

**TOLÜEN MARUZİYETİNİN OKSİDATİF STRES ETKİSİ
ÜZERİNE RESVERATROLÜN KORUYUCU
ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ahmet BARAT



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOLÜEN MARUZİYETİNİN OKSİDATİF STRES ETKİSİ ÜZERİNE
RESVERATROL'ÜN KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ahmet BARAT

Doç. Dr. Egemen DERE
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Ahmet BARAT tarafından hazırlanan “Tolüen Maruziyetinin Oksidatif Stres Etkisi Üzerine 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

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

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

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.

27/06/2022

Ahmet BARAT

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 kullandığını 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
27/06/2022

Ahmet BARAT
27/06/2022

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOLÜEN MARUZİYETİNİN OKSİDATİF STRES ETKİSİ ÜZERİNE RESVERATROL'ÜN KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet BARAT

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Egemen DERE

Bu çalışmada endüstride ve günlük hayatta yaygın olarak kullanılan, uçucu bir bileşik olan tolüen kullanılmıştır. Tolüen maruziyetinden sonra vücudun birçok organ ve dokularında ciddi hasarlar oluşabilir. Tolüen metabolizması vücutta oksidatif strese neden olur. Bu da reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına sebep olur. Antioksidanlar oluşan ROS'a karşı savunmada yer alır. Vücudumuzun ürettiği antioksidanlara ilave olarak besinlerle aldığımız antioksidanlar da vardır. Çalışmamızda tolüenin oluşturduğu oksidatif stres üzerine besinlerle aldığımız resveratrolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Resveratrol; antioksidan, anti-enflamatuar, yaşlanma karşıtı, antikanser, kardiyoprotektif ve nöroprotektif dâhil olmak üzere birçok biyolojik etkiye sahiptir. Resveratrol üzüm, yer fıstığı, dut gibi 72 farklı bitki türünde doğal olarak bulunan bir polifenoldür. Bu çalışmada, sıçanlarda tolüen maruziyetinin neden olduğu oksidatif stres, lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehit (MDA) ve antioksidanlardan biri olan glutatyon (GSH) üzerindeki değişiklikler araştırılmıştır. Bu amaçla, 250-350 gram ağırlığında 36 adet wistar-albino erkek sıçan, kontrol grubu ve deney grubu olarak ayrıldı. Kontrol gruplarına serum fizyolojik ve etanol (%10), deney gruplarına ise tolüen ve tolüen+resveratrol (5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg) verildi. Deney gruplarına 900mg/kg dozunda tolüen ve resveratrol 6 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyonu yapıldı. Altıncı günün sonunda hayvanlar disekte edilerek kan ve akciğer dokuları toplandı. Toplanan akciğer dokusunda ve kanda MDA ve GSH seviyeleri incelendi. Toplanan örneklerde tolüen enjeksiyonundan sonra büyük ölçüde GSH aktivitesi gözlemlendi. Tolüen ile muamele edilen grupla tolüen ve resveratrolün farklı dozlarıyla muamele edilen gruplar arasında anlamlı bir azalma görüldü. Aynı gruplar arasında akciğer dokusundaki MDA seviyesinde kontrol gruplarıyla tolüen grubu arasında önemli ölçüde artış görülürken kanda anlamlı bir değişiklik görülmedi.

Anahtar Kelimeler: Tolüen, resveratrol, malonaldehit, glutatyon
2022, vii + 40 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE PROPERTIES OF RESVERATROL ON OXIDATIVE STRESS EFFECTS OF TOLUENE EXPOSURE

Ahmet BARAT

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

Supervisor: Assoc. Dr. Egemen DERE

This study uses toluene, a volatile compound that is widely used in industry and in daily life. After toluene exposure, the body may suffer severe damage to many organs and tissues. Toluene metabolism causes oxidative stress in the body. This results in reactive oxygen types (ROS). Anti-oxidants are involved in the defense against ROS. There are antioxidants produced by our body when we take in food. In our study, the protective effect of resveratrol, which we take in with food, on oxidative stress caused by toluene was examined. Resveratrol has many biological effects, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-aging, anticancer, cardioprotective, and neuroprotective. Resveratrol is a naturally occurring polyphenol in 72 different plant species such as grapes, peanuts, and mulberries. In this study, the oxidative stress caused by toluene exposure in rats was investigated for changes in malondialdehyde (MDA), one of the lipid peroxidation products, and glutathione (GSH), one of the antioxidants. For this purpose, 36 Wistar-albino male rats, weighing 250-350 grams, were separated as a control group and an experiment group. The control groups were given physiological saline and ethanol (10%), and the test groups were given toluene and toluene + resveratrol (5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg). The experimental groups were injected for 6 days with toluene and resveratrol in the dose of 900mg/kg. At the end of the sixth day, animals were dissected and blood and lung tissues were collected. The accumulated lung tissue and the blood were examined for MDA levels and GSH activities. In the collected samples, GSH activity was largely observed after the toluene injection. A significant reduction was observed between groups treated with different doses of toluene and resveratrols with the group treated with toluene. In the same groups, when looking at the MDA activity in the lung tissue, there was a significant increase between the control groups and the toluene group, while no significant change in blood was seen.

Keywords: Toluene, resveratrol, malondialdehyde, glutathione
2022, vii + 40 pages.

TEŞEKKÜRLER

Tüm hayatım boyunca her an ve her konuda maddi ve manevi desteklerini benden esirgemedikleri, her adımda güvenlerini hissettirdikleri için ve tüm emekleri, sabır ve fedakârlıkları için sevgili aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans süresince danışmanlığımı yapan, hem akademik hem sosyal yaşama dair bilgi ve deneyimlerini her zaman en içten şekilde paylaşan ve yol gösteren, bu süreçte hoşgörü, sabır, destek ve emeğini hiçbir zaman eksik etmeyen değerli hocam öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Egemen DERE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, göstermiş olduğu güler yüz ve hoşgörü için Sayın Prof. Dr. Ferda ARI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan ve sabırla destek veren kıymetli Emine Gonca PEKEL'e, teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar arkadaşlarım Raissa Soamanjary ve Aboush Elarfaoui'ye yardımları, destekleri ve laboratuvarda birlikte geçirdiğimiz değerli zaman için teşekkürlerimi sunarım.

.

Ahmet BARAT
27/06/2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	Error! Bookmark not defined.
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Tolüen.....	3
2.1.1. Tolüenin kimyasal yapısı ve özellikleri	3
2.1.2. Kullanım alanları.....	4
2.1.3. Absorbsiyonu, dağılımı, metabolizması ve atılımı	5
2.1.4. Tolüen maruziyeti ve insan sağlığı üzerindeki etkileri	7
2.1.5. Kötüye kullanımı.....	10
2.2. Oksidatif stres, ROS ve antioksidan enzimler.....	12
2.3. Resveratrol	15
2.3.1. Resveratrolün koruyucu etkisi.....	17
2.4. Malondialdehit (MDA)	18
2.5. Glutasyon (GSH)	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1. MATERYAL	21
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	21
3.1.2. Sarf mazemeleri	21
3.1.3. Kullanılan cihazlar	21
3.2. YÖNTEM.....	22
3.2.1. Deney hayvanları	22
3.2.2. Tolüen maruziyetinin gerçekleştirilmesi ve resveratrol uygulaması	22
3.2.3. Doku ve kan örneklerinin toplanması	23
3.3. Malondialdehit (MDA) ölçüm kiti	23
3.3.1. Deney prensibi	23
3.3.2. Örnek hazırlanması	24
3.3.3. İşlem adımları.....	24
3.3.4. Sonuçların hesaplanması.....	25
3.4. Glutasyon (GSH) ölçüm kiti.....	25
3.4.1. Deney prensibi	25
3.4.2. Örnek hazırlama	25
3.4.3. İşlem adımları.....	26
3.4.4. Sonuçların hesaplanması.....	27
3.4.5. Standart seyreltme ve standart eğri	27
3.5. İstatistik analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. Glutasyon (GSH) bulguları.....	29
4.2. Malondialdehit (MDA) bulguları.....	30
5. SONUÇ (TARTIŞMA ve SONUÇ).....	33
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	40

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AMPA	α -amino-3 hidroksi-5 metil-4 izoksazolpropiyonik reseptörü
ATP	Adenozin trifosfat
ACGIH	Amerikan Toplum Endüstriyel Hijyenistleri Konferansı
CAT	Katalaz
CYP	Sitokrom p-450
CH_2	Metilen grup
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DTNB	Ditionitrobenzoik asit
EPA	ABD Çevre Koruma Kurumu
EP	Ependorf tüpü
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
HNE	4-Hidroksinonenal
H_2O_2	Hidrojen peroksit
İP	İntroperitoneal
LOO•	Lipit peroksit radikali
MDA	Malondialdehit
nAChR	Nikotinik asetilkolin reseptör
NMDA	N-metil-D-aspartatd
O_2	Moleküler oksijen
$O_2\cdot$	Süperoksit radikali
OD	Optik yoğunluk
OH•	Hidroksil radikali
PAYA	Poliansatüre yağ asit
PBS	Fosfat tamponu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbiktürik Asit Reaktif Madde
TNT	Trinitrotolüen
UV	Ultraviyol

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Tolüenin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2.2. Tolüen metabolizması.....	7
Şekil 2.3. Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipid peroksidasyon ürünleri.....	13
Şekil 2.4. Resveratrolün kimyasal yapısı: trans- ve cis- izomerleri.....	16
Şekil 2.5. Resveratrolün antioksidan aktivite mekanizması.....	17
Şekil 2.6. MDA'nın kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.7. GSH'ın kimyasal yapısı.....	19
Şekil 3.1. Malonaldehit ve Tiyobarbitürik asit tepkimesi (MDA+TBA).....	23
Şekil 3.2. GSH standart grafiği.....	28
Şekil 4.1. Akciğerde ve kandaki GSH seviyeleri.....	30
Şekil 4.2. Akciğerde ve kandaki MDA seviyeleri.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Tolüenin kimsayal ve fiziksel özellikleri.....	4
Çizelge 2.2. Resveratrolün kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	16
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan sıçanların gruplandırılması.....	22
Çizelge 3.2. Çalışmamızdaki kontrol ve deney grupları.....	22
Çizelge 3.3. MDA ölçüm kitinin reaktif bileşenleri.....	24
Çizelge 3.4. MDA Standart operasyon tablosu.....	24
Çizelge 3.5. GSH ölçüm kitinin reaktif bileşenleri.....	26
Çizelge 3.6. GSH Standart operasyon tablosu.....	27
Çizelge 4.1. Akciğer ve kanda GSH seviyeleri (ortalama $\pm$ standart sapma).....	30
Çizelge 4.2. Akciğer ve kanda MDA seviyeleri (ortalama $\pm$ standart sapma).....	32

1. GİRİŞ

Bu çalışmada endüstride ve günlük hayatta yaygın olarak kullanılan, uçucu bir bileşik olan tolüen kullanılmıştır. Tolüen maruziyetinden sonra vücudun birçok organ ve dokularında ciddi hasarlar olduğu gösterilmiştir. Tolüen metabolizması vücutta oksidatif strese neden olur. Bu da reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına sebep olur. Antioksidanlar, oluşan ROS'a karşı savunmada yer alır. Vücudumuzun ürettiği antioksidanlara ilave olarak besinlerle aldığımız antioksidanlar da vardır. Bu çalışmada tolüenin oluşturduğu oksidatif stres üzerine besinlerle aldığımız resveratrolün koruyucu etkisi incelenmiştir.

Resveratrol üzüm, yer fıstığı ve dut gibi 70'den fazla bitki türünde, doğal olarak oluşan bir polifenoldür. Bitkilerde yaralanma, enfeksiyon, ultraviyole ışığına maruz kalma gibi stres durumlarında sentezlenen resveratrol, güçlü antifungal, antiviral, antiinflamatuvar, antioksidan, yaşlanma karşıtı, antikanser ve antibakteriyel etkileri ile iyi bir kardiyovasküler sistem koruyucusudur. İnsanlar resveratrol'ü meyvelerden doğal olarak veya ilaçlar şeklinde destekleyici olarak almaktadır. Ancak resveratrolün yüksek dozlarının özellikle gastrointestinal sistem üzerinde çeşitli yan etkilerinin olabileceği de ileri sürülmüştür (Leifert ve Abeywardena 2008).

Tolüen; benzin, yapıştırıcılar, metal temizleyicileri ve boya ürünlerinde yaygın olarak kullanılan bir maddedir. Ayrıca sanayi endüstrisinde de oldukça sık karşımıza çıkmaktadır. Ucuz ve yasal bir şekilde her yerde bulunması yönüyle çocuklar ve ergenler arasında en sık kötüye kullanılan inhale bir çözücüdür. Bu durumun sebebi olarak tolüenin soluma ve yutma sonrasında hızla emilmesi gösterilmiştir. Çeşitli semptomlarla kendini gösteren tolüen, bireylerde koma ve ölüm gibi kötü sonuçlanan etkilere yol açmaktadır (Kurtzman, Otsuka ve Wahl, 2001, s.172; Cruz, Riviera-Garcia ve Woodward, 2014)

Oksidatif stres, hücrelerde aşırı miktarda serbest radikal olduğunda ortaya çıkan bir durumdur. Vücut, normal metabolik süreçler sırasında serbest radikaller üretir. Diyabet, kanser ve alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar da dâhil olmak üzere bir dizi sağlık

durumunun gelişiminde rol oynayabilir. Vücudumuz antioksidanları serbest radikallere karşı koymak için üretir. Bir kişinin diyeti önemli bir antioksidan kaynağıdır. Belirli yaşam tarzı ve diyet değişiklikleri yapmak, oksidatif stresi azaltmaya yardımcı olabilir. Bu tarz bir diyet, meyve ve sebzeler açısından zengin ve dengeli yemeği, vücut ağırlığını korumayı, düzenli egzersiz yapmayı içerebilir (Finaud, Lac, Filaire, 2006, s.329). Oksidatif stres hücre ve doku yıkımına neden olabilir. Ancak bu dengesizliğin bazı faydaları olabilir. Yapılan çalışmalarla, oksidatif stresin kanserle mücadeleye yardımcı olduğu gösterilmiştir (Finaud ve diğerleri, 2006).

Lipitler, proteinler, enzimler, karbohidratlar ve DNA, oksidatif stres tarafından zarar görebilir. DNA zincirleri, otoimmün hastalıkların gelişiminin moleküler temelini oluşturan membran hasarı nedeniyle rastgele kırılabilir ve birleştirilebilir. Bazı nörodejeneratif hastalıklar, kan-beyin bariyerini büyük ölçüde geçebilen antioksidanlar gerektirir (Pellegrini, Miglio, Del Rio, Salvatore, Serafini, Brighenti, 2009).

Antioksidanlar, elektron vererek serbest radikalleri nötralize eden veya uzaklaştıran maddelerdir. Antioksidanların nötralize edici etkisi, vücudun oksidatif stresten korunmasına yardımcı olur. ROS eliminasyonunda endojen antioksidan enzimler, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve bazı vitaminler (A, C ve E vitaminleri) ile antioksidan özellikli öncüller (benzoik asit, gallik asit, vanilik asit) ve antioksidanlar (likopen, resveratrol) kullanılır (Pellegrini ve diğerleri 2009). Bu moleküller vücutta oksidatif stres yoluyla yaygın hale gelen serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltırlar. Böylece, hücrelerin hasardan korunmasına yardımcı olabilirler. Doğal olarak oluşan antioksidanlar, çeşitli meyvelerde sebzelerde ve kuruyemişlerde bulunmaktadır. Oksidatif stres, hücreler ve dokularda ROS üretimi ve birikimi ile biyolojik sistemlerin bu reaktif ürünleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizliğin neden olduğu bir olgudur (Storz ve Imlayt, 1999, s.190).

Bu çalışmada, sıçanlarda toluen maruziyetinin neden olduğu oksidatif stres üzerine, resveratrolün koruyucu özelliğinin olup olmadığı, lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehit (MDA) ve antioksidanlardan biri olan glutatyon (GSH) seviyeleri ölçülerek araştırılmıştır.

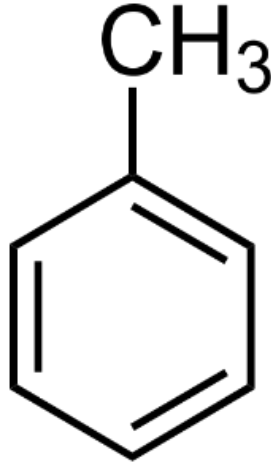
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tolüen

Tolüen, öncelikle tolu ağacında, petrol veya petrokimya işlemlerinden elde edilen doğal bir maddedir. Tolüen, renksiz, tiner gibi kokan bir sıvıdır (Cohr ve Stokholm, 1979, s.73). Yoğunluğu sudan az olduğu için (0,867 g/ml) suda çözünmez. Benzin, yapıştırıcılar ve boya ürünlerinde yaygın olarak bulunan bir bileşiktir. Tolüen tipik olarak diğer solventler ve boya pigmentleri gibi kimyasallarla karışım halinde kullanılır (Benignus, 1981).

2.1.1. Tolüenin kimyasal yapısı ve özellikleri

Aromatik hidrokarbon olan tolüen ($C_6H_5CH_3$) fenil halkasına bağlı bir metil grubundan oluşur (Şekil 2.1). Etanol, benzen, dietil eter, aseton, kloroform gibi birçok madde içinde çözünebilir. Tolüenin genel özellikleri çizelge 2.1 gösterilmiştir;



Şekil 2.1 Tolüenin kimyasal yapısı:

(<https://www.chemservice.com/toluene-n-13580-1g.html>, 2021).

2.1.2. Kullanım Alanları

Tolüen, endüstriyel bir ham maddedir. Boyalar, yapıştırıcılar başta olmak üzere birçok ticari ürünün imalatında çözücü olarak yaygın kullanılmaktadır. Franck ve Stadelhofer (1988)'in tolüen'in kullanım şeklini iki başlık altında değerlendirmiştir:

- a) Diğer kimyasalların ön maddesi olarak tolüen.
- b) Çözücü olarak tolüen.

Çizelge 2.1: Tolüen'in kimyasal ve fiziksel özellikleri

Kimyasal adı	Tolüen
Sinonim	Metilbenzen, Toluol, Fenilmetan
CAS numarası	108-88-3
Kimyasal formül	$C_6H_5CH_3$
Moleküler ağırlığı	92.141 g/mol
Yoğunluğu	0,867 g/Ml
Erime noktası	-95 °C
Kaynama noktası	111 °C
Parlama noktası	4°C
Renk	Renksiz
Fiziksel durum	Sıvı
Çözünürlük	Suda çözünmez. Alkol, kloroform, eter, aseton, karbon disülfid gibi organik çözücülerde çözünür.

Ozokwelu (2014) bir araştırmasında tolüen'in kullanım alanları ve faydalarını şu şekilde açıklamaktadır:

Endüstriyel Kullanımlar: Tolüen, diğer maddelerin kurumasına, çözülmesine ve inceltilmesine yardımcı olabildiğinden tipik olarak boya, kauçuk, cila ve yapıştırıcı üretiminde kullanılmaktadır.

Kişisel Bakım ürünleri: Tolüen, reçineler ve plastikleştiriciler gibi diğer maddelerin çözülmesine yardımcı olma özelliğinden dolayı oje çıkarıcılarda bir bileşen olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ojelerin, sertleştiricilerin ve cilaların sorunsuz bir şekilde uygulanmasını sağlamak için tırnak ürünlerinin formülasyonunda da kullanılmaktadır.

Toplu taşıma: Tolüen, yarış arabalarında ve diğer otomobillerde kullanılan yakıtın oktan oranlarını iyileştirmek için kullanılabilen bir benzin katkı maddesidir. Oktan sayısı veya derecesi ne kadar yüksek olursa, yakıtın yanma sırasında vuruntuya veya çarpmaya karşı direnci o kadar yüksek olur. Tolüen, yoğun olması ve birim hacim başına önemli miktarda enerji içermesi nedeniyle bu uygulamalarda kullanılmakta ve bu da araçların güç üretimini artırmaktadır (Ozokwelu, 2014).

Son olarak tolüen'in kullanım alanlarındaki etkileri ve toksikoloji araştırması şu şekilde açıklanmaktadır (Newman ve Reynolds, 2005, s.7):

- ✓ Tolüen gözleri tahriş eder. Çok fazla maruziyet gözler için toksik olabilir.
- ✓ Potansiyel bir kanserojen ajandır.
- ✓ Düşük ya da orta düzeylerde solunması işitme kaybı, yorgunluk, mide bulantısı, halsizlik, iştahsızlık, sarhoş tip hareketler, kafa karışıklığı, hafıza kaybı ve renk görme kaybına neden olabilir.
- ✓ Maruziyet engellendiğinde bu semptomların bazıları genellikle ortadan kalkar. Kısa sürede yüksek düzeyde tolüen solumak; bulantı, sersemlik, bilinç kaybı veya uyku hali ve hatta ölüme neden olabilir.
- ✓ Tolüen benzene göre çok daha az toksiktir, bu nedenle yaygın olarak kullanılır.
- ✓ Tolüen, muhtemelen dissosiyatif ve öforik etkileri nedeniyle eğlence amaçlı bir inhalan "koklama" olarak da kullanılmaktadır (Newman ve Reynolds, 2005).

2.1.3. Absorbsiyonu, Dağılımı, Metabolizması ve Atılımı

Absorbsiyonu

Tolüen, soluma ve yutma sonrasında hızla, deriden ise yavaşça emilir. Oldukça uçucu olduğundan tolüenin ana emilim yolunun solunum sistemi olduğu belirtilmiştir (Soares, Charão, Jacques, Dos Santos, Luchese, Pinton, Avila, 2020). Tolüenin inhalasyonunda %40-60 kadarı absorbe edilir. Soluma yoluyla maruz kalma sistemik etkilere neden olabilir. Tolüenin oral emilimine yönelik çalışmalar sınırlı olsa da yapılan çalışmalar oral

maruziyet sonrası neredeyse %100 emilim olduğunu göstermektedir (Anonim 2005). Egzersiz sırasında tolüene maruz kalan kişilerde alveoler tolüen miktarı, dinlenme sırasında maruz kalanlara göre 1-4 kat daha fazla olmaktadır (Anonim 2014). Tolüen havada 12–24 saat, sıvılarda 5–6 saat, toprakta ise 2–3 gün aralığında ayrışmaktadır.

Dağılımı

Tolüen, absorpsiyondan sonra hızla dolaşım sisteminde dağılım gösterir. Absorpsiyondan sonraki ilk dakikada yüksek oranda tolüen kan dolaşımına girer. Kimyasal yapısı tolüeni yüksek oranda yağda çözünür hale getirdiği için kan-beyin bariyerini kolayca geçmektedir. İnsan ve hayvanlarda yapılan inhalasyon çalışmalarında, yağ dokusu, kemik iliği, böbrekler, karaciğer, beyin ve kanda yüksek tolüen derişimi görülmüştür (Gotohda, Nishimura ve Morita 2009, s. 507).

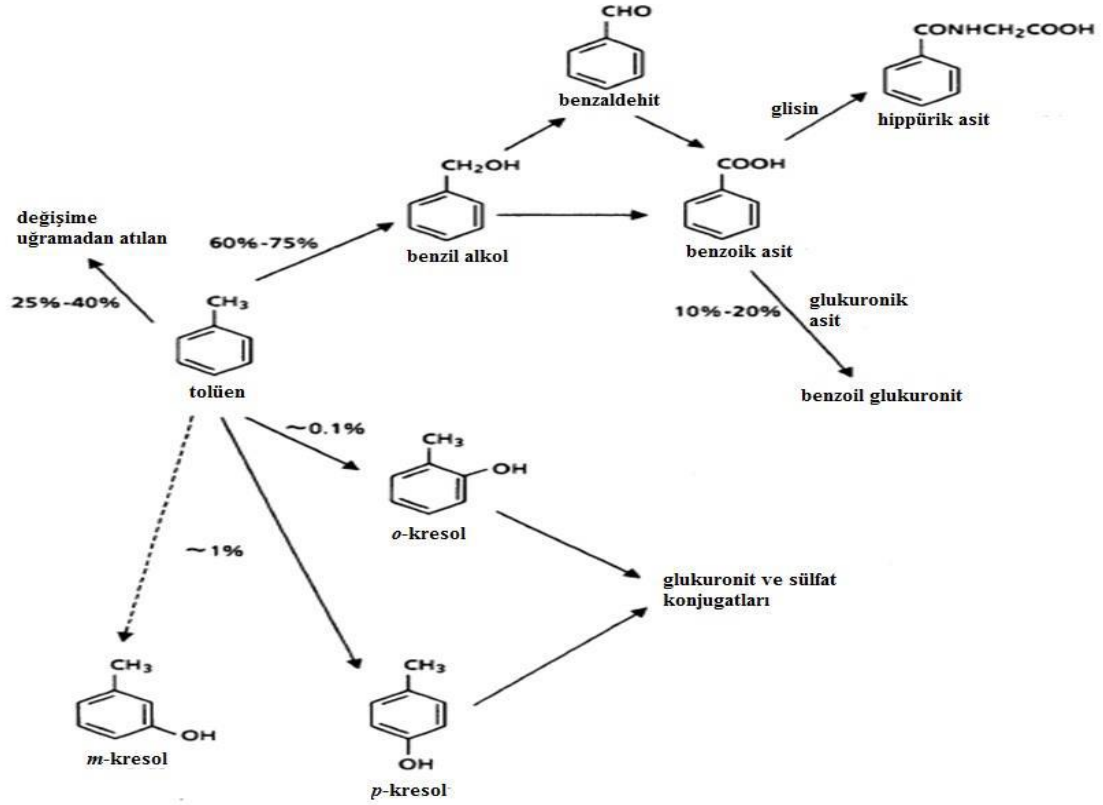
Metabolizması

Tolüen, büyük bir kısmı karaciğerde olmak üzere hızlıca metabolize edilir (Slooff ve Blokzijl 1988). İlk adım, tolüenin sitokrom p-450 (CYP) enzim ailesi tarafından yan zincir oksidasyonu ile benzil alkol oluşumudur. Benzil alkol, alkol dehidrojenaz ve aldehit dehidrojenaz enzimleri ile ileri oksidasyonlarla benzaldehit ve benzoik aside dönüşür. Tolüenin %60-70 kadarı hippurik asit ve benzoik aside metabolize edilerek böbreklerden atılır. Glisin ile benzoik asidin konjugasyonu ile oluşan hippürik asit tolüenin idrarda tespit edilebilen ana metabolitidir. Benzoik asit ve glukuronik asit tepkimesiyle oluşan benzoil glukuronid, absorblanan tolüenin %10-20'si kadardır. Tolüenin küçük bir miktarı (%1'den az miktar) ise halka hidroksilasyonu ile o-, m- ve p-kresol formlarına dönüşerek idrarla atılır (Toftgard ve Gustafsson 1980, s. 7). Tolüen metabolizması şekil 2.2 de gösterilmiştir.

Atılımı

Havayla alınan tolüenin %25-40'ı hiçbir değişikliğe uğramadan akciğerler tarafından elimine edilir. Metabolize edilen tolüenin %60-70 kadarı hippürik asit formunda, küçük

bir kısmı benzoil glukuronid (%20), o-, m-, p- krezol (%1'den az), sülfat ve glukuronid konjugatları formunda idrarla atılır. Yağda yüksek oranda çözülebildiğinden absorbe edilen tolüenin az bir kısmı yağ dokusunda toplanır. Kısa süreli ve basit maruziyetlerde 24 saat içerisinde tolüen tamamen vücuttan atılır.



Şekil 2.2. Tolüen metabolizması (Anonim,1986).

2.1.4. Tolüen maruziyeti ve insan sağlığına etkileri

Tolüen maruziyeti

Akut ve kronik tolüen kaynaklı ensefalopati vakalarının sayısı oldukça fazladır. Kazara veya kasıtlı inhalasyon ortamında meydana gelmektedir (Song, Chen, Luo, Sun 2020). Aslında, tolüen içeren maddelerin akut sarhoş edici etkileri, yaygın olarak bulunmaları, bu maddeyi Amerika Birleşik Devletleri'ndeki (ABD) en tehlikeli nörotoksinlerden biri haline getirmektedir. Sarhoş edici etkileri nedeniyle tutkal, benzin ve boyaların eğlence

amaçlı kullanımı muhtemelen birçok kişi tarafından hafife alınmaktadır (Hariz, Del Rio Sanz, Mercier, Valentin, Dietrich ve diğerleri. 2017, s. 268). Bu kapsamda tolüene maruz kalmak önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Tolüen metabolizmasında CYP enzim ailesi tarafından oksidasyon gerçekleşir. Bu sırada ROS oluşur ve oksidatif stres meydana gelir. Tolüen gibi organik çözügenler, oluşan bu ROS'lar nedeniyle hücreler üzerinde toksik etki oluştururlar (Mattia, LeBel, Bondy 1991, s. 880). Oluşan serbest radikaller elektronlarını eşleştirmek için hücre zarlarına, protein ve DNA yapılarına hasar verir. Belirtilen doğrultuda Amerikan Devlet Endüstriyel Hijyenistleri Konferansı (ACGIH), tolüene maruz kalma riski taşıyan işçiler için maruziyet endeksleri oluşturmuştur (Greenberg, 1997).

İnsan sağlığı üzerine toksik etkileri

Akut tolüen toksisitesi merkezi sinir sistemi etkileri (baş ağrısı, baş dönmesi, ataksi, uyuşukluk, öfori, halüsinasyonlar, titreme, nöbetler), ventriküler aritmiler, kimyasal pnömoni, solunum depresyonu ve elektrolit dengesizlikleri koordinasyonsuzluk, kafa karışıklığı hafıza kaybı, uygunsuz davranış, duygu durum dalgalanmaları ve nistagmus yaygın olarak görülür. Tolüen'e yüksek dozlarda maruz kalma; bireylerde bilinç kaybı, koma ve ölüm gibi beklenmedik durumlar meydana getirebilir. Tolüenin akut merkezi sinir sistemine etkileri, maruziyetin kesilmesinden sonra hızla geri döner. Bununla birlikte, tekrarlanan maruziyetler; motor koordinasyon bozukluğu ve bilişsel eksikliklerin kronik semptomlarına yol açabilir. Maruziyetin tamamen kesilmesinden sonra bu semptomların tersine dönmesinin yavaş olması, aylar hatta yıllar sürmesi beklenen bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Tsuruta, 1996, s. 372).

Yutulduğunda veya solunduğunda sistemik toksisiteye neden olabilir. Yoğun şekilde tolüen buharına maruz kalma, solunum yollarının mukoza zarlarını tahriş edebilir, akciğerlerde sıvı birikmesi ve solunum durması meydana getirebilir (Filley, Halliday, Kleinschmidt-Demasters. 2004). Özellikle tolüenin çözücü olarak kullanıldığı ortamlarda çalışan işçilerde nörotoksik etkiler gözlenmektedir (Kobald, Wascher, Blaszkewicz, Golka, Thriel. 2015, s. 52).

Yapılan bir çalışmada, toluene maruz kalan sıçan karaciğer dokusunda bulunan antioksidan özelliklere sahip ghrelin hormonunun azaldığı tespit edildirmiştir (Taş, Ögetürk, Meydan, Sapmaz, Dabak ve diğerleri 2009). Bir başka çalışmada ise tiner inhalasyonunun karaciğer üzerindeki etkileri histopatolojik olarak incelenmiş ve toksik hepatit bulgular gözlenmiştir (Toros, Yaşar, Özel, Kılıç. 2013, s. 98).

Tolüen, nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR'ler) ve N-metil-D-aspartat (NMDA), glutamat dâhil olmak üzere uyarıcı iyon kanallarını inhibe eder. Glisin, gama-aminobütirik asit reseptörü tip A ve serotonin reseptörleri gibi inhibitör iyon kanallarının işlevini güçlendirir. Ayrıca tolüen, voltaj kapılı kalsiyum kanallarını ve ATP kapılı iyon kanallarını bozar (Newman ve Reynolds. 2005, s. 7).

Metabolik etkileri incelendiğinde; yüksek düzeyde maruziyetten sonra tolüen, asit-baz dengesizliğine neden olmaktadır. Tolüeni kötü niyetle kullananlarda elektrolit ve asit-baz bozuklukları renal tübüler asidoz, potasyum eksikliği ve fosfat eksikliği görülmüştür (Fischman ve Oster, 1979).

Tolüenin bazı doku ve organlar üzerindeki etkileri.

Cilt: Sıvı tolüen, cilt ile uzun süreli veya tekrarlanan temastan sonra tahrişe ve yağ kaybına neden olabilir. Kızarıklık ve kabarcıklar oluşabilir. Nispeten geniş yüzey alanı ve düşük ağırlık oranı nedeniyle, çocuklar cilt yoluyla emilen toksik maddelere karşı daha hassastır.

Karaciğer: Yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda tolüen'in solvent bağımlılarında karaciğerde hücre hasarı meydana getirdiği görülmüştür.

Göz: Tolüen buharından kaynaklanan göz tahrişi, yaklaşık 300ppm derişimlerde başlamaktadır. İnflamasyon genellikle hafiftir. Tolüen göze sıçradığında yanma hissi, blefarospazm, konjunktivit ve keratinite neden olabilir.

Gastrointestinal: Yutulması halinde tolüen mideyi tahriş ederek bulantı, kusma ve ishale neden olabilir.

Kronik Maruz Kalma: 200ppm'den daha az kronik tolüen maruziyeti baş ağrısı, yorgunluk ve mide bulantısı ile ilişkilendirilmiştir. 200 ile 500ppm dozlara maruz kalan işçiler, koordinasyon kaybı, hafıza kaybı ve iştahsızlık gibi sorunlar bildirmişlerdir. İşyerinde kronik maruziyetten sonra bazı işçilerde optik sinirlerde geri dönüşümlü bozukluklar gelişmiştir. Kronik tolüen bağımlılarında kas bozuklukları, kardiyovasküler etkiler ve ani ölüm meydana gelmiştir. Kronik maruziyet, potansiyel olarak daha uzun gecikme süreleri nedeniyle çocuklar için daha ciddi olabilir.

Kanserojenlik: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı ve çevre koruma kurumu (EPA) tolüenin insanlar için kanserojenliğine göre sınıflandırılmaz olduğunu belirlemiştir.

Üreme ve Gelişimsel Etkiler: Tolüenin insan üremesine yönelik bir tehlike olduğu doğrulanmamıştır. Tolüenin plasentaya ve anne sütüne geçtiği bilinmektedir.

Kardiyovasküler Sistemdeki Etkileri: Yüksek dozlarda tolüen kardiyak anormalliklere neden olabilir. Tolüen, kalp ritmini potansiyel olarak bozarak, epinefrinin etkilerine karşı kalbin eşliğini düşürebilir. Solvent bağımlılarında, genellikle yoğun fiziksel aktiviteden hemen sonra, kalp durmasına yol açan düzensiz kalp ritimleri tanımlanmıştır

Böbrek üzerinde etkisi: Yoğun inhalasyondan sonra idrarda kan ve protein görülebilir. Bu etkiler, maruz kalma sonlandırılırsa genellikle ortadan kalkmaktadır (Donald, Hooper, Hopenhayn-Rich 1991, s. 242).

2.1.5. Kötüye Kullanımı

Uçucu maddelerin kötüye kullanılması ülkemiz gençliği için ciddi bir sorun teşkil etmektedir. Uçucu maddeler ucuz ve yasaldir; evlerden, ofislerden, süpermarketlerden ve hırdavatçılardan kolayca temin edilebilmeleri nedeniyle gençlerin ilgisini çeker. Uçucu

maddelerin kullanımı aynı zamanda çeşitli yasa dışı uyuşturucuların kullanımıyla da ilişkilendirilmiştir. Bunlar, organ sistemi işlevinde ciddi kayıplara ve hatta ani ölüme neden olabilir. Uçucularda bulunan ana bileşik tolüendir.

Uçucu madde kötüye kullanımı genellikle "çözücü kötüye kullanımı" olarak adlandırılan olgunun daha resmi versiyonu olarak karşımıza çıkmaktadır. Uçucu maddeler terimi, solunabilen bir buhar oluşturmak üzere oda sıcaklığında buharlaşan gazları veya kimyasalları ifade etmektedir. Tolüen, n-heksan, metil butil keton, trikloroetilen, trikloroetan, diklorometan, benzin, propan-bütan gibi birçok uçucu madde vardır. Tolüen kötüye kullanılan uçucu maddeler arasında önemli yer almaktadır (Flanagan, Streete, Ramsey 1991, s. 103).

Uçucu maddeler sinir sistemi depresanlarıdır. Beynin ve merkezi sinir sisteminin aktivitesini yavaşlatırlar, fiziksel, zihinsel ve duygusal tepkileri etkilerler. Solunduğunda, uçucu maddeler akciğerlerden kan dolaşımına emilir. Vücut yağında çözünürler ve bu nedenle beyne ve diğer organlara hızla geçerler. Uçucu maddenin kullanıldıktan sonraki etkisi genellikle birkaç dakika sürmekte ve halüsinasyonlara neden olmaktadır. Bir diğer etkisi olan sarhoş edici etki 30-40 dakikaya kadar devam edebilir (Kurtzman, Otsuka, Wahl. 2001, s. 173).

Tolüen dâhil olmak üzere kötüye kullanılan inhalanların moleküler ve hücresel hedefleri, çeşitli in vitro ve in vivo formülasyonlar kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışmaların çoğu, tolüenin nöronal uyarılabilirliği düzenlemede kilit rol oynayan iyon kanalları üzerindeki etkilerini belirlemeye odaklanmış, hem voltaj kapılı hem de ligand kapılı iyon kanallarının, tolüen derişimlerinden etkilendiğini göstermiştir. Ayrıca bu çalışmalar tolüen ve diğer inhale çözücülerin basit kimyasal yapılarına rağmen şaşırtıcı seçiciliğini göstermektedir. Örneğin, tolüenin, iyonotropik glutamat reseptörünün yakından ilişkili α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) izoformu üzerinde çok az etkiye sahipken, glutamatla aktive olan iyon kanallarının N-metil-D-aspartat (NMDA) izoformunu önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. Tolüenin bu özelliği ve kolay ulaşılabilir olması, ister tolüenin isterse de tolüen bazlı inhale çözücülerin kötüye

kullanımında neden fazlaca tercih edildiğini açıklamaktadır (Balya, Tu, Carpenter-Hyland, Chandler ve Woodward 2005).

2.2. Oksidatif Stres, ROS ve Antioksidan Enzimler

Oksidatif Stres

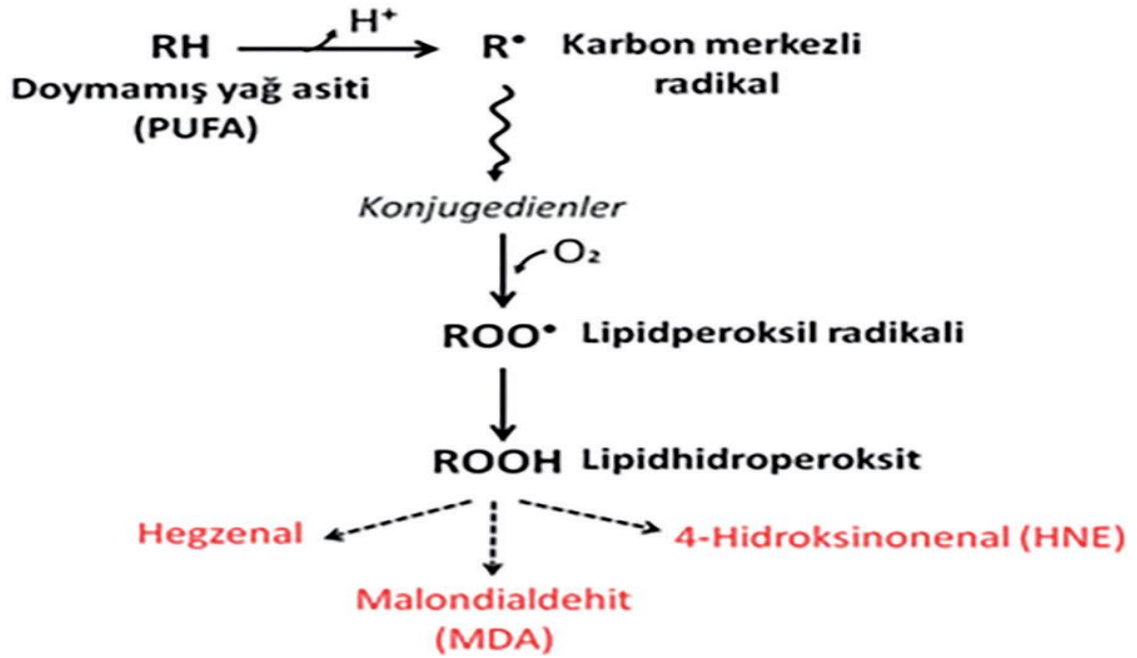
Oksidatif stres, vücuttaki serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki bir dengesizliktir. Serbest radikaller, eşit olmayan sayıda elektrona sahip oksijen içeren moleküllerdir. Serbest radikaller, diğer moleküllerle çok kolay tepkimeye girdikleri için vücutta kimyasal tepkimelere neden olabilir. Bu tepkimelere oksidasyon denmektedir. Bu tepkimeler yararlı veya zararlı olabilir. Oksidatif stresi insan vücudu için zararlı olarak tanımlama eğiliminde olsak da, kanser gibi klinik durumları belirli bir derecede klinik başarı ile tedavi etmek için terapötik bir yaklaşım olarak da kullanılmaktadır.

Oksidasyon, vücutta gerçekleşen normal ve gerekli bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Düzgün çalıştığında, serbest radikaller patojenlerle savaşmaya yardımcı olabilir. Patojenler ise enfeksiyonlara yol açmaktadır (Sies, Berndt, Jones 2017).

Serbest radikaller ve antioksidanlar vücudun doğal ve sağlıklı işlevlerinin bir parçasıyken, serbest radikaller ve antioksidanlar dengede olmadığında oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres çoğu dokuya zarar vererek zamanla birçok hastalığa yol açar. Vücudun doğal bağışıklık tepkisi de geçici olarak oksidatif stresi tetikleyebilir. Bu tür oksidatif stres, bağışıklık sistemi enfeksiyonla savaştıktan veya hasarı onandıktan sonra kaybolan, hafif iltihaplanmaya neden olabilir. Kontrolsüz oksidatif stres, yaşlanma sürecini hızlandırır ve insan sağlığında çeşitli olumsuz koşulların gelişimini tetikleyebilir (Newsholme, Cruzat, Keane, Carlessi, De Bittencourt, 2016).

ROS'lar, biyofilmlerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PAYA) oksidasyonuna neden olarak lipid peroksidasyonunu tetikler (Gupta, Shah, Patel, Chaudhary, jhu ve diğerleri 2014). ROS'lar arasında en reaktif radikal, Fenton veya Haber-Weiss tepkimesi ile oluşan •OH'dir. Hidrojen atomu sadece bir elektron içerdiğinden, bir elektronun metilen

grubundan ayrılması nedeniyle karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron kalır. Yağ asitlerindeki çift bağlar, bitişik karbonlar ve hidrojenler arasındaki bağı (C-H) zayıflatığı için hidrojen giderimi daha kolay hale gelir (Gutteridge. 1995). Bu nedenle, hücre zarı lipidlerin PAYA zincirleri peroksidasyona daha yatkındır. Hidrojen kaybeden yağ asitleri, konjuge dien yapıları oluşturmak için moleküler düzenlemeye tabii tutulur. Oluşan konjuge dien yapısı oksijen ile birleşir ve lipid peroksit radikaline (LOO•) dönüşür. Bu peroksit radikalleri, hidrojeni diğer yağ asitlerinden uzaklaştırarak zincir peroksidasyon tepkimelerini başlatır (Girotti. 1998). Lipit peroksidasyon tepkimeleri sonucunda oluşan lipit peroksitleri sekonder veya MDA, 4-Hidroksinonenal (HNE) ve hegzenal isimli aldehitlere dönüşür (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipit peroksidasyon ürünleri (Kanner, German, Kinsella, 1987; Esterbauer, Schaur, Zollner, 1991).

Ortama zincir kırıcı bir antioksidan eklenene kadar (örn, Vit. E), membranlarda meydana gelen zincirleme peroksidasyon tepkimeleri devam eder. Antioksidan eksikliğinde peroksit radikalleri birbirleri ile çapraz kovalent bağ oluşturarak membran yapısını bozar. Membran akışkanlığının bozulması, membranın H^+ ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğinin artmasına neden olur. İleri dereceli lipid peroksidasyonu, hücre zarlarının yırtılmasına ve hücresel içeriğin dağılmasına, hücre hasarına veya hücre ölümüne yol

açabilir (Catalá. 2006). Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitleri ve aldehitler tiyobarbitürik asit (TBARS) olarak isimlendirilmiş ve MDA eşdeğeri olarak dokuda ve kanda spektrofotometrik ve florometrik metotlarla ölçülebirlirler (Esterbauer, Cheeseman. 1990, s. 419; Pryor.1989, s. 178).

Reaktif oksijen türleri (ROS)

Oksijen, atmosferde O_2 (dioksijen) şeklinde bulunur. Oksijenin vücudumuza girdikten sonra az bir kısmı başta mitokondri olmak üzere hücresel kompartımanlarda indirgenerek ROS'a dönüşür. Başlıca ROS türleri O_2^- , $\bullet OH$ ve H_2O_2 'dir. Bunlardan ilk ikisi serbest radikal, H_2O_2 ise pro-oksidan'dır (Navarro ve Boveris. 2004).

ROS, aerobik metabolizmanın yan ürünleridir. ROS, hepsi farklı biyolojik hedeflere reaktivite kazandıran doğal kimyasal özelliklere sahip olan O_2^- , H_2O_2 ve $\bullet OH$ içermektedir (Apel ve Hirt. 2004). ROS genellikle oksidatif stres ilkesi ile ilişkilidir. Bu da ROS'un lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar vererek patolojiyi etkilediğini göstermektedir. Bununla birlikte, son yirmi yılda, ROS'un biyolojik ve fizyolojik süreçleri düzenlemek için sinyal molekülleri olarak da hizmet ettiği ortaya çıkmıştır (Noh ve Ha. 2011).

Çevresel stresörler yani UV, iyonlaştırıcı radyasyonlar, kirleticiler ve ağır metaller ve ksenobiyotikler yani antiblastik ilaçlar ROS üretimini büyük ölçüde artırmaya katkıda bulunur. Nefes alma, yiyecekleri sindirme, alkol ve ilaçları metabolize etme, yağları enerjiye çevirme gibi birçok doğal süreç, serbest radikaller üretir. Vücudumuzdaki antioksidanlar, oluşan serbest radikalleri nötrölize ederler. Bu denge bozulduğunda, serbest radikaller vücutta zincirleme tepkimelere neden olur. Meydana gelecek lipit peroksidasyonu hücre membranını bozar ve enzimlerin etkisini bloke ederek, hücresel süreçlerin düzgün çalışmasını engelleyebilir (Kurutaş. 2015, s. 2).

Protein hasarı; bölgeye özgü amino asit modifikasyonu, peptit zinciri parçalanması, çapraz bağlı tepkime ürünleri toplanması, elektrik yükü değişimi, enzimatik inaktivasyon ve proteoliz duyarlılığını içerir (Ayala, Munoz, Arguelles, 2014).

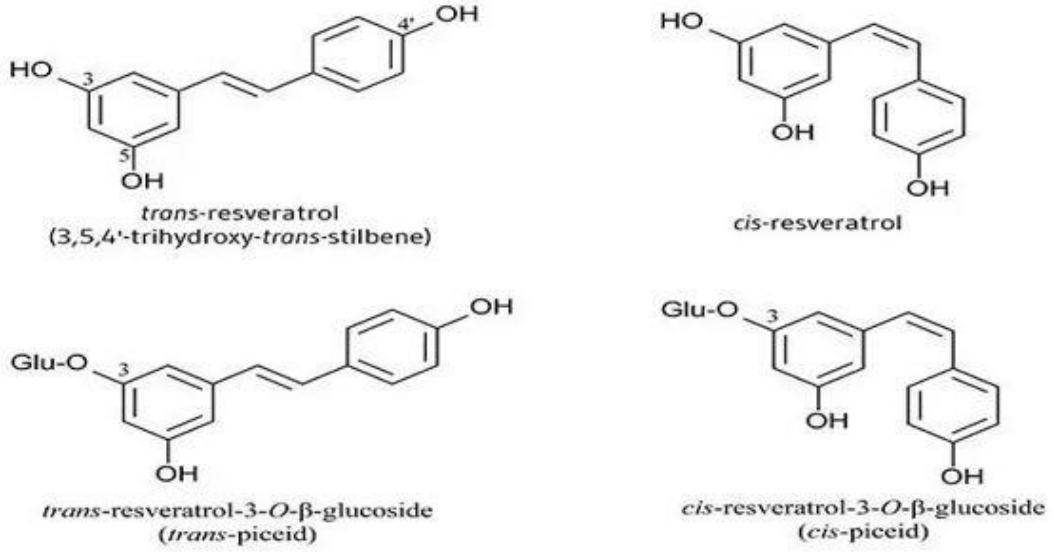
Antioksidanlar

Biyolojik sistemlerde, ROS'un hücre sel yapı lara zarar vermesini önleyen, antioksidanlar adı verilen bir savunma mekanizması vardır. Bu savunma mekanizmaları iç sel ve dış sal olmak üzere iki kategoriye ayrılır (Gupta ve diğ erleri 2014). Antioksidanların etki mekanizmalarından bazılarını ş u ş ekilde sıralayabiliriz:

- a) Bulundukları yerde ortamdan oksijeni uzaklaşt ırır veya deriş imini azalt ırılar.
- b) Katalitik metal iyonlarını ortamdan uzaklaşt ır ırılar.
- c) O_2^- , veya H_2O_2 gibi temel ROS'u zayıf moleküllere dönüştürürler veya ortamdan uzaklaşt ır ırılar.
- d) Serbest radikal hasarına yol aç an zincirleme tepkimeleri önlerler.
- e) Serbest radikallerin verdiği zararları onarıcı etkiye sahiptirler.

2.3. Resveratrol

Resveratrol (3,4',5 trihidroksistilben), bir antioksidan gibi davrandığı ndan UV ış ığı na maruz kaldığı nda, bitki bütünlüğü bozulduğ unda, enfeksiyon riski oluş tuğ unda asma, ç am ve baklagiller baş ta olmak üzere 72 farklı bitki türü tarafından doğ al olarak üretilen ve iki fenol halkasının bir etilen köprüsü ile bağ lanması sonucu oluş an polifenolik bir fitoaleksindir (Soleas, Tomlinson, Diamandis, Goldberg. 1997; Fremont, 2000, s. 668). Bu bağ resveratrolün cis- ya da trans- izomerik formda olmasını belirleyen faktördür. Resveratrol de dâhil olmak üzere polifenoller, genelde glikozit yapıdadır. Bu nedenle resveratrol, 3-O-beta glikozit olarak da bilinir (Ş ekil 2.4) (Baur ve Sinclair, 2006; Delmas, Aires, Limagne, Dutartre, Mazué, ve diğ erleri, 2011).



Şekil 2.4. Resveratrolün kimyasal yapısı: *trans*- ve *cis*- izomerler (Alkan, 2007.)

Çizelge 2.2. Resveratrolün kimyasal ve fiziksel özellikleri

Kimyasal adı	Resveratrol
Sinonim	3,4',5-trihydroxy- <i>trans</i> -stilbene
CAS numarası	108-88-3
Kimyasal formül	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Moleküler ağırlığı	228.25 g/mol
Renk	Hafif grimsi beyaz
Çözünürlük	Dimetil sülfoksit (DMSO), etanol ve aseton gibi çözücülerde kolaylıkla çözülür
Fiziksel durum	Katı-toz
UV absorbans değeri	Trans- için [UV _{max} (EtOH) nm (ε) 308 (30000)] Cis- için [UV _{max} (EtOH) nm (ε) 288 (12600)]

Bitkisel antibiyotikler olarak da bilinen fitoaleksinler bitkiler tarafından enfeksiyonlara ve patojenik mikroorganizmalara karşı üretilen etkili maddelerdir. Stilben fitoaleksinlerin en aktif üyesi resveratroidir (Hocaoğlu 2018). Özellikle üzümde *Botrytis cinerea* enfeksiyonu, yaprak epidermisinde ve üzüm kabuklarında resveratrolün özel sentezine yol açar. Bu bileşik çoğunlukla üzüm ve meyvelerin kabukları ve tohumlarında yoğunlaşma eğilimindedir. Kırmızı şarap üretimi sırasında üzüm kabukları ve tohumlarıyla birlikte fermente edilmediğinden, önemli miktarda resveratrol oluşmaktadır.

Antioksidan özelliğe sahip olan resveratrolün güçlü bir serbest radikal temizleyici olduğu bilinmektedir (Mc Gill, Du, Weemhoff, ve Jaeschke, 2015). Resveratrol, O_2^- , $\bullet OH$, H_2O_2 $ONOO^-$ gibi çeşitli oksidanları doğrudan uzaklaştırabildiği gösterilmiştir. İlave olarak, anti-inflamatuar, antikanserojenik, kardiyoprotektif, vazorelaksan, fitoöstrojenik ve nöroprotektif gibi diğer biyoaktif etkiler de rapor edilmiştir (Xia, Daiber, Förstermann ve Li, 2017).

Bu polifenolün biyolojik etkilerinin çoğu, antioksidan özelliklerine atfedilmiştir. Bu kapsamda resveratrol çeşitli alanlarla etkileşim halinde olmakta ve farklı koruyucu özellikler göstermektedir. Resveratrol birçok biyolojik özelliğe sahiptir, ancak en iyi tarif edilen özelliği, güçlü bir antioksidan olarak hareket etme kapasitesidir. Resveratrolün antioksidan aktivitesi, nükleer yapıdaki fonksiyonel grupların düzenlenmesine bağlıdır. Hidroksil gruplarının konfigürasyonunu, toplam sayısını, radikal temizleme ve metal iyonu şelasyon kapasitesi gibi çeşitli antioksidan aktivite mekanizmalarını önemli ölçüde etkiler. Şekil 2.5’de resveratrolün antioksidan aktivitesi gösterilmiştir.

Şekil 2.5. Resveratrolün antioksidan aktivite mekanizması (Hocaoğlu, 2018).

Kardiyovasküler hastalıkların gelişimini önlemede yüksek potansiyele sahip olduğuna inanılan doğal bileşiklerden birisidir. Artan çalışmalar, resveratrolün insan sağlığında potansiyel bir terapötik rol oynayabilecek antioksidan, anti-inflamatuar, anti-aging, anti-diyabetik ve apoptotik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Laboratuvar ve klinik çalışmalar, resveratrolün çeşitli yaralanmalara karşı doku ve organ koruması üretebileceğini göstermiştir. Bireyde meydana gelen yaşlanma ile resveratrolün ilişkisi incelendiğinde; resveratrolün yaşlanma karşıtı bir özellik gösterdiği de bulgulanmıştır (Hocaoğlu, 2018).

2.4. Malondialdehit (MDA)

MDA ($C_3H_4O_2$), vücuttaki oksidatif stresin önemli bir belirtecidir. Özellikle membran lipidlerinin oksidatif hasarlarının belirlenmesinde önemlidir. MDA, hücre içi çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. Serbest radikallerdeki artış, MDA'nın aşırı üretimine yol açabilir. MDA, kanda ve idrarda yoğun bir şekilde görülmektedir. MDA seviyeleri, kanser hastalarında oksidatif stres ve antioksidan durumun belirteci olarak kabul edilmektedir (Gawel, Wardas, Niedworok, Wardas, 2004). MDA'nın kimyasal formülü şekil 2.6 gösterilmiştir.



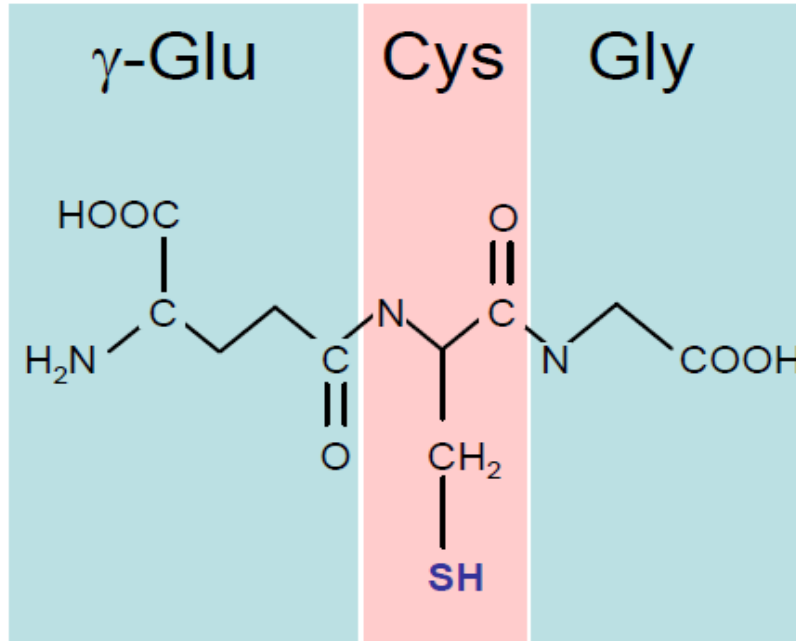
Şekil 2.6. MDA'nın kimyasal yapısı ($C_3H_4O_2$) (IARC, 1985).

Lipid peroksidasyonu, hayvanlarda ve bitkilerde iyi tanımlanmış hücresel hasar mekanizmasıdır. Lipid peroksitler, lipid peroksidasyonunun doğal iki ürünü olan MDA ve 4-HNE gibi daha karmaşık ve reaktif bileşikler oluşturmak üzere ayrışan hücrelerde oksidatif stresin kararsız göstergeleridir. Lipidlerin oksidatif modifikasyonu, çok çeşitli pro-oksidan ajanlar tarafından in vitro olarak indüklenebilir ve yaşlanma sırasında belirli hastalık koşullarında meydana gelebilir. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerini ölçmek, oksidatif hasar için en yaygın olarak kabul edilen analizlerden biridir. MDA veya HNE tarafından proteinlerin modifikasyonları, oksitlenmiş proteinlerin hem yapısal hem de

fonksiyonel değişikliklerine neden olabilir şeklinde ifade edilmektedir (Gönenç, Ozkan, Torun. 2001).

2.5. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH) $C_{10}H_{17}O_6N_3S$ formülüne sahip, gama glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. GSH'ın kimyasal yapısı: $C_{10}H_{17}O_6N_3S$ FW; 307 (Hopkins. 1929).

GSH vücuttaki birçok hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidatif maddelerden koruyan bir moleküldür (Champe ve Harvey 1997). Karaciğer tarafından üretilir ve birçok vücut işleminde yer alır. GSH, doku oluşturma ve onarımında, vücutta ihtiyaç duyulan kimyasalların ve proteinlerin yapımında ve bağışıklık sistemi işlevinde yer almaktadır. Ayrıca insanlar yaşlanma, alkol kullanım bozukluğu, karaciğer hastalığı, kalp hastalığı ve diğer birçok durum için GSH alırlar (Meister ve Anderson, 1983).

GSH insan vücudunda antioksidan görevi görmektedir. Serbest radikallerle mücadelede önemli bir moleküldür. Ayrıca, vücudun doğal olarak oluşturduğu bazı kimyasalların yanı sıra kirleticiler ve ilaçlar da dâhil olmak üzere pek çok kimyasal maddeyi detoksifiye

etmede yardımcı olmaktadır. Bireyler yaşılandıkça vücutlarındaki GSH seviyesi düşmekte ve bu durum da sağlığı olumsuz etkilemektedir (Hayes, Flanagan, Jowsey, 2005).

Yetersiz beslenme, çevresel toksinler ve stres gibi çeşitli faktörler GSH seviyelerinin azalmasına neden olur. Glutasyon seviyesinin azalması hücrelerin serbest radikallere karşı korunmasını azaltır. Böylece ROS'ların zararlı etkileri görülmeye başlanır. Okside glutasyon (GSSG) inaktif durumdadır ve hücrelerde %10 kadardır. %90 kadarı aktif GSH halindedir. Aktif seviye %90'ın altına indiği zaman serbest radikaller ortamda artmaya başlar. GSH seviyesi %70'in altına inerse bağışıklık sisteminde ciddi hasarlar görülmeye başlanır (Rushworth ve Megson, 2014, s. 152).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmamızda kullandığımız sıçanlar, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Biriminden alınmıştır. Bu çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan 2019/04-03 No'lu etik kurul kararı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Kimyasal maddeler

- Resveratrol $\geq 98\%$ by HPLC
- Tolüen, %97 saflıkta
- Etanol
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4), Merck
- Sodyum Hidroksit (NaOH), Merck
- Glutasyon ölçüm kiti
- Malondialdehit ölçüm kiti

3.1.2. Sarf mazemeleri

- Nitril, pudrasız, laboratuvar eldiveni
- 2 ml hacimli sentrifuj tüpleri, ISOLAB
- 1000 μl 'lik pipet uçları, ISOLAB
- 200 μl 'lik pipet uçları, ISOLAB
- 96 kuyulu mikroparka, Elabscience
- 1 ml insülin enjektörü
- 10 ml enjektör
- 5 ml enjektör

3.1.3. Kullanılan cihazlar

- Hassas terazi, Sartorius
- Homojenizatör, Schuett homgen^{plus}
- Santrifüj, HERMLE Z 326 K soğutmalı santrifüj
- Derin dondurucu, Arçelik
- 10-100 μl otomatik pipet, MICROLİT
- 100-1000 μl otomatik pipet, ISOLAB

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deney Hayvanları

Deneyde 200–350 gram ağırlığında 36 adet erişkin Wistar Albino erkek sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar yem ve suya serbest şekilde ulaşabilir ortamda, oda sıcaklığında (20-24°C) tutularak kontrol ve deney olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Kontrol gruplarını da kendi aralarında serum fizyolojik ve etanol olmak üzere iki gruba ayırdık. Deney grubuysa tolüen ve tolüen+resveratrol uygulamasına göre 4 grup olmak üzere kendi içinde ayrılmıştır. Çizelge 3.1 ve 3.2 çalışmamızdaki grupları göstermektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan sıçanların gruplandırılması.

Kontrol Grupları		Deney Grupları			
1.K	2.K	1.D	2.D	3.D	4.D
					
					
					

Çizelge 3.2. Çalışmamızdaki kontrol ve deney grupları.

1. Kontrol Grubu (1.K)	Serum Fizyolojik
2. Kontrol Grubu (2.K)	%10 Etanol
1. Deney Grubu (1.D)	Tolüen
2. Deney Grubu (2.D)	Tolüen + Resveratrol (5 mg)
3. Deney Grubu (3.D)	Tolüen + Resveratrol (10 mg)
4. Deney Grubu (4.D)	Tolüen + Resveratrol (20 mg)

3.2.2. Tolüen maruziyetinin gerçekleştirilmesi ve resveratrol uygulaması

Hayvanlara 6 gün boyunca intraperitoneal (i.p) yolla enjeksiyon uygulandı. 1. deney grubuna 900mg/kg dozunda tolüen, 2. deney grubuna aynı dozda tolüen ile birlikte 5mg/kg, 3. deney grubuna 10mg/kg, 4.deney grubuna 20mg/kg resveratrol i.p olarak uygulandı. Resveratrol toz halinde olduğundan %10 etanol içerisinde çözündürerek

enjekte edildi. Kontrol gruplarındaysa; 1. kontrol grubuna serum fizyolojik, 2. kontrol gurubuna %10 etanol enjeksiyonu yapıldı.

3.2.3. Doku ve kan örneklerinin toplanması

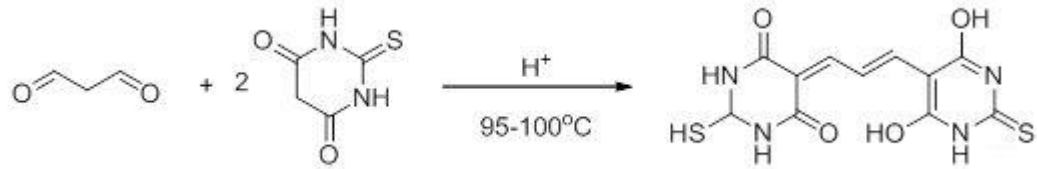
6 günün sonunda sıçanlar servikal dislokasyon yolu ile öldürüldü ve disekte edilerek akciğer dokusu ve kan süratle toplandı. Elde edilen doku örnekleri pH=7,4 fosfat tamponu çözeltisi ile yıkanarak temizlendikten sonra, yaş ağırlıkları hassas terazide tartıldı. Toplanan kan örnekleri 1000g'de 0-4°C'de, 15 dakika santrifüjlenirken, akciğer dokuları 1/9 (w/v) olacak şekilde soğuk tampon çözelti ile buz ile soğutulmuş ortamda 3000 devir/dak hızda homojenize edildi. Elde edilen homojenat 10.000g'de 15 dak. 0-4°C santrifüjlendi.

Bütün işlemler ölçümlerde kullanılan kitlerin talimatlarına uygun şekilde yapılarak örnekler analize hazır hale getirildi ve -80°C'de saklandı.

3.3. Malondialdehit (MDA) ölçüm kiti

3.3.1. Deney prensibi

Vücuttaki MDA içeriğinin tespiti, hücrelerdeki lipid peroksidasyon seviyesini yansıtdığından aynı zamanda hücresel hasarın seviyesini de yansıtmaktadır. Lipid peroksitin katabolitindeki MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile tepkimeye girerek 532nm'de maksimum absorpsiyon veren, pembe bileşik üretir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Malonaldehit ve Tiyobarbitürik asit tepkimesi (MDA+TBA).

3.3.2. Örnek Hazırlama

1. Serum veya hücre süpernatanı: Derişimi lineer aralığın dışında olan numuneyi, saptamadan önce serum fizyolojikle seyreltildi.
2. Doku: Dokuları küçük parçalara ayırıp, tarttıktan sonra soğuk ortamda PBS(0.01 M, pH=7,4) içinde homojenleştirdik, PBS hacmi (mL): dokunun ağırlığı (g)=9:1. Doku homojenatı 10000g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant toplandı ve analiz için soğuk bir ortamda bekletildi. Tüp tamamen karıştırılarak, plastik filmle sabitlendi, ardından iğne ile küçük bir delik açıldı. 95°C'lik su banyosunda 40 dakika inkübe edildikten sonra tüpler, akan su ile soğutuldu. 3100g'de 10 dakika santrifüjlenerek, süpernatant toplandı. Çift damıtılmış su ile sıfıra ayarlayıp 1cm çaplı küvet ile 532nm'de OD değerinin ölçümü yapıldı. Çalışmada kullandığımız MDA kitinin içeriği çizelge 3.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. MDA ölçüm kitinin reaktif bileşenleri.

	Bileşen	Spesifikasyon	Depolama
Reaktif 1	Clarificant	24mL * 1 şişe	2-8°C, 6 ay
Reaktif 2	Asit Reaktif	12mL * 1 şişe	2-8°C, 6 ay
Reaktif 3	Kromojenik Ajan	Toz * 2 şişe	2-8°C, 6 ay
Reaktif 4	10nmol/mL Standart	1.5mL * 2 şişe	2-8°C, 6 ay

3.3.3. İşlem adımları

Bu çalışmada kullanılan MDA kitinin işlem adımları çizelge 3.4'deki gibi yapıldı.

Çizelge 3.4. MDA Standart operasyon tablosu.

	Boş tüp	Standart tüp	Örnek tüp	Kontrol tüpü
Mutlak etanol (mL)	a*			
Reaktif 4 (mL)		a*		
Numuneler (mL)			a*	a*
Reaktif 1 (mL)	a*	a*	a*	a*
Reaktif 2 uygulama solüsyonu (mL)	3.0	3.0	3.0	3.0
Reaktif 3 uygulama solüsyonu (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
%50 buzlu asetik asit				1.0
a* numune, standart, mutlak etanol ve reaktif 1'in hacmini temsil eder, bunlar eşittir. Örneğin, örnekleme hacmi 0.1mL'dir, standart, mutlak etanol ve reaktif 1'in hacmi her biri				

için 0.1 mL'dir. Örnekleme hacmi 0,2mL ise, standart, mutlak etanol ve reaktif 1'in hacmi her biri için 0,2mL'dir.

3.3.4. Sonuçların hesaplanması

1. Serum ve diğer sıvı numuneler için:

MDA içeriği (nmol/mL)

$$= \frac{OD_{örnek} - OD_{kontrol}}{OD_{standart} - OD_{blank}} \times \text{Standart derişimi (10nmol/mL)} \times \text{Testten önce numunenin çoklu dilüsyonu}$$

2. Doku numunesi için:

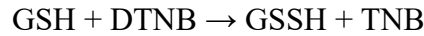
MDA içeriği (nmol/mgprot)

$$= \frac{OD_{örnek} - OD_{kontrol}}{OD_{standart} - OD_{blank}} \times \text{Standart derişimi (10nmol/mL)} \times \text{Testten önce numunenin çoklu seyreltisi} \div \text{Numunenin protein derişimi (mgprot/mL)}$$

3.4. Glutatyon (GSH) ölçüm kiti

3.4.1. Deney prensibi

GSH, yapısındaki sistein amino asitinin tiyol grubu, ditionitrobenzoik asit (DTNB) ile tepkimeye girerek sarı renkli tiyo-nitrobenzoik (TNB) meydana getirir.



TNB'nin, 420nm dalga boyunda verdiği optik densite (OD) değeri ölçülerek GSH içeriği hesaplanmıştır. Bu çalışmada kullandığımız GSH kitinin içeriği çizelge 3.5'de gösterilmiştir.

3.4.2. Örnek hazırlama

1. Serum: 0,7mL numune alındı. 0,7mL reaktif 1 ekleyip ve tamamen karıştırıldı. Ardından 4500g'de 10 dakika santrifüjlenip, süpernatantı test için alındı.

2. %5 doku homojenatı: Doku tartıldı ve PBS (0.01M, PH7.4) oranında ve ağırlık (g): hacim (mL)=1:19 nisbetin de eklenerek, buz banyosunda homojenize edildi. Ardından homojenat 10000g'de 15 dakika santrifüjlendi.

Çizelge 3.5. GSH ölçüm kitinin reaktif bileşenleri.

Reaktif	Spesifikasyonu	Depolama
Reaktif 1	Asit Reaktif, 45 mL × 2 şişe	2-8°C, 6 ay, karanlık ortamda.
Reaktif 2	Fosfat, toz × 2 şişe	2-8°C, 6 ay, karanlık ortamda.
Reaktif 2 uygulama solüsyonunun hazırlanması: Reaktif 2 tozunu 150 mL ddH ₂ O ile tamamen çözünüldü. Reaktif doymuş bir çözeltidir.		
Reaktif 3	DTNB Solüsyonu, 30 mL ×1 şişe	2-8°C, 6 ay, karanlık ortamda.
Reaktif 4	Tuz Reaktifi, toz × 4 şişe	2-8°C, 6 ay, karanlık ortamda.
Reaktif 4 uygulama solüsyonunun hazırlanması: bir şişe Reaktif 4 tozunu 10 mL ile ddH ₂ O tamamen çözünür. Karanlık ortamda ile bir ay boyunca 4°C'de saklanabilir		
Reaktif 5	GSH Standardı, 3.07 mg × 2 şişe	2-8°C, 6 ay, karanlık ortamda.
Reaktif 6	GSH Standart Stok Seyreltici	2-8°C, 6 ay, karanlık ortamda.
GSH standart uygulama solüsyonunun hazırlanması: GSH standart stok solüsyonu ddH ₂ O ile 1: 9 oranında seyreltilir ve tamamen karıştırılır.		
1 mmol/L GSH standart solüsyonunun hazırlanması: GSH'nin moleküler ağırlığı 307'dir, çözünmesi 3.07mg GSH ile 10mL GSH standart uygulama solüsyonu tam olarak çözünür.		
20 µmol/L standart solüsyonunun hazırlanması: 1 mmol/L GSH standart solüsyonunu GSH ile 1: 49 oranında seyreltilir ve tamamen karıştırılır.		

3.4.3. İşlem adımları

1. Boş tüp: 5mL ependorf (EP) tüpüne 1mL Reaktif 1 eklendi.
Standart tüp: 5mL EP tüpüne 1mL 20µmol/L GSH standart solüsyonu eklendi.
Örnek tüp: 5mL EP tüpüne 1mL süpernatant eklendi.
2. 1,25mL Reaktif 2 uygulama solüsyonu, 0,25mL Reaktif 3, 0,05mL Reaktif 4 eklendi.
3. Tamamen karıştırıp ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Çift damıtılmış suyla spektrofotometreyi sıfıra ayarlandı ve 420nm dalga boyunda her tüpün OD değerlerini ölçüldü.

Çizelge 3.6. GSH Standart operasyon tablosu.

	Boş tüp	Standart tüp	Örnek tüp
Reaktif 1 (mL)	1.0		
20 µmol/L GSH standart solüsyonu (mL)		1.0	
Süpernatant (mL)			1.0
Reaktif 2 uygulama solüsyonu (mL)	1.25	1.25	1.25
Reaktif 3 (mL)	0.25	0.25	0.25
Reaktif 4 uygulama solüsyonu (mL)	0.05	0.05	0.05
Tamamen karıştırılır ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. spektrofotometrede 420nm dalga boyunda her tüpün OD değerlerini ölçüldü.			

3.4.4. Sonuçların hesaplanması

1. Serum numuneleri için

GSH aktivitesi (mg GSH/L)

$$= \frac{OD_{örnek} - OD_{boş}}{OD_{standart} - OD_{boş}} \times \text{Standart derişimi (20} \times 10^{-3} \text{ mmol/L)} \times \text{GSH moleküler ağırlık (307)}$$

$\times$ Seyreltme faktörü (2) $\times$ Test edilmeden önce numunenin seyreltme faktörü

2. Doku homojenat örnekleri için

GSH aktivitesi (mg GSH/gprot)

$$= \frac{OD_{örnek} - OD_{boş}}{OD_{standart} - OD_{boş}} \times \text{Standart derişimi (20} \times 10^{-3} \text{ mmol/L)} \times \text{GSH moleküler ağırlık (307)}$$

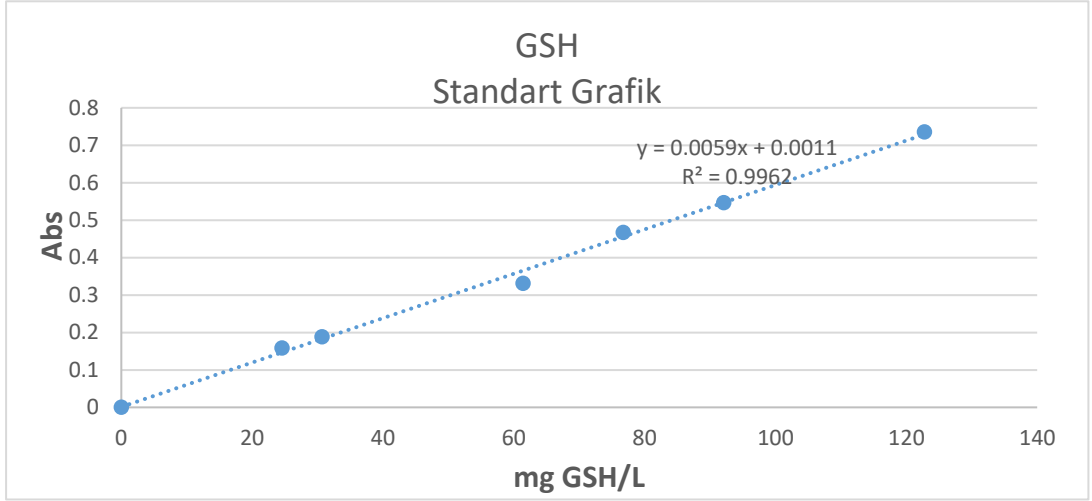
$\times$ Seyreltme faktörü (2) $\times$ Test edilmeden önce numunenin seyreltme faktörü

$\div$ Hemoglobindeki protein derişimi (gprot/L).

3.4.5. Standart seyreltme ve standart eğri

Standart seyreltme

1 mmol/L GSH (307mg GSH/L) standart solüsyonunu GSH standart uygulama solüsyonu ile bir seri derişimi vardır. Önerilen seyreltme derecesi aşağıdaki gibidir: 122.8, 92.1, 76.75, 61.4, 30.7, 24.56, 0 mg GSH/L.



Şekil 3.2: GSH standart grafiği

3.5. İstatistik

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism 9.3.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ardından posthoc Tukey testi kullanılarak belirlendi. Sonuç ortalama değer ve standart hata (SH) olarak ifade edildi. Farklar, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p = 0,001$ ve **** $p < 0,001$ ile istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. GSH bulguları

Toplanan akciğer doku örneklerinde, GSH seviyelerine bakıldığında, tolüen enjeksiyonu yapılmış deney grupla, serum fizyolojik ve etanol kontrol grupları karşılaştırıldığında %57 oranında anlamlı artış görüldü ($p<0,001$). Kontrol gruplarıyla tolüen+resveratrol 5mg/kg %40 oranında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı, 10mg/kg %57 oranında ve 20mg/kg %63 oranında önemli ölçüde artış görüldü ($p<0,001$).

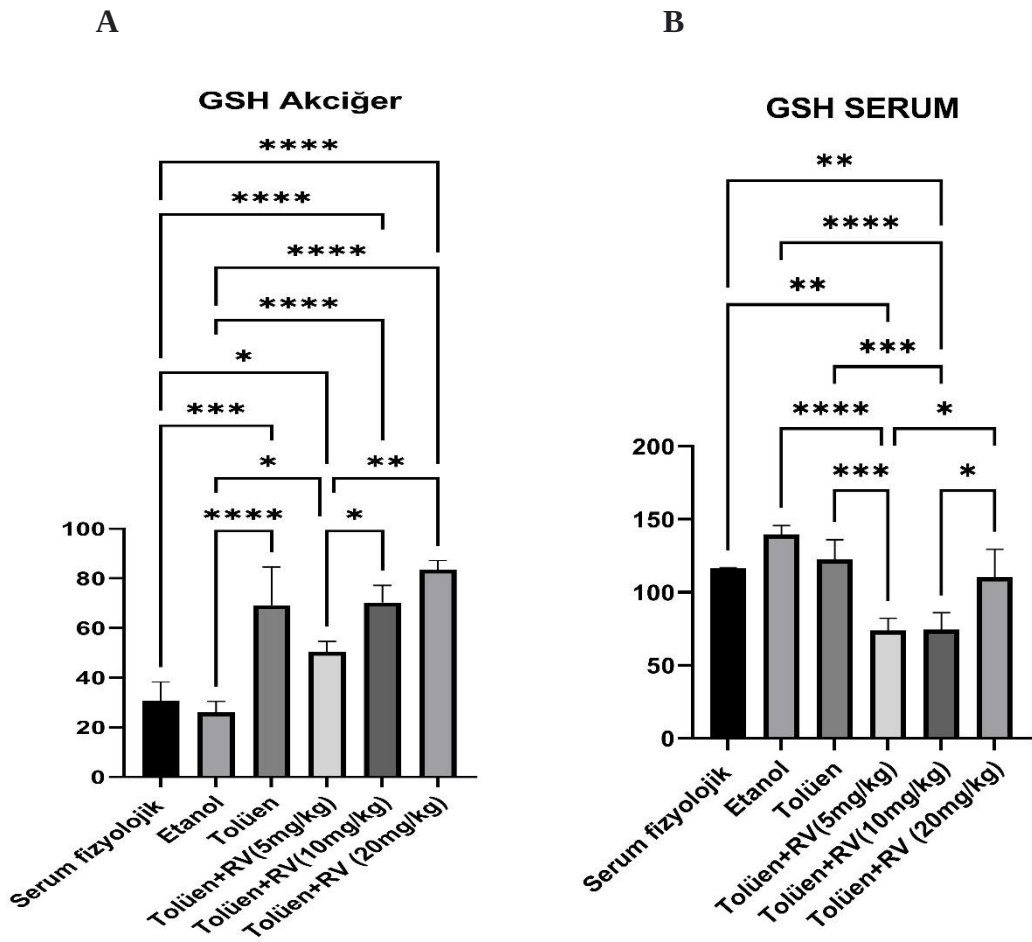
Tolüen ve tolüen+resveratrol 5mg/kg dozunda %28 oranında azalma görölse de resveratrol 10mg/kg dozunda anlamlı bir değişiklik görülmemekte, resveratrol 20mg/kg dozundaysa %18'lik istatistiksel olarak anlamsız artış görülmektedir ($p>0,05$).

Serum örneklerinde; serum fizyolojik kontrol grubuyla tolüen grubu karşılaştırıldığında %5 artış görülürken, etanol kontrol grubuyla tolüen deney grubu karşılaştırıldığında %12 azalma görüldü. Bu sonuçlarda anlamlı bir değişiklik olmadığı saptandı. Serum fizyolojik kontrol grubuyla tolüen+resveratrol (5mg/kg, 10mg/kg) %36 istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p<0,01$). Serum fizyolojik kontrol grubuyla tolüen+resveratrol (20mg/kg) grubu karşılaştırıldığında %5 azalma olsa da istatistiksel olarak anlamsız sonuçlar görüldü ($p>0,05$).

Etanol kontrol grubu ve tolüen + resveratrol (5mg/kg, 10mg/kg) %46'lık istatistiksel olarak önemli azalma görüldü ($p<0,001$). Etanol kontrol grubu ve tolüen + resveratrol 20mg/kg arasında %21'lik istatistiksel olarak anlamsız azalma görüldü. Tolüen ve tolüen+resveratrol (5mg/kg, 10mg/kg) grupları arasında %39'luk önemli ölçüde azalma görüldü ($p<0,001$). Tolüen+resveratrol (5mg/kg, 10mg/kg) gruplarıyla tolüen+resveratrol (20mg/kg) grubu arasında %32'lik istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0,05$). Akciğer ve serumdaki GSH seviyeleri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1 de gösterildi.

Çizelge 4.1. Akciğer ve serumdaki GSH seviyeleri (ortalama $\pm$ standart hata).

Gruplar	GSH Akciğer ($\mu\text{mol/L}$) Ort $\pm$ SH	GSH Serum ($\mu\text{mol/L}$) Ort $\pm$ SH
Kontrol serum fizyolojik	30.77 $\pm$ 7.55	116.59 $\pm$ 0.25
Kontrol etanol	26.00 $\pm$ 4.45	139.35 $\pm$ 6.57
Tolüen	69.19 $\pm$ 15.39	122.38 $\pm$ 13.64
Tolüen+Resveratrol (5 mg/kg)	50.32 $\pm$ 4.32	74.14 $\pm$ 8.07
Tolüen+Resveratrol (10 mg/kg)	70.32 $\pm$ 6.91	74.39 $\pm$ 11.68
Tolüen+Resveratrol (20 mg/kg)	83.43 $\pm$ 3.77	110.21 $\pm$ 19.36



4.1. Şekil: Akciğer (A) ve serumdaki (B) GSH seviyeleri. Farklar, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p = 0,001$ ve **** $p < 0,001$ ile istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.2. MDA bulguları

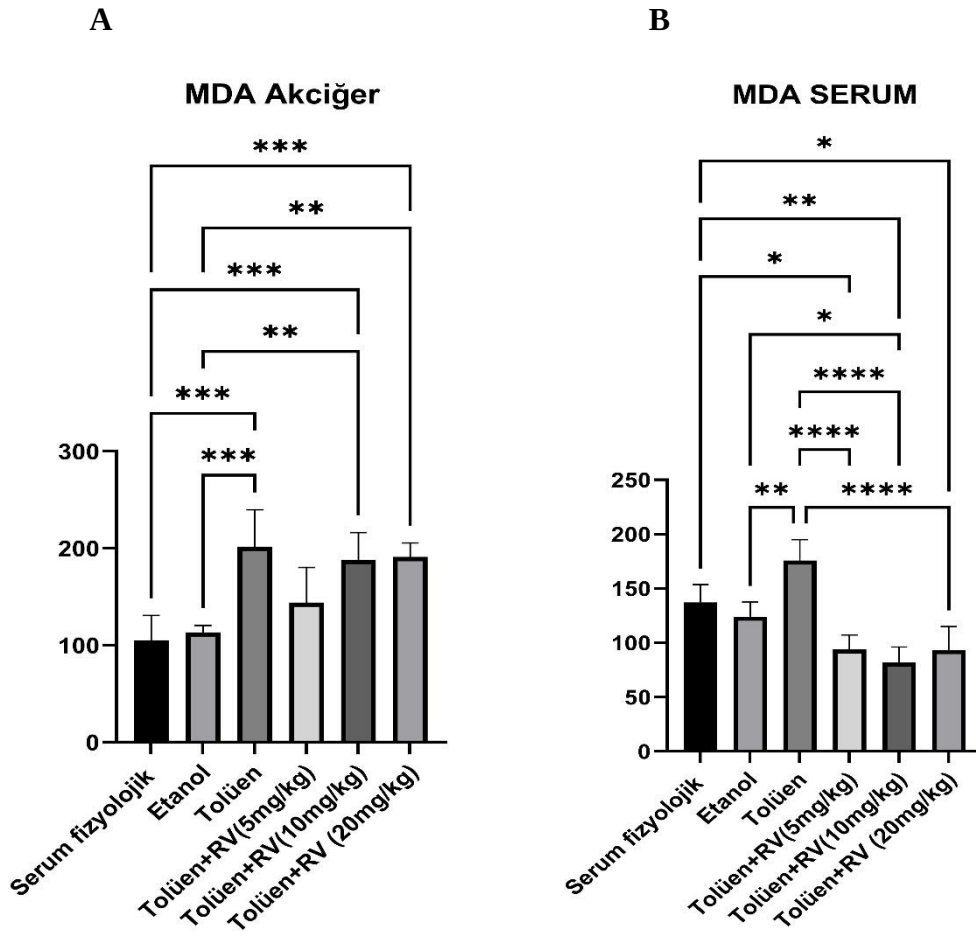
Toplanan akciğer doku örneklerinde serum fizyolojik kontrol grubuyla tolüen grubu arasında %48 oranında, etanol grubu ve tolüen grubu arasındaysa %43 oranında önemli ölçüde artış görüldü ($p<0,001$).

Serum fizyolojik kontrol grubuyla tolüen+resveratrol 5mg/kg grubu arasında %35 oranında, etanol kontrol grubuyla tolüen+resveratrol 5mg/kg grubu arasındaysa %27 oranında artış görülse de istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Serum fizyolojik kontrol grubuyla tolüen+resveratrol 10mg/kg grubu arasında %44 oranında, tolüen+resveratrol 20mg/kg grubu arasında %45 oranında istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0,001$). Etanol kontrol grubuyla tolüen+resveratrol 10mg/kg grubu arasında %39 oranında, tolüen+resveratrol 20mg/kg grubunda karşılaştırıldığında %40 oranında istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p <0,01$).

Toplanan serum örneklerinde serum fizyolojik kontrol grubuyla tolüen grubu arasında %21 oranında artış olsa da istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görülmedi ($p>0,05$). Etanol kontrol grubuyla tolüen grubu arasında %29 oranında istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0,01$). Serum fizyolojik kontrol grubuyla, tolüen+resveratrol 5mg/kg grubu karşılaştırıldığında %31 oranında, 10mg/kg grubu karşılaştırıldığında %40 oranında ($p<0,01$), 20mg/kg grubu karşılaştırıldığında %32 oranında istatistiksel olarak anlamlı azlama görüldü ($p<0,05$). Etanol kontrol grubuyla, tolüen+resveratrol 5mg/kg grubu karşılaştırıldığında %24 oranında, 10mg/kg grubu karşılaştırıldığında %34 oranında, 20mg/kg grubu karşılaştırıldığında %25 oranında azalmalar görüldü. Resveratrolün 5mg/kg ve 20mg/kg gruplarında istatistiksel olarak anlamsız azlama olurken ($p>0,05$), resveratrol 10mg/kg grubunda istatistiksel olarak anlamlı azlama görüldü ($p<0,05$). Tolüen grubuyla, tolüen+resveratrol 5mg/kg grubu karşılaştırıldığında %46 oranında, 10mg/kg grubu karşılaştırıldığında %53 oranında, 20mg/kg grubu karşılaştırıldığında %46 oranında istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmalar görüldü ($p<0,001$). Akciğer ve serumdaki MDA seviyeleri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Akciğerde ve serumdaki MDA seviyeleri (ortalama $\pm$ standart hata).

Gruplar	MDA Akciğer ($\mu\text{mol/L}$) Ort $\pm$ SH	MDA Serum ($\mu\text{mol/L}$) Ort $\pm$ SH
Kontrol serum fizyolojik	104.88 $\pm$ 25.92	137.29 $\pm$ 16.30
Kontrol etanol	113.13 $\pm$ 7.25	124.06 $\pm$ 13.45
Tolüen	201.50 $\pm$ 38.35	175.63 $\pm$ 19.25
Tolüen+Resveratrol (5 mg/kg)	144.17 $\pm$ 36.22	94.06 $\pm$ 13.21
Tolüen+Resveratrol (10 mg/kg)	187.75 $\pm$ 28.64	81.72 $\pm$ 14.53
Tolüen+Resveratrol (20 mg/kg)	191.00 $\pm$ 14.51	93.44 $\pm$ 21.58



Şekil 4.2. Akciğer (A) ve serumdaki (B) MDA seviyeleri. Farklar, *p<0,05, **p<0,01, ***p=0,001 ve ****p<0,001 ile istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamız, kronik tolüen maruziyetinin vücuttaki, ROS oluşumunu, oksidatif stres artışını ve resveratrolün koruyucu özelliğini anlamayı amaçlamaktadır. Bunun için akciğer dokusunda ve serumda GSH ve MDA düzeyleri değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda yüksek doz tolüene maruz bırakılan hayvanların bazılarının maruziyet sonrası ölümlerini, tolüenin yüksek oranda toksik olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Akcan, Çekin, Hilal, Arslan (2010) yaptıkları çalışmada uçucu maddelerin sağlık üzerinde birçok zararlı etkileri olduğunu, uzun süreli ve yüksek dozlardaki maruziyetinin ölüme neden olabileceğini belirtmişlerdir. Tolüen enjeksiyonu yapıldıktan sonra hayvanlarda görülen dengesiz hareketler, gözlerinin kızarması, ağız ve burundaki kanamaların tolüenin toksik etkilerinden kaynaklandığını düşünüyoruz. Resveratrol verildikten sonra, ağız ve burundaki kanamaların kesildiği, hayvanların kontrollü hareketlerini geri kazandığı görüldü. Bu durum da resveratrolün koruyucu etkisinin devreye girdiğini düşündürmektedir. Tolüenin etkisi üzerine tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 2-3'cü saatler arasında hayvanlarda, kusma, bazı hayvanların ağız ve burun bölgelerinde kanama ve ayakta dengede duramama gibi postür bozuklukları görülmüştür (Çiçek ve Şişman 2017).

MDA bulgularına bakdığımız zaman (Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2) tolüen enjeksiyonunun MDA seviyelerini önemli ölçüde artırdığını görmekteyiz. Bunun nedeni olarak, tolüenin lipofilik olması özelliğiyle hücre duvarındaki lipid yapısını kolaylıkla bozarak proteinlerle etkileşime girebilmesi olduğunu düşünmekteyiz. Yapılan bir çalışmada tiner bağımlılığının akciğer ve karaciğer dokularında lipid peroksidasyonu üzerine etkisi araştırılmış, lipid peroksidasyon düzeyinde artış gözlenmiş, çalışma sonucunda kronik tiner inhalasyonu sonucunda ROS oluşumunun hızlanmasına bağlı olarak lipid peroksidasyon düzeylerinde artış olabileceği öne sürülmüştür (Ulakoğlu, Saygı, Gümüştas, Akkaya, Kökoğlu. 1998, s. 76).

Bir diğerk çalışmada, yüksek dozlarda toluene maruz kalmanın, ROS ve RNS oluşumuna yol açan oksidatif stresi indükleyerek, doğrudan doku hasarına ve çeşitli antioksidan sistemlerde etki ettiğigösterilmiştir (Choi, Trinh, Yang, Ye, Shin, ve diğerkleri, 2018).

Çalışmamızda aldığımız doku ve serum örneklerindeki GSH sonuçlarında, tolüenle muamele edilen grupta GSH seviyeleri farklılık göstermektedir (Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1). Organik çözücü ve sigaraya maruz kalan bir vücutta ROS ve serbest radikal türlerinin artarak kanser gibi hastalıklara sebep olduklarını, GSH gibi antioksidan maddelerin de, vücut dokularında biriken bu serbest radikalleri zararsız hale getirdiklerini ve bu da antioksidan tepkimelerinde azalmaya neden olduğubildirilmiştir (Park, Chang, Jung, Jung, Song ve diğerkleri, 2006). GSH, DNA'nın sentezinde, hasarlı parçaların onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin muhtemel hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Chavan, Sava, Saxena, Pillai, Sontakke ve diğerkleri 2005).

Resveratrol uygulaması sonrasında GSH ve MDA değerlerinde düşüş görüldü (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Bu değişimi resveratrol ROS'ları engelleyerek yaptığını düşmekteyiz. Yapılan bazı çalışmalar resveratrolün oksidatif stres zamanı oluşan hücresel hasarı ve apoptozu önleyerek O_2^- anyonlarını, ROS'u ve H_2O_2 'i hücrelerden uzaklaştırmada oldukça güçlü bir etkiye sahip olduğubelirtilmiştir (Das ve Maulik, 2006, s.39, Bircan ve Merhan 2020, s. 218).

Tolüenin GSH ve MDA'nın akciğerk ve serumdaki düzeylerini artırdığı gözlemledik. Bu artışın tolüenin oluşturduğuk oksidatif stresin, neden olduğuk lipid peroksidasyonun artmasından kaynaklanabilir. Akciğerk doku örneklerine bakdığımız zaman kontrol gruplarıyla deney grupları arasında anlamlı fark olsa da tolüen ve tolüen+resveratrol enjeksiyonlarında GSH değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmemektedir. Serum örneklerinde ise yapılan tolüen ve tolüen+resveratrol'ün (5mg/kg, 10mg/kg) doz enjeksiyonlarının anlamlı bir değişiklik oluşturduğuknı görmekteyiz. Tolüen ve tolüen+resveratrol enjeksiyonları serumdaki GSH aktivitesini anlamlı ölçüde değiştirmiştir. Bu değişimleri şekil 4.1 de görebiliriz. Bu sonuçlara bakıldığında resveratrolün yüksek dozlarının akciğerk dokusundaki GSH aktivitesini indüklediğini

görmekteyiz (Şekil 4.1). Ortamdaki antioksidan miktarının fazlalaşması ROS miktarını azaltır. Serbest radikallerin temizlenmesi lipid peroksidasyonunu yavaşlatır. Bu da lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA seviyesinin azalmasına neden olabilir (Şekil 4.2).

MDA seviyelerine baktığımızda, kontrol gruplarıyla tolüen enjeksiyonu yapılan grupların, akciğer dokusundaki MDA seviyesini yükselttiğini görüyoruz. Serum örneklerinde ise tam tersi bir durum görülmektedir, tolüen ve tolüen+resveratrol gruplarının arasında yüksek fark vardır. Bu değişimleri şekil 4.2 de görebiliriz.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, oksidatif stres ve antioksidan aktivitelerinin değişimi üzerinde resveratrolün koruyuculuğunun olduğunu söyleyebiliriz. Tolüen maruziyetinin akciğer dokusunda ve serumda MDA seviyesini, akciğer dokusundaysa GSH seviyesini artırdığı sonucuna varıldı. Tolüen+resveratrol uygulaması da serum örneklerinde GSH ve MDA değerlerini azaltırken, akciğer doku örneklerinde herhangi bir anlamlı değişiklik görülmedi. Bu da resveratrolün koruyucu etkisini ve GSH düzenlemedeki etki mekanizmasını tanımlamak için daha detaylı araştırmalara gerek olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Akcan, R., Çekin, N., Hilal, A., Arslan, M.M. (2010). Gençlerde uçucu madde soluma sonucu ani ölüm: Olgu sunumu. *Dicle Tıp Dergisi*, 37(2): 154-156.
- Alkan, R. (2007). Doğal bitki antibiyotiği: resveratrol. Kocaeli Üniversitesi, Köseköy Meslek Yüksekokulu, Fermentasyon Bölümü. *Gıda Dergisi* 32(5): 259-262.
- Anonim, (1986). Toluene. Environmental Health Criteria, International Programme on Chemical Safety (IPCS). Yayın no: 52, 1986, Geneva.
- Anonim (2005). Toxicological review of Toluene. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). U.S. Environmental Protection Agency Washington D.C.
- Anonim (2014). Acute exposure guideline levels for selected airborne chemicals. National Research Council, Washington D.C.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, And Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Ayala, A., Munoz, M. F., Arguelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, And Signaling Mechanisms Of Malondialdehyde And 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 360438.
- Balya, AS., Tu Y., Carpenter-Hyland, EP., Chandler, LJ., Woodward JJ. (2005). Kötüye kullanılan inhalan toluene maruz kalmayı takiben hipokampal nöronlarda glutamaterjik ve gabaerjik iyon kanalı aktivitesinde değişiklikler. *Sinirbilim*; 130 (1):197–206.
- Baur, J. A., Sinclair, D. A., (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5 (6), 493-506.
- Benignus, V. A. (1981). Health Effects Of Toluene: A Review. *Neurotoxicology*, 2(3), 567-588.
- Bircan, C. I., ve Merhan, O. (2020). Kadmiyum Uygulanan Farelerde Oluşturulan Oksidatif Strese Karşı Resveratrolün Koruyucu Etkisinin Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(3), 215-220.
- Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:1482-1495.
- Champe, PC., Harvey, RA., (1997). Glikozaminoglikanlar. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E., Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 147-156.
- Chavan S., Sava, L., Saxena, V., Pillai, S., Sontakke A., Ingole, D. (2005). Reduced glutathione: Importance of specimen collection *Indian J Clin Biochem* 20 (1): 150-2.
- 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). doi.org/10.1038/s12276-018-0085-2.
- Cohr, K. H., Stockholm, J. (1979). Toluene: A Toxicologic Review. *Scandinavian Journal Of Work, Environment ve Health*, 71-90.
- 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. doi.org/10.4303/jdar/235840.

- Çiçek, M. ve Şişman, T. (2017). Akut Tolüen Maruziyetinin Tavşan Beyin Korteksinde Yol Açtığı Toksik Etkiler. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1), 33-38.
- Das, DK., Maulik, N. (2006). Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv*; 6(1): 36-47.
- Delmas, D., Aires, V., Limagne, E., Dutartre, P., Mazué, F., Ghiringhelli, F., Latruffe, N. (2011). Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1215 (1), 48-59.
- Donald, J. M., Hooper, K., ve Hopenhayn-Rich, C. (1991). Reproductive And Developmental Toxicity Of Toluene: A Review. *Environmental Health Perspectives*, 94, 237-244.
- Esterbauer, H., Cheeseman, KH. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, 186:407- 421.
- Esterbauer, H., Schaur, RJ., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*.11:81-128.
- Filley, C. M., Halliday, W., ve Kleinschmidt-Demasters, B. K. (2004). The Effects Of Toluene On The Central Nervous System. *Journal Of Neuropathology ve Experimental Neurology*, 63(1), 1-12.
- Finaud, J., Lac G., Filaire E. (2006). Oxidative Stress. *Sports Medicine*, 36(4), 327-358.
- Fischman, C. M., Oster, J. R. (1979). Toxic Effects Of Toluene: A New Cause Of High Anion Gap Metabolic Acidosis. *Jama*, 241(16), 1713-1715.
- Flanagan, R. J., Streete, P. J., ve Ramsey, J. D. (1991). Volatile Substance Abuse. *The International Handbook Of Addiction Behaviour*, 100-106.
- Franck, H. G., Stadelhofer, J. W. (1988). Production And Uses Of Toluene Derivatives. In *Industrial Aromatic Chemistry* (236-264). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fremont, L., (2000). Biological effects of resveratrol, *Life Sci.*, 66 (8), 663-673.
- Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 57(9-10), 453-455.
- Girotti, AW. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J Lipid Res*. 39:1529-1542.
- 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. doi.org/10.1002/jat.1435.
- Gönenç, A., Ozkan, Y., Torun, M. (2001). Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *J Clin Pharm Ther* 26(2):141-144. doi:10.1046/j.1365-2710.2001.00334.
- Greenberg, M. M. (1997). The central nervous system and exposure to toluene: a risk characterization. *Environmental research*, 72(1), 1-7.
- Gupta, RK., Patel, AK., Shah, N., Chaudhary, AK., Jha, UK., Yadav, UC., Gupta, PK., Pakuwal, U., (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 15:4405-4409.
- Gutteridge, JM. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 41. 1819-1828.
- Hariz, R., Del Rio Sanz, J. I., Mercier, C., Valentin, R., Dietrich, N., Mouloungui, Z., Hébrard, G. (2017). Absorption Of Toluene By Vegetable Oil–Water Emulsion In Scrubbing Tower: Experiments And Modeling. *Chemical Engineering Science*, 157, 264-271.

- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R., (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 51-88.
- Hocaoğlu, N. (2018). Organofosfatlı bileşiklerle akut zehirlenme tedavisinde resveratrolün koruyucu etkisi (Doctoral dissertation, Anadolu University. Turkey).
- Hopkins, F.G. (1929). On glutathione: a reinvestigation. *J. Biol. Chem.* 84: 269-320.
- IARC. (1985). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 36, Allyl Compounds, Aldehydes, Epoxides and Peroxides, Lyon, 163–177.
- Kanner, J., German, J.B., Kinsella, J.E. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 25:317-364. 20.
- Kobald, S.O., Wascher, E., Blaszkewicz, M., Golka, K., Thriel, C. (2015). Neurobehavioral and neurophysiological effects after acute exposure to a single peak of 200 ppm toluene in healthy volunteers. *NeuroToxicology*, 48: 50-59.
- Kurutaş, E. B. (2015). 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.
- Leifert, W.R., Abeywardena, M.Y. (2008). Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr Res*; 28: 729–37.
- Mattia, C.J., Le Bel, C.P., Bondy, S.C. (1991). Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol*, 42: 879-882.
- Mc Gill, M.R., Du, K., Weemhoff, J.L., Jaeschke, H. (2015). Critical review of resveratrol in xenobiotic-induced hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 86:309–318.
- Meister, A., ve Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
- Navarro, A., Boveris, A. (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287:1244-1249.
- Newman, L. A., Reynolds, C. M. (2005). Bacteria And Phytoremediation: New Uses For Endophytic Bacteria In Plants. *Trends In Biotechnology*, 23 (1), 6-8.
- Newsholme, P., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Carlessi, R., ve De Bittencourt Jr, P. I. H. (2016). Molecular Mechanisms Of Ros Production And Oxidative Stress In Diabetes. *Biochemical Journal*, 473(24), 4527-4550.
- Noh, H., Ha, H. (2011). Reactive Oxygen Species And Oxidative Stress. Karger Publishers. In *Diabetes And The Kidney* (170, 102-112).
- Ozokwelu, E. D. (2014). Toluene. *Kirk-Othmer Encyclopedia Of Chemical Technology*. ISBN; 978-047152688-9
- Park, J.J., Chang, H., Jung, J.Y., Jung, S.J., Song, K.H., Suh, W.N. (2006). A Case of Toluene-induced Renal Tubular Acidosis Presented with Hypokalemic Paralysis. www.jksem.org. 17(6), 656-658.
- Pellegrini, N., Miglio, C., Del Rio, D., Salvatore, S., Serafini, M., Brighenti, F. (2009). Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int J Food Sci Nutr* 60 (Suppl 2): 12–22.
- Pryor, W.A. (1989). On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radic Biol Med*, 7:177- 178.
- Rushworth, G. F., ve Megson, I. L. (2014). Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology ve therapeutics*, 141(2), 150-159.

- Sies, H., Berndt, C., Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review Of Biochemistry*, 86, 715-748.
- Slooff, W., Blokzijl, P.J. 1988. Integrated criteria document toluene. National Institute of Public Health and Environmental Protection. 75847310 nolu rapor, Bilthoven.
- Song, Y., Chen, S., Luo, F., Sun, L. (2020). Absorption Of Toluene Using Deep Eutectic Solvents: Quantum Chemical Calculations And Experimental Investigation. *Industrial ve Engineering Chemistry Research*, 59(52), 22605-22618.
- 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. doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113406.
- Storz, G., Imlay, J. A. (1999). Oxidative Stress. *Current Opinion In Microbiology*, 2(2), 188-194.
- Soleas, G.J., Tomlinson, G., Diamandis, EP. ve Goldberg, DM. (1997). Relative Contributions of Polyphenolic Constituents to the Antioxidant Status of Wines: Development of a Predictive Model *J. Agric. Food Chem.* 45, 10, 3995–4003. doi.org/10.1021/jf9702959.
- Taş, U., Ögetürk, M., Meydan, S., Sapmaz, H.I., Dabak, D.Ö., Kuloğlu, T., Sarsılmaz, M. (2009). Tolüen solutulan sıçanların karaciğerinde ghrelin ekspresyonu. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.*, 23(3): 151-154.
- Toftgard, R., Gustafsson, J.A. (1980). Biotransformation of organic solvents: A review. *Scand. J. Work Environ.*, 6: 1-18.
- Toros, A.B., Yaşar, B., Özel, L., Kılıç, G. (2013). Histopathological changes in the rat liver exposed to chronic thinner inhalation. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 12(3): 95-99.
- Tsuruta, H. (1996). Skin Absorption Of Solvent Mixtures Effect Of Vehicles On Skin Absorption Of Toluene. *Industrial Health*, 34(4), 369-378.
- Ulakoğlu, Z., E., Saygı, A., Gümüştas, M.K., Zor, E., Akkaya, A., Kökoğlu, E. (1998). The effect of chronic thinner inhalation on lipid peroxidation in rat lung and liver. *Cerrahpaşa J. Med.*, 29(2): 75-78.
- 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. doi.org/10.1111/bph.13492.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmet BARAT
Doğum Yeri ve Tarihi : Azerbeycan, Saatlı, 04 Temmuz 1996
Yabancı Dil :

Eğitim Durumu
Lise : Osman Mirzeyev adına Saatlı il liseyi
Lisans : Bakü Mühendislik Üniversitesi
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Çalıştığı Kurum/Kurumlar :

İletişim (e-posta) : Ahmet.baratov@mail.ru

Yayınları :