

**NİTRİK OKSİT ÜRETİMİ ÜZERİNE TOLÜENİN ETKİSİ
VE RESVERATROL'ÜN KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Raissa SOAMANJARY



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NİTRİK OKSİT ÜRETİMİ ÜZERİNE TOLÜENİN ETKİSİ VE
RESVERATROL'ÜN KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Raissa SOAMANJARY

Doç. Dr. Egemen DERE
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Raissa SOAMANJARY tarafından hazırlanan “Nitrik Oksit Üretimi Üzerine Tolüenin Etkisi Ve Resveratrol’ün Koruyucu Özelliğinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Egemen DERE

Başkan : Doç. Dr. Egemen DERE
0000-0001-9572-1051
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Ferda ARI
0000-0002-6729-7908
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER
0000-0002-0290-1166
Bursa Teknik Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Biyomühendislik Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım
Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü
.././.....

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

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

beyan ederim.

14/02/2022

Raissa SOAMANJARY

TEZ YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Doç. Dr. Egemen DERE
14.02.2022

Raissa SOAMANJARY
14.02.2022

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NİTRİK OKSİT ÜRETİMİ ÜZERİNE TOLÜENİN ETKİSİ VE RESVERATROL'ÜN KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Raissa SOAMANJARY

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Egemen DERE

Tolüen, dünyada en yaygın kullanılan organik çözücülerden biridir. Tolüen endüstride ve birçok ticari üründe örneğin boyalar, boya incelticiler, oje, yapıştırıcılar, vernikler ve temizleyicilerde kullanılmaktadır. Tolüen aynı zamanda en sık kötüye kullanılan inhale çözücüdür. Tolüenin metabolizması sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) veya reaktif nitrojen türleri (RNS) üretilir. Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), birçok bitki türünde, özellikle üzüm, yer fıstığı, ve dutlar doğal olarak oluşan bir polifenoldür. Resveratrolün antioksidan, anti-enflamatuar, yaşlanma karşıtı, antikanser, kardiyoprotektif ve nöroprotektif dahil birçok biyolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından L-arginin'den endojen olarak üretilen iki atomlu serbest radikal, oldukça reaktiftir, çeşitli reaktiflerle tepkimeye girerek çoklu sinyal yollarını düzenleyebilen bir gazdır. Memelilerde üç NOS izoformu bulunmaktadır: nöronal NOS (nNOS), endotel NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). Bu çalışmada, tolüen maruziyetinin serbest radikal NO üretimi üzerindeki etkisi ve resveratrolün koruyucu etkisi araştırıldı. Bu amaçla, 250-350 gram ağırlığında Wistar Albino erkek sıçanlar (36 adet) kullanıldı. Sıçanlar kontrol ve deney olmak üzere iki gruba ayrıldı. Deney gruplarındaki sıçanlara altı gün boyunca 900mg/kg dozunda tolüen ve üç farklı resveratrol dozunda (5mg/kg, 10mg/kg ve 20mg/kg) *i.p* yolla uygulandı. Kontrol grubundaki sıçanlara ise serum fizyolojik ve %10 etanol aynı yöntemle verildi. Altıncı günün sonunda hayvanlar disekte edilerek karaciğer ve kan dokuları toplandı. Toplanan karaciğer dokusunda ve serumda NO seviyeleri ve NOS aktiviteleri incelendi. Sonuç olarak karaciğer dokusunda ve serumda NO seviyelerinde tolüen uygulamasından sonra kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış gözlemlendi. Tolüen ile birlikte resveratrolün üç farklı dozunun uygulanmasından sonra, tolüenle-muamele edilen gruba ve kontrol gruplarına kıyasla karaciğerdeki NO seviyesinde anlamlı bir azalma bulundu. Tolüenin etkisiyle NOS aktiviteleri etkilendi ve en yüksek aktivitesi iNOS'ta bulundu. Ancak resveratrol uygulamasından sonra iNOS aktivitesinde belirgin azalmalar gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Tolüen, resveratrol, nitrik oksit, nitrik oksit sentaz
2022, vii + 39 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TOLUENE ON NITRIC OXIDE PRODUCTION AND PROTECTIVE PROPERTIES OF RESVERATROL

Raissa SOAMANJARY

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Dr. Egemen DERE

Toluene is one of the most widely used organic solvents in the world. Toluene is used in industry and in various commercial products, including paints, paint thinners, varnishes, nail polish, and cleaning products. Toluene is also the most commonly abused inhaled solvent. Exposure to toluene occurs primarily through inhalation of vapors and sometimes through oral or dermal contact. Metabolism of toluene produces reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS). Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a naturally occurring polyphenol in many plant species, particularly grapes, peanuts, and mulberries. Resveratrol has been shown to have numerous biological effects, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-aging, anti-cancer, cardioprotective, and neuroprotective. Nitric oxide (NO), a diatomic free radical formed endogenously from L-arginine by the nitric oxide synthase (NOS) family of enzymes, is a highly reactive gas that can regulate multiple signaling pathways by reacting with various reagents. In mammals, there are three NOS isoforms: neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), and inducible NOS (iNOS). The purpose of the present study was to investigate the effect of toluene exposure on the production of free radical NO and the protective effect of resveratrol. For this purpose, 36 male Wistar albino rats weighing 250-350 grams were used. The rats were divided into two, control and experimental groups. Toluene at a dose of 900mg/kg and three different doses of resveratrol (5mg/kg, 10mg/kg, and 20mg/kg) were administered *i.p.* to the rats in the experimental groups for six days. Rats in the control group received physiological serum and 10% ethanol in the same manner. On the sixth day, the rats were dissected and liver and blood tissues were collected. NO levels and NOS activities in the collected liver tissue and serum were examined. Our result showed that toluene treatment increases the level of NO in the liver tissue and serum compared to the control groups. However, toluene and resveratrol-treated at different doses of 5mg/kg, 10mg/kg, and 20mg/kg significantly decreased NO level in the liver tissue compared to toluene-treated groups and control groups. NOS activities were affected by the effect of toluene and the highest activity was found in iNOS. However, a significant decrease in iNOS activity was observed after resveratrol administration.

Key words: Toluene, resveratrol, nitric oxide, nitric oxide synthase
2022, vii + 39 pages.

TEŞEKKÜR

Bana T¼rkiye'de y¼ksek lisans eğitimimi s¼rd¼rme fırsatı verdiği için T¼rkiye Bursları'na (YTB), teŐekk¼rlerimi sunarım.

Y¼ksek lisans s¼resince danıŐmanlıęımı yapan, T¼rkiye'de akademik yılım boyunca her zaman benimle paylaŐtıęı bilgi ve deneyimler, g¼sterdięi sabır, anlayıŐ ve destek için değerli hocam Sayın Doç. Dr. Egemen DERE'ye, teŐekk¼rlerimi sunarım.

ÇalıŐmalarım s¼resince takıldığım zamanlarda bitmeyen sorularıma daima g¼n¼lden cevaplayan Sayın Prof. Dr. Ferda ARI'ya, teŐekk¼rlerimi sunarım.

Tez çalıŐmam boyunca bana her konuda yardımcı olan ve sabırla destek veren kıymetli Emine Gonca PEKEL'e, teŐekk¼rlerimi sunarım

Laboratuvar arkadaşlarım Ahmet Baratov ve Aboush Elarfaoui'ye yardımları, destekleri ve laboratuvarda birlikte geçirdiğimiz değerli zaman için teŐekk¼r ederim.

D¼rt yıllık uzaktan eğitimin doruk noktası olan bu araştırma boyunca desteklerini esirgemeyen aileme içtenlikle teŐekk¼rlerimi sunuyorum.

ÇalıŐmamın her aŐamasında bana g¼ ve motivasyon veren, bu araŐtırmayı ve y¼ksek lisansımı tamamlamamda bana destek olan t¼m arkadaşlarıma teŐekk¼r ederim.

Raissa Soamanjary
14/02/2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Tolüen.....	4
2.1.1. Tolüen nedir?.....	4
2.1.2. Tolüenin kullanım alanları ve etkileri.....	5
2.1.3. Tolüenin toksikokinetiği (absorbsiyonu, dağılımı, metabolizması ve atılımı).....	5
2.2. Resveratrol.....	8
2.2.1. Resveratrolün genel özellikleri ve kullanım alanları.....	8
2.2.2. Resveratrol absorpsiyonu ve metabolizması.....	9
2.3. Nitrik oksit (NO).....	10
2.3.1. NO genel özellikleri ve biyosentezi.....	10
2.3.2. Nitrik oksit sentaz (NOS).....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Kimyasal maddeler ve kitler.....	12
3.1.2. Sarf malzemeler.....	13
3.1.3. Cihazlar.....	13
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. Deney hayvanları.....	14
3.2.2. Tolüen maruziyetinin gerçekleştirilmesi ve resveratrol uygulaması.....	14
3.2.3. Doku ve kan örneklerinin toplanması.....	14
3.2.4. Nitrik oksit (NO) seviyelerinin ölçümü.....	14
3.2.5. NOS aktivitesinin belirlenmesi.....	18
3.2.6. İstatistiksel analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. NO bulguları.....	22
4.2. NOS aktivitesi bulgular.....	24
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	27
KAYNAKLAR.....	31
ÖZGEÇMİŞ.....	39

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
ADH	Alkol Dehidrojenaz
ALDH	Aldehit Dehidrojenaz
APM	Aminopeptidaz M
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin
CaM	Kalmodulin
CYP	Sitokrom P450
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
eNOS	Endotel Nitrik Oksit Sentaz
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	Flavin Mononükleotid
GGT	Gamma-glutamil Transpeptidaz
GST	Glutasyon S-transferaz
iNOS	Endüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JNK	c-Jun N-terminal Kinaz
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NAT	N-acetyltransferase
NF-κB	Nükleer Faktör-kappa B
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O ₂	Oksijen
ONOO ⁻	Peroksinitrit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SIRT1	Sirtuin 1
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Tolüenin kimyasal yapısı	4
Şekil 2.2. Tolüen metabolizması	7
Şekil 2.3. Resveratrolün kimyasal yapısı Trans (A) ve cis (B)	9
Şekil 2.4. L-argininden NO biyosentezi.....	10
Şekil 3.1. Nitrit ve kromojenik ajanla tepkimesi	15
Şekil 3.2. NO standart grafiği	17
Şekil 3.3. Western blot aşamalarının şematik gösterimi	19
Şekil 4.1. Karaciğer (A) ve Serum (B) NO seviyesi.....	23
Şekil 4.2. Tolüen ve resveratrolün iNOS, eNOS ve nNOS aktiviteleri üzerine etkisi....	25
Şekil 4.3. iNOS (A), eNOS (B) ve nNOS (C) protein aktiviteleri.....	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Tolüenin kimyasal ve fiziksel özellikleri	4
Çizelge 3.1. Sodyum nitrit standartlarının hazırlanması	16
Çizelge 3.2. Sodyum Nitrit standartlarının hazırlanması	16
Çizelge 3.3. Kromogenik reagent ile tepkimesi	17
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorlar	21
Çizelge 4.1. Karaciğer ve serum NO seviyeleri	23

1. GİRİŞ

Tolüen, dünyada en yaygın kullanılan organik çözücülerden biridir. Tolüen esas olarak benzen, tolüen diizosiyanat, fenol, nitrotolüen, benzil klorür, benzaldehit gibi çeşitli ürünlerin üretimi için kimya endüstrisinde hammadde olarak kullanılır (Cosnier, Brochard, Burgart, ve Cossec, 2012). Tolüen ayrıca boyalar, boya incelticiler, vernikler, çeşitli kozmetik malzemeler, solvent tabanlı temizleyiciler, yakıt katkı maddeleri ve yapıştırıcılar dahil olmak üzere birçok ticari üründe çözücü olarak da kullanılır (Nagasawa ve diğerleri, 2011). Ek olarak, tolüen özellikle çocuklar ve ergenler arasında, en sık kötüye kullanılan inhale çözücüdür (Cruz, Riviera-Garcia ve Woodward, 2014), çünkü kolay ulaşılabilir, ucuz ve yasaldir (Kurtzman, Otsuka ve Wahl, 2001).

Tolüene maruz kalma esas olarak buharların solunması ve bazen oral veya dermal temas yoluyla gerçekleşir. Çeşitli çalışmalar toluenin merkezi sinir sistemi üzerindeki olumsuz etkilerini göstermiştir. Tolüene kısa süreli veya tekrarlanan maruz kalma durumlarında memelilerde baş ağrısı, uyuşukluk, hafıza kaybı ve kas-iskelet sistemi bozukluklarına neden olduğu gösterilmiştir (Braunscheidel, Gass, Mulholland, Floresco ve Woodward, 2017). Orta veya yüksek tolüen seviyelerine maruz kalma belirtilen etkilerin yanısıra karaciğer, böbrek ve akciğerlerde zararlı etkiler sebep olduğu, hayvanlarda bozulmuş bağışıklık fonksiyonlarının ortaya çıktığı gösterilmiştir (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2017).

Tolüen atmosferden esas olarak atomik oksijen, hidroksil radikalleri ve ozon ile tepkimeye girerek 13 saat ile bir gün arasında yarılanma ömrü ile uzaklaştırılır (Anonim, 1990). Tolüen yüzey sularına girdiğinde, 5 saatlik yarılanma ömrü ile hızla havaya karışır. Toprakta, 5 mg tolüenin (kg toprak başına) ayrışması, 3 ile 2 günlük bir yarı ömre sahiptir (Davis ve Madsen, 1996). Havadaki tolüen akciğerlerden hızla emilir ve kan yoluyla başta beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokusu olmak üzere çeşitli dokulara hızla dağıtılır (Gotohda, Nishimura ve Morita, 2009). Solunan toluenin çoğu karaciğerde sitokrom p-450 (CYP) ve glutatyon S-transferaz (GST) tarafından metabolize edilir, metabolik ara ürünler ve bir yan ürün reaktif oksijen türleri (ROS) üretir (Kim, Won ve Ko, 2015).

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), birçok bitki türünde, özellikle üzüm, yer fıstığı, çilek ve çayda doğal olarak oluşan bir polifenoldür (Shrikanta, Kumar ve Govindaswamy, 2015). Bitkiler stres, yaralanma, ultraviyole radyasyon ve mantar enfeksiyonuna yanıt olarak resveratrol sentezler (Chitarrini, Zulini, Masuero ve Vrhovsek, 2017). Resveratrol ayrıca üzüm suları ve şarap gibi birçok ticari üzüm ürünüde gösterilmişken yer fıstığı gibi diğer bazı doğal kaynaklarda kıyasla yüksek miktarlarda bulunduğu ileri sürülmüştür (Hasan ve Bae, 2017). Resveratrol yağda çözünür ve bir *cis*- ve bir *trans*-izofomda bulunur; bununla birlikte, *trans*-izofomun daha fazla olduğu ve biyolojik olarak daha aktif olduğu görülmektedir (Navarro-Cruz ve diğerleri, 2017).

Önceki çalışmalar resveratrolün antioksidan olarak faydalarını göstermiştir (Truong, Jun ve Jeong, 2018), anti-enflamatuar, yaşlanma karşıtı ajan (Li, Li ve Lin, 2018), antikanser ajanı (Espinoza, Kurokawa ve Takami, 2018), kardiyoprotektif ajan ve nöroprotektif ajan (Villaflares ve diğerleri, 2012). Oral uygulamadan sonra, resveratrol pasif difüzyonla bağırsakta emilir ve daha sonra kan dolaşımına salınır. Resveratrol metabolizması esas olarak resveratrolün glukuronidlere ve sülfatlara dönüştürüldüğü karaciğerde meydana gelir (Gambini ve diğerleri, 2015).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından L-arginin'den endojen olarak üretilen iki atomlu serbest radikal bir gazdır (Yu ve diğerleri, 2018). NO, bir serbest radikal olarak, sulu çözeltilerde 0,1 ila 5s arasında yarı ömrü olan kısa ömürlü bir moleküldür; ancak *in vivo* olarak NO seviyesini NOS enzimleri tarafından sürekli olarak düzenlenir (Ignarro, 1990). NOS memelilerde üç izofomda bulunur: nöronal NOS (nNOS), endotel NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) (Pradhan, Bertels ve Akerman, 2018). NO suda az çözünür, ancak lipitler ve polar olmayan çözücüler içinde yüksek oranda çözünür ve basit difüzyonla plazma zarının lipit iki tabakasından serbestçe geçmesine izin verir (Toledo ve Augusto, 2012).

Dış yörüngesinde çiftlenmemiş elektron taşıyan NO oldukça reaktiftir ve çeşitli reaktiflerle tepkimeye girebilir ve çoklu sinyal yollarını düzenleyebilir (Fang ve diğerleri, 2021). NO, nitrit (NO₂⁻) veya nitrat (NO₃⁻) kolayca oksitlenebilir (Bryan ve Grisham, 2007). Ek olarak, NO oksijen (O₂) ile tepkimeye girebilir ve metal merkezleri, DNA ve

lipit radikalleri de dahil olmak üzere doğrudan hedef moleküllere bağlanabilir (Fang ve diğerleri, 2021). Ayrıca, NO süperoksit serbest radikalleri (O_2^-) ile tepkimeye girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) üretimine neden olmaktadır (Pacher, Beckman ve Liaudet, 2007). Peroksinitrit, reaktif bir nitrojen türü (RNS) ve lipid peroksidasyonu ve DNA bölünmesi gibi moleküler hasara neden olan ve hastalığa neden olan hücresel işlev bozukluğuna yol açan güçlü bir oksidandır (Hu, Xiang, Su ve Tang, 2020).

Yapılan bir çalışmada, tolüen diizosiyanata maruz kalmanın, ROS ve RNS oluşumuna yol açtığı, oksidatif stresi indüklediği, doğrudan doku hasarına ve çeşitli antioksidan sistemlerde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Choi ve diğerleri, 2018). Başka bir çalışmada sıçanlarda tolüen inhalasyonu sonrası bronkoalveoler lavaj sıvısında NO seviyeleri ve NOS-bağımlı reaktif türlerin üretimini arttırdığı gösterilmiş tolüen maruziyetinin ardından, alveoler makrofajlar tarafından üretilen NO'nun serbest radikal havuzuna katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (Huffman ve diğerleri, 1997). Dokulardaki yüksek NO derişimi, iNOS fonksiyonunun yukarı regülasyonuna yol açar ve proteinlere, DNA'ya ve lipidlere doğrudan zarar verebilecek oksidasyonu teşvik ederek hücresel işlev bozukluğuna neden olur (Kodavanti ve diğerleri, 2015).

Bu çalışmanın amacı, tolüen maruziyetinin karaciğer dokusu ve kanda NO üretimi üzerindeki etkilerini belirlemek ve resveratrolün tolüen toksisitesi üzerindeki koruyucu etkisini araştırmaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tolüen

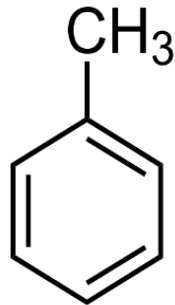
2.1.1. Tolüen nedir?

Tolüen, ham petrol ve tolu ağacında doğal olarak bulunan belirgin bir kokuya sahip, berrak, renksiz bir sıvıdır (ATSDR, 2017). Tolüen, metil grubuna bağlı bir benzen halkasından oluşan aromatik bir hidrokarbondur (Şekil 2.1). Tolüenin kimyasal ve fiziksel özellikleri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Tolüenin kimyasal ve fiziksel özellikleri

(https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=en&p_card_id=0078&p_version=2, 2020)

Özellik	Bilgi
Kimyasal adı	Tolüen
Sinonim	Metilbenzen, Toluol, Fenilmetan
CAS numarası	108-88-3
Kimyasal formül	C_7H_8 veya $C_6H_5CH_3$
Molekül kütlesi	92,1 g/mol
Renk	Renksiz
Fiziksel durum	Sıvı
Bağıl yoğunluk (su=1)	0,87 g/cm ³
Çözünürlük	Suda çözünmez. Alkol, kloroform, eter, aseton, karbon disülfid gibi organik çözücülerde çözünür.
Parlama noktası	4°C



Şekil 2.1. Tolüenin kimyasal yapısı

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Toluene>, 2022)

2.1.2. Tolüenin kullanım alanları ve etkileri

Tolüen endüstrilerde yaygın olarak kullanılan çözücülerden biridir. Başlıca; boyalar, boya incelticiler, oje, yapıştırıcılar, vernikler ve temizleyicilerde bulunmaktadır (Estevan ve diğerleri, 2012). Ayrıca tolüen, oktan oranlarını artırmak için benzen ve ksilen ile birlikte benzine eklenir (Anonim, 2005). Ek olarak plastik, naylon, poliüretan üretiminde, trinitrotolüen (TNT), benzoik asit, benzoil klorür ve tolüen diizosiyanat sentezinde de kullanılmaktadır (ATSDR, 2017).

Bununla beraber tolüenin inhalasyon sonrası hızlı etkileri nedeniyle dünyada en çok suistimal edilen çözücülerden biri olduğu bildirilmiştir (Pelletti ve diğerleri, 2018). Tolüenin kötüye kullanımı çocuklar ve ergenler arasında yaygındır çünkü çeşitli ticari ürünlerde bulunur ve elde edilmesi kolaydır, aynı zamanda ucuzdur ve yasaldir (Balster, Cruz, Howard, Dell ve Cottler, 2009).

Akut ve kronik tolüene maruz kalmanın insanlarda ve hayvanlarda merkezi sinir sistemini etkilediği görülmüştür (Win-Shwe ve Fujimaki, 2010). İnsanlarda akut maruziyetten sonra baş ağrısı, yorgunluk, göz tahrişi, uyuşukluk ve hafıza kaybı gibi çeşitli etkiler bıraktığı bildirilmişken (Thetkathuek ve diğerleri, 2015) ataksi ve konfüzyon şeklinde motor bozulma da bildirilmiştir (Benignus, Boyes, Kenyon ve Bushnell, 2007). Tolüenin uzun süreli kötüye kullananlarda (en az 1 yıl) ise rahatsız edici davranışlar; yavaş düşünce ve konuşma; yanıltıcı yanlış yorumlama; dokunsal, işitsel, halüsinasyon ve sanrsal fikirler de görülmüştür (Evans ve Raistrick, 1987). Tolüene kronik maruziyetten sonra serebellar disfonksiyon, serebral ve hipokampal atrofi ve beyin hacmi kaybı olduğu ileri sürülmüştür (Deleu ve Hanssens, 2000).

2.1.3. Tolüenin toksikokinetiği (absorbsiyonu, dağılımı, metabolizması ve atılımı)

Absorbsiyonu

Tolüen oldukça uçucudur ve bu nedenle tolüenin ana emilim yolu solunum sisteminden geçer (Soares ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte tolüen absorpsiyonu oral ve dermal yoldan da gerçekleşebilir. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalar, tolüenin inhalasyondan sonra hızlı emildiğini gösterilmiştir (Lof ve diğerleri, 1993). Tolüenin oral

emilimi de vardır ancak bu oran pulmoner emiliminden daha yavaştır (Sullivan ve Connolly, 1988). Tolüenin insan derisinden emilimi nispeten yavaştır (Dutkiewicz ve Tyras, 1968), emilim oranları 14 ile 23 mg/cm²-saat arasında değişmektedir.

Dağılımı

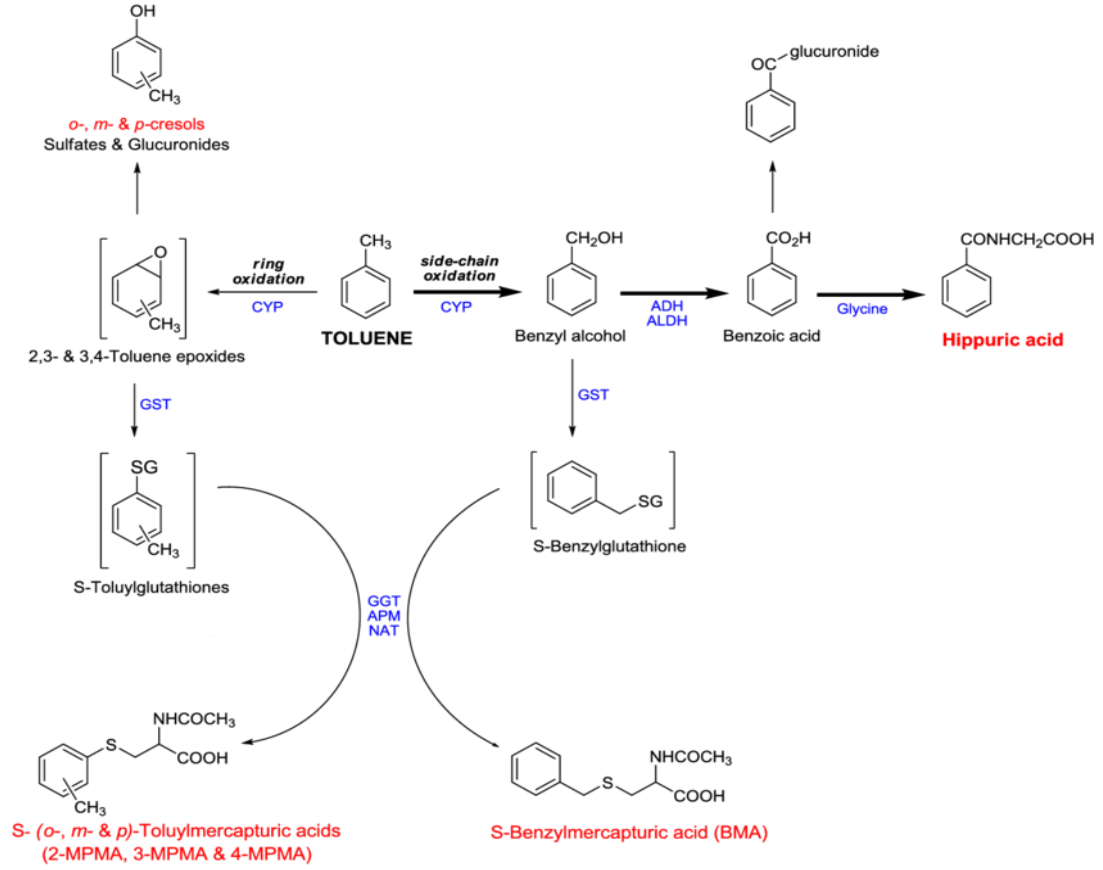
Absorbsiyondan sonra tolüen, tüm vücuda hızla dağılır. Yapılan insan ve hayvan inhalasyon çalışmalarında, yağ dokusu, kemik iliği, adrenal bezler, böbrek, karaciğer, beyin ve kanda yüksek tolüen derişimi gözlenmiştir (Gotohda ve diğerleri, 2015). Mevcut insan verileri, inhalasyona maruz kaldıktan sonra beyinde karaciğerden daha yüksek tolüen derişimi bulunduğunu, oral maruz kaldıktan sonra ise karaciğerin en yüksek tolüen derişimi içerdiğini gösterilmiştir (ATSDR, 2017). Bununla birlikte hayvan çalışmalarında Pyykko, Tahti ve Vapaatalo (1977), sıçanlarda hem oral hem de inhalasyon maruziyetini takiben karaciğerde beyinden daha fazla tolüen derişimi olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Metabolizması

Tolüen metabolizması karaciğerde sitokrom P450 izoformları tarafından gerçekleşir ve idrarla atılan hippurik asit oluşturulur (Nakajima ve Wang, 1994). İlk adım, tolüenin metil grubunun sitokrom P450 (CYP) enzim ailesi tarafından yan zincir hidroksilasyonu ile benzil alkol oluşumudur. Benzil alkol, alkol dehidrojenaz (ADH) ve aldehit dehidrojenaz (ALDH) ile benzoik aside hızla oksitlenir. Benzoik asidin çoğu daha sonra hippurik asit oluşturmak için glisin ile konjuge edilir ancak küçük bir kısım asil-glukuronid oluşturmak için UDP-glukuronat (glukuronik asit) ile konjuge edilebilir (Cosnier ve diğerleri, 2012). Emilen tolüenin az bir miktarının CYP enzimleri tarafından *o*-, *m*- ve *p*-kresole dönüştürüldüğü halka hidroksilasyonu da oluşabilir (Nakajima, Wang ve Elovaara, 1997; Cosnier ve diğerleri, 2012).

Kresoller, esas olarak sülfatlar ve glukuronitler oluşturmak üzere çeşitli konjugasyon tepkimelerine maruz kalabilir. Glutasyon konjugasyonu ayrıca gerçekleşebilir. Merkapturik asitler (MA) de dahil olmak üzere insanlarda ve sıçanlarda diğer küçük metabolitler de tanımlanmıştır. S-benzilmerkapturik asit (BMA), benzil alkolün glutasyon-S-transferazlar tarafından katalize edilen glutasyon ile konjugasyonu yoluyla oluşur (Takahashi, Matsubara, Hasegawa, Akane ve Shiono, 1993). Sp-tolüilmerkapturik

asit (4-MPMA), epokside halkanın glutatyon-S-transferazlar tarafından katalize edilen glutatyon ile konjugasyonu yoluyla oluşur (Angerer, Schildbach ve Kramer, 1998). Tolüenin genel metabolizması Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Tolüen metabolizması (Cosnier ve diğerleri, 2012)

Atılımı

Tolüen ve türevlerinin eliminasyonu esas olarak böbrekte gerçekleşir. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalar, vücuttaki tolüenin çoğunluğunun idrarda metabolit olarak elimine edildiğini göstermiştir (Lof ve diğerleri, 1993; Tardif, Plaa ve Brodeur, 1992). Tolüenin majör idrar metaboliti hippurik asittir ve %80'e kadar solunan tolüene maruz kaldıktan sonra 12 saat içinde idrarda hippurik asit (%83-94) olarak atılır. Minör idrar metabolitleri arasında benzoil glukuronid (%3-9), *orto*- ve *para*- kresol (%5'ten az) ve bunların sülfat ve glukuronid konjugatları, S-benzil merkapturik asit ve S-P-toluy merkapturik asit bulunur (Tassaneeyakul ve diğerleri, 1996; Nakajima ve diğerleri, 1997;

Angerer ve diğeri, 1998). Emilen tolüenin yaklaşık %25-40'ı değışmeden akciğeri yoluyla havada elimine edilir (Monster, Kezic, Van ve Gevel, 1993). Birçok çalışmada, solunan tolüenin çoğunun vücuttan hızla elimine edildiğı gösterilmiştir. Bununla birlikte daha küçük bir kısmı yağ dokusunda depolanır ve 12 ile 72 saat içinde tamamen elimine edilir (Janasik, Jakubowski ve Jalowiecki, 2008).

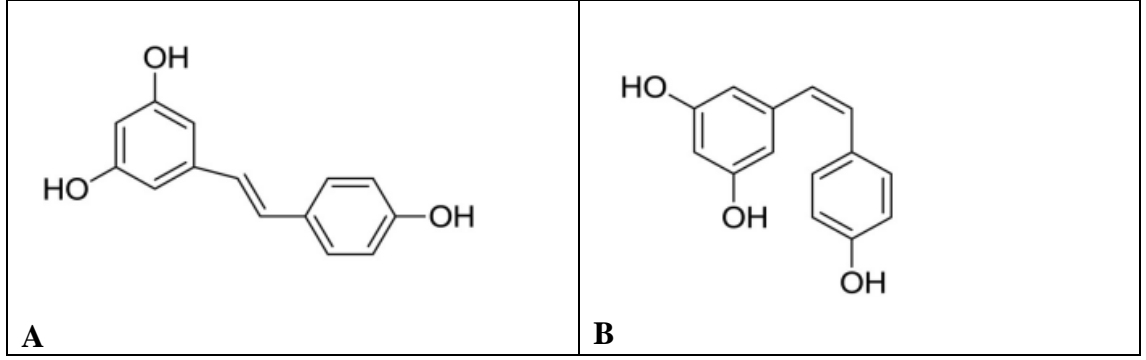
2.2. Resveratrol

2.2.1. Resveratrolün genel özellikleri ve kullanım alanları

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben), Japon knotweed (*Polygonum cuspidatum*), üzüm (*Vitis vinifera*), yer fıstığı (*Arachis hypogaea*) ve dutlar (*Morus rubra*) dahil olmak üzere çok sayıda bitki türünde bulunan doğal bir polifenoldür (Gupta, Kannappan, Reuter, Kim ve Aggarwal, 2011). Bitkiler resveratrolü strese, yaralanmaya, aşırı güneş ışığına, ultraviyole radyasyona, enfeksiyon ve mantarlara karşı savunma mekanizması olarak sentezler (Becker ve diğeri, 2017).

Resveratrol ayrıca üzüm suları ve şarap, özellikle kırmızı şarap gibi birçok ticari üzüm ürününde bulunur. Üzüm kabuğı, gövde, yaprak, yaprak sapı ve kök dahil olmak üzere üzümün hemen hemen tüm bitki kısımları resveratrol içerir ancak en büyük miktarı üzüm kabuğunda bulunur (Hasan ve Bae, 2017). Taze üzüm kabuğundaki resveratrol içeriğı 50-100 mg/g'dır ve şarabın türüne bağılı olarak yaklaşık 0,2-5,8 mg/L şaraptır (Truong, Jun ve Jeong, 2018).

Yapısal olarak resveratrol, moleköl ağırlığı 228,25g/mol olan 3,5,4'-trihidroksistilben (Şekil 2.3) oluşturan bir stiren çift bağı ile bağlanmış iki fenolik halkadan oluşan bir stilben sınıfına aittir (Gambini ve diğeri, 2015). Bu çift bağı, resveratrolün iki izomerik formundan sorumludur, *trans*-resveratrol (Şekil 2.3 A) ve *cis*-resveratrol (Şekil 2.3 B). *Cis*-resveratrol daha az yaygın ve çok kararsızken *trans*-resveratrol baskın, daha kararlı ve biyolojik olarak aktiftir ve güneş ışığına veya UV radyasyonuna maruz bırakılarak *cis*-resveratrol'e dönüştürülebilir (Chimento ve diğeri, 2019).



Şekil 2.3. Resveratrolün kimyasal yapısı Trans (**A**) ve cis (**B**) (Chimento ve diğerleri, 2019)

2.2.2. Resveratrol absorpsiyonu ve metabolizması

Resveratrolün sudaki düşük çözünürlüğü (<0,05mg/ml) emilimini etkiler. Çözünürlüğünü artırmak için etanol (50mg/ml) veya organik çözücüler kullanılmaktadır. Resveratrolün, oral uygulamadan sonra pasif difüzyon veya membran taşıyıcılar (integrin) tarafından bağırsakta emildiği ve daha sonra kan dolaşımına salındığı ve burada üç farklı biçimde saptanabildiği gösterilmiştir: glukuronid, sülfat veya değişmemiş olarak (Gambini ve diğerleri, 2015). Resveratrolün metabolizması esas olarak resveratrolü konjuge glukuronidlere ve sülfat metabolitlerine dönüştüren karaciğerde meydana gelir. Gambini ve diğerleri, aynı çalışmada resveratrolün idrarda beş farklı metabolit olmak üzere resveratrol monosülfat, resveratrol monoglukuronidin iki izomerik formu, monosülfat dihidroresveratrol ve monoglukuronid dihidroresveratrol tespit edildiğini ileri sürülmüştür.

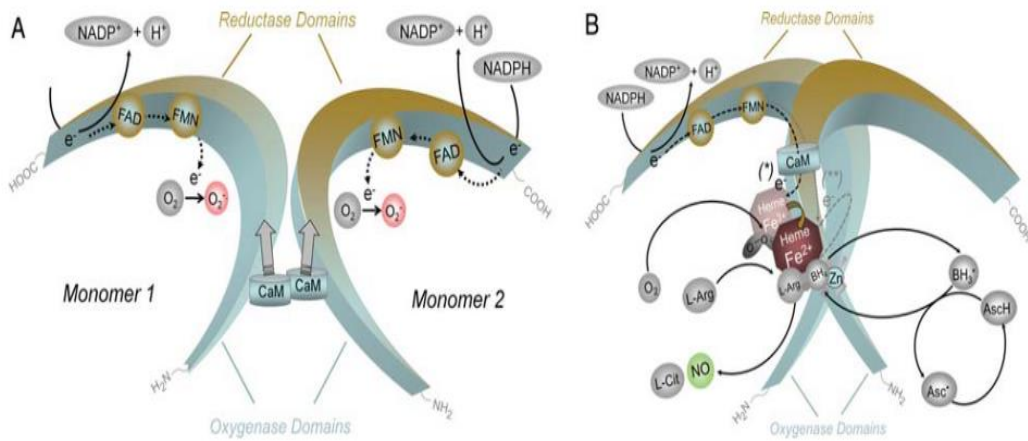
Resveratrol hızla emilir, geniş ölçüde metabolize olur ve hızla atılır ancak biyoyararlanımı %1'den azdır. Oliveira, Monteiro ve Navegantes-Lima (2017), resveratrol tedavisi ile ilgili temel sorunun düşük biyoyararlanımı olduğunu söylemiştir. Bazı insan çalışmalarında, yüksek doz resveratrol tedavisinin (500mg/gün) bile bu antioksidanın düşük plazma derişimlerine (10-71,2 ng/ml) yol açtığını bildirilmiştir.

2.3. Nitrik Oksit (NO)

2.3.1. NO genel özellikleri ve biyosentezi

NO, dış yörüngesinde bir eşleşmemiş elektrona sahip, oldukça reaktif, iki atomlu bir gaz molekülüdür ($\cdot\text{N}=\text{O}$ veya $\cdot\text{NO}$) (Fang ve diğerleri, 2020). 1987 yılında NO, endotel tarafından üretilen ve damar gevşemesine neden olan endotel kaynaklı rahatlatıcı bir faktör (EDRF) olarak tanımlandı (Ignarro, Buga, Wood, Byrns ve Chaudhuri, 1987; Palmer, Ferrige ve Moncada, 1987). NO, suda az çözünür ancak lipidlerde ve polar olmayan çözücülerde yüksek oranda çözünür (Fukuto, Cho ve Switzer, 2000). Bu nedenle NO, basit difüzyon ile plazma membranını serbestçe geçebilir (Toledo ve Augusto, 2012).

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) ile enzimatik olarak veya nitritin kimyasal indirgenmesi (NO_2) olarak üretilir (Fang ve diğerleri, 2020). Normal oksijen koşulları altında NO, NOS olarak bilinen enzim ailesi tarafından L-argininin, NO ve L-sitrüline dönüştürülmesiyle sentezlenir (Alimoradi, Khaled, Allan ve Gregory, 2019). Tepkime, elektron donörü olarak NADPH kullanır ve beş elektron tüketen bir tepkimede kofaktörler olarak hem, Flavin Adenin Dinükleotidi (FAD), Flavin Mononükleotidi (FMN) ve (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (BH_4) gerekir. Genel tepkime iki aşamalı bir süreçten oluşur. İlk aşamada NOS, L-arginini hidroksi-L-arginine hidroksile eder. İkinci aşamada NOS, hidroksi-L-arginini L-sitrüline ve NO'ya okside eder (Şekil 2.4) (Alderton, Cooper ve Knowles, 2001).



Şekil 2.4. L-argininden NO biyosentezi (Förstermann ve Sessa, 2012, s. 831)

Nitrit'in indirgenmesi, hem globinler (örneğin, hemoglobin ve miyogloblin) ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinin çeşitli bileşenleri gibi nitrit redüktazlar tarafından katalize edilen NO'yu da üretebilir (Shiva, 2013, s.40). NOS tarafından üretilen NO düşük O₂ ile sınırlandığında NO₂'nin NO'ya indirgenmesi hipoksizde hayati önem taşır.

2.3.2. Nitrik oksit sentaz (NOS)

NOS, vücutta NO üretimini katalize eden bir enzim ailesidir. Memelilerde, üç farklı gen tarafından kodlanan üç NOS izoformu tanımlanmıştır; nöronal NOS (nNOS; NOS1 tarafından kodlanmıştır), indüklenbilir NOS (iNOS; NOS2 tarafından kodlanmıştır) ve endotel NOS (eNOS; NOS3 tarafından kodlanmıştır) (Keshet ve Erez, 2018). nNOS ve eNOS izoformları, sırasıyla nöronlarda ve endotel hücrelerde sürekli olarak eksprese edildikleri ve kalmodulin (CaM) ve doku kalsiyumundaki artış tarafından aktive edildiklerinden yapısal NOS olarak da adlandırılır (Alderton ve diğerleri, 2001). Ancak sentez süresinin çok kısa olması, sentezlenen NO miktarının geçici ve çok düşük olmasına neden olmaktadır.

nNOS ve eNOS'un aksine iNOS'un ifadesi sağlıklı durumda mevcut değildir. Bunun yerine iNOS'un ifadesini, sitokinler, bakteriyel lipopolisakkarit gibi inflamatuvar uyarılara ifade edilir ve endotel, monositler, mast hücreleri, makrofajlar, hepatositler ve düz kas hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde, iNOS tarafından enfeksiyona yanıt olarak indüklenir (Aktan, 2004, s. 641). iNOS'un enzimatik aktivitesi kalsiyumdan bağımsızdır ve indüksiyon sonrası NO sentezi saatlerce hatta günlerce sürebilir ve büyük miktarda NO (>1µM) üretir (Korde, Sheetal, Sachin, Amol ve Vaishali, 2013).

iNOS tarafından üretilen yüksek miktarda NO, inflamasyonda önemlidir ve antimikrobiyal, antiviral, antiparaziter ve antitümör etkileri olduğu belirlenmiştir. NO'nun antimikrobiyal aktivitesine esas olarak hücrelerin ve mikropların üzerindeki toksisitesi aracılık eder (Lee, Kevin, Christine, ve Jonathan, 2017). Bununla birlikte birçok patolojik koşul altında iNOS tarafından üretilen büyük miktardaki NO, önemli reaktif nitrojen türlerinin (RNS) ana kaynağıdır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan sıçanlar Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Biriminden temin edilmiştir. Çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca verilen 2019/04-03 No'lu etik kurul kararı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler ve kitler

- Nitrik oksit kolorimetrik ölçüm kiti, Elabscience
- Tolüen, %97 saflıkta
- Resveratrol $\geq 98\%$ by HPLC
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4), Merck
- Sodyum Hidroksit (NaOH), Merck
- Etanol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)
- Polifeks % 0,9 izotonik sodyum klorür (NaCl) çözeltisi
- BCA Protein Assay Kit
- RIPA Lysis Buffer System
- NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 12-well, Invitrogen
- NuPage Sample Reducing Agent (10X), Invitrogen
- NuPage LDS sample buffer (4X), Invitrogen
- NuPage Antioxidant, Invitrogen
- MES SDS Running Buffer (20X), Invitrogen
- iBlot® Transfer Stack, nitrocellulose, Invitrogen
- Western Blotting 20X Görüntüleme solüsyonu (LumiGLO) Cell S. 7003
- BioUltraPure Tris Buffer, Bioshop
- Tween 20, Sigma Life Science
- Yağsız Süt Tozu, Bishop
- Anti-fare IgG HRP'ye bağlı antikor
- Anti-tavşan IgG antikor
- β -aktin (C4) fare monoklonal IgG1
- iNOS Antikoru, poliklonal antikor

- nNOS Antikoru, poliklonal antikor
- eNOS Antikoru, poliklonal antikor

3.1.2. Sarf malzemeler

- Nitril, pudrasız, laboratuvar eldiveni
- 2 ml hacimli santrifuj tüpleri, ISOLAB
- 1000 µl'lik pipet uçları, ISOLAB
- 200 µl'lik pipet uçları, ISOLAB
- 96 kuyulu mikropłaka, Elabscience
- 1 ml insülin enjektörü, 100 ml enjektörü
- Serolojik pipet (5ml, 10ml, 25ml)

3.1.3. Cihazlar

- Hassas terazi, Sartorius
- Homojenizatör, Schuett homgen^{plus} , yarı otomatik homojenizatör
- Santrifüj, HERMLE Z 326 K soğutmalı santrifüj
- Microfuger 16 sentrifüj, Beckman Coulter
- Vorteks, VELP Scientifica
- pH metre, Sartorius PP-15
- Derin dondurucu, Arçelik
- Mikropleyt okuyucu, BioTek ELx800
- 10-100 µl otomatik pipet, MİCROLİT
- 100-1000 µl otomatik pipet, ISOLAB
- Mini Gel Tank, İnvitrogen
- iBlot®, İnvitrogen
- Sterilizatör, NÜVE FN 500
- Thermo Block TDB 120, BIOSAN
- Fusion, Fx7

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney hayvanları

Çalışmada 250-350 gram ağırlığında Wistar Albino erkek sıçanlar (36 adet) kullanıldı. Hayvanlar kontrol ve deney olmak üzere iki gruba ayrıldı, su ve yeme ulaşımın serbest olduğu ortamda (*Ad libitum*), 22-24°C koşullarında tutuldu. Kontrol grubundaki sıçanlar iki gruba ayrıldı. Birinci kontrol grubuna (n=6) serum fizyolojik intraperitoneal (i.p) yolla altı gün boyunca verilirken ikinci kontrol grubuna (n=6) %10 etanol aynı yöntemle verildi. Deney gruplarındaki sıçanlara ise, tolüen ve resveratrol uygulaması verildi yine intraperitoneal olarak uygulandı.

3.2.2. Tolüen maruziyetinin gerçekleştirilmesi ve resveratrol uygulaması

Tolüenin LD50 dozu 1,64 g/kg'dır (Ikeda ve Ohtsuji, 1971). Birinci deney grubundaki sıçanlara, altı gün boyunca 900mg/kg dozunda tolüen verildi. İkinci deney grubuna (n=6) aynı dozda tolüen ile birlikte 5mg/kg resveratrol verilirken, üçüncü deney grubuna (n=6) 10mg/kg, dördüncü deney grubuna (n=6) 20mg/kg resveratrol i.p yolla uygulandı (resveratrol %10 etanol içerisinde hazırlandı). Enjeksiyon yapıldıktan sonra hayvanlara su ve yem serbest olarak verildi. Altı günün sonunda sıçanlar servikal dislokasyon yoluyla öldürüldü. Sıçanlardan karaciğer ve kan dokusu süratle alındı.

3.2.3. Doku ve kan örneklerinin toplanması

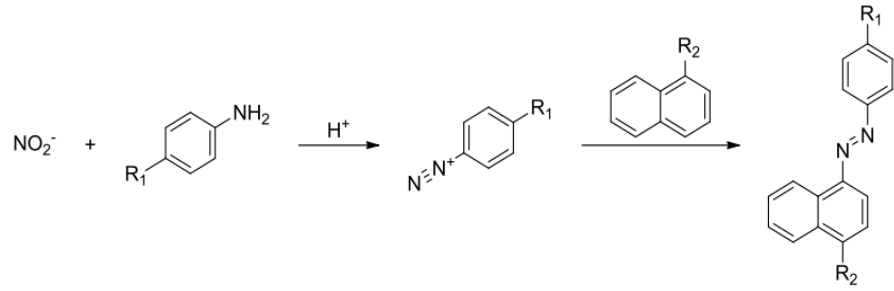
Kan örnekleri ependorf tüpler içinde toplanarak, 15 dakika içinde oda sıcaklığında bekletildi. Bu örnekleri, serum elde etmek için 1000g'de 4°C'de, 15 dakika santrifüjlendi. Elde edilen serumlar yeni ependorflara aktarıldı ve analizleri gerçekleşinceye kadar -80°C'de saklandı. Elde edilen karaciğer dokuları pH=7,4 soğuk fosfat tamponu çözeltisi ile yıkanarak üzerindeki kan temizlendi ve doku kaplar içinde toplandı. Karaciğer dokuları ölçümler için kullanılan kitlerin talimatlarına göre homojenize ve santrifüj edilerek örnekler analize hazır hale getirildi (Elabscience, 2018).

3.2.4. Nitrik oksit (NO) seviyelerinin ölçümü

NO seviyelerinin ölçmek için ELABSCIENCE markasından alınan NO ölçüm kiti, kolorimetrik yöntem ile gerçekleştirildi.

Deney Prensipleri:

NO₂⁻, -in vivo ortamda veya sulu çözelti içinde kolayca Nitrit'e (NO₂⁻) oksitlenir. Nitrit daha sonra kırmızımsı azo bileşiği oluşturmak için kromojenik ajanla tepkimeye girer (Şekil 3.1). Azo bileşiğinin derişimi ile NO derişimi arasında doğrusal bir ilişki vardır. NO derişimi, 550 nm'de OD değeri ölçülerek dolaylı olarak hesaplandı. Analiz için uygun hale getirilen kan serumu ve karaciğer süpernatanı NO seviyeleri bu prensibe göre tayin edildi.



Şekil 3.1. Nitrit ve kromojenik ajanla tepkimesi (<https://www.elabscience.com/p-nitric-oxide-nocolorimetricassaykit-40590.html>, 2020)

Kit Bileşenleri

- Reagent 1: Sülfat Çözeltisi (Sıvı)
- Reagent 2: Alkali Reagent (Sıvı)
- Reagent 3: Kromojenik Ajan A (Sıvı)
- Reagent 4: Kromojenik B (Toz)
- Reagent 5: Asit Çözeltisi (Sıvı)
- Reagent 6: 2 mmol/L Sodyum Nitrit Standart (Sıvı)

Reagent 4'ün çalışma çözeltisinin hazırlanması: kromojenik ajan B'yi 3,8 mL distile su ile tamamen çözünüp 4°C'de saklandı.

Kromojenik reagent hazırlanması: reagent 3, reagent 4 çalışma çözeltisi ve reagent 5, 3:3:2 oranında karıştırılıp 4°C'de saklandı.

Sodyum nitrit standartlarının hazırlanması:

Standart grafiği oluşturmak için ilk önce 2 mmol/L sodyum nitrit standart çözeltisini 1000, 600, 300, 200, 150, 100, 40, 20, 10, 0 µmol/L farklı derişimlerde distile su ile

seyreltildi. Sodyum Nitrit standartları 0-1000 $\mu\text{mol/L}$ aktivite arasında hazırlandı ve Çizelge 3.1’de gösterilen işlemler uygulanarak deney gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. Sodyum nitrit standartlarının hazırlanması

Sodyum nitrit derişimi	Standart tüp
1000 $\mu\text{mol/L}$	300 μL
600 $\mu\text{mol/L}$	300 μL
300 $\mu\text{mol/L}$	300 μL
200 $\mu\text{mol/L}$	300 μL
150 $\mu\text{mol/L}$	300 μL
100 $\mu\text{mol/L}$	300 μL
40 $\mu\text{mol/L}$	300 μL
0 $\mu\text{mol/L}$	300 μL
Reagent 1	200 μL
Reagent 2	100 μL
Tamamen karıştırılıp 15 dakika’ da oda sıcaklığında bekletildi	
3100g'de 10 dakika santrifüjlendi	
Aşağıdaki prosedür için 160 μL süpernatant alındı	

Örneklerin hazırlanması:

Yaş ağırlıklar hassas terazide tartıldıktan sonra karaciğer dokuları, soğuk tampon çözelti (0,01M Potasyum Fosfat Tamponu pH=7,4) içerisinde PBS hacmi (mL): doku ağırlığı (g), 9:1 oranında, Schuett homgen^{plus} yarı otomatik olan homojenizatörü kullanarak 3000 devir’de 15 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri buzlar içerisinde yapıldı. Elde edilen doku homojenatı 3100g’de 10dk boyunca 4°C’de santrifüjlenip süpernatant toplandı. Toplanan süpernatant NO seviyelerinin ölçümüne kadar -80°C’de saklandı. Serumun NO seviyeleri doğrudan tespit edildi. Deney daha sonra aşağıdaki prosedürü takiben gerçekleştirildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Sodyum Nitrit standartlarının hazırlanması

Örnek tüp	Karaciğer dokusu	Serum
	200 μL	250 μL
Reagent 1	200 μL	
Reagent 2	100 μL	
Tamamen karıştırılıp 15 dakika’ da oda sıcaklığında bekletildi		
3100g'de 10 dakika santrifüjlendi		
Aşağıdaki prosedür için 160 μL süpernatant alındı		

Tepkime:

Tüm standart ve örnekleri, aşağıdaki Çizelge 3.3'teki tepkimeye göre kuyucuklara iki tekrar olacak şekilde eklenmiştir:

Çizelge 3.3. Kromogenik reagent ile tepkimesi

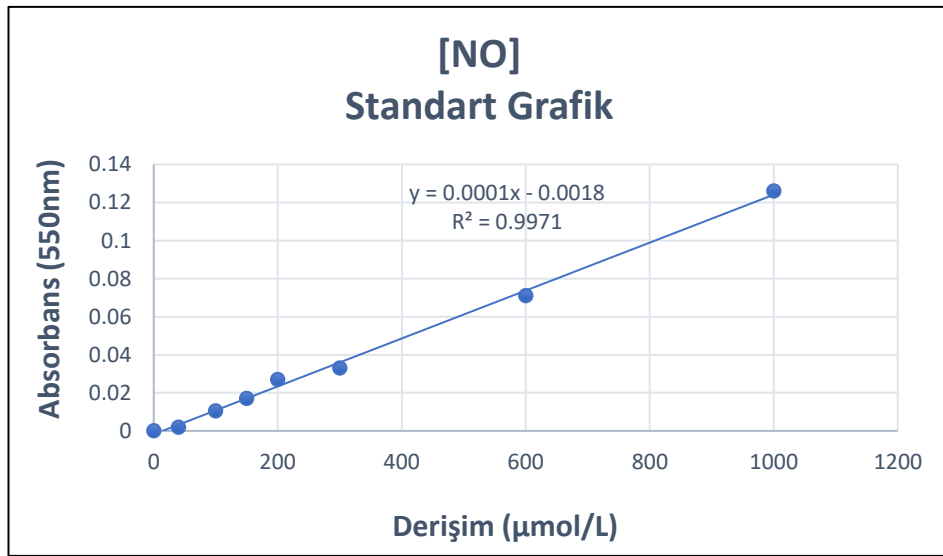
	Standart tüp	Örnek tüp
Supernatant	160µL	160µL
Kromogenik reagent	80µL	80µL
2 dakika'da iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi		
550nm dalga boyunda mikropleyt okuyucu ile absorbanslar okundu		

Sonuçların hesaplanması:

Tüm standart ve örneklerin absorbans ortalamaları hesaplandı. Kör ortalama absorbans değerini tüm standart ve örneklerin absorbanslarından çıkarıldı. X ekseninde standart derişimi ve y ekseninde absorbans değerleri ile standart grafiği oluşturdu ($y = ax + b$). Her örneğin NO derişimi aşağıdaki standart grafiği göre belirlendi (Şekil 3.2).

$$y = 0.0001x - 0.0018$$

- y: 550 nm'de standardın mutlak absorbans değeri
- x: standart derişimi
- a: standart grafiğinin eğimi
- b: akseni kesim noktası (intercept)



Şekil 3.2. NO standart grafiği

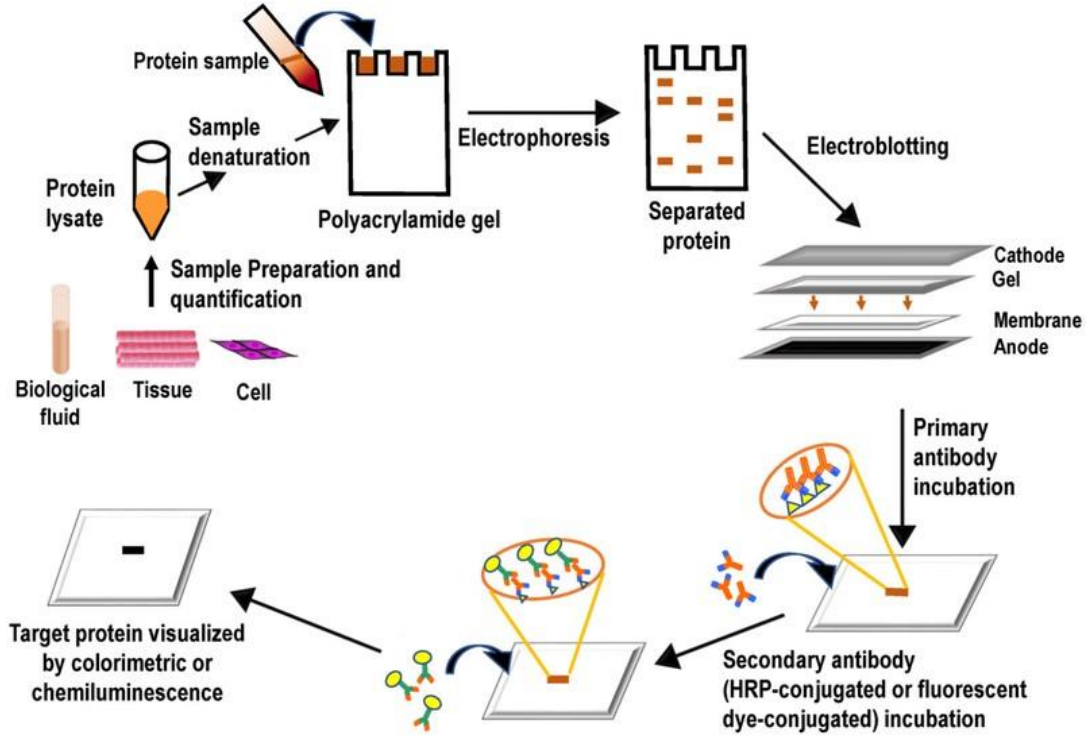
3.2.5. NOS aktivitesinin belirlenmesi

Karaciğer dokusunda NOS aktivitesini belirlemek için western blot analizi kullanıldı.

Western blot analizi

Western blot, bir protein karışımında hedeflenen proteini tespit etmek için kullanılan bir tekniktir, sırası ile (Murphy ve Lamb 2015; Bass, Wilkinson ve Rankin, 2017):

- a. Örnek hazırlama: protein ekstraksiyonu ve hücre veya doku lizatlarından protein derişimi ölçülmesi;
- b. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) üzerinde proteinin boyutuna göre ayrılması;
- c. Jelden ayrılmış proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması;
- d. Membran üzerinde spesifik olmayan proteinlerin bloke edilmesi;
- e. Spesifik primer antikolarla hedef proteinlerin proklanması;
- f. Etiketli kemilüminesan veya floresan molekülü ile konjuge sekonder antikor ile inkübasyon;
- g. Antijen/antikor bağlanmasını yansıtan sinyallerin tespiti (kemilüminesan sinyalin Optimal tespiti)
- h. İlgilenilen protein bantlarının densimetri analizi (Şekil 3.3) aşamaları uygulanır.



Şekil 3.3. Western blot aşamalarının şematik gösterimi (Mishra, Tiwari ve Gomes, 2017)

Örnek hazırlama ve protein ölçümü

300mg karaciğer dokusu, 3ml soğuk lizis tamponu (RIPA Lysis Buffer) içerisinde, buz üzerinde Schuett homgenplus yarı otomatik homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Doku homojenatı buz üzerinde 30 dakika inkübe edildikten sonra 10.000g'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, taze bir eppendorf tüpünde toplandı ve protein derişimi için analiz edildi. Her lizat içindeki protein derişimleri, BCA protein tahlil kiti kullanılarak ölçüldü.

SDS-PAGE ile protein ayrımı

Her lizat 4X sample buffer (NuPage LDS sample buffer) ve 10X reducing agent (NuPage reducing agent) ile karıştırarak elektroforez için eşit miktarda protein 25µg (BCA yöntemiyle belirlenen) hazırlandı. Karışım daha sonra örnekleri denatüre etmek için 95°C'de 7 dakika ısıtıldı. Örnekler daha sonra marker (ladder) ile birlikte SDS-PAGE jelinin (Nupage™ Novex™ %4-12 bis-Tris Protein jelleri) ayrı kuyularına belirlenen

miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi yapıldıktan sonra, jel oda sıcaklığında 1 saat boyunca 170V'de çalıştırıldı. Proteinler moleküler boyutlarına göre ayrıldı, daha küçük proteinleri jelden daha hızlı geç ederler. Elektroforezdeki kullanılan çalışma tamponu (*running buffer*) aşağıdaki gibi hazırlandı:

Running buffer hazırlama:

50ml running bufer (MES SDS running buffer 20X) ve 500µl antioksidan (NuPage antioksidan) 1000ml soğuk saf suda çözüldü.

Nitroselüloz membrana protein transferi

Proteinin jel elektroforezi ile ayrılmasından sonra, protein 7 dakika boyunca bir nitroselüloz membranına (iBlot® Transfer Stack, nitroselüloz) aktarıldı.

İmmünoteksiyon

Transfer edildikten sonra, nitroselüloz membranı 3 defa beşer dakika TBS-T (Tris-buffered saline Tween20) ile yıkandı.

TBS-T yıkama tamponu hazırlama (10x ila 1x):

24,23g Tris baz, 80,6g NaCl distile suda çözülerek (pH=7,6) 10ml Tween20 ilave edildi ve distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Membran daha sonra spesifik olmayan bağlanma bölgesini bloke etmek için oda sıcaklığında 1 saat boyunca TBST içerisinde %5'lik süt çözeltisi içerisinde bloke edildi. Süre sonunda membran 3 defa beşer dakika TBST ile yıkandı ve gece boyunca 4°C'de primer antikorla inkübe edildi.

Primer antikorlarla inkübasyondan sonra, membran 3 kez beşer dakika TBST ile tekrar yıkandı ve karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat boyunca sekonder antikorla inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, membran 3 defa beşer dakika TBST ile son kez tekrar yıkandı. Primer ve sekonder antikorlar %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı (Çizelge 3.4). Proteini tespit etmek için membran önce 20X LumiGLO reagent içerisinde (250µl reagent A, 250µl reagent B ve 4,5ml distile su) hafif çalkalanarak oda sıcaklığında karanlık bir odada 1 dakika inkübe edildi ve Füzyon FX-7 cihazı kullanılarak görüntüledi.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Primer antikor	Seyreltme	Türleri	Sekonder antikor
β -aktin (kontrol)	1:2000	Tavşan	Anti-rabbit IgG
iNOS	1:1000	Fare	Anti-mouse IgG
eNOS	1:1000	Tavşan	Anti-rabbit IgG
nNOS	1:500	Tavşan	Anti-rabbit IgG

3.2.6. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism 9.3.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ardından post-hoc Tukey testi kullanılarak belirlendi. Sonuç ortalama değer ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Farklar, $p < 0,05$ ve $p < 0,001$ ile istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. NO Bulguları

Karaciğer dokusunda ve serumda NO seviyeleri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Karaciğer NO seviyeleri incelendiğinde, tolüenle muamele edilen deney gruplarının serum fizyolojik ve etanol kontrol grupları karşılaştırıldığında yaklaşık %32 oranında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$).

Bununla birlikte, tolüen ile birlikte resveratrolün 5mg/kg, 10mg/kg ve 20mg/kg'lık farklı dozlarda uygulanmasından sonra, sadece tolüenle muamele edilen gruba kıyasla karaciğerdeki NO seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p<0,001$). Resveratrolün 5mg/kg ve 10mg/kg dozlarında %83'lük bir azalma bulunurken resveratrolün 20mg/kg ise %68 düzeyinde bir azalma gözlemlendi. Kontrol gruplarla karşılaştırıldığında, resveratrolün 5mg/kg ve 10mg/kg dozlarında karaciğerdeki NO seviyesi %75'lik bir azalma bulunurken resveratrolün 20mg/kg ise %53'lük istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p<0,05$).

Serum örneklerinde NO seviyesi incelendiğinde, tolüen uygulanan gruba serum fizyolojik kontrol grubuna göre %52'lik bir artış gösterirken etanol kontrol grubuna göre ise %45 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,05$). Buna karşılık, 5mg/kg ve 10mg/kg dozlarında resveratrol uygulaması, serumdaki NO düzeyini tolüen grubuna göre yaklaşık %73 oranında azalttığı gözlemlendi ($p<0,001$).

Bununla birlikte, 20mg/kg resveratrol uygulamasında, tolüen uygulanan gruba göre bir azalma göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0,05$) (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). Kontrol gruplarla karşılaştırıldığında, farklı resveratrol dozları uygulanan sıçanlarda serumdaki NO seviyesi istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0,05$).

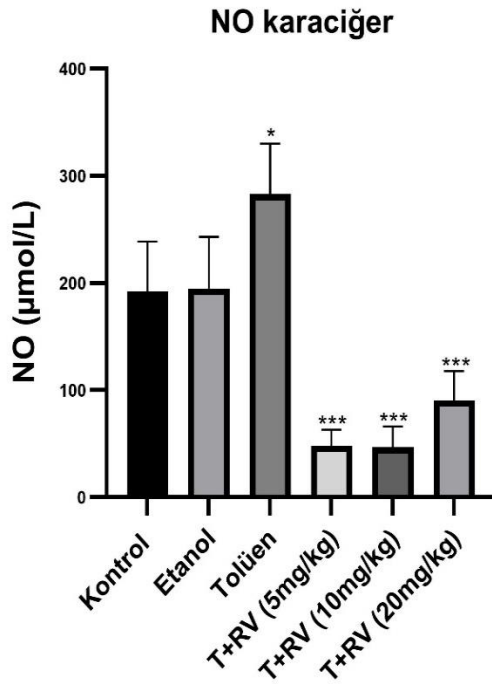
Çizelge 4.1. Karaciğer ve serum NO seviyeleri (ortalama ± standart sapma)

Gruplar	NO (µmol/L)	
	Karaciğer	Serum
Kontrol serum fizyolojik	192,17 ± 46,52	484,67 ± 166,45
Kontrol etanol	194,67 ± 48,56	558 ± 135
Tolüen	283 ± 47,338*	1013 ± 268,51*
Tolüen+Resveratrol (5 mg/kg)	48 ± 21,21***	280,5 ± 59,09***
Tolüen+Resveratrol (10 mg/kg)	46,75 ± 19,31***	268 ± 120***
Tolüen+Resveratrol (20 mg/kg)	90,5 ± 27,23***	623 ± 20

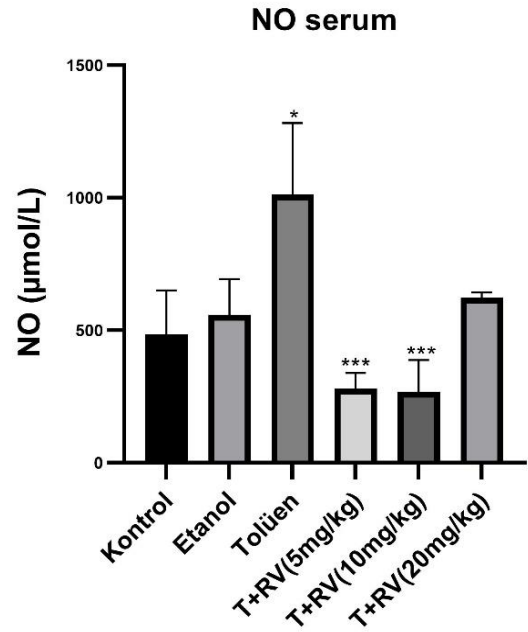
Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilir

*p<0,05 tolüen uygulanan gruplar kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır.***p<0,001 resveratrol gruplar tolüen gruplarına göre önemli ölçüde anlamlıdır.

A



B



Şekil 4.1. Karaciğer (A) ve Serum (B) NO seviyesi

*p<0,05 tolüen uygulanan gruplar kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır. ***p<0,001 resveratrol gruplar tolüen gruplarına göre önemli ölçüde anlamlıdır.

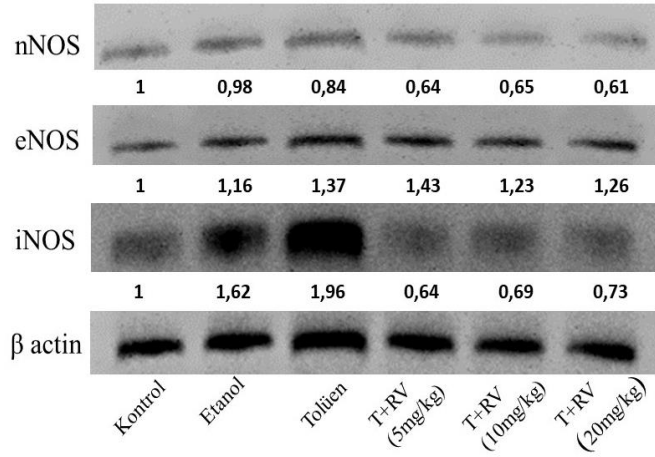
4.2. NOS Aktivitesi Bulgular

Tolüen ve resveratrolün iNOS, eNOS ve nNOS aktivitelerinin western blot analiz sonuçları Şekil 4.2’de gösterilirken, kontrol grupları, tolüen ve tolüen ile birlikte resveratrol uygulaması sonucu elde edilen histogramlar Şekil 4.3’de gösterilmiştir.

Tolüenin etkisiyle NOS aktivitelerinden en yüksek olanı iNOS 1,96 olurken eNOS 1,37 ve nNOS 0,84 β -aktin bantlarına karşılık gelen yoğunlukları olarak hesaplanmıştır. iNOS serum fizyolojik kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2 kat artış gösterirken etanol grubu ile ise hemen hemen aynı değerlerde kalmıştır. Resveratrol uygulamasından sonra iNOS aktivitesinden belirgin azalmalar görülmüştür. Bu azalmalar 5mg/kg resveratrol uygulamasında %67,35 olurken 10mg/kg resveratrol uygulamasında %64,79 ve 20mg/kg resveratrol uygulamasında %62,75 olmuştur.

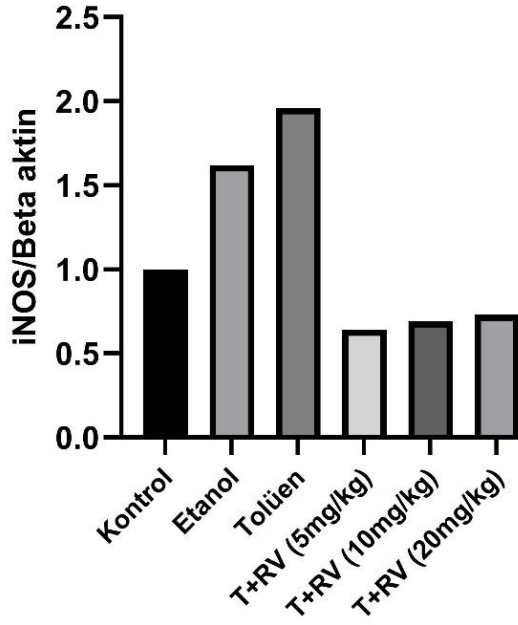
Tolüenin etkisiyle eNOS aktivitesinde serum fizyolojik ve etanol kontrol gruplarına göre az da olsa bir artış görülmektedir. Bu artış etanol gruba ile karşılaştırıldığında %15,33 kadar olmuştur. Resveratrol uygulamasından sonra her üç dozda da eNOS aktiviteleri, tolüen uygulamasındaki eNOS aktivite değerleri ile hemen hemen aynı değerlerde hesaplanmıştır. Tolüen ile birlikte resveratrol uygulamasının her üç dozu, etanol grubu ile karşılaştırıldığında eNOS aktivitesinin arttığı dikkat çekmektedir. Bu artış 5mg/kg resveratrol uygulamasında %18,88 olurken 10mg/kg resveratrol uygulamasında %5,69 ve 20mg/kg resveratrol uygulamasında %7,94 olmuştur.

Tolüen etkisiyle nNOS aktivitesinde etanol kontrole göre her hangi bir değişiklik görülmemiştir. Ancak tolüen ile birlikte resveratrol uygulamasında her üç dozda da nNOS aktivitesinde bir azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.3 C). Bu azalma ortalama olarak %24,21 olarak hesaplanmıştır.

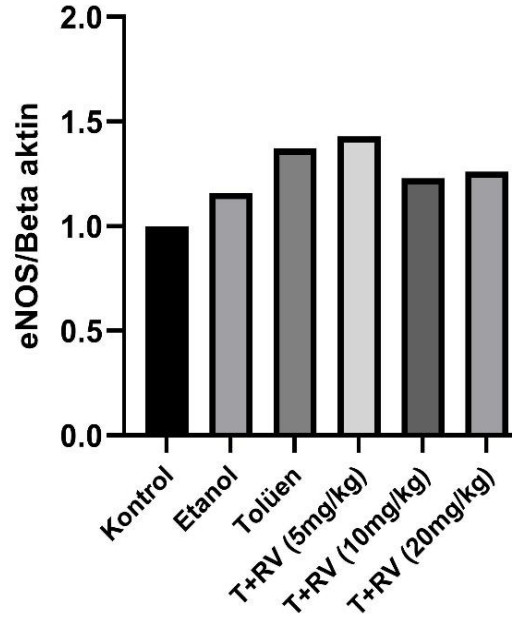


Şekil 4.2. Tolüen ve resveratrolün iNOS, eNOS ve nNOS aktiviteleeri üzerine etkisi. Western blot, karaciğer dokusundan eşit miktarda protein (25 μ g) kullanılarak yapıldı.

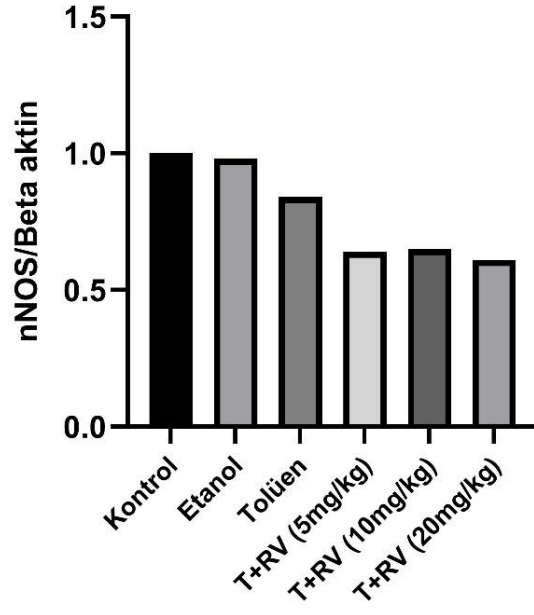
A



B



C



Şekil 4.3. iNOS (A), eNOS (B) ve nNOS (C) protein aktiviteleri. Sonuçları β -aktin bantlarına karşılık gelen yoğunlukları göre ifade edildi. T + RV: Tolüen + Resveratrol

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamız, intraperitoneal tolüen enjeksiyonunun karaciğer ve serumda NO düzeylerinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Tolüenin etkisiyle, karaciğer ve serumda NO seviyelerinin artmış olması, iNOS aktivitelerinin artmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. Western blot analizlerinde NOS/Beta-aktin bantlarının tolüen uygulamasından sonra yüksek olması bu görüşümüzü desteklemektedir (Şekil 4.3 A).

Huffman ve diğerleri (1997) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, tolüen diizosiyanat (TDI) inhalasyon maruziyetinin, esas olarak bronkoalveolar lavaj hücrelerinde iNOS izoformunun akciğerden yukarı regülasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan NO üretiminin artmasına neden olduğunu bildirilmiştir. Elde ettikleri sonuçlar ile alveolar makrofajlar tarafından üretilen NO'nun, TDI maruziyetinden sonra bu hücreler tarafından üretilen serbest radikal havuzuna katkıda bulunduğunu ileri sürülmüşlerdir.

Tolüenin etkisi ile artan NO seviyelerinin bir başka nedeni de tolüen etkisi ile meydana gelen serbest radikallerin, NO oluşumunu arttırmış olması olabilir. Mattia, Ali ve Bondi (1993) yaptıkları çalışmalarda çeşitli tolüen dozlarına (0,5; 1 ve 1,5 g/kg *i.p*) in vivo maruz kalmanın, karaciğer ve kan dokularında ROS oluşumunun artmasıyla sonuçlandığını gösterilmişlerdir. Başka bir çalışma da, TDI maruz kalmanın ROS ve RNS oluşumuna yol açan oksidatif stresi indüklediğini, doğrudan doku hasarına ve çeşitli antioksidan sistemlerde değişikliklere neden olduğunu bildirilmiştir (Choi ve diğerleri, 2018).

Tolüen etkisi ile NO seviyelerinde görülen artış karaciğerin hasar görmesinden de kaynaklanabilir. Aynı yaptıkları çalışmada Huffman ve diğerleri (1997), TDI'ya maruz kalmanın akciğerlerde enflamatuar bir tepkiye, solunum yollarında aktive lenfosit sayısının artmasına, interferon-gama salınımına ve alveolar makrofajlardan yüksek NO üretimine neden olduğunu gösterilmiştir. Karaciğer hasarı, tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve interlökin (IL)-1 β gibi proinflamatuar sitokinler, Kupffer hücrelerini ve hepatositleri uyarak iNOS ekspresyonun indüklendiği ve NO üretiminin yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Miki ve diğerleri, 2016).

Tolüen ile birlikte resveratrolün farklı dozlarının uygulanması NO seviyelerinde anlamlı azalmalara sebep olmuştur. Bu durum da resveratrolün NO sentezini azaltması ile mümkündür. Resveratrol, iNOS ekspresyonunu azaltarak veya inhibe ederek NO sentezini azaltması mümkün olabilir. Yapılan kaynak çalışmalarında birkaç hücre içi sinyal yolunun, nükleer faktör kappa B (NF- κ B), protein kinaz B/Akt ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) dahil olmak üzere hepatosit iNOS ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Zhang, Perpetua, Fulmer ve Harbrecht, 2004; Hong, Zhang ve Harbrecht, 2010). Resveratrol, NF- κ B transkripsiyonunun bir inhibitörü olarak bilinir (Manna, Mukhopadhyay ve Aggarwal, 2000). Yapılan bir çalışmada, resveratrolün NF- κ B bağlanma aktivitesini bloke ederek iNOS ekspresyonunu inhibe ettiğini bildirilmiştir (Tsai, Lin-Shiau ve Lin, 1999). Diğer bir çalışma da, resveratrolün, JNK sinyal yolunu yukarı regüle ederek hepatositlerde sitokin kaynaklı iNOS ekspresyonunu ve aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Kimbrough, Lakshmanan, Matheson ve Woeste, 2015).

Tolüen etkisiyle artış gösteren NO, süperoksit radikal ile tepkimeye girerek güçlü ve yarılanma ömrü uzun olan peroksinitrit (ONOO⁻) meydana getirebilir. Peroksinitrit, DNA, lipidler ve proteinler dahil olmak üzere çeşitli hücrel moleküllere zarar verebilir ve ayrıca birçok hedef proteinin yapısını ve işlevini etkileyerek protein nitrasyonunu teşvik edebilir (Kurutas, 2016). Resveratrol da açığa çıkan bu peroksinitritleri azaltacak yönde etki göstermiş olabilir. Polifenolik bir bileşik olarak resveratrolün güçlü bir antioksidan ve serbest radikal temizleyici olduğu bilinmektedir (McGill, Du, Weemhoff ve Jaeschke, 2015). Resveratrol, süperoksit (O₂⁻), hidroksil radikalleri (\bullet OH), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve peroksinitrit (ONOO⁻) gibi çeşitli oksidanları doğrudan temizleyebildiği gösterilmiştir (Xia, Daiber, Förstermann ve Li, 2017, s.1635).

Çalışmamızda, tolüen ile birlikte resveratrol uygulamasının NOS aktivitelerini azalttığı görülmektedir (Şekil 4.3 A B C) özellikle iNOS aktivitesinde görülen belirgin düşüşün diğer iki NOS'ten (eNOS ve nNOS) farklı özellikler sahip olması olabilir. iNOS transkripsiyonel olarak düzenlenir ve aktivasyonu için hücre içi kalsiyum ihtiyaç duymaz. Hücrede TNF- α , interferon, interlökin-1, endotoksin, hipoksi, okside LDL ve lipopolisakkaridler gibi farklı enflamatuar ajanların etkisiyle ekspresyonu uyarılır.

Resveratrolün en önemli özelliklerinden birisi de anti-inflamatuar etkili olmasıdır. Resveratrolün anti-enflamatuar yanıtı, pro-enflamatuar sitokinleri aşağı regüle ederek gerçekleştirilmektedir. Resveratrol pro-enflamatuar eikosanoitlerin sentezinin baskılanmasına yol açan pro-enflamatuar enzim siklooksijenaz-1'in (COX-1) inhibisyonunu neden olduğu Das ve Das (2007) tarafından gösterilmiştir. Ayrıca anti-inflamatuar etkilere deasetilasyon yoluyla, ana enflamatuar transkripsiyon faktörü NF- κ B'yi baskılayan SIRT1 aracılık edebileceği ileri sürülmüştür (Yeung ve diğerleri, 2004).

Resveratrolün iNOS aktivitelerinde gösterdiği azalmanın nedenlerinden birisi de çeşitli serbest radikalleri ortadan kaldırılması olabilir. Molekül yapısındaki hidroksil (OH) grupları bu tepkimelerde önemli olmaktadır (Şekil 2.3). Resveratrol NADPH oksidan aracılı ile ROS üretimini inhibe ettiği oksidazın ekspresyonunu ve aktivitesini aşağı doğru düzenlenmektedir. Ek olarak resveratrol çeşitli antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırarak ROS'un detoksifikasyonunu hızlandırdığı ileri görülmektedir (Xia, Daiber, Förstermann ve Li 2017).

Resveratrol uygulamasının eNOS aktivitelerine çok az olsa etkili olduğu söylenmektedir (Şekil 4.3 B). Tolüen ile birlikte resveratrol uygulamasının her üç dozu da özellikle 5mg/kg dozunda eNOS aktivitesinin arttığı dikkat çekmektedir. eNOS özellikle düz kasların gevşemesini regüle etmektedir.

eNOS aktivitesinin artmasının nedenlerinden biri resveratrolün eNOS aktivitesini yukarı regüle ederek olabilir. Wallerath ve diğerleri (2002), trans-resveratrolün, vasküler endotel hücrelerinden akut NO salınımını uyardığını ve 24 ila 72 saatlik inkübasyondan sonra eNOS gen ekspresyonunun yukarı regülasyonunu indüklediğini bildirilmiştir. Wallerath ve diğerleri (2003, 2005) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışma da, kültürlenmiş insan endotel hücrelerinin resveratrol ile tedavisinin, eNOS'un mRNA ve protein ekspresyonunu arttırdığını gösterilmiştir. Resveratrolün, hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel mekanizmaları gösteren eNOS promotörünün aktivitesini ve eNOS mRNA stabilitesini arttırıldığı ileri sürülmüşlerdir.

Resveratrol NOS üzerindeki etkisini metabolitleri aracılığı ile de gösterebilir. Bazı resveratrol metabolitleri, ana molekül kadar güçlü olmasa da biyolojik olarak aktiftir (Miksits ve diğeri, 2009; Lu ve diğeri, 2013). Resveratrol ve metabolitlerinin dokularda birikerek etkilerini gösterebildikleri Bresciani ve diğeri (2014) ayrıca Cai ve diğeri (2015) tarafından ileri sürülmüştür.

Bu çalışma ile, tolüene maruz kalmanın karaciğer dokusunda ve serumda NO düzeylerini arttırdığı sonucuna varmıştır. Tolüen ile birlikte resveratrol uygulaması ile de NO düzeylerinin azalması resveratrolün koruyucu olarak görev aldığı görüşümüzü desteklemektedir. Resveratrolün, sıçanlarda tolüene maruz kaldıktan sonra karaciğerde NOS enzimlerinin ekspresyonlarını düzenlemedeki etki mekanizmasını tanımlamak için daha detaylı araştırmalara gerek olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2017). Toxicological profile for Toluene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75(6), 639–653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593–615.
- Alimoradi, H., Khaled G., Allan B. G. ve Gregory I. G. (2019). “Controlled Delivery of Nitric Oxide for Cancer Therapy.” *Pharmaceutical Nanotechnology* 7 (4): 279–303. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190429111306>.
- Angerer, J., Schildbach, M. ve Kramer, A. (1998). S-p-toluylmercapturic acid in the urine of workers exposed to toluene: A new biomarker for toluene exposure. *Arch Toxicol* 72 (2): 119-123
- Anonim. (1990). Some organic solvents, resin monomers, and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 79–123 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 47)
- Anonim. (2005). Toxicological review of Toluene. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). September 2005. U.S. Environmental Protection Agency Washington D.C.
- Anonim. (2020, 17 Aralık). Toluene. Erişim adresi: https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=en&p_card_id=0078&p_ve rsion=2
- Anonim. (2020, 02 Şubat). Nitric Oxide (NO) Colorimetric Assay Kit. <https://www.elabscience.com/p-nitric-oxide-nocolorimetricassaykit-40590.html>
- Anonim. (2022, 08 Ocak). Toluene. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Toluene>
- Balster, R.L., Cruz, S.L., Howard, M.O., Dell, C.A., Cottler, L.B. (2009). Classification of abused inhalants. *Addiction* 104: 878–882.
- Bass, J.J., Wilkinson, D.J., Rankin, D. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*, 27(1), 4–25.
- Becker L., Bellow S., Carré V., Latouche, G., Poutraud, A., Merdinoglu, D., Brown, S.C., Cerovic, Z. G., Chaimbault, P. (2017). Correlative analysis of fluorescent

phytoalexins by mass spectrometry imaging and fluorescence microscopy in grapevine leaves, *Analytical Chemistry*, vol. 89, no. 13, pp. 7099–7106

- Benignus, V.A, Boyes, W.K., Kenyon, E.M., Bushnell, P.J. (2007). Quantitative comparisons of the acute neurotoxicity of toluene in rats and humans. *Toxicol Sci*; 100(1):146–55. doi: 10.1093/toxsci/kfm203.
- Braunscheidel, K. M., Gass, J. T., Mulholland, P. J., Floresco, S. B. ve Woodward, J. J. (2017). Persistent cognitive and morphological alterations induced by repeated exposure of adolescent rats to the abused inhalant toluene. *Neurobiol. Learn. Mem.* 144, 136–146. doi: 10.1016/j.nlm.2017.07.007
- Bresciani, L., Calani, L., Bocchi, L., Delucchi, F., Savi, M., Ray, S. (2014). Bioaccumulation of resveratrol metabolites in myocardial tissue is dose-time dependent and related to cardiac hemodynamics in diabetic rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 24: 408–415.
- Cai, H., Scott, E., Kholghi, A., Andreadi, C., Rufini, A., Karmokar, A. (2015). Cancer chemoprevention: evidence of a nonlinear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. *Sci Transl Med* 7: 298ra117.
- Chimento, A., De Amicis, F., Sirianni, R., Sinicropi, M. S., Puoci, F., Casaburi, I., ... Pezzi, V. (2019). Progress to improve oral bioavailability and beneficial effects of resveratrol. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061381>
- Chitarrini, G., Zulini, L., Masuero, D. ve Vrhovsek, U. (2017). Lipid, phenol and carotenoid changes in “Bianca” grapevine leaves after mechanical wounding: a case study, *Protoplasma*, vol. 254, no. 6, pp. 2095–2106
- Choi, G. S., Trinh, H. K. T., Yang, E. M., Ye, Y. M., Shin, Y. S., Kim, S. H. ve Park, H. S. (2018). Role of clusterin/progranulin in toluene diisocyanate-induced occupational asthma. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(5). <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0085-2>
- Cosnier, F., Brochard, C., Burgart, M. ve Cossec, B. (2012). Mercapturic acids derived from toluene in rat urine samples: Identification and measurement by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(6–7), 1907–1917. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6262-6>
- Cruz, S.L., Rivera-Garcia, M.T., Woodward, J.J. (2014). Review of toluene action: clinical evidence, animal studies and molecular targets. *J Drug Alcohol Res* 3:1–8. <https://doi.org/10.4303/jdar/235840>
- Das, S. ve Das, D. K. (2007). Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 6(3), 168–173. <https://doi.org/10.2174/187152807781696464>

- Davis, J.W., Madsen, S. (1996). Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. *Chemosphere*, 33:107–130.
- Deleu, D., Hanssens, Y. (2000). Cerebellar dysfunction in chronic toluene abuse: beneficial response to amantadine hydrochloride. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38, 37–41.
- Dutkiewicz, T. ve Tyras, H. (1968). Skin absorption of toluene, styrene and xylene by man. *Br J Ind Med* 25:243.
- Espinoza, J.L., Kurokawa, Y., Takami, A. (2018). Rationale for assessing the therapeutic potential of resveratrol in hematological malignancies. *Blood Rev.* 2018
- Estevan, C., Ferri, F., Sogorb, M.A., Vilanova, E. (2012). Characterization and evolution of exposure to volatile organic compounds in the spanish shoemaking industry over a 5-year period. *J Occup Environ Hyg* 9:653–62.
- Evans, A.D., Raistrick, D. (1987). Phenomenology of intoxication with toluene-based adhesives and butane gas. *Br. J. Psychiatry* 150:769-773.
- Fang, W., Jiang, J., Su, L., Shu, T., Liu, H. ve Lai, S. (2020). Free Radical Biology and Medicine The role of NO in COVID-19 and potential therapeutic strategies. *Free Radical Biology and Medicine* 163 (2021) 153–162
- Förstermann, U. ve Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Fukuto, J.M., Cho, J.Y., Switzer, C.H. (2000). Chapter 2 - The chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides. In: Ignarro LJ, ed. Nitric Oxide. San Diego: Academic Press; 2000:23-40.
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K.M., Gomez-Cabrera, M.C., Vina, J., Borras, C. (2015). Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxid Med Cell Longev* 837042. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>
- Gotohda, T., Nishimura, A. ve Morita, K. (2009). Immunohistochemical studies on early stage of hepatic damage induced by subacute inhalation of toluene vapor in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 29(6), 505–509. <https://doi.org/10.1002/jat.1435>
- Gupta, S.C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J.H., Aggarwal, B.B. (2011). Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215, 150–160.
- Hasan, M. M. ve Bae, H. (2017). An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: Perspectives for resveratrol-enriched grape products. *Molecules*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020294>

- Hong, G., Zhang, B., Harbrecht, B.G. (2010). Cyclic AMP inhibits IL-1beta plus IFNgamma-induced NF-kappaB translocation in hepatocytes by a PKA independent mechanism. *The Journal of surgical research*. 159(1):565–71. [PubMed: 19481766]
- Hu, Y., Xiang, J., Su, L. ve Tang, X. (2020). The regulation of nitric oxide in tumor progression and therapy. *Journal of International Medical Research*, 48(2). <https://doi.org/10.1177/0300060520905985>
- Huffman, L. J., Judy, D. J., Frazer, D., Shapiro, R. E., Castranova, V., Billie, M. ve Dedhia, H.V. (1997). Inhalation of toluene diisocyanate is associated with increased production of nitric oxide by rat bronchoalveolar lavage cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145(1), 61–67. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8162>
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E, Chaudhuri, G. (1987). Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265–9269.
- Ignarro, L.J. (1990). Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 30(1): 535-60.
- Ikeda, M., Ohtsuji, H. 1971. Phenobarbi-tal-induced protection against toxicity of toluene and benzene in the rat. *Toxicol. Appl. Pharma*, 20: 30-43.
- Janasik, B., Jakubowski, M., Jalowiecki, P. (2008). Excretion of unchanged volatile organic compounds (toluene, ethylbenzene, xylene and mesitylene) in urine as result of experimental human volunteer exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 81(4):443-449
- Keshet, R. ve Erez, A. (2018). Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 11(8).<https://doi.org/10.1242/dmm.033332>
- Kim, K. W., Won, Y. L. ve Ko, K. S. (2015). Ethnic differences in the metabolism of toluene: Comparisons between Korean and foreign workers exposed to toluene. *Toxicological Research*, 31(1), 25–32. <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.1.025>
- Kimbrough, C. W., Lakshmanan, J., Matheson, P. J., ve Woeste, M. (2015). Resveratrol Decreases Nitric Oxide Production By. *Surgery*, 158(4), 1095–1101. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.07.012.RESVERATROL>
- Kodavanti, P. R. S., Royland, J. E., Moore-Smith, D. A., Besas, J., Richards, J. E., Beasley, T. E., ... Bushnell, P. J. (2015). Acute and subchronic toxicity of inhaled toluene in male Long-Evans rats: Oxidative stress markers in brain. *NeuroToxicology*, 51, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.09.001>
- Korde, C., Sheetal, M. C., Sachin, B., Amol, R. G. ve Vaishali, J. (2013). “Nitric Oxide and Cancer: A Review.” *World Journal of Surgical Oncology* 11(1):1.

- Kurutas, E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr. J.* 15, 71.
- Kurtzman, T.L., Otsuka, K.N., Wahl, R.A. (2001). Inhalant abuse by adolescents, *J. Adolescent Health* 28: 170–180.
- Lee, M., Kevin, R., Katrina, B., Christine, W. ve Jonathan, C. (2017). “Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase.” *Results and Problems in Cell Differentiation* 62:181–207.
- Li, H., Xia, N., Förstermann, U. (2012). Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide* 26, 102–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.12.006>.
- Li, Y.R., Li, S., Lin, C.C. 2018. Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. *BioFactors* 2018, 44, 69–82.
- Lof, A., Hjelm, E.W., Colmsjo, A., Lundmark, B.O., Norstrom, A ve Sato, A. (1993). Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to ²H₈-toluene. *Br J Ind Med* 50:55-59.
- Lu, D.L., Ding, D.J., Yan, W.J., Li, R.R., Dai, F., Wang, Q. (2013). Influence of glucuronidation and reduction modifications of resveratrol on its biological activities. *ChemBiochem* 14: 1094–1104.
- Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., Aggarwal, B.B. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-κB, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 164: 6509–6519
- Mattia, C.J., Ali, S.F., Bondy, S.C. (1993). Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Mol Chem Neuropathol* 18:313–328
- McGill, M.R., Du, K., Weemhoff, J.L., Jaeschke, H. (2015). Critical review of resveratrol in xenobiotic-induced hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2015;86:309–318.
- Miki, H., Tokuhara, K., Oishi, M., Nakatake, R., Tanaka, Y., Kaibori, M., ... Kon, M. (2016). Japanese Kampo Saireito Has a Liver-Protective Effect Through the Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Induction in Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 40(7), 1033–1041. <https://doi.org/10.1177/0148607115575035>
- Miksits, M., Wlcek, K., Svoboda, M., Kunert, O., Haslinger, E., Thalhammer, T. (2009). Antitumor activity of resveratrol and its sulfated metabolites against human breast cancer cells. *Planta Med* 75:1227–1230.

- Mishra, M., Tiwari, S. ve Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: Next generation western blotting techniques. *Expert Review of Proteomics*, 14(11), 1037–1053. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
- Monster, A.C., Kezic, S., Van de Gevel, I. (1993). Evaluation of biological monitoring parameters for occupational exposure to toluene. *Int Arch Occup Environ Health* 65(Suppl):159-162.
- Murphy, R.M., Lamb, G.D. (2013). Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes. *J Physiol*, 2013;591(23), 5823–5831.
- Nagasawa, Y., Ukai, H., Okamoto, S., Samoto, H., Itoh, K., Moriguchi, J., ... Ikeda, M. (2011). Organic solvent use in enterprises in japan. *Industrial Health*, 49(4), 534–541. <https://doi.org/10.2486/indhealth.MS1244>
- Nakajima, T. ve Wang, R.S. (1994). Induction of cytochrome P450 by toluene. *Int J Biochem* 26(12):1333-1340
- Nakajima, T., Wang, R.S., Elovaara, E. (1997). Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* 53(3):271-277.
- Navarro-Cruz, A. R., Ramírez Y Ayala, R., Ochoa-Velasco, C., Brambila, E., Avila-Sosa, R., Pérez-Fernández, S., ... Aguilar-Alonso, P. (2017). Effect of Chronic Administration of Resveratrol on Cognitive Performance during Aging Process in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8510761>
- Oliveira de Brito, A. L., Monteiro, V.V.S., Navegantes-Lima, K.C. (2017). “Resveratrol role in autoimmune disease—a mini-review,” *Nutrients*, vol. 9, no. 12, article 1306, 2017.
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L. (2007). “Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease”, *Physiol Rev*, 87, 315-424.
- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524–526.
- Pelletti, G., Rossi, F., Garagnani, M., Barone, R., Roffi, R. ve Pelotti, S. (2018). Medico-legal implications of toluene abuse and toxicity. Review of cases along with blood concentrations. *Legal Medicine*, 34(May), 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2018.08.008>
- Pradhan, A. A., Bertels, Z., ve Akerman, S. (2018). Targeted Nitric Oxide Synthase Inhibitors for Migraine. *Neurotherapeutics*, 15(2), 391–401. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0614-7>

- Pyykko, K., Tahti, H., Vapaatalo, H. (1977). Toluene concentrations in various tissues of rats after inhalation and oral administration. *Arch Toxicol* 38:169-176.
- Shiva, S. (2013). Nitrite: a physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biol.* 1: 40-44.
- Shrikanta, A., Kumar, A., Govindaswamy, V. (2015). Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *J Food Sci Technol* 52: 383–390. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0993-z>
- Soares, M. V., Charão, M. F., Jacques, M. T., dos Santos, A. L. A., Luchese, C., Pinton, S. ve Ávila, D.S. (2020). Airborne toluene exposure causes germline apoptosis and neuronal damage that promotes neurobehavioural changes in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113406>
- Sullivan, M.J., Conolly, R.B. (1988). Comparison of blood toluene levels after inhalation and oral administration. *Environ Res* 45:64-70
- Takahashi, S., Matsubara, K., Hasegawa, M., Akane, A., Shiono, H. (1993). Detection and Measurement of S-Benzyl-N-Acetylcysteine in Urine of Toluene Sniffers Using Capillary Gas-Chromatography. *Arch Toxicol* 67:647–650
- Tardif, R., Plaa, G.L., Brodeur, J. (1992). Influence of various mixtures of inhaled toluene and xylene on the biological monitoring of exposure to these solvents in rats. *Can J Physio Pharmacol* 70:385-395.
- Tassaneeyakul, W., Birkett, D.J., Edwards, J.W. (1996). Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m- and p-xylene. *J Pharmacol Exp Ther* 276(1):101-108.
- Thetkathuek, A., Jaidee, W., Saowakhontha, S. ve Ekburanawat, W. (2015). Neuropsychological Symptoms among Workers Exposed to Toluene and Xylene in Two Paint Manufacturing Factories in Eastern Thailand. *Advances in Preventive Medicine*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/183728>
- Toledo, J. C. ve Augusto, O. (2012). Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chemical Research in Toxicology*, 25(5), 975–989. <https://doi.org/10.1021/tx300042g>
- Truong, V.L., Jun, M., Jeong, W.S. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *BioFactors* 44, 36–49.
- Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y. ve Lin, J. K. (1999). Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFκB in macrophages by resveratrol. *British Journal of Pharmacology*, 126(3), 673–680. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702357>

- Win-Shwe, T.T. ve Fujimaki, H. (2010). Neurotoxicity of toluene. *Toxicol. Lett.* 198, 93-99.
- Villaflores, O.B., Chen, Y.J., Chen, C.P., Yeh, J.M., Wu, T.Y. (2012). Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 51:515-525.
- Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K., Forstermann, U. (2002). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106, 1652-1658.
- Wallerath, T., Poleo, D., Li, H., Forstermann, U. (2003). Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: A mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 471-478.
- Wallerath, T., Li, H., Godtel-Ambrust, U., Schwarz, P.M., Forstermann, U. (2005). A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide* 12, 97-104.
- Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U. ve Li, H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1633-1646. <https://doi.org/10.1111/bph.13492>
- Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A. ve Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO Journal*, 23(12), 2369-2380. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600244>
- Yu, X., Ge, L., Niu, L., Lian, X., Ma, H. ve Pang, L. (2018). The dual role of inducible nitric oxide synthase in myocardial ischemia/reperfusion injury: Friend or foe? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8364848>
- Zhang, B., Perpetua, M., Fulmer, M., Harbrecht, B.G. (2004). JNK signaling involved in the effects of cyclic AMP on IL-1beta plus IFN gamma-induced inducible nitric oxide synthase expression in hepatocytes. *Cellular signalling*. 16(7):837-46. [PubMed: 15115662]

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Raissa SOAMANJARY
Doğum Yeri ve Tarihi : Madagaskar, 10 Ağustos 1991
Yabancı Dil : İngilizce, Fransızca, Türkçe ve Endonezyaca

Eğitim Durumu
Lise : Saint Jean, Antsiranana, Madagaskar
Lisans : UIN Maulana Maliki Malang, Endonezya
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Türkiye

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : -

İletişim (e-posta) : raissa.zua@gmail.com

Yayınları : -