

Nikotinin Sıçan Hipokampüsünde Lipid Peroksidasyonu ve Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi

Effects of Nicotine on Lipid Peroxidation and Nitric Oxide Levels at Rat's Hippocampus

Duygu Kumbul Doğuç

Medine Cüre

Yusuf Kara

Recep Sütçü

Namık Delibaş

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta

Geliş tarihi: 11 Şubat 2009

Kabul tarihi: 04 Haziran 2009

ÖZET

Amaç: Nikotin, sigara dumanının önemli bir bileşenidir. Periferik ve merkezi sinir sisteminde reaktif oksijen türlerinin üretimini uyararak oksidatif stresin oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir. Diğer taraftan Parkinson Hastalığı ve Alzheimer Hastalığı riski ile sigara kullanımı arasında ters bir orantı olduğu çeşitli epidemiyolojik araştırmalarla ortaya konmuş ve nikotinin bu etkilerden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Çalışmamızda oksidan sistem ile nikotin ilişkisini araştırmak amacıyla subkronik nikotin uygulaması sonrası sıçan hipokampüslerinde malondialdehid ve nitrik oksit düzeylerini inceledik.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada Sprague Dawley cinsi toplam 40 adet erkek sıçan kullanıldı. 20 adet 3-6 aylık ve 20 adet 12-24 aylık sıçanlar, genç kontrol grubu (n=10), genç nikotin grubu (n=10), yaşlı kontrol grubu (n=10) ve yaşlı nikotin grubu (n=10) şeklinde dört gruba ayrıldı. (-)-nikotin hidrojen tartrat tuzu (Sigma, Amerika) sıçanlara 0.45 mg/kg olacak şekilde, günde iki kez (08:30 ve 17:30), 18 gün boyunca cilt altına enjekte edildi. Kontrol grubuna da eş zamanlı olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Son enjeksiyondan 15 saat sonra eter anestezisi altında sıçanlar dekapite edildi. Beyinleri alındı, hipokampüsler çıkarıldı. Homojenize edilen hipokampüs örneklerinin süpernatantlarında Lowry yöntemi kullanılarak protein tayini yapıldı. Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehid; Draper ve Hadley'in çift ısıtmalı metodu kullanılarak ölçüldü. Nitrik oksit düzeyleri ise Griess reaksiyonu ile, nitrik oksit ve nitrat, nitrite dönüştürülerek ölçüldü.

Bulgular: Gruplar arasında hipokampus malondialdehid ve nitrik oksit düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sonuç: Subkronik nikotin uygulamasının gruplar arasında hipokampus malondialdehid ve nitrik oksit düzeyleri açısından anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü. Bazı çalışmalarda belirtilen; nikotinin antioksidan etkisi, doza veya kullanım süresine spesifik olabilir.

Anahtar Sözcükler: Nikotin, Kavrama performansı, Antioksidan etkiler

Bu çalışma 19-22 Nisan 2007 tarihleri arasında Antalya'da düzenlenen VII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

Objective: Nicotine is an important component of cigarette smoke. Nicotine administration may result in oxidative stress by inducing the generation of reactive oxygen species in the periphery and central nervous system. Numerous epidemiological studies have demonstrated an inverse relationship between cigarette smoking and the risk of developing PD and AD. Nicotine might be responsible for this effect. In this study we evaluate the malondialdehyde and nitric oxide levels of hippocampus after subchronic nicotine administration.

Materials and Methods: 3-6 months and 12-24 months aged, 40 rats were used. We arranged 4 groups as; young nicotine, aged nicotine, young control and aged control. Each group include 10 male sprague dawley rats. Young nicotine and aged nicotine groups were treated for 18 days with twice daily subcutaneously injections of nicotine (0.45 mg/kg, as the hydrogen tartrate salt) (Sigma, USA) and at the same time young control and aged control groups were treated with isotonic saline by the same way. 15 hours after the final treatment animals were euthanized with ether inhalation. Following brain removal, the hippocampus were dissected out bilaterally. Malondialdehyde was determined by the double heating method of Draper and Hadley. Nitric oxide was determined by the Griess reaction, in which nitric oxide and nitrate were converted to nitrite.

Results: The malondialdehyde and nitric oxide levels of hippocampi represented no difference between groups.

Conclusion: The dosage of nicotine and the period that we administered, represented no oxidant or antioxidant effect. The antioxidant effect of nicotine may be dose spesific or period of administration may be the other fact.

Key Words: Nicotine, Cognitive performance, Antioxidant effects

GİRİŞ

Nikotin, piridin ve piroldin halkasından oluşan ve tobacco bitkisinin yapraklarından izole edilen alkaloid bir bileşiktir. Sigara dumanının önemli bir bileşenidir (1). Nikotin, nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) üzerinden nöronlarda ve diğer hücrelerde agonist gibi etki yaratır, kan beyin bariyerini geğererek endojen nörotransmitter asetilkolin (ACh) gibi davranır ve beyinde birden çok reseptör subtipiyle etkileşime girer (2). Yüksek doz nikotin ve enantiomerlerinin periferik ve merkezi sinir sisteminde (MSS), hücre içi metabolizması esnasında, sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesinin arttığı ve reaktif oksijen türlerinin üretimini uyarılarak serbest radikal oluşumuna neden olabildiği düşünölmektedir (2).

Sigara tiryakilerinde nikotinin, özellikle dikkat isteyen işlerde performansı arttırdığı gösterilmiştir. Sigara kullanmayanlara nikotin yamaları yapıştırılarak dikkat ve uyanıklıkta gelişme sağlandığı rapor edilmiştir (3). Alzheimer hastalığında (AH) kavrama disfonksiyonu

korteks ve hipokampususta nikotinik reseptörlerde dramatik bir düşüşle beraberdir (4). Bu veriler nikotin ile nAChR'si üzerinden nöroprotektif etki sağlanabileceğini düşündürmektedir (4-6). Nikotinik bazlı terapötik yaklaşım AH, şizofreni, dikkat bozukluğu ve hiperaktivite hastalığı gibi çeşitli kavrama fonksiyonunda bozukluklarla seyreden hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir (5,6).

Serbest radikaller, AH, Parkinson hastalığı (PH) gibi yaşlanma sürecinin kronik hastalıklarının başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynarlar (7,8). Yaşlanma sürecinde oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge daha çok oksidan yöne kaymaktadır. Ancak PH ve AH riski ile sigara kullanımını arasında ters bir orantı olduğu çeşitli epidemiyolojik araştırmalarla ortaya konmuştur (9). Sigara dumanı içindeki bileşiklerden biri olan nikotinin bu etkilerden sorumlu olduğu ileri sürölmüştür (9). Bilimsel çalışmalar göstermiştir ki sadece sigara kullanımı ile değil nikotin sakızı ve nikotin yamaları ile PH'de tremorlar ve bradikinezi azalmakta,

AH'de de dikkat, bilginin işlenmesi gibi fonksiyonlar gelişmektedir (9). Ayrıca genç ve yaşlı sıçanlarda nikotin tedavisinin kavrama fonksiyonlarını düzelttiği görülmüştür (5,9,10). PH ve AH'de nikotinin sağladığı yararlı veya koruyucu etkilerin en azından bir kısmının antioksidan mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan PH ve AH patogenezinde serbest radikaller ve demir (Fe) ile indüklenen oksidatif stresin rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır (9).

Nitrik oksit (NO); nitrik oksit sentaz (NOS) adlı enzim ile arjininden endojen olarak elde edilir. Düşük konsantrasyonda, MSS'de biyolojik haberci molekül gibi davranır ve fizyolojik şartlarda sinaptik plastisite, hafıza oluşumu, vazodilatasyon ile serebral kan akımı ve nöroendokrin sekresyon gibi birçok fonksiyonda rol oynar. Nöronal olarak üretilen NO'nun hafıza oluşumunda rol oynadığına dair bazı kanıtlar vardır. NO, nikotinin MSS'deki etkisinde aracı veya sonuç moleküllerden biri gibi görünmektedir (7,11-14). Ancak yüksek konsantrasyonda NO, O₂ ile veya süperoksit anyonu (O₂⁻) ile reaksiyona girerek reaktif nitrojen-oksijen radikallerini (RNOS) oluşturur (14).

Biz de çalışmamızda oksidan sistem ile nikotin ilişkisini araştırmak amacıyla subkronik nikotin uygulaması sonrası NO ve lipid peroksidasyon ürünü olarak malondialdehid (MDA) düzeylerini inceledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan Sprague Dawley cinsi toplam 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 3-6 aylık ve 12-24 aylık, genç ve yaşlı grup oluşturmak üzere iki grup halindeydi. Genç kontrol grubu (n=10), genç nikotin grubu (n=10), yaşlı kontrol grubu (n=10) ve yaşlı nikotin grubu (n=10) olmak üzere toplam dört gruba ayrıldılar. Sıçanlara uygulanacak yeteri kadar (-)nikotin hidrojen tartrat tuzu (Sigma, Amerika)

hergün tartılıp, serum fizyolojik içinde çözümlü, fosfat tamponu kullanılarak pH'ı 7.4'e ayarlandı. Nikotin sıçanlara 0.45 mg/kg olacak şekilde, günde iki kez (08:30 ve 17:30), 18 gün boyunca cilt altına enjekte edildi (15). Kontrol grubuna da eş zamanlı olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Deney süreci boyunca hayvanların davranış ve genel durumları gözlemlendi. Deney sonunda genç nikotin grubundan 4 tane, genç kontrol grubundan 2 tane, yaşlı nikotin grubundan 2 tane ve yaşlı kontrol grubundan 1 tane sıçan öldü. Son enjeksiyondan 15 saat sonra eter anestezisi altında sıçanlar dekapite edilerek öldürüldü. Beyinleri alındı. Hipokampus çıkarılarak önceden hazırlanmış, içi 50 mM fosfat tamponu dolu ependorf tüplere konuldu. Homojenize edilen örnekler 5000 g'de +4°C soğutmalı santrifüjde 5 dakika santrifüj edildi. Örneklerin süpernatantlarında Lowry yöntemi kullanılarak protein tayini yapıldı (16). Lipid peroksidasyonu tayini; lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA; Draper ve Hadley'in tiyobarbitürik asit (TBA) reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü (17). Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek 532 nm de maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturur. NO tayini; Griess reaksiyonu ile, NO ve nitrat, nitrite dönüştürülerek spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (18).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler, One way ANOVA ile yapıldı. Grupların birbiriyle karşılaştırılması için Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hatanın ortalaması (SEM) olarak verildi. P değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Gruplar arasında hipokampus MDA düzeyleri ve NO düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05) (Tablo 1).

Tablo 1. Tüm gruplarda MDA ve NO düzeylerinin ortalamaları ve SEM değerleri.

Gruplar	MDA (nmol/mg protein)	NO (μ mol/mg protein)
GN (n=6)	0.091 \pm 0.02	0.686 \pm 0.02
GK (n=8)	0.087 \pm 0.01	0.711 \pm 0.05
YN (n=8)	0.094 \pm 0.04	0.722 \pm 0.04
YK (n=9)	0.084 \pm 0.02	0.705 \pm 0.02

GN: Genç nikotin, GK: Genç kontrol, YN: Yaşlı nikotin, YK: Yaşlı kontrol

TARTIŞMA

Oksidatif stres sonucu oluşan beyin dokusunun yıkımı ve fonksiyon yitimi, yaşam kalitesi ve süresiyle bağlantılıdır. Yaş ilerledikçe veya organizma toksin ve/veya serbest radikal üreten reaktiflere maruz kaldıklarında, antioksidan savunma elemanları işlevlerini yapamazlar. Sonuçta yaşlanmayla ilgili hastalıklar ve yaşlanma belirtileri ortaya çıkar (19). Serbest radikaller, ateroskleroz, diyabet, kanser, katarakt, AH, PH ve romatoid artrit gibi yaşlanma sürecinin kronik hastalıklarının başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynarlar (7,8). Yaşlanma sürecinde oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge daha çok oksidan yöne kaymaktadır. Bu nedenle serbest radikal bağlantılı hastalıklara ve erken yaşlanmaya karşı koyabilmenin sırrı, organizmaların yaşam boyunca oksidatif süreçlerin bir sonucu olarak oluşan moleküler bozunmaya karşı koyabilme yeteneklerine bağlıdır (20,21).

Nikotinin kavrama performansı ve öğrenme olgusu üzerine yararlı etkileri birçok hayvan ve insan deneyi ile ortaya konmuştur. Linert ve ark. (9), doğal ve sentetik antioksidanlarla yaptıkları deneysel çalışmada yaşlı sıçanlarda antioksidanların kavrama performansını arttırdığını saptamışlar. Buradan yola çıkarak nikotinin kavrama performansını arttırıcı etkisinin antioksidan mekanizmalar üzerinden olabileceğini düşünmüşlerdir.

Yıldız ve arkadaşlarının yaptığı invitro bir çalışmada, in Hamster Yumurtalık (CHO) hücrelerinde, nikotin ve enantiomerleri ile (10 mM) hücrelerin koloni oluşturması inhibe

olmuştur. 5 ve 10 mM nikotin konsantrasyonu ile glutasyon (GSH) düzeyinde anlamlı bir düşüş, MDA düzeyinde anlamlı bir yükselme saptanmış. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz gibi serbest radikalleri detoksifiye eden enzimlerin eklenmesiyle kültür ortamında nikotin ile indüklenen GSH düşüşü inhibe olmuştur (1). Bu bulgulara dayanarak nikotinin, CHO hücrelerinde oksidatif stresi indüklemekte olduğu söylenebilmektedir. Ancak bu çalışmada hücrelerin maruz kaldığı nikotin dozu oldukça yüksek ve çalışılan doku CHO hücrelidir (1).

Memelilerde yapılan çalışmalarda nikotinin indüklediği maksimum oksidatif stres sıçan beyinde mitokondride bulunmuştur. Nikotinin mitokondrial solunum zincirini kırarak O₂⁻ ve hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (1). Yüksek doz nikotin ve enantiomerlerinin hücre içi metabolizması esnasında sitokrom P-450 enzimlerinin aktivitesi artarak serbest radikal oluşumuna neden olabilmektedir (2).

Linert ve ark. (9)'nın in vivo olarak yürüttüğu çalışmada beyinde kavrama açısından önemli olduğu varsayılan beyin bölgelerinde (neokortex, hipokampus, neostriatum) nikotinin, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve lipid peroksidasyonu üzerine herhangi bir etkisi olmadığını saptamışlardır. Aynı çalışmanın in vitro deneylerinde neokortikal homojenatlara uygulanan çeşitli dozlardaki nikotin ile yapılan çalışmalarda tiobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) oluşumunda kontrol grubuna kıyasla bir fark saptanmamıştır (9).

Soto-Otero ve ark. (22)'nin yaptığı bir çalışmada, sıçan beyini mitokondrisinden hazırlanan numunelere nikotin uygulandığında 6-hidroksidopamin otooksidasyonu ile indüklenen lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlanmıştır ve nikotinin, lipid peroksidasyonunun antioksidan bir inhibitörü şeklinde rol oynadığı belirtilmiştir.

Birçok araştırmacı, farklı dokularda (myokard, özefagus, pankreas, beyin, akciğer ve karaciğer)

yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir ki, sigarada bulunan ve oksidatif hasarlanma ve reaktif oksijen türlerinin oluşumundan sorumlu olan birincil ajan nikotindir. 10 gün boyunca 1.6 mg/kg/gün dozunda uygulanan nikotin ile kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm dokularda TBARS düzeylerinde artış saptanmıştır (2).

Görüldüğü gibi nikotin farklı dokularda, farklı doz ve farklı uygulama sürelerinde farklı sonuçlar verebilmektedir. Ayrıca çeşitli çalışmalar göstermiştir ki, yüksek doz nikotin nörotoksosite ve oksidatif stresi stimüle ederken düşük konsantrasyonda nikotin antioksidan gibi davranmakta ve nöral koruyucu etki açısından çok önemli bir rol oynayabilmektedir (1). Nikotine cevap doza bağımlı gibi görünmektedir. Alternatif bir yaklaşım, nikotin, sıçanların beyinlerinde antioksidan aktiviteye sahip olabilir ve bu etkilerini ölçülmeyen oksidatif göstergeler üzerinden (protein oksidasyonu, DNA oksidasyonu, hidroksil radikali oluşumu) göstermiş olabilir (9).

Pogun ve ark. (11)'nin yaptığı çalışmada akut ve kronik nikotin uygulanan sıçanların çeşitli beyin bölgelerinde stabil NO metabolitlerinin arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç nikotinin nöronal NOS enzimini stimüle ettiğini desteklemektedir. NOS stimülasyonunun nAChR'lerine Ca^{+2} akımı ile veya nikotinin diğer nörotransmitter ve/veya sinyal iletim sistemleriyle etkileşimi üzerinden olabileceği vurgulanmıştır (11).

Sıçan kortikal nöron kültürlerinde glutamat veya N-Metil-D-Aspartat'a maruziyetin hücre yaşamını kısalttığına dair çalışmalar vardır ve NO nörotoksitesinde aracı olarak tanımlanmaktadır (11). Diğer taraftan bazı araştırmacılar, nikotinin gözlemlenen nöroprotektif etkisini, NO oluşumu üzerine olası inhibitör etkisine bağlamaktadırlar. Benzer şekilde nikotinin, kortikal nöron kültürlerinde, 7 nöronal nAChR yoluyla Ca^{+2} tarafından tetiklenen NO oluşumunu azaltarak

glutamat ile indüklenen sitotoksiteden korunduğu rapor edilmiştir (23). Yapılan çeşitli çalışmalarda nikotinin NO düzeyleri üzerine yorumlar çelişmektedir.

Bu çalışmada, 0.45 mg/kg, 18 gün nikotin enjeksiyonu yapılan ve kontrol amaçlı serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan sıçanların hipokampuslerinde oksidatif stresi değerlendirmek üzere MDA düzeyleri ve NO düzeyleri ölçülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. Bulgularımız bu dozda ve bu sürede nikotin uygulamasının hipokampus düzeyinde herhangi bir oksidan ya da antioksidan etkisi olmadığına işaret etmektedir. NO düzeyleri de kullanılan dozda nikotin ile hipokampus düzeyinde bir farklılık yaratmamıştır. Nikotinin oksidan etkisi veya antioksidan aktivitesi dokuya spesifik ve/veya doza spesifik olabilir. Nikotinin nöroprotektif etkisine farklı bir yaklaşım; presinaptik ve postsinaptik nAChR'leri üzerinden non-kolinergik (glutamat, dopamin, adrenalin, noradrenalin ve serotonin) nörotransmitterlerin salınımını sağlayarak tetiklediği yollar ile kavrama performansını geliştirebileceği yönündedir (2,13).

Sonuçta bu çalışma, nikotinin motor ve kavrama fonksiyonu üzerine olası olumlu etkisinin antioksidan mekanizmalar ile değil, ayrı ayrı veya birbiriyle ilişkili çeşitli non-antioksidan mekanizmalar ile olabileceğini desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. Guan ZZ, Yu WF, Nordberg A. Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochem Int* 2003; 43: 243-9.
2. Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Bickford PC, Tighe T, Sanberg PR. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci* 2002; 71: 2807-20.
3. Rezvani AH, Levin ED. Cognitive Effects of Nicotine. *Biol Psychiatry* 2001; 49: 258-67.
4. Bettany J, Levin ED. Ventral hippocampal alpha 7 nicotinic receptor blockade and chronic nicotine effects on memory performance in the radial-arm maze. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 70: 467-74.

5. Levin ED. Nicotinic Receptor Subtypes and Cognitive Function. *J Neurobiol* 2002; 53: 633-40. Review.
6. Nakamura S, Takahashi T, Yamashita H, Kawakami H. Nicotinic acetylcholine receptors and neurodegenerative disease. *Alcohol* 2001; 24: 79-86.
7. Pryor WA. Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 393: 1-22.
8. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-45.
9. Linert W, Bridge MH, Huber M, Bjugstad KB, Grossman S, Arendash GW. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1454: 143-52.
10. Levin ED, Sledge D, Baruah A, Addy NA. Ventral hippocampal NMDA blockade and nicotinic effects on memory function. *Brain Res Bull* 2003; 61: 489-95.
11. Pogun S, Demirgoren S, Taskiran D, Kanit L, Yilmaz O, Koylu EO, Balkan B, London ED. Nicotine modulates nitric oxide in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000; 10: 463-72.
12. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 83-106. Review.
13. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 359-84. Review.
14. Lieberman MA, Marks A. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins; 3rd edition 2008; 439-57.
15. Zhang X, Gong ZH, Nordberg A. Effects of chronic treatment with (+)- and (-)-nicotine on nicotinic acetylcholine receptors and N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain. *Brain Res* 1994; 644: 32-9.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
17. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-31.
18. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-3.
19. Le Bourg E. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 2001; 498: 183-6. Review.
20. Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* 2001; 497: 1-5.
21. Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1083-100. Review.
22. Soto-Otero R, M'endez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, L'opez-Real AM, Labandeira-Garcia JL. Effects of (-)- nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 125-35.
23. Fedele E, Varnier G, Ansaldo MA, Raiteri M. Nicotine administration stimulates the in vivo N-methyl-D-aspartate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat hippocampus through glutamate release. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1042-8.

Yazışma adresi:

Dr. Duygu Kumbul Doğu
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta
Tel : 0.246 211 20 74
Faks : 0 246 237 02 40
E-posta : duygukd@yahoo.com
