actb*) Gen Dizilimi

Sıçan  $\beta$ -aktin geninin 1293 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM\_031144.3

```
1 gtcgagtcgctccaccgcgagtacaacctcttcgagctcctccgctgcccgggtccac
61 accgccaccagttgccatggatgacgatatcgctgcgctcgtcgtcgacaacgggtcc
121 ggcatgtgcaaggccggcttcgcggggcagcagatgctccccgggcccgttccctccatc
181 gtgggcccgcctaggcaccagggtgtgatgggggtatgggtcagaaggactcctacgtg
241 ggcgacgagcccagagcaagagaggcatcctgacctgaagtacccattgaacacgggc
301 attgtaccaactgggacgatatggagaagatttggcaccacatttctacaatgagctg
361 cgtgtggcccctgaggagcacctgtgctgctcaccgaggccccttgaaccctaaggcc
421 aaccgtgaaaagatgaccagatcatgtttgagacctcaacaccccagccatgtacgta
    >>>>>>>>>>                <<<<<<<<<<<
481 gccatccaggctgtgttgcctctgtatgcctctggctgtaccactggcattgtgatggac
    <<<<<<<<<<<<<
541 tccggagacggggtcaccacactgtgccatctatgagggttacgcgctccctcatgcc
601 atcctgcgtctggacctggctggccgggacctgacagactacctcatgaagatcctgacc
661 gagcgtggctacagcttcaccaccacagctgagagggaaatcgtgcgtgacattaaagag
721 aagetgtgetatgttgccttagacttcgagcaagagatggccactgccgcatcctcttcc
781 tcctggagaagagctatgagctgcctgacggtcaggtcatcactatcggcaatgagcgg
841 ttccgatgccccgaggctctctccagccttcttctgggtatggaatcctgtggcatc
901 catgaaactacattcaattccatcatgaagtgtgacgttgacatccgtaaagaccttat
961 gccaacacagtgtgtctggggcaccacctgtaccagcattgctgacaggatgcag
1021 aaggagattactgccctggctcctagcacatgaagatcaagatcattgctcctcctgag
1081 cgcaagtactctgtgtgattgggtggctctatcctggcctcactgtccacctccagcag
1141 atgtggatcagcaagcaggagtacgatgagtcggcccctccatcgtgcaccgaaatgc
1201 ttctagggcggactgttactgagctgcgttttacaccttctttgacaaaacctaacttg
1261 cgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer





#### **4. TARTIŞMA ve SONUC**

Kan gazı ve biyokimyasal analizlerde; vücutta oksidatif strese bağlı oluşan metabolik süreçte çeşitli etkilenmelerin mevcut olduğu görüldü. Yapılan kangazı analiz sonuçlarında her iki madde içinde pH düzeyi ve HCO<sub>3</sub> düzeyinde azalma olması ve asitlik ortamı göstermektedir. Na, Cl ve K elementleri vücut asitliğinin belirlenmesinde önemli rol olmaktadır. Bizim çalışmamızda bu elementlere ait değişikliklerin olduğu K seviyesinin anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. Bu değişimlerin oksidatif stres ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Kangazı analizlerinde dikkat çeken diğer vir nokta ise aynı ortamda, aynı sürede ve şekilde Karbonmonoksit maruz bırakılan sıçanlarda farklı dozlarda COHb görülmesidir. Bu bulgular literatür bilgileri ile uyumludur. Çıkan bu değişikliklerin biyokimyasal parametrelerin değişimi neticesinde olduğu anlaşılmaktadır(103-105).

Oksidatif stres, lipid peroksidasyonunun belirteci olan TBARS ile SOD, CAT, GPx (enzimatik) ve GSH (enzimatik olmayan) enzimlerinden oluşan antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik durumudur Dokularda oluşabilecek serbest radikaller ve diğer ROS (reaktif oksijen türleri) ürünleri SOD, CAT, GSH-Px, GSH-redüktaz gibi antioksidan savunma sistemleri tarafından etkili bir biçimde temizlenebilmektedir. Oksidan ve antioksidan denge arasındaki değişiklikler sonucunda meydana gelmekte ve ROT lehindeki artışlar oksidatif hasar olarak görülebilmektedir Oksidatif stres dönüşümsüz hücre hasarı ve birçok enzimin inaktivasyonuna neden olabilmektedir Serbest radikaller yüksek reaktivitelerinden dolayı hücre zarında bulunan doymamış yağ asitleri ile etkileşerek lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir. Oluşan lipid peroksiditler kolaylıkla yıkımlanarak başta MDA olmak üzere birçok sekonder ürünler meydana getirebilmektedir. Bu ürünlerin çok çabuk bir şekilde ortamda farklı ürünlere dönüşmesi ve saptanmalarının zorluğu nedeniyle, bu çalışmada lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak TBA ile MDA arasında oluşan tiyübarbitürik asit reaktif sübstanlarının (TBARS) düzeyleri analiz edilmeye çalışılmıştır (106-109).

TBARS, SOD, CAT, GSH ve GPx düzeylerine ait değerler tablo.... da verilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda karbonmonoksit verilen ratlarda oksidatif hasarın göstergesi olan TBARS düzeyinin kontrol ve diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi. Bununla birlikte karbonmonoksit uygulamasının antioksidan savunma sistemi elemanları olan GSH, SOD ve CAT düzeylerinde istatistik olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu tespit edildi. Bu sonuçlara göre

karbonmonoksit maruz kalan beyin dokusunda hasar oluştuğu anlamı çıkmıştır. Antioksidan savunma sistemi elemanlarından GPx düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. GPx enzimatik bir tepkime olması nedeniyle, bu farklılığın GPx aktivitesinin maruziyetin ilerleyen dönemlerinde artmasına bağlı olabileceği düşünöldü. Bu hasarın, oksijene göre 200-250 kat daha fazla bir afinite ile hemoglobine bağlanan, karbonmonoksitin oluşturduğu histotoksik ve anemik hipoksinin aynı anda söz konusu olduğu asfiksi nedeniyle oluşabileceği düşünöldü.

Karbondioksit verilen ratlarda oksidatif hasarın göstergesi olan TBARS düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir farklılık olmadığı tespit edildi. Bununla birlikte karbondioksit uygulamasının antioksidan savunma sistemi elemanları olan GSH, SOD ve GPx düzeylerinde düzeylerinde değişikliklere neden olduğu, ancak istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık olmadığı tespit edildi. Antioksidan savunma sistemi elemanlarından CAT düzeyinde ise istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu tespit edildi. Karbondioksitin hemoglobin afinitesinin karbondioksit göre düşük olması nedeniyle antioksidan mekanizmalardan GSH, SOD ve GPx düzeylerinde büyük bir değişiklik olmadığı göröldü. Katalaz, peroksizomlarda ve sitozolde bulunan ve yapısında hem içeren bir protein olup, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in moleküler oksijen ve suya çevrilmesini katalizler. CAT'ın burada anlamlı bir şekilde etkilenmesindeki temel olayın hemoglobine bağlı olan CO<sub>2</sub> miktarı nedeniyle kanda bulunan CAT üzerinde negatif etkiyi diğer antioksidanlara göre daha fazla artırmış olması olabileceği düşünöldü.

Histopatolojik incelemelerde; kontrol grubunda beyin ve beyincik dokusu normal histolojik görünümde izlendi (Resim 11A,B). Kontrol grubuna ait Hematoksilen- Eozin (H-E) ile boyanan beyin dokusundaki nöronların ökromatik nükleus ve nükleolusu belirgindi (Resim 11B). Kontrol grubu beyincik dokusunun tabakalarının ve Purkinje hücrelerinin normal histolojik görünümde olduğu tespit edildi (Resim 14A). CO ve CO<sub>2</sub> gruplarında ise beyin dokusunda bazı histopatolojik değişiklikler olduğu gözlemlendi. Bu değişiklikler pia materde vasküler konjesyon (Resim 12A,13A), serebral kortekste belirgin hücre infiltrasyonu (Resim 12B, 13B), serebral kortekste vasküler konjesyon (Resim 12B,13B), hemoraji (Resim 12C) ve nöronlarda dejenerasyon (Resim 12D, 13C) (sitoplazmik büzölme ve eozinofili gösteren, piknotik nükleuslu nöronlar) olarak tespit edildi. CO ve CO<sub>2</sub> grupları karşılaştırıldığında CO grubunda histopatolojik hasarın daha belirgin olduğu, CO<sub>2</sub> grubunda ise daha hafif derecede olduğu tespit edildi. Ayrıca CO

uygulanan grupta beyincik dokusunda ise Purkinje hücrelerinde belirgin dejenerasyon olduğu (Resim 14B), CO<sub>2</sub> uygulanan grupta ise (Resim 14C) CO grubuna göre daha az Purkinje hücre dejenerasyonu olduğu tespit edildi. Bu hasarlardaki farklılığın, oksijene göre 200-250 kat daha fazla bir afinite ile hemoglobine bağlanan, karbonmonoksitin oluşturduğu histotoksik ve anemik hipoksinin aynı anda söz konusu olduğu asfiksi nedeniyle bu grupta daha ciddi seyrettiği düşünüldü. Beyin ve dolayısıyla nöronlar oksijen ihtiyaçları yüksek olan dokulardır. Aynı zamanda özgün metabolizmalarını sağlayan çeşitli enzimler nedeniyle, oksijen seviyesinin azalmasına bağlı oluşan hipoksinin yanı sıra, dışardan verilen maddelerin enzimler üzerindeki etkisine bağlı dokuda farklı düzeyde hasar oluşturmaktadırlar. CO'in oluşturduğu kimyasal hipoksi nedeniyle beyin dokusunun hasarının bu grupta CO<sub>2</sub>'na göre daha ciddi olacağı düşünüldü (110-113).

Moleküler genetik incelemelerde; her grup için ayrı ayrı *Ngb* Gen ifadelerine bakılmıştır. Grup içinde farklı sıçanlarda tespit edilen *Ngb* mRNA düzeyleri arasında geniş aralıklar olduğu görülmüştür. Gruplarda ortalama *Nbg* gen seviyeleri artmış olmasına rağmen yapılan istatistiksel ölçümlerde (Kruskal-Wallis testi sonrası) herhangi bir anlamlı fark tespit edilememiştir. *Ngb* m RNA sentezinin çeşitli durumlarda arttığı ve nöroprotektif yönde etkisi olduğu bilinmektedir. Fordel E ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı çalışmada; farklı oksijen oranı içeren hipoksi durumlarında, hücredeki enerji üretiminin hücre solunumundan anaerobik glikolize geçirilmesinde görevi olan bir faktör olan *Hypoxia Inducible Factor 1α (HIF-1α)* seviyesindeki değişime oranla, nöroglobin seviyesinin değişim miktarının sınırlı olduğunu ve nöroglobin sentezi düzenleyen farklı mekanizmaların da olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada literatürü destekler niteliktedir (90).

Yapılan kan gazı ve biyokimyasal analizler sonucunda farklı pH ve oksidatif stres düzeyleri oluşan gruplarda *Ngb* mRNA sentezinde oluşan değişikliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca gruplar arasında nöroglobin mRNA düzeyinin belirlenmesinde değişen toksik gazında primer bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Picotti P ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada; in vitro olarak globin türevlerinin farklı pH değerlerinde (farklı asidik ortamlarda) fonksiyonel ve yapısal açıdan oluşan değişimler analiz edilmiştir. Nöroglobin ve myogloblin ile yapılan çalışmada pH düzeyleri 2 ve 7 olarak seçilmiş olup, nöroglobinin bu iki farklı pH düzeyi için fonksiyonel ve

yapısal açıdan, myoglobine göre daha stabil olduğu saptamışlardır. Bizim çalışmamızdan çıkan sonuçlarda bu literatür bilgisini destekler niteliktedir (92).

Nöroglobin, son yıllarda tanımlanan ve diğer globin yapıdaki proteinlere göre mekanizması tam açıklanamamış olan bir proteindir. Nöroprotektif etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Nöronal hipoksi, beyin travması, çeşitli toksit maddelerin belirli seviyelerinde (örn; arsenik) arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca apoptozis ve hücrel çeşitli sinyal basamaklarında rol aldığı yönünde hipotezler ve halen devam eden çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızın sonucunda *Ngb* geninin karbondioksit ve karbonmonoksit maruziyetine bağlı sentezinde bir değişiklik olup olmayacağını anlaşılması hedeflenmiştir. Deney sonrası gruplar arası, beyin *Ngb Gen* ifadeleri arasında Kruskal-Wallis testi sonrası herhangi bir anlamlı fark tespit edilememiştir ( $P=0,143$ ) Uygulanan doz ( $CO_2$  %20'lik,  $CO$  %0,05'lik) ve süre içerisinde (15 dk) sentez beyin *Ngb Gen* miktarının gruplar arası ortanca değerinin arttığı tespit edilmiş ise de yapılan istatistiksel analizler neticesinde anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir. Literatürde yapılan çalışmaların incelenmesi neticesinde çalışmamızda %0,05'lik karbonmonoksit dozu seçilmiştir. Çalışmamızda karbonmonoksite maruz bırakılan grupta çıkan verilerde, karboksihemoglobin (COHb) seviyesi  $3,75 \pm 2,15$  (min= 2,10; max=5,70) olarak ölçülmüştür. Yapılan deney neticesinde, maruziyet oranı ve sürelerinin değişeceği çalışmalarda *Ngb* mRNA sentezinde anlamlı farklılıklar olacağı yönünde bir kanaat oluşmuştur. Bizim çalışmamızın *Ngb* geni üzerinde literatürde yapılan toksik gazlara maruziyet açısından *ilk in vivo karşılaştırma çalışması* olması yönüyle, diğer çalışmalara rehberlik edeceğini düşünmekteyiz.

Genetik ve/veya biyokimyasal toksikolojiyi ilgilendiren çalışmalardan genellikle ölçülebilir ve net sonuçlar hedeflenir. Yapılan çalışma ve buna benzer biyokimyasal ve genetik toksikolojiyi ilgilendiren çalışmalar, Adli Toksikoloji ile iç içe düşünülmesi teknolojinin ve çağımızdaki bilimsel gelişimin gereğidir. Genetik ve/veya biyokimyasal toksikolojiyi ilgilendiren çalışmalardan elde edilecek ölçülebilir ve güvenilir veriler adli olayların aydınlatılmasında önemli bir role bürünebilir. Örneğin, zehirlenme sonucu ölen birinde yapılacak olan genetik/biyokimyasal toksisite testleri neticesinde elde edilecek güvenilir bir sonuç olayın adli açıdan aydınlatılmasında temel rol oynayacaktır. Bu nedenle Adli Toksikoloji bilimini ilgilendiren konularda teknolojiye uygun cihazlarla, multi/interdisipliner yaklaşımlarla yapılan çalışmaların artırılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

## 5. ÖZET

Toksikolojik analizlerin objektif kriterler sağlayarak, herhangi bir kuşkuya yer vermeden sonuçlanması analizlerin adli olayların aydınlatılmasındaki önemini göstermektedir. Örneğin; otopsi esnasında soğuğa bağlı gelişen bir ölü lekesinin karbonmonoksit zehirlenmesinde de benzer şekilde görülebileceği Adli Tıp pratiğinde karşılaşılan bir durumdur. Aynı zaman da açık bir alanda yanan bir cesetten bakılan kanda karboksihemoglobin (COHb) seviyesinin ölümcül sınırlar içerisinde olmaması tanı ve ayırıcı tanılarda problemlere yol açabilmektedir. Gelişen analiz yöntemi ve bu yöntemlerin uygulandığı cihazları adli toksikoloji alanında kullanmak daha az metaryal ile daha net sonuçlar vermek Adli Toksikoloji ve Adli Tıbbın teknoloji ile birlikte ilerlemesine katkıda bulunacaktır. Biyokimyasal ve Genetik Toksikolojinin gelişimi ile ölçümü yapılabilen genotoksisite reaksiyonları, Adli Toksikolojinin sağlayacağı interdisipliner yaklaşımlarla Adli Tıbbın gelişimi ve kriminal olayların daha etkin bir şekilde aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

Karbonmonoksitin neden olduğu asfiksilerde, karboksihemoglobin (CO-Hb) düzeyi kullanılmakla birlikte, oluşan toksisite durumunun her insanda farklılık göstermesi ve ağırlık derecesinin her zaman için COHb düzeyi ile korale olmaması nedeniyle farklı mekanizmaların da toksisitede yer aldığı düşünülmektedir. Bu durumun açıklanması için karboksihemoglobinden daha spesifik belirteçler bulmaya yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Asfiksi olgularının ayırımında klasik bilgi olarak globin türevi olan hemoglobin ve miyoglobin üzerinden teoriler öne sürülmektedir. Neuroglobin (Nöroglobin) ise globin türevleri içerisinde bulunan yeni tanımlanmış bir monomerik globin türevidir. Nöro-endokrin dokularda nöroprotektif rolü olduğu yönünde çalışmalar yapılan ve nöroglobin, 2000'li yılların başında tanımlanmıştır. Nöroglobinin; hemoglobin ve myoglobin gibi hem-türevi içeren, insan ve omurgalılarda bulunan solunumsal bir protein olduğu belirtilmektedir. Çalışmalarda Merkezi sinir sisteminde (MSS) ve Çevresel Sinir Sistemi (ÇSS) en yüksek ifade düzeyine sahip olduğu, retinada yüksek olmakla birlikte esas olarak beyinde sentezlendiği bildirilmiştir. Adenohipofiz, böbrek üstü bezi, testisler gibi endokrin dokularda sentezlendiği yönünde görüşler mevcuttur. Beyinde hasar nedeniyle oluşan durumlarda, arsenik gibi nörotoksik ajanlara bağlı oluşan durumlarda nöroglobin sentezi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Bu araştırmada karbondioksit ve karbonmonoksite maruz kalan ratların beyin ve kan dokusunda biyokimyasal parametrelerin değişimi, beyin dokusunda nöroglobin gen ifade seviyeleri ve histopatolojik olarak beyin dokusundaki değişimlerin belirlenmesi amaçlandı. Nöroglobin sentezinin karbonmonoksitin etkisi ile karbondioksitin etkisinden farklı miktarda oluşacağı hipotezi kuruldu.

Yapılan çalışmadan çıkan sonuçlara göre; sıçanlardan alınan kan gazlarında maruz kontrol grubuna göre karbondioksit grubunda  $pCO_2$ , karbonmonoksit grubunda  $pHCO$  yüksekliği kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. pH ve  $HCO_3$  değerleri arasındaki farklılığa bağlı oksidan strese artış olduğu düşünülmüştür.

Histopatolojik analizlere bakıldığında, karbonmonoksit grubunda olan nöronal hasarın karbonmonoksit grubuna göre daha ciddi seviyelerde olduğu anlaşılmaktadır. Karbonmonoksit ve karbondioksidin oluşturduğu asfiksi mekanizmalarının farklılığı bu duruma neden olabilir. Karbondioksidin globüler affinitesinin karbonmonoksite göre düşük olması ve oksijene tersinir bağlanmanın kolaylıkla sağlanması, karbondioksit maruziyetindeki hasarın göreceli olarak hafif olmasını açıklayabilir.

Biyokimyasal analizlerde kontrol grubuna göre her iki grupta da oksidan/antioksidan dengesizlik olduğu ve oksidan aktivitenin artmış olduğu görülmüştür. Oksidan stresin artmış olmasının organizmada çeşitli metabolik düzensizliklere neden olacağı bilinmektedir. Her iki maruziyet arasında farklılıklar bulunması literatür bilgilerini doğrulamaktadır.

Genetik toksikoloji açısından Türkiye’de ilk kez yaptığımız çalışmamızın hipotezinde ön gördüğümüz nöroglobin mRNA seviyesi ile ilgili değişikliklerin olduğu, ancak gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın bu dozlar ve sürede gerçekleşmediği görülmüştür. Grupların ortalaması düşünüldüğünde her iki grubun ortalamasının da kontrol grubundan yüksek olduğu görülmektedir. Nöroprotektif etkisi olan ve hipokside sentezlendiği belirtilen nöroglobin mRNA’sının sentezlenme düzeyi, verilen gazların maruziyet süresi ve maruz bırakılan dozların değişimi sağlandığında, bu çalışmadan farklı sonuçlar alınabilmesini sağlayabilir. Ayrıca bir mRNA’nın sadece bir adet protein sentezi ile sınırlı kalmaması, birden fazla veya ortam koşullarına göre değişken miktarda protein sentezi sağladığı bilinmektedir. Bu nedenle nöroglobinin protein seviyesi ile nöroglobin mRNA düzeyinin birbirinden farklı olabileceğini unutmamak gerekir. Çalışmamızın, genetik toksikolojiyi ilgilendiren bu tür deneysel hayvan çalışmalarının yapılmasına örnek olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca adli toksikoloji açısından henüz ülkemizde gelişmemiş olan interdisipliner bir yaklaşıma da öncülük etmiş olmanın gururunu yaşamaktayız.

**Anahtar kelimeler:** Karbonmonoksit Zehirlenmesi, Karbondioksit Maruziyeti, Asfiksi, Nöroglobin, CO-Hb

## **6. SUMMARY**

By providing objective criteria of the toxicological analysis and the conclusion which takes place mostly without any doubt demonstrates the importance of the analysis. For instance, cold-induced dead spots during an autopsy can be seen in a similar way of carbon monoxide poisoning and this is a situation encountered in forensic science practice. At the same time, if the carboxyhemoglobin (COHb) level from blood sample taken from a corpse which was burnt in an open area is not in lethal boundaries may lead to problems in diagnosis and differential diagnosis. Developing methods of analysis and using the devices that apply these methods in the field of forensic toxicology and using less materials to get clearer results will contribute the development toxicology and forensic medicine along with the technology. The genotoxicity reactions which can be measured by the development of Biochemical and Genetic Toxicology along with interdisciplinary approach provided by Forensic Toxicology will contribute the development of Forensic Science and enlightenment of criminal cases more effectively.

In asphyxia caused by carbon monoxide, although using carboxyhemoglobin (CO-Hb) level, the resulting toxicity condition differs in each man. Besides, the severity of the case is not all the time correlated with the COHb level, therefore different mechanisms are thought to be involved in toxicity. In order to explain this situation the studies on more specific indicators than carboxyhemoglobin is increasing day by day. In the differentiation of asphyxia cases, some theories have been proposed as a classical information on the derivative of hemoglobin and myoglobin. Neuroglobin is a newly defined derivative of monomeric globin derivatives. Neuroglobin, which assumed to have neuroprotective role in neuroendocrine tissues from the conducted studies, was defined at the beginning of 2000s. The neuroglobin is reported to be a respiratory protein, which contains Hem-derivatives like hemoglobin and myoglobin, is found in human and vertebrates. In the studies stated that, the central nervous system (CNS) and Peripheral Nervous System (CSS) have the highest expression level, retina has a high level, however, the mainly it is synthesized in the brain. There are some opinions about some other organs like Anterior pituitary, adrenal gland, the testes and endocrine tissue which may synthesize it. Some studies on Neuroglobin synthesis because of the cases caused by the damage of brain and neurotoxic agents that result in cases such as arsenic were done.

In this study, the change of parameters in blood and brain tissues of rat which were exposed to carbon monoxide and carbon dioxide, neuroglobin gene expression levels in brain tissues and the histopathological changes in brain tissues aimed to be determined. The hypothesis arose from the idea that neuroglobin synthesis will be in different amounts by the effects of carbon dioxide and carbon monoxide.



According to the results of the study; the gases taken from the blood rats showed that pCO<sub>2</sub> was high in carbon dioxide group and pHCO was high in carbon monoxide group when we compare them with the control group. The increase in oxidative stress was due to differences between pH ve HCO<sub>3</sub> values.

When we look at histopathological analysis, it was seen that neuronal damage in the carbon group was in more serious levels than the carbon monoxide group. The differences in asphyxia mechanisms because of carbon monoxide and carbon dioxide, could cause this situation.

Globular affinity of carbon dioxide is lower than carbon monoxide and the easiness of reversible binding to oxygen may relatively explain why the exposure to carbon dioxide is less. In biochemical analysis, oxidant / antioxidant imbalance has been observed in both groups when compared to the control group and an increase in oxidant activity has also been seen. It is known that the increase in oxidant stress may lead to various metabolic disorders in organisms. The determination of the differences between two exposures confirm the literature. In the hypothesis of our genetic toxicology study, which was the first study in Turkey, we anticipated that there was changes related to neuroglobin mRNA level, however, statistically significant differences between groups during this time and dose was not observed. When the average of the groups considered, the average of the two groups appear to be higher than the control group.

If the level of neuroglobin mRNA, synthesized in hypoxia and is mentioned to have neuroprotective effect, provided and the change of the exposure time and doses of the given gases are achieved, this study may get different results. Besides, it is known that an mRNA is not limited with only one protein synthesis, it could synthesize more than one or a different number of proteins depending on the environmental conditions. Therefore, we need to remember that the protein level of neuroglobin and neuroglobin mRNA's might be different from each other. We think that our study will be an example to experimental animal studies which involves genetic toxicology.

In addition, we are proud to have pioneered to an undeveloped interdisciplinary approach in terms of forensic toxicology in our country.

**Keywords:** Carbon monoxide poisoning, exposure to carbon dioxide, asphyxia, neuroglobin, CO-Hb

## **7. KAYNAKLAR**

1. Soysal Z, Eke M, Gök Ş. Dünyada Adli Tıbbın Tarihçesi ve Gelişimi, Adli Tıbbın Türkiye’de Geçirdiği Tarihi Evreler. Soysal Z, Çakalır C, editörler. Adli Tıp Cilt 1. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul,1999; 1-44.
2. Celbis O, Karakoc Y, Ozdemir B, Gulyasar T, Cakina S. Investigation of lead mobilization from the buckshot residues to the critical organs. Biol Trace Elem Res. 2011;143(2):688-94
3. Koç S.Biyografi: Adli toksikolojinin duayen ismi Prof. Dr. Hayri Sözen. Adli Tıp Bülteni. 2011; 16(3):110-3
4. Çöloğlu AS. Kimyasal zararlara bağlı ölümler. Soysal Z, Çakalır C, editörler. Adli Tıp Cilt 1. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul,1999; 183-231.
5. Sanderson J, Cheong PH. Tweeting prayers and communicating grief over Michael Jackson online. Bulletin of Science, Technology & Society.2010; 30(5):328–40
6. Gök Ş. Karbonmonoksitle Zehirlenme. Adli Tıp. Altıncı basım. Filiz Kitapevi, İstanbul,1991; 151-6
7. Olson KR, Tharratt RS. Çevre ve Meslek Toksikolojisi. In: Olson KR ed. 5th ed.(Savcı V çev) Zehirlenmeler ve ilaç aşırı dozu. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul,2012;240-52
8. Battal D. Adli toksikoloji analizlerinde biyolojik örnek ve analitik yöntem seçimleri. Adli Tıp Dergisi. 2012;27 (1): 44-53
9. Güley M, Vural N. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara,1978.
10. Polat O, İnanıcı MA, Aksoy ME. Zehirlenmeler. Adli Tıp Ders Kitabı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul,1997; 267-91
11. Eckert WG. Introduction to forensic sciences, In: Eckert WG ed. Introduction to forensic sciences second ed. Florida: CRC press; 2000; 1-10.
12. Eckert WG. Historical development of forensic sciences, In: Eckert WG ed. Introduction to forensic sciences second ed. Florida: CRC press; 2000; 11-33.
13. Duncan JR, Dick AL, Egan G, Kolbe S, Gavrilesco M, Wright D, Lubman DI, Lawrence AJ. Adolescent toluene inhalation in rats affects white matter maturation with the potential for recovery following abstinence. PLoS One. 2012;7(9): 1-12

- 14.** Poklis A. Forensic toxicology, In: Eckert WG ed. Introduction to forensic sciences 2nd ed. Florida: CRC press; 2000; 123-46.
- 15.** Duncan GT, Tracey ML. Serology and DNA typing. In: Eckert WG ed. Introduction to forensic sciences second ed. Florida: CRC press; 2000; 251-96.
- 16.** Jones AL, Karalliedde L. Poisoning. In: Boon NA, Colledge NR, Walker BR, Hunter JAA eds, Davidson's Principles and Practice of Medicine. 20th ed. London: Churchill Livingstone. 2006; 203-26.
- 17.** Field MJ, Burnett L, Sullivan DR, Stewart P. Clinical biochemistry and metabolism. In: Boon NA, Colledge NR, Walker BR, Hunter JAA eds, Davidson's Principles and Practice of Medicine. 20th ed. London: Churchill Livingstone. 2006; 419-54.
- 18.** DiMaio VJ, DiMaio D. Asphyxia. Forensic pathology 2nd ed. USA: CRC press, 2001; 285-313
- 19.** Saukko P, Knight B. Poisoning and the pathologist. Knight's forensic pathology. 3rd ed. USA: Oxford University Press; 2004; 541-51
- 20.** Dick AL, Axelsson M, Lawrence AJ, Duncan JR. Specific impairments in instrumental learning following chronic intermittent toluene inhalation in adolescent rats. Psychopharmacology. 2014;231(8):1531-42
- 21.** Aksoy N, Proteinler: Miyogloblin ve hemogloblin. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW eds. 25 th ed. (Dikmen N, Özgünen T çev). Harper Biyokimya. Nobel Tıp Kitap Evleri. İstanbul, 2004; 63-73.
- 22.** Mizrak B, Celbiş O, Parlakpınar H, Olmez E. Effect of melatonin and atenolol on carbon monoxide cardiotoxicity: an experimental study in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2006; 98(6):565-8.
- 23.** Sun X, Xu H, Meng X, Qi J, Cui Y, Li Y, Zhang H, Xu L. Potential use of hyperoxygenated solution as a treatment strategy for carbon monoxide poisoning. PLoS One. 2013;8(12):e81779.
- 24.** Çolakoğlu S, Saritas A, Eroz R, Oktay M, Yaykasli KO, Akoz A, Kaya E, Kandis H. Is one-time carbon monoxide intoxication harmless? Evaluation by argyrophilic nucleolar-organizing regions staining method. Hum Exp Toxicol. 2015;34(1):24-31.
- 25.** Baransel A, Dulger HE, Tokdemir M. DNA amplification fingerprinting using 10 x polymerase chain reaction buffer with ammonium sulfate for human identification. Saudi Med J. 2004;25(6):741-5.

26. Yağmur G, Albayrak N, Daş T, Yıldırım M, Özgün A, Büyük Y. Comparison of Two Different Real-Time PCR Systems in Postmortem Diagnosis of Tuberculosis in Paraffin-Embedded Tissues. *Bulletin of microbiology*. 2014; 48(4): 577 – 84.
27. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*. 2011;4(3):221-9
28. Golbamaki N, Rasulev B, Cassano A, Marchese Robinson RL, Benfenati E, Leszczynski J, Cronin MT. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale*. 2015;7(6):2154-98.
29. Soysal Z, Eke M. Anestezi ile ilgili ölümler, Soysal Z, Çakalır C, editörler. *Adli Tıp Cilt 1. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul,1999; 231-96.*
30. Gerçek Z. *Adli Kimya. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Yayınevi, Ankara,2014; 1-12*
31. San Nicolas AC, Lemos NP. Toxicology findings in cases of hanging in the City and County of San Francisco over the 3-year period from 2011 to 2013. *Forensic Sci Int*. 2015; article in press
32. Polat O. Zehirlenmeler. *Klinik Adli Tıp Adli Tıp Uygulamaları. Üçüncü baskı. Seçkin yayıncılık, Ankara,2007; 439-46*
33. Cantürk N, Başbulut AZ, Cantürk G, Dağalp R. Evaluation of the autopsy cases carbonmonoxide poisonings in Ankara between 2002-2006. *J For Med*. 2008; 22(1): 25-30.
34. Yu Z, Liu N, Liu J, Yang K, Wang X. Neuroglobin, a novel target for endogenous neuroprotection against stroke and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*. 2012;13(6):6995-7014
35. Dogan M, Celbis O, Ozdemir B, Bozkurt S, Okumus M. Accidental death due to intentionally usage of organophosphate: Report of two cases. *Medicine Science*. 2012;1(3):206-10
36. DiMaio VJ, DiMaio D. *Interpretive toxicology: drug abuse and drug deaths. Forensic pathology 2nd ed. USA: CRC press, 2001; 445-65*
37. Ozdemir B, Sahin I, Kapucu H, Celbis O, Karakoc Y, Erdogan S, Onal Y. How safe is the use of herbal weight-loss products sold over the internet?. *Hum Exp Toxicol*. 2013;32(1):101-6
38. Haghghi F, Xin Y, Chanrion B, O'Donnell AH, Ge Y, Dwork AJ, Arango V, Mann JJ. Increased DNA methylation in the suicide brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2014;16(3):430-8.

39. Boztaş MH, Kaygusuz ÇÇ, Arısoy Ö, Gürel S. Chronic inhalant dependence with early onset cognitive impairment, depression and psychotic disorders: a case report. *Düşünen Adam Psikiyatri ve Nörolojik Bilimler Dergisi*. 2011; 24(1) :69-74
40. DiMaio VJ, DiMaio D. Time of death. *Forensic pathology* 2nd ed. USA: CRC press, 2001; 28-62
41. Cengiz S, Zehirlenmenin genel kavramları. In: Knight B ed. 10 th ed. ( Birgen N, çev). *Simpson Adli Tıp. Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı*. İstanbul,1995; 301-9.
42. Alper AT, Akyol A, Hasdemir H, Nurkalem Z, Güler O, Güvenç TS, Erdinler I, Cakmak N, Eksik A, Gürkan K. Glue (toluene) abuse: increased QT dispersion and relation with unexplained syncope. *Inhal Toxicol*. 2008;20(1):37-41.
43. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Moreira R, Proença JB, Santos A, Duarte JA, Bastos Mde L, Magalhães T. Clinical and forensic signs related to chemical burns: a mechanistic approach. *Burns*. 2015; 41(4):658-79.
44. Balcı Y. Zehirlenmeler. Herkes için adli tıp cep kitabı. Osmangazi Üniversitesi Basımevi, Eskişehir,2008; 111-20
45. Vural N, Sayın H. Kan alkol düzeyini etkileyen faktörlerin adli tıp açısından değerlendirilmesi. *Adli Tıp Bülteni*, 1996; 1(2): 74-81.
46. Tuğcu H, Zeyfeoğlu Y, Ortatatlı M, Toygar M, Safalı M. Autopsy Safety On Fatalities Related To Chemical Agents. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2006; 63(1): 135-8.
47. Gürler S. Türkdoğan FT, Türkdoğan KA, Karabacak M, Akpınar O, Karahan O, Yiğit M. Carbonmonoxide poisoning caused by bilateral lesion of globus pallidus. *CausaPedia*. 2014; 3(1):1-3.
48. Büker HS, Demir E, Yüncü Z, Gülen F, Midyat L, Tanaç R. Effects of volatile substance abuse on the respiratory system in adolescents. *Multidiscip Respir Med*. 2011; 6(3):161-8.
49. Soysal Z, Özaslan A. Genel olarak asfiksiler,ası,boğma,tıkama-tıkanma,kimyasal asfiksiler. Soysal Z, Çakalır C, editörler. *Adli Tıp Cilt 1*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul,1999; 405-57.
50. DiMaio VJ, DiMaio D. Asphixia. *Forensic pathology* 2nd ed. USA: CRC press, 2001; 285-313
51. Demirci Ş, Doğan KH. Asfiksi türleri ve asfiksi olgularında ölü muayenesi. *Klinik Gelişim Adli Tıp Özel Sayı*. 2009; 22(1): 23-32
52. Cobelo-García A, Filella M, Croot P, Frazzoli C, Du Laing G, Ospina-Alvarez N, Rauch S, Salaun P, Schäfer J, Zimmermann S. COST action TD1407: network on

technology-critical elements (NOTICE)-from environmental processes to human health threats. *Environ Sci Pollut Res Int*. Epub ahead of print, 2015

**53.** Albek E, Cengiz S. Gaz halindeki zehirler. In: Knight B ed. 10 th ed. ( Birgen N, çev). *Simpson Adli Tıp. Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı*. İstanbul, 1995;343-50.

**54.** Bulut ER, Yılmaz R, Açıkgöz D, Ömeroğlu E, Baysal E, Yüksekbaş Ö, Büyük Y. Boğucu gaz ile meydana gelen ölümlerin adli tıp yönünden değerlendirilmesi. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*. 2007; 29 (3): 97-103

**55.** Ertem G, Oksel E, Akbıyık A. A Retrospective review about the malpractice applications in medicine. *Dirim*. 2009; 84 (1) :1-10.

**56.** Koç S, Biçer Ü. Adli tıbbın tarihsel gelişimi, Türkiye'deki yapılanması ve sorunları. *Klinik Gelişim Adli Tıp Özel Sayı*. 2009; 22(1): 1-5

**57.** Çolak C, Parlakpınar H. Hayvan deneyleri: in vivo denemelerin bildirimi: ARRIVE kılavuzu-derleme. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2012;19(2):128-31.

**58.** Pesce A, Bolognesi M, Bocedi A, Ascenzi P, Dewilde S, Moens L, Hankeln T, Burmester T. Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep*. 2002;3(12):1146-51.

**59.** Fiocchetti M, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M. Neuroglobin and neuronal cell survival. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834(9):1744-9.

**60.** Taylor JM, Kelley B, Gregory EJ, Berman NE. Neuroglobin overexpression improves sensorimotor outcomes in a mouse model of traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2014;577:125-9

**61.** Yu Z, Liu N, Liu J, Yang K, Wang X. Neuroglobin, a novel target for endogenous neuroprotection against stroke and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*. 2012;13(6):6995-7014

**62.** Beltran-Parrazal L, Acuna D, Ngan AM, Kim E, Ngan A, Kawakami K, Edmond J, Lopez IA. Neuroglobin, cytoglobin, and transcriptional profiling of hypoxia-related genes in the rat cerebellum after prenatal chronic very mild carbon monoxide exposure (25 ppm). *Brain Res*. 2010;1330:61-71.

**63.** Burmester T, Hankeln T. What is the function of neuroglobin? *J Exp Biol*. 2009;212 (10):1423-8.

**64.** Zhang LN, Ai YH, Gong H, Guo QL, Huang L, Liu ZY, Yao B. Expression and role of neuroglobin in rats with sepsis-associated encephalopathy. *Crit Care Med*. 2014;42(1):12-21.

65. Trent JT 3rd, Watts RA, Hargrove MS. Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *J Biol Chem.* 2001; 276(32):30106-10
66. Ostojić J, Grozdanić SD, Syed NA, Hargrove MS, Trent JT 3rd, Kuehn MH, Kwon YH, Kardon RH, Sakaguchi DS. Patterns of distribution of oxygen-binding globins, neuroglobin and cytoglobin in human retina. *Arch Ophthalmol.* 2008;126(11):1530-6.
67. Sun Y, Jin K, Mao XO, Zhu Y, Greenberg DA. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(26):15306-11.
68. Liu ZF, Zhang X, Qiao YX, Xu WQ, Ma CT, Gu HL, Zhou XM, Shi L, Cui CX, Xia D, Chen YG. Neuroglobin protects cardiomyocytes against apoptosis and cardiac hypertrophy induced by isoproterenol in rats. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(4):5351-60.
69. Di Pietro V, Lazzarino G, Amorini AM, Tavazzi B, D'Urso S, Longo S, Vagnozzi R, Signoretti S, Clementi E, Giardina B, Lazzarino G, Belli A. Neuroglobin expression and oxidant/antioxidant balance after graded traumatic brain injury in the rat. *Free Radic Biol Med.* 2014;69:258-64.
70. Khan AA, Wang Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Miles E, Graboski J, Chen S, Ellerby LM, Jin K, Greenberg DA. Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(47):17944-8.
71. Brunori M, Giuffrè A, Nienhaus K, Nienhaus GU, Scandurra FM, Vallone B. Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(24):8483-8
72. Wang J, Zhang W, Sun D, Song L, Li Y, Xu C. Analysis of neuroglobin mRNA expression in rat brain due to arsenite-induced oxidative stress. *Environ Toxicol.* 2012;27(9):503-9.
73. Li RC, Guo SZ, Lee SK, Gozal D. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30(11):1874-82.
74. Alıcı DE. Akut karbonmonoksit zehirlenmesine maruz kalan sıçanlarda normobarik, hiperbarik oksijen ve N-asetilsistein tedavilerinin akciğer ve beyin dokularına histopatolojik etkileri. Uzmanlık tezi, TC Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp-Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi; İstanbul,2006.
75. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):585-630.

- 76.** Xu J, Yang M, Kosterin P, Salzberg BM, Milovanova TN, Bhopale VM, Thom SR. Carbon monoxide inhalation increases microparticles causing vascular and CNS dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;273(2):410-7.
- 77.** Park EJ, Min YG, Kim GW, Cho JP, Maeng WJ, Choi SC. Pathophysiology of brain injuries in acute carbon monoxide poisoning: a novel hypothesis. *Med Hypotheses.* 2014;83(2):186-9.
- 78.** Prockop LD, Chichkova RI. Carbon monoxide intoxication: an updated review. *J Neurol Sci.* 2007;262(1-2):122-30.
- 79.** Arıcı AA, Demir Ö, Özdemir D, Ünverir P, Tunçok Y. Acil servise başvuran karbonmonoksit maruz kalımları: on dört yıllık analiz. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 2010; 24(1):25-32.
- 80.** Turedi S, Yılmaz SE, Mentese A, Turkmen S, Karaca Y, Sen O, Yulug E, Gunduz A. The diagnostic value of serum ischemia-modified albumin levels in experimentally induced carbon monoxide poisoning and their correlation with poisoning severity. *Acad Emerg Med.* 2013;20(7):652-8.
- 81.** Tiryaki Ö, Usalan C. Glomerüler filtrasyon hızının değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci.* 2006;2(38):1-7
- 82.** Özçiftçi S, Biberoglu S. Karbon monoksit zehirlenmelerine yaklaşım. *Ortadogu Medical Journal.* 2014; 6(2):86-9.
- 83.** Cesari WA, Caruso DM, Zyka EL, Schroff ST, Evans CH Jr, Hyatt JP. Study of physiological responses to acute carbon monoxide exposure with a human patient simulator. *Adv Physiol Educ.* 2006;30(4):242-7.
- 84.** Hansen MB, Kondziella D, Danielsen ER, Larsen VA, Jansen EC, Hyldegaard O. Cerebral proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates reversibility of N-acetylaspartate/creatine in gray matter after delayed encephalopathy due to carbon monoxide intoxication: a case report. *J Med Case Rep.* 2014; 8: 211.
- 85.** Cerrah AO. Physiologic responses of different aerobic level athletes to altitude training and optimum altitude and exposing time. *Pamukkale Journal Of Sport Sciences.* 2010; 1(3):24-38.
- 86.** Weaver LK, Hopkins RO, Chan KJ, Churchill S, Elliott CG, Clemmer TP, Orme JF Jr, Thomas FO, Morris AH. Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med.* 2002;347(14):1057-67.
- 87.** Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature.* 2000;407(6803):520-3.



88. Chen LM, Xiong YS, Kong FL, Qu M, Wang Q, Chen XQ, Wang JZ, Zhu LQ. Neuroglobin attenuates Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating Akt signaling. *J Neurochem.* 2012;120(1):157-64.
89. Zhang LN, Ai YH, Gong H, Guo QL, Huang L, Liu ZY, Yao B. Expression and role of neuroglobin in rats with sepsis-associated encephalopathy. *Crit Care Med.* 2014;42(1):12-21.
90. Trent JT 3rd, Watts RA, Hargrove MS. Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *J Biol Chem.* 2001; 276(32):30106-10
91. Brunori M, Vallone B. Neuroglobin, seven years after. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(10):1259-68.
92. Picotti P, Dewilde S, Fago A, Hundahl C, De Filippis V, Moens L, Fontana A. Unusual stability of human neuroglobin at low pH--molecular mechanisms and biological significance. *FEBS J.* 2009;276(23):7027-39.
93. De Marinis E, Ascenzi P, Pellegrini M, Galluzzo P, Bulzomi P, Arevalo MA, Garcia-Segura LM, Marino M. 17 $\beta$ -estradiol--a new modulator of neuroglobin levels in neurons: role in neuroprotection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity. *Neurosignals.* 2010;18(4):223-35.
94. Brittain T, Skommer J, Henty K, Birch N, Raychaudhuri S. A role for human neuroglobin in apoptosis. *IUBMB Life.* 2010;62(12):878-85.
95. Liu X, Gao Y, An Y, Fu X, Li Y, Sun D, Wang J. Neuroglobin Plays a Protective Role in Arsenite-Induced Cytotoxicity by Inhibition of Cdc42 and Rac1GTPases in Rat Cerebellar Granule Neurons. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 36(4):1613-27.
96. Liu A, Brittain T. A futile redox cycle involving neuroglobin observed at physiological temperature. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):20082-94.
97. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-8.
98. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34(3):497-500.
99. Beutler E. Red cell metabolism. In: *A Manual of Biochemical Methods.* *Int J Mol Sci.* 1975; 13(2): 1790–803.
100. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
101. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-7.
102. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

- 103.** Campos A, Díaz R, Martínez-Bartolomé S, Sierra J, Gallardo O, Sabidó E, López-Lucendo M, Ignacio Casal J, Pasquarello C, Scherl A, Chiva C, Borrás E, Odena A, Elortza F, Azkargorta M, Ibarrola N, Canals F, Albar JP, Oliveira E. Multicenter experiment for quality control of peptide-centric LC-MS/MS analysis - A longitudinal performance assessment with nLC coupled to orbitrap MS analyzers. *J Proteomics*. 2015; S1874-3919(15): 30010-5.
- 104.** Bozkurt S, Altunören O, Kurutaş EB, Okumuş M, Doğan M. Comparison of the results of venous blood gas and laboratory measurement of potassium. *JAEM* 2012; 11(2): 73-6.
- 105.** Bakoğlu E, Kebapçioğlu AS, Ak A, Girişgin AS, Zararsız İ. Acil serviste periferik venöz kan gazının arter kangazı yerine kullanılabilirliğinin araştırılması. *Eur J Basic Med Sci*. 2013;3(2);29-33
- 106.** Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy. *Crit Care Med*. 1993;21(2):92-102.
- 107.** Alsharif NZ, Hassoun EA. Protective effects of vitamin A and vitamin E succinate against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced body wasting, hepatomegaly, thymic atrophy, production of reactive oxygen species and DNA damage in C57BL/6J mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;95(3):131-8.
- 108.** Rani P, Unni KM, Karthikeyan J. Evaluation of antioxidant properties of berries. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2004, 19 (2) 103-10
- 109.** Rani P, Unni KM, Karthikeyan J. Evaluation of antioxidant properties of berries. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2004, 19 (2) 103-10
- 110.** Cummings PM, Trelka DP, Springer KM (2010). Aspirasyon ve Boğulma, Adli Histopatoloji Atlası. (Özdemir B, Aydın NE, Celbiş O, çev).Sevil yayıncılık. 2013;48-52
- 111.** Cummings PM, Trelka DP, Springer KM (2010). Zehirlenmeler, Adli Histopatoloji Atlası. (Özdemir B, Aydın NE, Celbiş O, çev).Sevil yayıncılık. 2013;53-91
- 112.** Ciftci O, Oztanir MN, Cetin A. Neuroprotective effects of  $\beta$ -myrcene following global cerebral ischemia/reperfusion-mediated oxidative and neuronal damage in a C57BL/J6 mouse. *Neurochem Res*. 2014;39(9):1717-23.
- 113.** Oztanir MN, Ciftci O, Cetin A, Aladag MA. Hesperidin attenuates oxidative and neuronal damage caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model. *Neurol Sci*. 2014;35(9):1393-9.
- 114.** Cigremis Y, Turkoz Y, Tuzcu M, Ozen H, Kart A, Gaffaroglu M, Erdogan K, Akgoz M, Ozugurlu F. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on

the formation of peroxynitrite, level of nitric oxide, xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in rat kidney. *Mol Cell Biochem.* 2006;291(1-2):127-38.

**115.** Aladag MA, Turkoz Y, Ozcan C, Sahna E, Parlakpınar H, Akpolat N, Cigremis Y. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoidal haemorrhage by increasing brain nitric oxide levels. *Int J Dev Neurosci.* 2006;24(1):9-14.

**116.** Besli GE, Ergüven M, Karadoğan M, Yılmaz Ö. Çocuklarda karbon monoksit zehirlenmesi. *JAEM.* 2010;9(1):26-30

**117.** Queiroga CS, Vercelli A, Vieira HL. Carbon monoxide and the CNS: challenges and achievements. *Br J Pharmacol.* 2015;172(6):1533-45.



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 12-11-2014  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol no.su : 2014/A-90  
Deneide Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat  
Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyu : *Wistar albino*  
Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 36 Adet  
Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 200-300 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Osman CELBİŞ'in yürütücüsü olduğu "Karbondioksit ve Karbonmonoksit Maruz Bırakılan Sıçanlarda Biyokimyasal ve Moleküler Genetik Parametrelerin Değişimi" isimli 2014/A-90 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ  
Başkan

Prof. Dr. Nigar VARDI  
Üye

Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ  
Üye

Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ  
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ  
Üye

Katılmadı  
Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN  
Üye

Salih AVCI  
Sivil Üye

Katılmadı  
Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU  
Sivil Üye