



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2012; 26 (1): 01 - 06
http://www.fusabil.org

Sıçan Prefrontal Korteksinde Tolüenin Neden Olduğu Apoptoza Karşı Melatoninin Koruyucu Etkisinin Araştırılması *

Ufuk TAŞ¹
Murat ÖGETÜRK²
Hilal IRMAK SAPMAZ²
Zafer İsmail KARACA³
Birsen ÖZYURT⁴
Erkan SÖĞÜT⁵
Mustafa SARSILMAZ⁶

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Anatomi Anabilim Dalı
Tokat, TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Anatomi Anabilim Dalı
Elazığ, TÜRKİYE

³İnönü Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Anatomi Anabilim Dalı
Malatya, TÜRKİYE

⁴Gaziosmanpaşa Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Histoloji ve
Embriyoloji Anabilim Dalı
Tokat, TÜRKİYE

⁵Gaziosmanpaşa Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı
Tokat, TÜRKİYE

⁶Şifa Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Anatomi Anabilim Dalı
İzmir, TÜRKİYE

Geliş Tarihi :17.09.2011
Kabul Tarihi :21.02.2012

Amaç: Tolüen endüstride sık kullanılan, periferik ve santral sinir sistemi hasarına yol açabilen solunabilir bir hidrokarbondur. Pineal bezin en temel hormonu olan melatonin güçlü bir antioksidan ve radikal giderici özelliği sahiptir. Bu çalışma tolüen solunumunun sıçan prefrontal korteksi üzerindeki apoptotik etkisini ve melatonin hormonunun koruyucu etkisini araştırmak amacı ile planlandı.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla 21 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan (200-220 g) 3 eşit gruba ayrıldı. Grup I kontrol olarak kullanıldı. Grup II' deki sıçanlar dört hafta boyunca tolüene maruz bırakılırken (3000 ppm/1 saat/gün) Grup III'deki sıçanlara tolüen ile birlikte melatonin verildi (10 mg/kg/gün, ip). Dört haftalık deney süresinin sonunda hayvanlar dekapitasyon yolu ile öldürüldü. Prefrontal korteks dokusu çıkarılarak %10'luk formalin solüsyonuna atıldı. Doku örnekleri parafine gömüldü ve kesildi (5 µm kalınlıkta). Apoptozisin tespit edilebilmesi için kesitler TUNEL yöntemi ile boyandı.

Bulgular: Tolüen soluyan sıçanların prefrontal korteks dokusunda apoptotik hücre sayısının arttığı görüldü. Melatonin tedavisinin apoptotik hücre sayısını belirgin bir şekilde azalttığı görüldü.

Sonuç: Sonuçta bu immünohistokimyasal çalışmada melatonin tedavisinin tolüenin neden olduğu sıçan prefrontal korteksinde nöronal hasarı önlediği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Tolüen, melatonin, prefrontal korteks.

Investigation of protective effect of melatonin against toluene-induced apoptosis in rat prefrontal cortex

Objective: Toluene is a volatile hydrocarbon that is principally used in industry and can cause central and peripheral nervous system impairment. Melatonin, the principal secretory product of the pineal gland, functions as a potent antioxidant and free radical scavenger. This study was designed to investigate the harmful effects of toluene inhalation and protective effects of melatonin in the prefrontal cortex of rats.

Material and Methods: For this purpose, 21 adult male Wistar-albino rats (200-220 g) were randomly divided into three equal groups. Animals in group I were used as control group. The rats in group II were exposed toluene (3000 ppm/1hour/day) for 4 weeks, while the rats in group III treated with melatonin (10 mg/kg/day, ip) plus toluene inhalation. At the end of 4 weeks experimental period, all rats were killed by decapitation. The prefrontal cortex tissues were removed and fixed in % 10 neutral formalin solution. Then tissue specimens were embedded in paraffin and sectioned (thickness, 5µm). The sections were immunohistochemically stained using TUNEL method for determination apoptosis.

Results: Increased numbers of apoptotic cell were observed in the prefrontal cortex of toluene inhaled rats. Treatment of melatonin markedly reduced the the number of apoptotic cells.

Conclusion: In conclusion, in the present immunohistochemical study, we found that melatonin treatment prevents toluene-induced neuronal damage in the prefrontal cortex of rats.

Key Words: Toluene, melatonin, prefrontal cortex.

Yazışma Adresi Correspondence

Ufuk TAŞ
Gaziosmanpaşa Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Anatomi Anabilim Dalı
Tokat-TÜRKİYE

dr_ufuk_tas@hotmail.com

Giriş

Tolüen, endüstride yoğun bir şekilde kullanılan renksiz, kokusuz solunabilir bir hidrokarbondur. Benzin, tiner, tutkal ve temizlik ajanları gibi birçok ürünün içerisinde yüksek miktarda bulunur (1,2). Çoğunlukla solunum yolu ile vücuda alınabilen tolüenin (1,3), yaklaşık % 80'i oksidatif yolla karaciğerde metabolize edilerek idrarla atılır (4). Tolüenin öfori verici etkisinden dolayı toplumda bağımlılığına sık rastlanılmaktadır. Ucuz ve kolay bulunabilir olduğundan dolayı bağımlıların tercihi sıklıkla tutkal ve tinerdir (5). Akut ve kronik maruziyetlerinde özellikle santral sinir sistemi ve karaciğer başta olmak üzere birçok doku üzerine toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir (6, 7).

* 9. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 13-17 Nisan 2010, İstanbul.

Santral sinir sisteminin kısımlarından prefrontal korteks; gyrus frontalis superior, gyrus frontalis medius ve gyrus frontalis inferior'un büyük bölümü ile gyri orbitales ve gyrus cinguli'nin ön yarısını içine alır. Öğrenme, hafıza, hareketlerin planlanması ve düşüncelerin olgunlaştırılması gibi görevleri vardır (8,9). Ayrıca prefrontal alanların kişilik ve davranışların düzenlenmesi, dikkatin sürdürülmesi gibi birtakım bilişsel fonksiyonları da vardır. Bununla birlikte karar alma, geleceği tahmin etme, motor hareketlerin sonucunun kestirilmesi, karmaşık matematik ve soyut problemlerin çözülmesi ve daha birçok alanda görev almaktadır (10,11).

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) memelilerde pineal bezde üretilen ve sirkadiyen ritimle salınan bir nörohormondur (12). Bu hormon lipofilik ve hidrofilik aktiviteye sahip olmasından dolayı plasenta ve kan beyin bariyeri de dahil biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilir (13). Melatoninin endokrin ritmi düzenleyici (14) ve nöroprotektif etkiye (15) sahip olduğu bildirilmekle, birlikte lipit peroksidasyonunu önleyerek dokuları koruduğu da bilinmektedir (16).

Tolüenin sinir sistemi üzerine etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma olmasına rağmen spesifik olarak prefrontal korteks dokusunda yaptığı hasarı (apoptozis) ve melatoninin koruyucu etkisini gösteren çalışmaya rastlayamadık. Bu çalışmada tolüenin prefrontal korteks dokusunda oluşturduğu hasar ve bu hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisi TUNEL metodu kullanılarak gösterilmeye çalışıldı.

Gereç ve Yöntem

Tolüen ve melatoninin verilmesi: Çalışmada, 21 adet Wistar-albino cinsi erkek sıçan (200–220 gr) rastgele üç eşit deney grubuna ayrılarak kullanıldı. Grup I' deki sıçanlar kontrol olarak düzenlendi. Grup II' deki sıçanlar, 4 hafta boyunca solunum yoluyla tolüene (3000 ppm/1saat/gün) maruz bırakılırken Grup III' deki sıçanlara ise tolüen uygulamasının yanı sıra melatonin (10 mg/kg/gün, ip) tedavisi uygulandı. Tolüen konsantrasyonu Yılmaz ve arkadaşlarının kullandığı metoda göre ayarlandı (17). Tolüen konsantrasyonu gaz kromatografi cihazı kullanılarak (UNICAM, Cambridge, UK) ölçüldü. 4 haftalık deney süresinin sonunda hayvanlar dekapitasyon yolu ile öldürüldü. Prefrontal korteks dokusu çıkarılarak %10 luk formalin solüsyonuna alındı. Doku örnekleri parafine gömülerek parafin bloklardan 5µm kalınlıkta kesitler alındı. Apoptozisin tespit edilebilmesi için kesitler TUNEL yöntemi ile boyandı. Her hayvandan iki kesit olmak üzere tüm hayvanlardan mikroskop altında (x400) apoptotik hücreler sayıldı. Apoptotik indeks hesaplanarak Şekil 1' de ifade edildi.

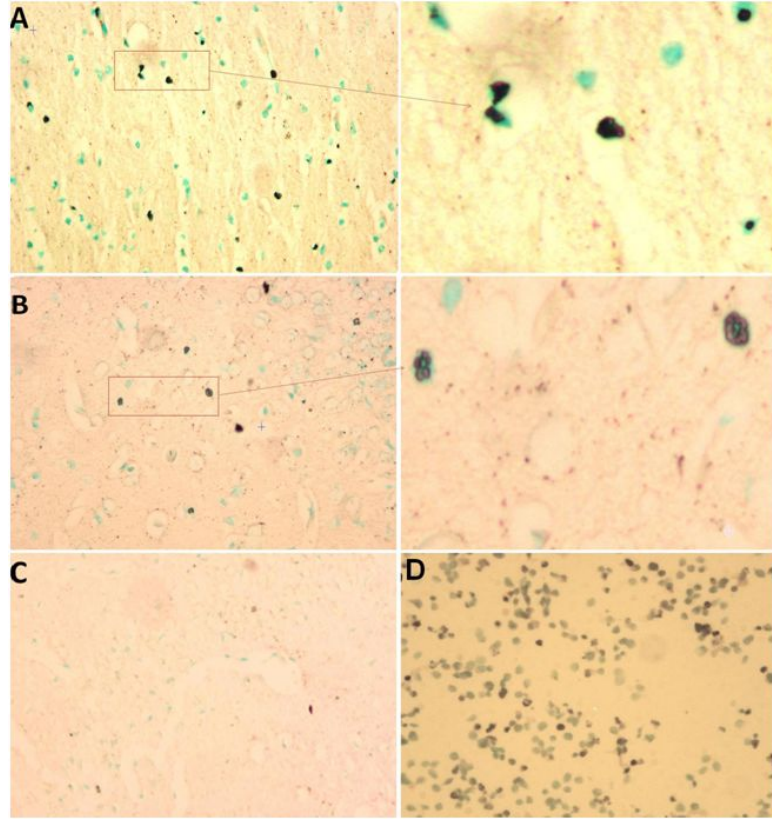
TUNEL Yöntemi: Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: QIA33, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilip PBS ile yıkandı. Yüzde beşlik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 20 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37 °C' de nemli ortamda bekletildi. TdT Enzyme damlatılarak ile 37 °C' de nemli ortamda 90 dakika inkübe edildi. Block buffer da 10 dakika daha sonra Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Peroxidase ile 30 dakika inkübe edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntüledi. Methyl green ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Yeşil çekirdekli hücreler normal kabul edilirken kahverengi çekirdekler apoptozis lehine değerlendirildi.

İstatistik: Her hayvanda iki kesit, her kesitten ise 8 alan 400' lük büyütme altında taranarak apoptotik hücreler sayıldı. Gruplardaki apoptotik hücre sayıları istatistiksel açıdan değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 15.0 bilgisayar paket programı (SPSS Inc. Software Chicago, IL, USA) kullanıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığı Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. P<0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

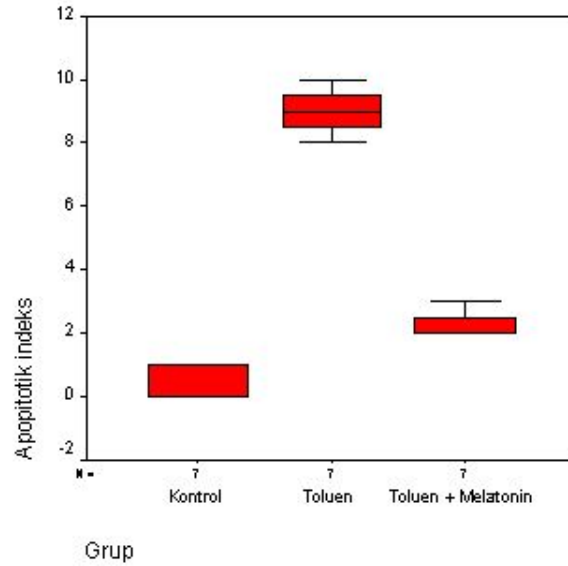
Bulgular

Klinik bulgular: Tolüen uygulanan kafeslere konulduktan 15-20 dakika sonra hayvanların hareketlerinde azalma olduğu ve hareket ettiklerinde dengelerini sağlayamadıkları görüldü. Günlük tolüen solutulmasının sona ermesinden sonra, kafeslerinden çıkarılan hayvanların kaslarındaki tonusun oldukça azaldığı, salyalarının aktığı, solunum sayılarının ve kalp atım hızlarının arttığı gözlemlendi. Deneyin ilk günlerinde hayvanlar oldukça uysalken ikinci haftanın sonlarına doğru saldırgan hale geldikleri gözlemlendi. Hayvanların deneyin başlangıcındaki ve sonundaki ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında fark olmasına rağmen bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

TUNEL bulguları: Gruplardaki apoptotik hücre sayıları istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde tolüen grubundaki hayvanlarda apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (p<0.01). Tolüen ile birlikte melatonin verilen grupta ise apoptotik hücre sayısının azaldığı, tolüen grubu ile tolüen+melatonin grubunda anlamlı bir fark olduğu tespit edildi (p<0.01, Şekil 2).



Şekil 1. Sıçan prefrontal korteks dokusunda TUNEL boyamasını gösteren doku fotoğrafları. Tolüen verilen hayvan dokularında sayıları artmış TUNEL pozitif hücreler (A), tolüen ile birlikte melatonin tedavisi uygulanan dokularda tolüen grubuna oranla daha az sayıda görülen TUNEL pozitif hücreler (B). Kontrol hayvanlarında az sayıda TUNEL pozitif hücre (C). 0.5 µg/ml actinomycin D ile 19 saat inkübe edilmiş HL60 hücrelerinin boyanması ile elde edilmiş pozitif kontrol dokusu (D).



Şekil 2. Her gruba ait dokulardaki apoptotik hücre sayısı (TUNEL pozitif hepatosit) ($p < 0.01$).

Tartışma

Apoptozis DNA'nın parçalanması, hücre membran değişiklikleri, komşu hücrelere hasar vermeden ve inflamasyona yol açmadan meydana gelen programlanmış bir hücre ölümüdür (18). Apoptotik yollar genel olarak intrinsik (mitokondri aracılı) ve ekstrinsik (reseptör aracılı) olarak ifade edilmektedir (19,20). Pro apoptotik proteinler (Bax, Bak, Bad) apoptoza gidişi hızlandırırken anti apoptotik proteinler apoptozu yavaşlatmaya çalışırlar (21). Kaspazlar ise apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarında görev alırlar. Bunlardan her iki yolağında ortak proteini olan ve Cellat kaspaz olarak bilinen Caspase-3 ise, kromatinlerin yoğunlaşması, DNA'nın parçalanması ve membran proteinlerinin yıkılması gibi morfolojik değişikliklerin meydana gelmesinden sorumludur (22). DNA'nın kırık uçlarına bağlanarak hasarı gösteren TUNEL yöntemi ise apoptozisi göstermede ileri yöntemlerden biridir.

Bizim çalışmamızda da tolüen verilen sıçanların prefrontal korteks dokularında TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre sayısının önemli oranda arttığı gösterildi ($p<0,01$).

Tolüenin beyin değişik bölgelerinde apoptotik nörodejenerasyona yol açtığı (7, 23), ayrıca periferik sinir sistemini de hasarladığı gösterilmiştir (24). Tolüen solutulan gebe sıçanların serebellum, kalp, böbrek, karaciğer dokularında ve fetüs dokularında yüksek oranda tolüen tespit edilmiştir (25). Tolüenin serebellum ve hipokampus dokusunda apoptotik nörodejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir (23). El-Nabi Kamel ve Shehata (26) tolüen verilen sıçanlarda en çok etkilenen dokunun beyin dokusu olduğunu, özellikle serebellum ve korteks bölgelerinin en fazla etkilenen yerler olduğunu kaspaz-3 miktarının artışı ile göstermişlerdir. Gotohda ve ark. (27) tolüenin hipokampus ve serebellum dokusunda GFAP (Glial fibriler asidik protein) miktarında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Fujita ve ark. (28) tolüen bağımlısı bir kişide serebrum, serebellum ve beyin sapında atrofi ve bununla orantılı klinik bulgulara rastlamışlardır (28). Tolüenin frontal korteks ve beyin sapında hasara yol açarak caspase-3 aktivitesinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (7). Taş ve ark. (29) kronik tolüen maruziyetinin Bax immune reaktivitesinde artışa yol açtığını göstermişlerdir (29). Tolüene maruz kalan sıçanların akciğer, beyin ve testis dokularında TUNEL pozitif hücre sayısında anlamlı oranda artış olduğu bildirilmiştir (7, 30, 31).

Lipofilik özelliğe sahip olan tolüen hücre duvarındaki lipit yapısını değiştirip proteinlerle etkileşime girerek ve Na/K-ATPaz aktivitesini etkileyerek membran yapısını ve akışkanlığını etkileyebilir (32). Doz cevap ilişkisini gösterir çok fazla çalışma olmadığından doz cevap ilişkisi tam olarak belirlenmemiştir ancak yüksek dozlarda ilk etkinin santral sinir sistemi depresyonu olduğu bilinmektedir. Yüksek dozda maruziyetlerde diğer uçucu

maddelerle benzer olarak psikomotor hasarlanma, lokomotor aktivitelerde eksitasyon ve daha sonra da inhibisyon, ayakta durma refleksinin kaybolması ve sedasyon gibi etkiler görülür. Tolüenin bu etkileri gabaerjik, glutamaterjik, serotonerjik, dopaminerjik yolları etkileyerek yaptığı sanılmaktadır (5,25).

Çalışmamızın sonuçları incelendiğinde literatürdeki çalışmalarla paralellik gösteriyordu. Tolüene maruz kalan hayvanlarda akut dönemde lokomotor aktivitede azalma, taşikardi ve hipersalivasyon gözlemlenirken, uzun dönemde hayvanlarda davranış değişiklikleri, iştahsızlık ve saldırgan hareketlerin arttığı gözlemlendi.

Reiter (33) melatoninin hem direk hem de dolaylı olarak antioksidan özelliğe sahip olduğunu belirtmiştir. Melatoninin mitokondri üzerinde etki göstererek yaşlanmayla birlikte meydana gelen doku hasarını önlediği (13), Parkinson ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda oldukça yüksek bir tedavi edici potansiyele sahip olduğu da bilinmektedir (34). İskemi-reperfüzyon hasarı gibi çok fazla hasarın olduğu durumlarda bile dışarıdan verilen melatoninin en az fizyolojik melatonin kadar koruyucu etkisi olduğu iddia edilmektedir (35). Melatoninin oldukça toksik etkili bir madde olan formaldehitin birçok dokuda meydana getirdiği oksidatif hasarı önlediği de gösterilmiştir (15). Baydaş ve ark. (36, 37) % 60-70 oranında tolüen içeren tiner (3000 ppm/45 gün) ile yaptıkları çalışmalarda melatoninin artan oksidatif stresin neden olduğu GFAP seviyelerini düşürdüğünü, hafıza öğrenme bozukluklarını azalttığını göstermişlerdir. Kronik tolüene maruz kalan sıçanların frontal korteks ve beyin sapı dokularında apoptotik hücre sayısının arttığı kaspaz-3 aktivitesinde artış ve TUNEL pozitif hücre sayısındaki artış ile gösterilmiştir (7).

Bizim çalışmamızda ise melatonin hormonunun bu çalışmalara paralel bir etki göstererek dokuyu koruduğu bunun neticesi olarak melatonin grubundaki sıçanlarda TUNEL pozitif hücre sayılarının kontrol grubuna yakın olarak düşük olduğu görüldü.

Bu çalışmada tolüen verilen sıçanlarda tolüen toksisitesi ile ilgili klinik belirtiler gözlemlenmiştir. Bunun yanında apoptotik hücrelerin sayısında artma olması tolüenin prefrontal korteks dokusunda ciddi hasara yol açtığının bir göstergesidir. Melatonin tedavisi ile bir düzelmeye sağlanmış olması melatoninin tolüenin toksik etkilerini azaltmada bir koruyucu ve tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir.

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

Kaynaklar

1. OEHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment) Determination of Acute Reference Exposure Levels for Airborne Toxicants. http://www.oehha.ca.gov/air/acute_rels/pdf/108883A.pdf 15.09.2011
2. Ono A, Kawashima K, Sekita K, et al. Toluene inhalation induced epididymal sperm dysfunction in rats. *Toxicology* 1999; 139: 193-205.
3. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Case Studies in Environmental Medicine; Toluene Toxicity. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/toluene/> 15.09.2011
4. Dossing M, Aelum JB, Hansen SH, Lundqvist GR, Andersen NT. Urinary hippuric acid and orthocresol excretion in man during experimental exposure to toluene. *Br J Ind Med* 1983; 40: 470-473.
5. Balster RL. Neural basis of inhalant abuse. *Drug Alcohol Depend* 1998; 51: 207-214.
6. Gotohda T, Nishimura A, Morita K. Immunohistochemical studies on early stage of hepatic damage induced by subacute inhalation of toluene vapor in rats. *J Appl Toxicol* 2009; 29: 505-509.
7. Kanter M. Protective Effects of *Nigella sativa* on the Neuronal Injury in Frontal Cortex and Brain Stem after Chronic Toluene Exposure. *Neurochem Res* 2008; 33: 2241-2249.
8. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi (2.cilt)*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1995: 388.
9. Duncan J. An adaptive coding model of neural function in prefrontal cortex. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 820-829.
10. Ganong WF. *Tıbbi Fizyoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2002: 249-268.
11. Ranganath C, Jonson MK, D'Espisoto M. Prefrontal activity associated with working memory and episodic long-term memory. *Neuropsychologia* 2003; 41: 378-389.
12. Shida CS, Castrucci AM, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res* 1994; 16: 198-201.
13. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ. Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2002; 32: 143-148.
14. Forsling ML, Stoughton RP, Zhou Y, Kelestimur H, Demaine C. The role of the pineal in the control of the daily patterns of neurohypophysial hormone secretion. *J Pineal Res* 1993; 14: 45-51.
15. Zararsiz I, Kus I, Ogeturk M, et al. Melatonin prevents formaldehyde-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rats: an immunohistochemical and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 413-418.
16. Longoni B, Salgo MG, Pryor WA, Marchiafava PL. Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Life Sci* 1998; 62: 853-859.
17. Yilmaz B, Canpolat S, Sandal S, et al. Paint thinner exposure inhibits testosterone synthesis and secretion in a reversible manner in the rat. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 791-796.
18. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res* 2000; 45: 528-537.
19. Friedlander MR. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 1365-1375.
20. Fulda S, Debatin KM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 217-223.
21. Tao W, Kurschner C, Morgan JI. Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins. *J Biol Chem* 1997; 272:15547-15552.
22. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 2010; 17: 1104-1114.
23. Ladefoged O, Hougaard KS, Hass U, et al. Effects of combined prenatal stress and toluene exposure on apoptotic neurodegeneration in cerebellum and hippocampus of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 94: 169-176.
24. Coskun O, Yuncu M, Kanter M, Buyukbas S. Ebselen protects against oxidative and morphological effects of high concentration chronic toluene exposure on rat sciatic nerves. *Eur J Gen Med* 2006; 3: 64-72.
25. Bowen SE, Hannigan JH, Irtenkauf S. Maternal and fetal blood and organ toluene levels in rats following acute and repeated binge inhalation exposure. *Reprod Toxicol* 2007; 24: 343-352.
26. El-Nabi Kamel MA, Shehata M. Effect of toluene exposure on the antioxidant status and apoptotic pathway in organs of the rat. *Br J Biomed Sci* 2008; 65: 75-79.
27. Gotohda T, Tokunaga I, Kubo S, et al. Effect of toluene inhalation on astrocytes and neurotrophic factor in rat brain. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 233-238.
28. Fujita K, Koga Y, Takemasa K, Koike H, Akai J. A case of chronic toluene intoxication with atrophy of cerebrum, cerebellum and brainstem on CT and MRI. *Rinsho Shinkeigaku* 1992; 32: 421-425.
29. Tas U, Ogeturk M, Meydan S, et al. Hepatotoxic activity of toluene inhalation and protective role of melatonin. *Toxicol Ind Health* 2011; 27: 465-473.
30. Kanter M. Thymoquinone attenuates lung injury induced by chronic toluene exposure in rats. *Toxicol Ind Health* 2011; 27: 387-395.
31. Kanter M. Thymoquinone reestablishes spermatogenesis after testicular injury caused by chronic toluene exposure in rats. *Toxicol Ind Health* 2011; 27: 155-166.
32. Calderon-Guzman D, Espitia-Vazquez I, Lopez-Dominguez A, et al. Effect of toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and NA+/K+-ATPase in adult rat brain. *Neurochem Res* 2005; 30: 619-624.
33. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1129-1146.
34. Mayo JC, Sainz RM, Uria H, et al. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells:

- implications for Parkinson's disease. J Pineal Res 1998; 24: 179-192.
35. Kavakli A, Parlakpınar H, Yahsi S, Ogeturk M, Acet A. The effects of melatonin on focal cerebral ischemia-reperfusion model. Saudi Med J 2004; 25: 1-2.
36. Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, et al. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. Toxicol Lett 2003; 137: 169-174.
37. Baydas G, Ozveren F, Akdemir I, Tuzcu M, Yasar A. Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin. J Pineal Res 2005; 39: 50-56.