TOLUENİN TOKSİSİTESİNE KARŞI RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİSİNİN DETOKSİFİKASYON ENZİMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Behesht FARAHİ

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOLUENİN TOKSİSİTESİNE KARŞI RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİSİNİN DETOKSİFİKASYON ENZİMLERI İLE ARAŞTIRILMASI

Behesht FARAHİ

Prof. Dr. Ferda ARI
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2023

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOLUENİN TOKSİSİTESİNE KARŞI RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİSİNİN DETOKSİFİKASYON ENZİMLERI İLE ARAŞTIRILMASI

Behesht FARAHİ

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Toluen, plastik üretimi, kimyasal sentez ve benzin üretimi dahil olmak üzere birçok endüstriyel proseste yaygın olarak kullanılan organik bir çözücüdür. Toluenin metabolizması sonucu reaktif oksijen veya nitrojen türleri üretilmektedir. Resveratrol üzüm, çilek ve yer fıstığı gibi bitkilerde bulunan bir polifenolik fitoksindir. Resveratrol anti-inflamatuar, anti-kanser ve antioksidan gibi özelliklere sahiptir. Aynı zamanda apoptozun hücre döngüsünün ve anjiyogenezinin düzenlenmesi gibi durumlarda önemli rolleri vardır. Asetilkolinesteraz (AChE), merkezi sinir sisteminde nöromüsküler kavşaklarda ve kolinerjik sinapslarda bulunan önemli bir enzimdir. Asetilkolin, AChE tarafından kolin ve asetata hidrolize edilmektedir. Katalaz (CAT) endojen bir antioksidan olarak hücre içi organellerde bulunan bir enzimdir. CAT hücresel aktivasiyonlar sırasında oluşan hidrojen peroksitin etkisini ortadan kaldırmak için su ve oksijen dönüşümünü gerçekleştirmektedir. Glutatyon S-Transferaz (GST) ksenobiyotik metabolizmada önemli olan bir enzimdir. Detoksifikasyon, hücre sinyalizasyonu, anti-apoptotik aktivite, anti- ve pro-inflamatuar yanıtlar olmak üzere çeşitli hücresel faaliyetleri rol oynamaktadır.

Bu tez çalışmasında, beyin dokusunda toluen maruziyetine karşı resveratrolün koruyucu etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda beyin dokusunda hücresel antioksidan enzimlerin (CAT, GST) ve AChE aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmamızda, 250-350 gram ağırlığında Wistar Albino erkek sıçanlar (36 adet) kullanılmıştır. Sıçanlara altı gün boyunca 900 mg/kg dozunda toluen ve resveratrol (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) intraperiteonal yolla uygulanmıştır. Kontrol grubundaki sıçanlara ise serum fizyolojik ve %10'luk etanol aynı yöntemle verilmiştir. Altıncı günün sonunda hayvanlar disekte edilerek beyin dokusunda AChE, CAT ve GST aktiviteleri araştırılmıştır.

Sonuç olarak, beyin dokusunda toluen maruziyetinin AChE, CAT ve GST enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre bir artışlar gözlenmiştir. Fakat toluenle birlikte resveratrol uygulaması sonrasında AChE, CAT ve GST aktivitelerinde azalmalar gözlenirken, resveratrolün toluen toksisitesine karşı koruyucu rolü olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Toluen, Resveratrol, AChE, CAT, GST

2023, vii + 58 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF RESVERATROL AGAINST TOLUENE TOXICITY WITH DETOXIFICATION ENZYMES

Behesht FARAHİ

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

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

Toluene is an organic solvent widely used in many industrial processes, including plastic production, chemical synthesis, and gasoline production. As a result of the metabolism of toluene, reactive oxygen or nitrogen species are produced. Resveratrol is a polyphenolic phytoxin found in plants such as grapes, strawberries and peanuts. Resveratrol has properties such as anti-inflammatory, anti-cancer and antioxidant. At the same time, has important roles in the regulation of the cell cycle, apoptosis and angiogenesis. Acetylcholinesterase (AChE) is an important enzyme found at neuromuscular junctions and cholinergic synapses in the central nervous system. Acetylcholine is hydrolyzed by AChE to choline and acetate. Catalase (CAT) is an enzyme found in intracellular organelles as an endogenous antioxidant. CAT converts water and oxygen to counteract the effect of hydrogen peroxide generated during cellular activations. Glutathione S-Transferase (GST) is an enzyme that is important in xenobiotic metabolism. Various cellular activities play a role in detoxification, including cell signaling, anti-apoptotic activity, anti- and pro-inflammatory responses.

In this thesis study, it is aimed to determine the protective effect of resveratrol against toluene exposure in brain tissue. For this purpose, the activities of cellular antioxidant enzymes (CAT and GST) and AChE in brain tissue were determined. In our study, Wistar Albino male rats weighing 250-350 grams (36 pieces) were used. Rats were administered toluene and resveratrol (5 mg/kg, 10 mg/kg and 20 mg/kg) intraperitheonally at a dose of 900 mg/kg for six days. Rats in the control group were given saline and 10% ethanol by the same method. At the end of the sixth day, the animals were dissected and AChE, CAT and GST activities were investigated in the brain tissue.

As a result, an increase in AChE, CAT and GST enzyme activities of toluene exposure in brain tissue was observed compared to the control group. However, after resveratrol administration with toluene, decreases in AChE, CAT and GST activities were observed, while resveratrol showed its protective role against toluene toxicity.

Key words: Toluene, Resveratrol, AChE, CAT, GST

2023, vii + 58 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince benden maddi ve manevi desteklerini esirgemedikleri için aileme içtenlikle minnettarım.

Bu süreçte danışmanlığımı yapan, Türkiye'de akademik yolculuğum boyunca her zaman benimle paylaştığı bilgi ve deneyimler, gösterdiği sabır, anlayış ve destek için değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ferda ARI'ya, teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan ve sabırla destek veren Sayın Doç. Dr. Egemen DERE hocama ve kıymetli Emine Gonca PEKEL'e, teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Bursa Uludağ Üniversitesi Kanser Araştırma Laboratuvarı (BUMKAL) ailesine yüksek lisans öğrenci hayatıma bana destek veren arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
Yüksek Lisans Tezi i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 4
2.1. Toluen 4
2.1.1. Toluen nedir? 4
2.1.2. Toluenin kullanım alanları ve etkileri 5
2.1.3. Toluenin toksikokinetiği 6
2.2. Resveratrol 8
2.2.1. Resveratrolün genel özellikleri ve kullanım alanları 8
2.2.2. Resveratrol absorbsiyonu ve metabolizması 9
2.3. Kolinerjik Sinir Sistemi 10
2.3.1 Asetilkolin (ACh) Biyosentezi 11
2.3.2. Asetilkolin (ACh) taşıması ve reseptörleri 11
2.3.3. Nikotinik ACh Reseptörleri (nAChRs) 11
2.3.4. Muskarinik ACh Reseptörleri (mAChRs) 12
2.4. Asetilkolin esteraz (AChE; EC 3.1.1.7) 13
2.4.1. Kolinesteraz ailesi (ChEs) 13
2.4.2. AChE'nin Genel Özellikleri 14
2.5. Reaktif oksijen ve azot türleri (RONS), Oksidatif stres ve Antioksidanlar 16
2.5.1. Reaktif oksijen ve azot türleri (RONS) 16
2.5.2. Oksidatif stres ve Antioksidanlar 19
2.5.3. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) 21
2.5.4. Glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) 21
3. MATERYAL ve YÖNTEM 24
3.1. Materyal 24
3.1.1. Kimyasal maddeler 24
3.1.2. Sarf malzemeler 24
3.1.3. Cihazlar 25
3.2. Yöntem 25
3.2.1. Deney hayvanları 25
3.2.2. Tolüen maruziyetinin gerçekleştirilmesi ve resveratrol uygulaması 25
3.2.3. Beyin doku örneklerinin toplanması 26
3.2.4. Proteinlerin BCA Yöntemi ile konsantrasyonlarının ölçülmesi 26
3.2.5. Asetilkolin Estereaz (AChE) Aktivite Ölçümü 27
3.2.6. Katalaz (CAT) Aktivite Ölçümü 28
3.2.7. Glutatyon S-transferaz (GST) Aktivite Ölçümü 30
3.2.8. İstatistiksel Analiz 31
4. BULGULAR 33
4.1. Beyin Dokularında Asetilkolin estereaz (AChE) Aktivitesi 34
4.2. Beyin Dokularında Katalaz (CAT) Aktivitesi 35
4.3. Beyin Dokularında Glutatyon S transferaz (GST) Aktivitesi 37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 39
KAYNAKLAR 44
ÖZGEÇMİŞ 58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
AC	Adenil siklaz
ACh	Asetilkolinin
AChE	Asetilkolinesteraz
AsetilCoA	Asetil-koenzim A
ATCI	Asetilkolin iyodür
CAT	Katalaz
CDNB	1- kloro-2,4-dinitrobenzen
ChAT	Kolin Asetiltransferaz
ChAT	kolin asetiltransferaz
ChE	Kolinesteraz
CoA	Asetil-koenzim A
DTNB	5,5´-Dithiobis (2-Nitro-Benzoik asit)
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSS	Glutatyon sentetaz
GST	Glutatyon S-transferaz
K_2HPO_4	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
KH_2PO_4	Potasyum Dihidrojen Fosfat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
SOD	Süperoksit dismutaz

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1.	Toluenin kimyasal ve fiziksel özellikleri	4
Çizelge 2.2.	Toluen maruziyetinin etkileri	5
Çizelge 2.3.	Radikal ve radikal olmayan oksijen metabolitleri	17
Çizelge 2.4.	Reaktif azot metabolitleri	17
Çizelge 2.5.	Endojen oksidanların tepkimleri.	20
Çizelge 3.1.	AChE aktivite ölçümünde uygulanan deneysel işlemleri	28
Çizelge 3.2.	CAT aktivite ölçümünde uygulanan deneysel işlemleri	29
Çizelge 3.3.	GST aktivite ölçümünde uygulanan deneysel işlemleri	30
Çizelge 4.1.	Toluen ve Toluen + Resveratrol kombinasyonunun sıçan beyin dokularında AChE, CAT ve GST özgül aktivitelerine etkisi	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Toluenin kimyasal yapısı 4
Şekil 2.2. Resveratrolün kimyasal yapısı cis (A) ve trans (B)..... 9
Şekil 2.3. AChE mekanizması..... 9
Şekil 2.4. AChE bağlanma bölgeleri..... 15
Şekil 3.1. Protein standart eğri grafiği..... 27
Şekil 4.1. Toluen ve toluen+resveratrol kombinasyonunun sıçan beyin dokularında AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi……. 35
Şekil 4.2. Toluen ve toluen+resveratrol kombinasyonunun sıçan beyin dokularında CAT enzim aktivitesi üzerine etkisi……. 36
Şekil 4.3. Toluen ve toluen+resveratrol kombinasyonunun sıçan beyin dokularında GST enzim aktivitesi üzerine etkisi…… 38

1. GİRİŞ

Toluen (Toluol, Metilbenzen ve Fenilmetan), plastik üretimi, kimyasal sentez ve benzin üretimi dahil olmak üzere birçok endüstriyel proseste yaygın olarak kullanılan organik bir çözücüdür. Toluen, uçucu bir sıvı (yani, oda sıcaklığında buharlaşır), kasıtlı olarak saf formdan veya çok sayıda ticari üründen (örneğin, çözücüler, benzin, boyalar, vernikler, boya incelticiler, yapıştırıcılar, mürekkepler, gibi ürünler) solunduğunda psikoaktif etkiler üretir (Balster ve diğerleri, 2009).

Bireyler, ev/okul ürünlerini kullandıklarında veya arabayı benzinle doldurduklarında düşük toluen konsantrasyonlarına maruz kalabilirler, ancak bu maruz kalımlar genellikle iyi havalandırılan alanlarda gerçekleştirildiğinde önemli sağlık riskleri oluşturmaz. Fabrikalar, atölyeler veya rafineriler gibi işyerlerinde mesleki maruziyet genellikle haftada beş gün, günde birkaç saat gerçekleşir. Fizyolojik ve davranışsal olumsuz sonuçları önlemek için düzenlemeler mevcuttur. Ülkeler arasında farklılık gösterse de güvenli maruz kalma sınırları genellikle 10-100 ppm aralığındadır. Yaşam ve sağlık için hemen tehlikeli olan sınırın 500 ppm olduğu tahmin edilmektedir (Occupational Safety and Health Administration [OSHA], 2013).

Toluen akciğerlerden hızla emilir. Hem de gastrointestinal ve dermal emilim de oluşur. Emildikten sonra, yüksek oranda perfüze edilir ve lipit bakımından zengin organlara dağıtılır. Lipitler için yüksek afinitesi nedeniyle, toluen beyin kan bariyerini ve plasentayı kolayca geçebilir. Beyindeki perfüzyon çok yüksek olduğu için bu bölgede beynin toluen konsantrasyonu da yüksektir (Cruz ve digerleri, 2014). Solunan toluenin çoğu karaciğerde sitokrom P450 (CYP) ve Glutatyon S-transferaz (GST), organik hidroperoksitlerin, lipit peroksitlerin ve elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksikasyon yeteneğine sahip enzimler tarafından metabolize edilir (Kodavanti ve digerleri, 2011).

Resveratrol (3,5,4’-trihidroksi-trans-stilben), bir etilen köprüsü ile birbirine bağlı iki fenol halkasına sahip polifenollerin stilbenoidler grubuna aittir. Resveratrol’ün suda düşük miktarı (<0,05 mg/ml çözünürlüğe), etanolda (50 mg/ml) veya organik çözücülerde kolayca çözülebilir. Bu doğal polifenol, yetmiş'ten fazla bitki türünde ve çeşitli insan gıdalarında tespit edilmiştir. Resveratrol doğal bir gıda bileşeni olarak antioksidan, kardiyoprotektif, nöroprotektif, antienflamatuar ve antikanser aktiviteleri de dahil olmak

üzere çok çeşitli biyolojik özelliklere sahiptir. Resveratrol'ün antioksidan özellikleri, hücreleri hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif strese karşı korumak için faydalı etkilere sahiptir (Salehi ve diğerleri, 2018). Beyin, ağırlık bazında en yüksek oksijen tüketim oranlarından birine sahip aerobik bir organdır. Bu nedenle, radikallerin oksidatif hasarına daha duyarlı doku olarak tanımaktadır (Haider ve diğerleri, 2014).

Asetilkolinesteraz (AChE), kolinesteraz ailesi ait sinaptik bölgede bulunan asetilkolinin (ACh) aktivite ve sinaptik iletimini sonlandırmak için önemli bir enzimdir (Daniels, 2007). Bu enzimi ortadan kaldıran veya inhibe eden herhangi bir işlem sinaps içindeki aktivite, beyindeki ACh birikiminde belirgin bir artışa neden olur. Bu inhibasyon ACh'ın muskarinik ve nikotinik reseptörleri stimülasyonuna neden olur.

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, canlı organizmalar için aerobik yaşam tarzının doğal bir sonucudur. ROS, en az bir eşleşmemiş elektrona sahip oksijen türevleridir. Böylece, hücre yapısıyla kolayca reaksiyona girer. Bu reaktif molüküller Küçük miktarlarda birçok hücresel mekanizmayı olumlu yönde etkiler, ancak aşırı miktarda oksidatif stres oluşumundan sorumludur. Oksidatif stress ise hücre mekanizmasını bozar ve çeşitli hücresel hasarlar sebep olur. Redoks homeostazını korumak için ROS'un organizmalar üzerindeki olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılması, antioksidanlar sayesinde mümkündür (Habig ve diğerleri, 1974).

Katalaz (CAT) bilinen en eski ve ilk keşfedilen antioksidan enzim, hidrojen peroksit (H_2O_2) metabolizmasına girer onu suya ve oksijene ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O+O_2$) yüksek verimlilikle parçalayarak hücre oksidatif hasarını önlemeye anahtar bir enzimdir (Alfonso-Prieto ve diğerleri, 2009).

Glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyonun (GSH) ksenobiyotikler ve metabolitleri ile konjugasyonunu katalize eden çok yönlü bir detoksifiye edici ve antioksidan enzimlerinden biridir (Habig ve diğerleri, 1974).

Bu tez çalışmasında, beyin dokusunda toluen maruziyetine karşı resveratrolün koruyucu etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda beyin dokusunda hücresel antioksidan enzimlerin (CAT ve GST) ve ACh katalize edilen enzim olan AChE enziminin aktiviteleri araştırılmıştır.

Sıçanlara beyin dokusunda AChE aktivitesinin uygulanan toluen maruziyeti sonrasında kontrol gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olduğunu gözlenmiştir ($p<0,001$). Benzer şekilde toluen+resveratrol 5 mg/kg uygulamasında toluen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlığı ve toluen toksisitesine karşı koruyucu olarak bulunmuştur ($p<0,01$). CAT aktivitesinin toluen maruziyeti sonrasında kontrol gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yükseldiği belirlemiştir ($p<0,001$). Toluen ile birlikte resveretrol uygulanan gruplar (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg), CAT aktivitesinin toluen grubuna göre azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlığı ($p<0,001$) gözlenmiştir. Bu durum resveratrolün toluen toksisitesine karşı koruyucu rolünü göstermektedir. GST aktivitesinin toluen maruziyeti sonrasında kontrol gruplara göre artığı ve istatistiksel olarak anlamlığı bulunmuştur ($p<0,001$). Benzer şekilde toluen+ resveratrol gruplarında (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) toluen gruplarına göre anlamlı bir azalma gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Bu durum resveratrolün toluen toksisitesine karşı koruyucu rolünü göstermektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

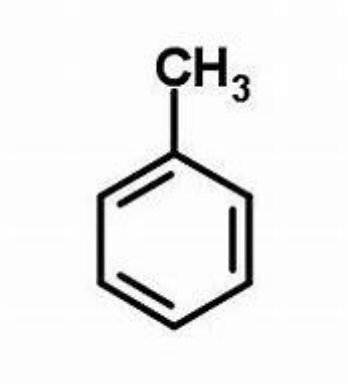
2.1. Toluen

2.1.1. Toluen nedir?

Toluen (toluol, metilbenzen ve fenilmetan) aromatik hidrokarbon olarak sıvı formunda sudan daha hafif, ancak buhar şeklinde havadan üç kat daha ağır, lipitler için yüksek afiniteye sahip organik bir çözücü tanımlanmaktadır (ATSDR, 2013). Toluen, metil grubuna bağlı bir benzen halkasından oluşan aromatik bir hidrokarbondur (Şekil 2.1). Toluenin kimyasal ve fiziksel özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Toluenin kimyasal ve fiziksel özellikleri (Cruz ve diğerleri, 2014).

Özellik	**Bilgi**
Kimyasal adı	Toluen
Kimyasal formül	C_7H_8
Molekül ağırlığı	92,13 g/mol
Kaynama noktası	110,6 ºC
Erime noktası	-95 ºC
Buhar basıncı	28,4 mmHg
Fiziksel durum	Renksiz, Yanıcı sıvı
Parlama noktası	4,4 ºC



Şekil 2.1. Toluenin kimyasal yapısı (Cruz ve diğerleri, 2014).

2.1.2. Toluenin kullanım alanları ve etkileri

Toluen organik bir çözücü olarak plastik üretiminde, kimyasal sentezinde ve benzin üretimi dahil olmak üzere birçok endüstriyel süreçte yaygın şekilde kullanılmaktadır. Toluen uçucu bir sıvı (oda sıcaklığında buhar haline gelir) olarak saf formda veya çok çeşitli ticari üründen (örneğin; çözücüler, benzin, boyalar, vernikler, boya incelticiler, yapıştırıcılar, mürekkepler ve benzeri) geldiğinde solunduğunda psikoaktif etkiler üretmektedir (Balster ve diğerleri, 2009). Bu uçucu maddeler, aynı zamanda alifatik gibi çeşitli kimyasallar: hidrokarbonlar (propan, bütan), aromatik hidrokarbonlar (ksilen, benzen), esterler (etilazat, bütilasetat), eterler (dimetilter, dietiletter), çeşitli anestezik ajanlar (halojenli hidrokarbonlar gibi, halotan, izofluran, kloroform olarak) mevcuttur.

Toluenin elde edilmesi kolay, ucuz ve yasal olduğundan dolayı, endüstriyel ve kimyasal ürünler içeren çözücülerin mevcudiyeti ile son yıllarda tüketmesini artmıştır. Tüm bu nedenlerle birlikte toluene maruz kalmak özellikle çocuklar ve ergenlere zarar verebilmektedir. Ayrıca merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri göz önüne alındığında hızlıdır. Dünyanın pek çok bölgesinden toluen maruziyetinin kronik ve akut zehirlenmelere sebep olduğu bildirilmiştir (Wille ve Lambert, 2004). Toluen maruziyetinin etkileri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Toluen maruziyetinin etkileri (Cruz ve diğerleri, 2014).

Akut etkiler	1. Gözler ve solunum yollarının tahrişi 2. Uyarılma 3. Duygusal sorumluluk: ani ruh hali değişiklikleri 4. Baş dönmesi 5. Konuşma bozukluğu 6. Bulanık görme 7. Denge koordinasyon eksikliği 8. Yanılsama; Halüsinasyon 9. Kas spastisitesi
Kronik etkiler	1. Bilişsel bozukluklar (örneğin; hafıza kaybı, konsantre olma zorluğu ve dikkat eksikliği) 2. Beyaz madde/ anormallikleri, Özellikle beyin ventrikülleri çevresinde 3. Ventriküler genişleme 4. Kas gücü kaybı 5. Güçsüz motor koordinasyonuna yol açan serebellar ataksi 6. İşitme kaybı; görme bozukluğu

2.1.3. Toluenin toksikokinetiği

Absorbsiyonu

Toluen oldukça uçucudur ve bu nedenle ana emilim yolu solunum sisteminden geçer. Dikkat çekici bir şekilde, liposolubilitesi aynı zamanda kutanöz emilim için bir mekanizma sağlar (Kang ve diğerleri, 2005). Ayrıca toluen lipofilik özelliği nedeniyle, kan-beyin bariyeri dahil olmak üzere biyolojik zarları kolayca geçebilir.

İnsan deneylerinde toluenin sindirim sistemi yoluyla alınabildiği gösterilmiştir (Andrews ve diğerleri, 1977). Aynı zamanda hayvan deneylerinde toluene absorbansının sindirim sisteminde akciğer kıyaslarında daha yavaş gösterilmektedir. Böylece toluen kan konsantrasyonu oral uygulamadan sonra iki saat içinde maksimum miktarına ulaştığı bilinmektedir (Pyykko ve diğerleri, 1977). Toluenin insan derisinden emilimi nispeten daha yavaştır (Dutkiewicz ve Tyras, 1968). Toluenin hayvanlara subkutan enjeksiyonundan sonra kan konsantrasyonunun dört saat sonra maksimum miktara ulaşabilmektedir (Gerarde, 1959). İnsan verilerde toluen emilim oranı 14-23 mg cm^2/saat olarak belirlenmiştir (Dutkiewicz ve Tyras, 1968).

Dağılımı

Toluen buharının solunmasıyla hızlı bir şekilde emildiği ve daha sonra çeşitli dokulara, özellikle beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokusuna yayılabildiği belirlenmiştir (Gotohd ve diğerleri, 2009). Mevcut insan verileri, inhalasyona maruz kaldıktan sonra beyinde karaciğerden daha yüksek toluen derişimi bulunduğunu, oral ve solunum sistemine maruz kaldıktan sonra ise karaciğerin en yüksek toluen derişimi içerdiğini göstermiştir (ATSDR, 2017). Bununla birlikte hayvan çalışmalarında sıçanlarda hem oral hem de inhalasyon maruziyetini takiben karaciğerde beyinden daha fazla toluen derişimi olduğu ileri sürülmüştür (Pyykko ve diğerleri,1977).

Metabolizması

Toluen akciğerlerden hızla emilmekle birlikte, az miktarda gastrointestinal ve dermal emilimi de olmaktadır. Emildikten sonra, yüksek perfüzyonlu lipit bakımından zengin

organlara gidebilmekte, beyin kan bariyeri ve plasentadan da kolayca geçebilmektedir. İnsanlarda ve sıçanlarda toluen metabolizması benzerdir (ATSDR, 2000).

Emilen toluen metabolitinin çoğunluğu (%80), karaciğerdeki oksidasyon enzimlerinden ile CYP izozimler tarafından başlatılmaktadır. İlk olarak toluenin metil grubunun CYP enzim ailesi tarafından yan zincir hidroksilasyonu ile benzil alkol oluşumu gerçekleşir. Benzil alkol, alkol dehidrojenaz (ADH) ve aldehit dehidrojenaz (ALDH) ile benzoik aside hızla oksitlenir. Benzoik asit daha sonra hippürik asit (idrar metabolitlerinin %83-94'ü) oluşturmak için glisin veya benzilglukuronid (%3-9 idrar metabolitlerinin) oluşturmak için glukuronik asit ile konjuge edilebilir. Emilen toluenin CYP enzimleri halka hidroksilasyonu tarafından 2,3- ve 3,4-epoksit ara ürünler yoluyla o-, m- ve p-kresole dönüştürüldüğü halka hidroksilasyonu da oluşabilir. Bu bileşikler sülfat veya glukuronik asit ile birleşmektedir ve toluen metabolizma metabolitlerin % 5< oranındadır. Benzil alkol GST enzimi tarafından glutatyon ile birleşerek toluen metabolizmasının glutatyon yolunu bağlanıp S-benzil merkapturik asitin oluştuğu düşünülmektedir (Takahashi ve diğerleri, 1993).

SP-tolüilmerkapturik asit, 3,4- toluene epokside halkanın GST tarafından katalize edilen glutatyon (GSH) ile konjugasyonu yoluyla oluşur (Angerer ve diğerleri, 1998). Ardından S-benzil merkapturik asit ve SP- tolüilmerkapturik asit'in glutamik asitti, γ-glutamiltranspeptidazın (GGT); glisini, amino peptidaz M (APM); asetil grubu, N-asetiltransferaz (NAT) katalitik etkisi tarafında temin edilmektedir (Takahashi ve diğerleri, 1993).

Atılımı

Toluen ve türevlerinin eliminasyonu esas olarak böbrekte gerçekleşir. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalar, vücuttaki toluenin çoğunluğunun idrarda metabolit olarak elimine edildiğini göstermiştir (Lof ve diğerleri, 1993; Tardif ve diğerleri, 1992). İnsanlarda %80'i emilen toluen, hippürik asit olarak idrarda atılır. Hippürik asidin yanı sıra emilen toluenin küçük bir miktarı (<%1) aromatik halka olarak oksidlenir ve idrara o- ve p-cresol olarak atılır. Bu atık hem hayvanlarda hem de insanlarda görülebilmektedir (Andersson ve diğerleri, 1983; Angerer, 1979; Bakke ve Scheline, 1970; faffli ve

diğerleri, 1979; Woiwode ve diğerleri, 1979). Toluen emilenlerin %7 ila %14'ü insanlarda hiç değişmeden ekshalasyon ile atılır (Carlsson, 1982).

2.2. Resveratrol

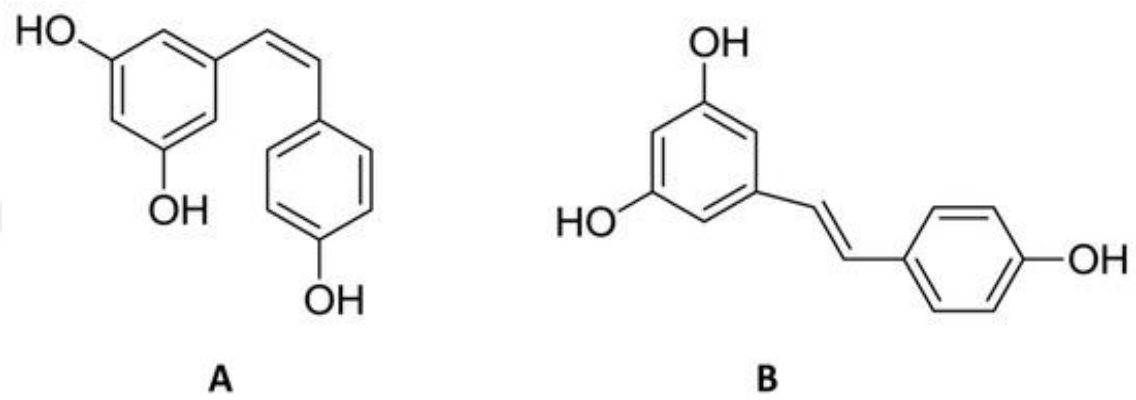
2.2.1. Resveratrolün genel özellikleri ve kullanım alanları

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroksi-stilben) fenolik ailesine ait, üç hidroksil grubu sahip, etilen köprüsü ile birbirine bağlayan iki fenol halkasına sahiptir. Güçlü antioksidan aktiviteye sahip olan resveratrol çeşitli bitkilerde bulunan bir polifenoldür (Akinwumi ve diğerleri, 2018). Bitkilerde, resveratrol fitoaleksin şeklinde mekanik yaralanmaya, UV ışınlarına ve mantar saldırılarına yanıt olarak sentezlenmektedir (Li ve diğerleri, 2016).

Resveratrol üzüm kabukları, üzüm çekirdeği, Japon madımağı (*Polygonum cuspidatum*), cassia tohumları (*Semen cassia)*, tutku meyvesi (*Passiflora*), beyaz çay (*Camellia sinensis*), erik (*Prunus subg*) ve yer fıstığı (*Arachis hypogaea*) dahil olmak üzere yetmiş'ten fazla bitki türünde bulunmaktadır (Piotrowska ve diğerleri, 2012; Mei ve diğerleri, 2015; Liu ve diğerleri, 2017; Chastang ve diğerleri, 2018). Resveratrol ilk olarak 1940 yılında beyaz hellebore (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), daha sonra 1963 yılında *Polygonum cuspidatum* köklerinden izole edilerek, Çin ve Japonlara ait geleneksel anti-enflamatuar ve anti-trombosit ajan olarak kullanılmıştır (Nawaz ve diğerleri, 2017). Resveratrolün önemli miktarda kırmızı şarapta varlığı tespit edilmiştir (Li ve diğerleri, 2015). Taze üzüm kabukları, %5-10'a karşılık gelen biyokütlelerinin başına 50-100 mg/kg resveratrol içerir (Gusman ve diğerleri, 2001). Endüstriyel amaçlar için, resveratrol genellikle kimyasal veya biyoteknolojik sentez olarak mayalar *Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilebilmektedir (Beekwilder ve diğerleri, 2006). Resveratrol beslenme takviyesi olarak çeşitli farmakolojik etkilere sahip, hücresel savunma etkisi de dahil olmak üzere oksidatif strese karşı satılmaktadır (Malhotra ve diğerleri, 2015).

Yapısal olarak resveratrol, molekül ağırlığı 228,25 g/mol olan 3,5,4'-trihidroksistilben oluşturan bir etilen çift bağı ile bağlanmış iki fenolik halkadan oluşan bir stilben sınıfına aittir (Şekil 2.2) (Gambini ve diğerleri, 2015). Bu çift bağ, resveratrolün iki izomerik

formundan sorumludur, trans-resveratrol (Şekil 2.2 B) ve cis-resveratrol (Şekil 2.2 A) şeklindedir. Söz konusu izoformlar arasında, trans-resveratrol daha yaygın, kararlı ve aktif yapıya sahiptir. Bunun yanı sıra güneş ışığına veya UV radyasyonu, 254 ya da 366 nm dalga boyunda, maruz kalırsa cis-resveratrol'e, dönüştürülebilmektedir (Chimento ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.2. Resveratrolün kimyasal yapısı cis (A) ve trans (B) (Chimento ve diğerleri, 2019).

2.2.2. Resveratrol absorbsiyonu ve metabolizması

Resveratrolün kimyasal yapısı nedeniyle su çözünürlüğü düşüktür (<0,05 mg/mL). Bu azalma aynı zamanda emilimini de etkilenmektedir. Çözünürlüğünü arttırmak için etanol (50 mg/ml) veya organik çözücüler kullanılmaktadır (Laza-Knoerr ve diğerleri, 2010). Resveratrol, bağırsaktan geçtiğinde pasif şekilde veya membran taşıyıcılar (integrin) tarafından emilmektedir. Kan dolaşımına girdikten sonra, resveratrol esasen üç farklı biçimde bulunmaktadır: glukuronid, sülfat veya değişmemiş olarak (Delmas ve diğerleri, 2011).

Resveratrol yüksek metabolizmaya sahiptir ve esas olarak resveratrolü konjuge glukuronidlere ve sülfat metabolitlerine dönüştüren karaciğerde metabolize olmaktadır (Wang ve diğerleri, 2004), İdrarda bulunan beş farklı metabolitler: resveratrol monosülfat, iki resveratrol monoglukuronidin izomerik formları, monosülfat

dihidroresveratrol ve monoglukuronid dihidroresveratrol tesbit edilmiştir (Boocock ve diğerleri, 2007).

İnsanlarda resveratrolün oral emilimi yaklaşık %75'tir ve esas olarak trans epitelyal difüzyon ile meydana geldiği düşünülmektedir. Bağırsak ve karaciğerde geniş ölçüde metabolizmaya girer.

2.3. Kolinerjik Sinir Sistemi

ACh üreten nöronlar (yani kolinerjik nöronlar) beynin her yerinde, özellikle beyin sapında, bazal ön beyinde, stratum ve medial habeler çekirdekte bulunmaktadır (Frahm ve diğerleri, 2015). Asetilkolin, sadece bir nörotransmitter olarak değil, aynı zamanda sinir sisteminde bir nöromodülatör olarak hücre proliferasyonu, farklılaşması, migrasyon ve homoeostazın sürdürülmesi gibi sayısız fonksiyonun düzenlenmesinde çok yönlü bir molekül olarak tanımlanmaktadır (Picciotto ve diğerleri, 2012). Kolinerjik sinir sistemleri, parasempatik ve sempatik sinir sistemlerinin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Bellier ve Kimura, 2011).

Kolinerjik sistemin bileşenleri: kolinerjik nöronlar, anatomik kolinerjik yapılar, nörotransmitter ACh ve kolinerjik reseptörleri içermektedir. ACh, kolin ve asetil koenzim A'dan sinir uçlarındaki Kolin Asetiltransferaz (ChAT)'da yer alan sitoplazmik katalizörden sentezlenmektedir. ACh, bağışıklık dışı hücrelerde sentezden hemen sonra salgılanır, ancak aktivasyondan sonra pre-sinaptik nöronlarda salgılanan nöronal hücrelerde özel bir vezikülde depolanır. ACh'nin serbest bırakılması, hücrelerde Ca^{2+} iyonunun akışını ve ardından ACh içeren vezikül kenetlenmesinin membran ve füzyonun kenetlenmesini ve nörotransmitterin ekzositoz olarak bilinen bir süreçle sinaptik yarığa salınması gerektirmektedir. ACh, otokrin veya parakrin mekanizma yoluyla post-sinaptik nöronlar veya bağışıklık hücrelere taşınmak için nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR'ler) veya muskarinik asetilkolin reseptörlerine (mAChR'ler) bağlanır. Post-sinaptik membran üzerinde bulunan AChE, ACh'yi kolin ve asetik aside parçalanır (Halder ve Lal, 2021). Kolin daha sonra CHT1 gibi spesifik kolin taşıyıcılarının varlığı yoluyla presinaptik nörona geri dönüştürülür ve ACh sentezleme için kulanmaktadır (Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016).

2.3.1. Asetilkolin (ACh) Biyosentezi

Kolin, ACh'in sentezinde ana madesidir (Prado ve diğerleri, 2017). Kolinin çoğunluğu, fosfatidilkolin (lesitin)'in parçalanmasıyla ve asetilkolinin hidrolizi ile oluşmaktadır (Sanders ve Zeisel, 2007). Mitokondri tarafından üretilen asetil-koenzim A (AsetilCoA), kolin esterifikasyonu amacı ile parasempatik sitoplazmik sinir sisteminde, ChAT tarafından meydana gelmektedir.

2.3.2. Asetilkolin (ACh) taşıması ve reseptörleri

Kolinerjik sinyalizasyon ATP sitrat liyaz (Acly) ile başlar, asetil-koenzim A (CoA) ve daha sonra ChAT ile ACh üretilmektedir. Veziküler ACh taşıyıcı (VAChT) ile paketlenir ve ekzositoza taşınmaktadır (Kolisnyk ve diğerleri, 2013). Bu ACh dolgulu taşıyıcılar, veziküllerin hücre membranla füzyonunu uyaran ve ACh'nin hücre dışı boşluğa salınmasına izin veren Ca^{2+} tarafından tetiklenmektedir. Böylece ACh sekresyonu Ca^{2+}'nın sitozolik varyasyonlarına bağlanmaktadır. ACh hücre dışı boşluğa salındıktan sonra, mAChR veya nAChR bağlanabilir ve çok çeşitli hücre tiplerinde spesifik sinyal yollarını aktive edebilmektedir (Wessler ve diğerleri, 1999). Bu reseptörler iki süper aileden; ligand-kapılı cys-loop nACh (α ve β alt birimleri) reseptör ailesi ve G-proteinine bağlı mACh (beş alt tipe sahip M_1–M_5) reseptör ailesine aittir (Zhang ve diğerleri, 2016). Hem nikotinik hem de muskarinik reseptörler merkezi ve periferik sinir sisteminde eksprese edilmektedir. Beyinde, ACh reseptörleri, ACh'nin nöromodülatör fonksiyonlarına aracılık etmek için hem pre hem de postsinaptik olarak ifade edilmektedir (Haam ve Yakel, 2017).

2.3.3. Nikotinik ACh Reseptörleri (nAChRs)

Nikotinik ACh reseptörleri iyon-kapılı reseptör, katyonlar için K^+, Na^+ ve Ca^{2+} seçici olan kanallar tanımlanmaktadır. Hücresel yanıt, hızlı bir şekilde nikotinik reseptör aktivasyonunu takiben gerçekleşmektedir. Dokuz nikotinik reseptör ve beş farklı alt birimler:α, β, δ ve γ (fetal) veya ε (yetişkin) tespit ve çeşitli yapılarda; merkezi sinir sistemi, ganglionlar ve kaslar dahil olmak üzere görev yapılmaktadır. Kas ve gangliyonlarda bulunan kolinerjik nikotinik reseptörler, iki α alt birim artı diğer üçünün her birinin bir kombinasyonu dahildir. Öte yandan, nöronal nikotinik reseptörler sadece

iki tip reseptörün kombinasyonu alt birimler (α_2-α_{10} ve β_2-β_4) ile oluşur. Dahası, en yaygın merkezi sinir sistemi'de eksprese edilen nikotinik alt birim α_7'den tanımlanmaktadır. Sonuç olarak, her bir nikotinik reseptör tipi farklı özellikler ve fonksiyonlar taşınmaktadır (Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016).

Nikotinik reseptörler aktivasyonu girdiği zaman periferik sinir sistemi'de, hızlıca sinaptik iletime yol açar. Ancak, merkezi sinir sistemi'de bu ACh reseptörleri bir modülatör olarak kullanır, uyarma veya inhibisyon etki sağlamaktadır (Role ve Berg, 1996). Merkezi sinir sistemi'de, nikotinik reseptörlerin çoğu presinaptik nöronal membranda, periferik sinir sistemi'de ise post-sinaptik olarak yer alır. Ana rolleri esas olarak nörotransmitterlerin salınımını düzenlenmesidir (Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016).

Nikotinik merkezi sinir sistemi presinaptik nöronal membranda bulunan reseptörlerin uyarımı, presinaptik Ca^{2+} konsantrasyonunda bir artışa yol açar. Bu da bir dizi nörotransmitterin salınımını; glutamat, γ- aminobütirik asit (GABA), dopamin, serotonin, norepinefrin ve ACh gibi kolaylaştırabilmektedir (Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016).

Nikotinik reseptör aktivitesi protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC) ve tirozin kinaz fosforilasyonu (TKP) tarafında sıkı bir şekilde düzenlenebilmektedir (Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016). Ayrıca nikotinik reseptörler Ca^{2+} allosterik olarak da düzenlenebilmektedir; Ca^{2+} hücre dışı olan nikotinik reseptörler amino terminal bölgesine bağlanır ve ACh'ye bağımlı akımların voltaja duyarlı şekilde güçlendirir (Mulle ve diğerleri, 1992). Öte yandan, Ca^{2+} hücre reseptörün içi bölgelere bağlandığı zaman, voltaja bağımlı iletkenliktesi azalır ve sonuç olarak Ach sekresyonu engellenmektedir (Glushakov ve diğerleri, 1999).

2.3.4. Muskarinik ACh Reseptörleri (mAChRs)

Merkezi sinir sistemi'de, mAChR'lerin etkinleştirilmesi daha yavaş, ancak potansiyel olarak daha davamlı bir yanıtla sonuçlanmaktadır (Raedler ve diğerleri, 2007). mAChR, G-proteini bağlantılı reseptör (GPCR) aile üyeleri ve beş ayrı reseptör alt tipi olan M_1-M_5 ile tanımlamıştır. Tüm GPCR'ler gibi, mAChR'ler de yedi transmembran α-helikslerden (TM_1_TM_7) oluşan integral membran proteinler, üç hücre içi (ICL_1'den ICL_3'e) ve üç hücre dışı (ECL_1'den ECL_3'e) döngü aracılığıyla bağlanır bileşinleri açıklanmaktadır. Aktif olan mAChR'ler, belirlenmiş G-protein sınıflarına bağlı farklı ikinci haberci

kaskadlarını tetikler ve böylece vücutta çok çeşitli fizyolojik fonksiyonlara aracılık eder (Szczurowska ve diğerleri, 2022). M_1_benzeri (M_1, M_3 ve M_5) mAChR alt tipleri, fosfolipaz C'nin aktivasyonuna ve inositol fosfatların ve diğer ikinci habercilerin oluşumuna yol açar. Bu da K^+ kanallarının kapanmasını teşvik edebilir. Böylece hücre içi Ca^{2+}'un mobilizasyonunu indüklemek için tercihen Gq proteinlerini uyarılabilirliğini kolaylaştırır. M_2_benzeri (M_2 ve M_4), mAChR alt tipleri aktivasyon üzerine adenilil siklazı (AC) inhibe eder, cAMP üretimini azaltır, voltaj kapılı Ca^{2+} kanalların inhibisyonunu teşvik eder ve böylece hücre uyarılabilirliğini azaltmak K^+ iletkenliğini artıran Gi proteinlerine bağlanır (Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016).

Sinaptik lokalizasyon açısından, M_1/M_3 reseptörleri esas olarak post-sinaptik seviyede bulunur. Öte yandan, M_2 / M_4 reseptörleri genellikle otoreseptörler gibi davranır ve pre-sinaptik olarak bulunur, ACh salınımını negatif olarak düzenlenmektedir (Ferreira-Vieira ve diğerleri, 2016).

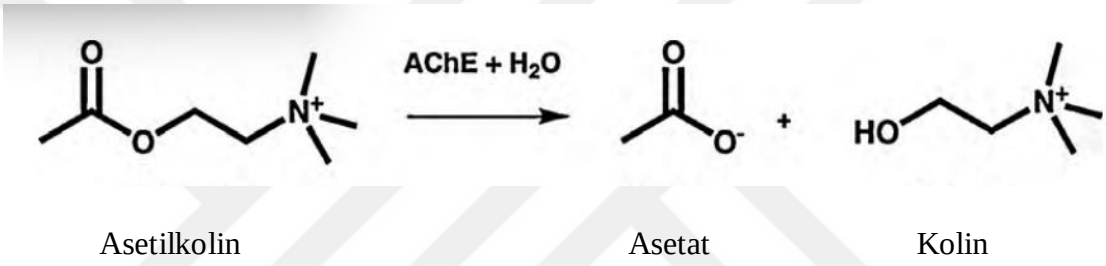
2.4. Asetilkolin esteraz (AChE; EC 3.1.1.7)

2.4.1. Kolinesteraz ailesi (ChEs)

AChE, ChEs ait, kolin ve esterler bağlanmasını koparan bir spesifik karboksilik ester hidrolazlarıdır. Kolinesteraz sınıfı, nörotransmitter asetilkolini hidrolize eden (AChE; EC 3.1.1.7) ve bütirilkolini substrat olarak kullanılan psödokolinesteraz veya bütirilkolinesteraz (BChE; EC 3.1.1.8) içermektedir. BChE plazmada bulunur ve kandaki fizyolojik işlevi hala bilinmemektedir (Costa ve diğerleri, 2005). AChE ayrıca, kan grubu antijenini oluşturduğu kırmızı kan hücresi zarlarında da bulunmaktadır. Bir kişinin kan grubunu belirlemeye yardımcı olur. Ancak eritrosit zarı üzerindeki fizyolojik işlevi bugüne kadar bilinmemektedir (Daniels, 2007). AChE esas olarak nöromüsküler kavşaklarda ve kolinerjik sinapslarda merkezi sinir sistemi bulunmaktadır. AChE, postsinaptik membrandaki asetilkolinin reseptör aktivasyonundan sonra asetilkolini kolin ve asetat hidrolize edilmektedir. AChE aktivitesi sinaptik iletimi sonlandırmak, sinir uçlarında sinir ateşlemeleri önlemek için sorumludur. Bu nedenle, merkezi ve periferik sinirin normal çalışması önemlidir (Daniels, 2007).

Bilinen en hızlı enzimlerden biri olan AChE, bir substrat molekülü 100 µs süreçte gerçekleşmektedir (Lawler, 1961). ACh, kolin ve asetil-CoA'dan sentezlenir ve

presinaptik terminalde veziküller halinde paketlenir. Sonrasında presinaptik terminaline gelen bir eylem potansiyeli, voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının açılmasını tetikler, sitosolün içine giren Ca^{2+} vezikülleri ACh'lerini ekzositoz yoluyla sinaptik yarığa bırakırır. ACh yarık boyunca yayılır ve yarığa geçtiğinde, postsinaptik reseptörlere (nAChR ya da mAChR) bağlanır. Na^{+} ve K^{+}'ın zar boyunca dağılmasına izin verir ve hücreyi depolarize eder. AChE, ACh'yi asetat ve koline hızla bozar, reseptörü devre dışı bırakır ve iletilen sinir impulsunu azalır. Kolin, ACh'nin resentezi için presinaptik terminal tarafından tekrar alınır (Shen ve diğerleri, 2002). Şekil 2.3'de ACh'nin, AChE tarafından enzimatik hidrolize edilen mekanizması göstermektedir.



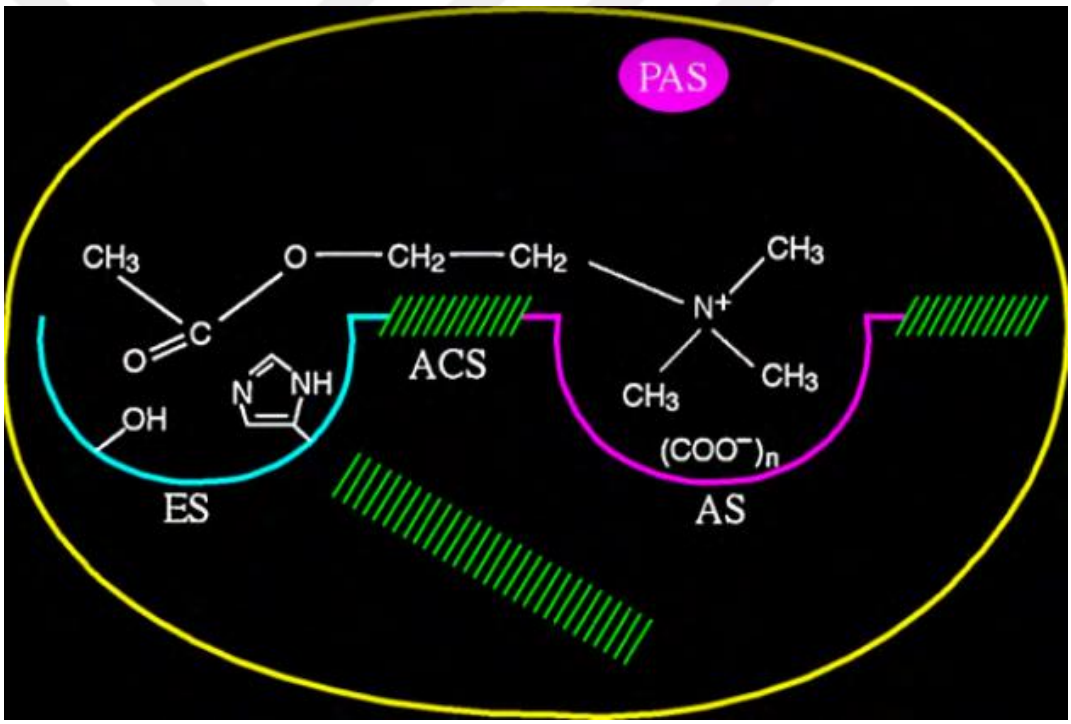
Şekil 2.3. AChE mekanizması (Dvir ve diğerleri, 2010).

2.4.2. AChE'nin Genel Özellikleri

AChE molekülü, yaklaşık beş yüz kalıntıdan oluşan büyük bir katalitik alan ve elli'den az kalıntıdan oluşan küçük bir C-terminal peptide, iki farklı protein alanından oluşmaktadır. AChE, tek bir genin ürünüdür (Getman ve diğerleri, 1992) farklı dokularda farklı ekleme formlarında ifade edilmektedir. AChE pre-mRNA'nın 3′ terminalindeki alternatif ekleme, üç varyant üretir: birincil, "sinaptik" AChE-S ("kuyruklu" AChE-T olarak da bilinir) (Massoulie, 2002), stres kaynaklı, çözünür (okuma) AChE-R varyantı ve eritrositik AChE-E açıklanmaktadır (Meshorer ve Soreq, 2006). Bu izoformlar, benzer bir katalitik alanı paylaşır, ancak moleküler formlarını ve lokalizasyonlarını etkileyen ve spesifik özellikler kazandıran C-terminal alanlarında farklılık gösterilmektedir (Park ve diğerleri, 2004). "Sinaptik" AChE-S, beyin ve kastaki temel multimerik enzimi oluşturmaktadır. Tipik olarak tetrameriktir ve sinaps zara bağlanmaktadır. Çözünür, monomerik "okuma" AChE-R, kimyasal ve fiziksel stres altında indüklenir; eritrositik AChE-E, eritrosit ve

lenfositlerin plazma zarını hedef alan glikofosfatidilinositol- (GPI-) bağlantılı bir dimerdir (Grisaru ve diğerleri, 1999). Aynı zamanda AChE-S ve AChE-R, periferik kan hücrelerinde de tanımlanmıştır (Pick ve diğerleri, 2004).

AChE'nin aktif bölgesi iki alt bölge içermektedir: anyonik bölge ve esteratik bölge. Anyonik alt bölge, asetil kolinin pozitif kuaterner amininin bağlanma bölgesidir. Esteratik alt bölge, asetilkolinin asetat ve koline hidrolize edildiği bölgedir. Karboksil esterin hidrolizi, bir asil-enzim ve serbest kolin oluşumuna yol açarmaktadır. Daha sonra asil-enzim, bir su molekülü tarafından nükleofilik saldırıya uğrayarak asetik asidi serbest bırakır ve serbest enzimi yenilemektedir (Taylor ve Radic, 1994). Şekil 2.4'de AChE'nin bağlanma bölgelerinin şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.4. AChE bağlanma bölgeleri (Dvir ve diğerleri, 2010).

ES; esteratik bölgesi, AS; anyonik substrat bağlama bölgesi, ACS; aromatik katyon bağlama bölgesi, PAS; periferik anyonik bağlanma bölgesi. Taralı alanlar, varsayılan hidrofobik bağlanma bölgelerini temsil eder. Histidin ve Serin'in imidazol ve hidroksil yan zincirleri esteratik bölge içinde gösterilmiştir. Anyonik site içinde (COO^-)n , 6–9 varsayılan negatif yükü temsil etmektedir (Dvir ve diğerleri, 2010).

2.5. Reaktif oksijen ve azot türleri (RONS), Oksidatif stres ve Antioksidanlar

2.5.1. Reaktif oksijen ve azot türleri (RONS)

Kimyasal olarak, her bileşik oksijen de dahil olmak üzere elektron kabul etmek "oksidan veya oksitleyici" bir ajan (Baud ve Ardaillou, 1986) yanı sıra, elektron bağışlayan madde bir "indirgen veya indirgeyici" ajan olarak adlandırılmaktadır (Cao ve Prior, 1998; Prior ve Cao,1999). Redüktör; elektron alan herhangi bir kimyasal moleküle denir (Schafer ve Buettner, 2001). Oksidasyon, elektron kaybıyla oluşan bir işlemdir. Bir indirgeyici elektronlarını bağışladığında, başka bir maddenin azalmasına neden olur ve bir oksidan elektronları kabul ettiğinde, başka bir maddenin oksitlenmesine neden olur (Hrbac ve Kohen, 2000).

Biyolojide, bir indirgeyici ajan, genellikle hidrojen bağışı veya oksijen çıkarılması yoluyla gerçekleştirilmektedir. Bu tür elektron alışverişi redoks reaksiyonu olarak adlandırılır. İndirgeyici ve oksitleyici iken kimyasal terimlerle, biyolojik ortamlarda sırasıyla antioksidan ve pro-oksidan olarak adlandırılır (Cao ve Prior, 1998; Prior ve Cao,1999).

RONS, tüm aerobik hücreler tarafından üretilirken ROS ve RNS sırasıyla oksijen ve azotun reaktif radikali ve radikal olmayan türevlerinden biridir (Powers ve diğerleri, 2011). Bu moleküller, proliferasyon, migrasiyon, farklılaşma ve metabolizma gibi çeşitli fizyolojik prosidürlerin düzenlemelerinden sorumludur (Griendling ve diğerleri, 2016). RONS, aşırı miktarda hayati moleküllerle; lipitler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere reaksiyona girer. Böylece hedef moleküllerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri değişip ve geniş doku disfonksiyonuna ve yaralanmasına yol açabilmektedir (Aprioku, 2013). RONS aileller, aynı zamanda organik moleküllerden enerji çıkarılmasında, bağışıklık savunmasında ve sinyalizasyon sürecinde de rol oynamaktadır (Genestra, 2007).

Genel olarak bu pro-oksidanlar ROS olarak iki bileşik grubuna, radikallere ve radikal olmayanlara sınıflandırılabilirler. Radikal grubu, genellikle yanlış bir şekilde serbest radikal olarak adlandırılır; bir radikal, atom kabuklarında en az bir eşleşmemiş elektron çekirdeği etrafında varoluş ve bağımsız yeteneğine sahiptir. Bu anlamda bir radikal her

zaman özgürdür (Kohen ve Nyska, 2002). Oksijen molekülünün kendisi de bir radikaldir, iki farklı orbitalda iki eşleşmemiş elektron içerir ve böylece, bir radikaldir (Halliwell ve Gutteridge, 1986). Çizelge 2.3'te, ROS ve radikal olmayan oksijen kaynaklı pro-oksidanlar ve Çizelge 2.4'te, RNS metabolitleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Radikal ve radikal olmayan oksijen metabolitleri (Kohen ve Nyska, 2002).

Ad	Sembol
Oksijen radikalleri (ROS)	
Oksijen (bi-radikal)	O_2**
Süperoksit iyonu	O_2^{*-}
Hidroksil	HO*
Peroksil	ROO*
Alkoksil	RO*
Nitrik oksit	NO*
Radikal olmayan oksijen türevleri	
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Organik peroksit	ROOH
Ozon	O_3
Aldehitler	HCOR
Oksijen	O_2
Peroksinitrit	ONOOH
Hipokloröz asit	HOCL

Çizelge 2.4. Reaktif azot metabolitleri (Somogyi ve diğerleri, 2007).

Ad	Sembol
Nitröz oksit	N_2O
Peroksinitrit	$OONO^-$
Peroksinitroz asit	$ONOOH$
Nitroksil anyon	NO^-
Nitril klorür	NO_2CL
Nitrosil katyon	NO^+
Azot dioksit	NO_2^*
Diazot trioksit	N_2O_3
Nitröz asit	HNO_2

RONS iki endojen (içsel) ve eksojen (dışsal) kaynaklardan yer almaktadır:

RONS'un endojen kaynakları; nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, miyeloperoksidaz (MPO) enzimlerde bulunmaktadır (Salisbury ve Bronas, 2015).

NADPH oksidaz, radikal süperoksit anyonun (O_2*) yaygın kaynağıdır ki hücresel solunum sırasında moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle NADPH tarafından sağlanan elektronlarla oluşur. O_2^*'nin çoğu süperoksit dismutaz (SOD) tarafında hidrojen peroksite (H_2O_2) indergenir (Genestra, 2007). H_2O_2 eşleşmemiş elektronları olmadığında radikal değildir, ancak Fenton veya Haber-Weiss tepkisi aracılığıyla, yüksek reaktif ROS hidroksil iyonu (HO*) oluşturabilir. Hidroksil radikalleri son derece reaktiftir ve özellikle hücre zarlarındaki fosfolipitlerle ve proteinler reaksiyona girer ve ROS'un lipid peroksidasyon mekanizmasına girmesini sağlamaktadır (Singh ve diğerleri, 2015). Bu lipid hidro-peroksit, bir lipit oksil radikali (LO*) oluşturmak için Fe^{2+} hızlı bir şekilde veya bir lipid peroksil radikali LOO* oluşturmak için Fe^{3+} ile çok daha yavaş reaksiyona girmektedir. LOO* Ayrıca Hidroksil radikal (HO*) çoklu doymamış yağ asidinden bir elektron almasını ve oksijen desteklemesiyle meydana gelebilmektedir (Valko ve diğerleri, 2007).

Nötrofillerde, H_2O_2 klorür ve MPO huzurunda hipoklora asit, hücresel proteinlere zarar veren bir ROS'a dönüştürülebilir (Genestra, 2007; Kohen ve Nyska, 2002).

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{\text{miyeloperoksidaz (MPO)}} \text{HCLO} + OH$$

Nitrik oksitin (*NO) biyoaktif üretmenin yolu, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3)'ın azaltılmasını içerir. Hem nitrit hem de nitrat eksojen veya endojen olarak sentezlenir. Eksojen kaynaklardan gelen NO_2^- sebze, meyve ve et olduğu ve NO_3'ın yaklaşık %80'i sebze tüketiminden elde edilir. Alternatif olarak, nitrat ve nitrit, nitrik oksit sentetaz (NOS) tarafından katalize edilen reaksiyonlarda L-arginin ve oksijen moleküllerden üretilir (Kamm ve diğerleri, 2019).

*NO, flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin adenin mononükleotid (FMN), tetrahidrobiyopterin (BH4) ve kalmodulin kullanılarak nitrik oksit sentaz ailesinin (NOS) enzimleri tarafından L-arginin, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve oksijenden sentezlenir. Üç NOS izoformları nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelyal NOS (eNOS) olarak tanımlanmaktadır (Knowles ve Moncada, 1994). Şu izoformlar Sitosolda yerleştirilmiştir ancak çekirdek ve mitokondride (mtNOS) de bulunabilirler (Kamm ve diğerleri, 2019).

RONS'un eksojen kaynakları; hava ve su kirliliği, tütün, alkol, ağır veya geçiş metalleri, ilaçlar (örneğin, siklosporin, takrolimus, gentamisin ve bleomisin), endüstriyel çözücüler, pişirme (örneğin, füme et, atık yağ ve katı yağ) ve radyasyon, vücutta radikallere metabolize edilmektedir (Phaniendra ve diğerleri, 2015).

2.5.2. Oksidatif stres ve Antioksidanlar

Oksidatif stres, hücrelerde ve dokularda ROS üretimi ve birikimi arasındaki dengesizliğin ve bu reaktif ürünleri detoksifiye yeteneğini bastırmasını neden olduğu bir olgudur (Pizzino ve diğerleri, 2017). Hücrelerdeki radikaller tarafından oluşturulabilecek oksidatif stresi ortadan kaldırmak için en önemli silahı antioksidanlardır. Antioksidanlar radikalleri temizleyebilen ve hücre hasarını engelleyebilen maddelerdir. Vücutta bulunan antioksidanlar ya doğal olarak üretilirler ya da dışarıdan ilave olarak alınmaktadır. Hem endojen hem de eksojen antioksidanlar radikal süpürücü olarak hareket ederler. Bundan dolayı savunma sisteminin etkisini artırarak hastalık riskini de azaltırlar. (Karabulut ve Gülay, 2016).

Endojen Antioksidanlar

Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılmaktadır. Antioksidan enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px); nonenzimatik ise glutatyon-S-transferaz (GST) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz olarak tanımlanmaktadır (Birben ve diğerleri, 2012).

Nonenzimatik antioksidanlar, RONS ile etkileşime giren ve radikal zincir reaksiyonlarını sonlandıran düşük moleküler ağırlığı bileşikler: bilirubin, α-tokoferol (E vitamini) ve β-karoten, albumin, ürik asit ve tiol (sülfhidril) grubu oluşturan tripeptitler (L-γ-glutamil-L-sisteinil-Lglisin) GSH, %85'i plazmadaki antioksidan kapasitesinin sahip olan tepkime girer (Birben ve diğerleri, 2012).

Çizelge 2.5'de önemli endojen oksidanların tepkimlerini göstermektedir (Birben ve diğerleri, 2012).

Çizelge 2.5. Endojen oksidanların tepkimleri (Birben ve diğerleri, 2012).

Oksidan	Sembol	Reaksiyon
Süperoksit anyon	O_2^{-*}	$NADPH + 2O2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{-*} + H^+$
Hidrojen peroksit	H_2O_2	$2O_2^{-*} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2\,O_2$ Hipoksantin+H_2O + O_2 ↔ ksantin+H_2O_2 Ksantin+H_2O+O_2 ↔ ürik asit+H_2O_2
Hidroksil radikal	*OH	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + *OH$
Hipokloröz asit	HOCl	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCL + H_2O$
Peroksil radikalleri	ROO^*	$R^* + O_2 \rightarrow ROO^*$
Hidroperoksil radikal	HOO^*	$O_2^- + H_2O \leftrightarrow HOO^* + OH^-$

Eksojen Antioksidanlar

Eksojen kaynaklı antioksidanları, vitaminler ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. α- tokoferol (Vitamin E), β-karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C) ve folik asit (Vitamin B9): dışarıdan alınan vitamin kaynaklı antioksidanlardır (Karabulut ve Gülay, 2016).

2.5.3. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6)

Katalaz, dört protein alt birimden meydana gelir. Her bir alt birim, bir hem grubu ve bir NADPH molekülü içermektedir (Karabulut ve Gülay, 2016). Katalaz, büyük ölçüde peroksizomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. Hidrojen peroksitin, H_2O ve O_2'ye dönüşümünü katalize eder (Limon-Pacheco ve Gonsebatt, 2009). Süperoksit radikali (O_2^{-}*) SOD aracılığıyla H_2O_2'e dönüştürülür. Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına ve biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmemesine rağmen, Cu ve Fe iyonlarının katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali (HO*) oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016).

$$2O_2^{-*} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + cu^+/Fe^{2+} \xrightarrow{\text{Fenton reaksiyonu}} HO* + OH^- + cu^{+2}/Fe^{+3}$$

2.5.4. Glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18)

GST, Selenyuma bağımsız ve Selenyuma bağımlı (GPx, EC 1.11.1.19) enzimatik antioksidanlar oksidatif strese karşı koruma, iki tip glutatyonla ilişkili enzimlerdir (Sagara ve Sugita, 2001). GST, reaktifin elektrofiller detoksifikasyonu, hücre sinyalizasyonu, anti-apoptotik aktivite, anti- ve pro-inflamatuar yanıtlar olmak üzere çeşitli faaliyetleri rol oynamaktadır (Tew ve diğerleri, 2011). GST bir enzim ailesi olarak toksik hidrofobik ve elektrofilik substratları indirgenmiş glutatyon (γ-glutamil-sisteinil-glisin; GSH) konjugasyon ile inaktive halı dönüştürmektedir (Jakoby, 1978).

GSH ve oksidatif strese bağlantısı

Glutatyon enzimatik olmayan antioksidanların biri, hemen hemen bütün ökaryotik hücrelerde sentezlenir. Bundan dolayı yüksek yoğunluklarda bulunur. Glutatyon bir antioksidan olarak hareket eder ve ayrıca hücrenin redoks durumunu korumada, detoksifikasyon sisteminin çalışmasında, eikosanoidlerin sentezlenmesinde, hücre sinyal

mekanizmasının düzenlenmesinde, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de antioksidan olarak faaliyet göstermektedir (Townsend ve diğerleri, 2003).

GSH yaklaşık olarak %85-90'ı sitoplazmada bulunur. Fakat bazen GSH sitoplazmada sentezlendikten sonra mitokondri, çekirdek, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumda da bulunabilmektedir (Karabulut ve Gülay, 2016). Glutatyonun sentezlenmesi iki önemli aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamin ve sisteini bağlayarak γ-glutamilsisteini oluşturur.

$$\text{Glutamin} + \text{Sistein} \xrightarrow{\text{GCL}} \gamma - \text{glutamilsistein}$$

İkinci olarak glutatyon sentetaz (GSS), γ-glutamilsisteine glisini bağlayarak GSH molekülünü meydana getirir.

$$\gamma - \text{glutamilsistein} + \text{Glisin} \xrightarrow{\text{GSS}} \text{Glutatyon}$$

Glutamin-sistein ligaz, katalitik (GCLC) ve düzenleyici (GCLM) alt birimlerden oluşmaktadır. Glutamin-sistein ligazın katalitik alt birimi, katalitik aktivite için sistein ve glutaminin bağlanmasından sorumludur. Glutamin-sistein ligazın düzenleyici alt birimi ise GCLC'nin etkisini artırır (Karabulut ve Gülay, 2016).

GSH, GPx'in katalitik etkisiyle lipit peroksitleri ve hidrojen peroksitleri, oksijene ya da hidroksile detoksifiye eder.

GST'in sınıflandırılması

GST'lerin çoğunluğu sitozolik (cGST) formda bulunmaktadır. Bu grup sitozol içinde bulunur ve memelilerde en az sekiz gen ailesi (alfa;α, beta;β, delta;Δ, mu;μ, pi;π, sigma;Σ, zeta;Z ve theta;Θ) tarafından kodlanmaktadır (Dong ve diğerleri, 2018).

GST'in İşlevleri

Genel olarak, aktif GST'ler iki özdeş zincirden oluşuan dimerik enzimlerdir, ancak heterodimerler de özdeş olmayan zincirlerle mevcuttur. Her GST monomeri (23–30 kDa) iki adet farklı alanlardan: N-terminal tioredoksin benzeri bir alan (G-bölgesi) ve C-terminali α-heliks etki alanı (H-bölgesi)'den oluşturmaktadır. G bölgesi, GSH ile bağlanır ve GST ailelerin arasında oldukça korunmaktadır (Liu ve diğerleri, 2015).

GST tarafından katalize edilen reaksiyon, GSH'nin kükürt tiyolatının nükleofilik ilavesinden geniş bir elektrofilik bileşiklerin yelpazeye oluşturmaktadır;

$$\mathrm{GSH} + \mathrm{R} - \mathrm{X}(\text{elektrofilik substrat}) \rightarrow \mathrm{GSR} + \mathrm{HX}$$

GSH aktivasyonundan sonra, nükleofilik kükürt atomu, H bölgesinde bulunan elektrofilik toksik bileşiğe saldırır, daha az tehlikeli bir bileşik üretimiyle sonuçlanmaktadır. Ürün sürümü, C-terminal bölgesi tarafından kontrol edilmektedir (Nieslanik ve diğerleri, 1999).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan sıçanlar Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney 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

- Toluen, %97 saflıkta
- Resveratrol ≥98% by HPLC
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4), Merck
- Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4), Merck
- Asetilkolin iyodür (ATCI), Merck
- 5,5′-Dithiobis (2-Nitro-Benzoik asit) (DTNB, Ellman Reaktifi), Sigma
- Hidrojen peroksi H_2O_2 çözeltisi %30 saflıkta, Merck
- 1- kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), Sigma
- Etanol C_2H_6O %99 saflıkta, Merck
- Glutatyon (GSH,$C_{10}H_{17}N_3O_6S$), Merck

3.1.2. Sarf malzemeler

- Nitril, pudrasız, laboratuvar eldiveni
- Parafilm, ISOLAB
- 2 ml hacimli santrifuj tüpleri, ISOLAB
- Pipet uçları (10 µl'lık, 200 µl'lik ve 1000 µl'lik), ISOLAB
- Serolojik pipet (25 ml, 50 ml)
- Erlen Mayer Cam 100 ml
- Beher Cam 10 ml
- Manyetik Balık Silindirik (30×6 mm), ISOLAB
- Spektrofotometre Küvet (10 mm)

3.1.3. Cihazlar

- 10-100 µl otomatik pipet, MİCROLİT
- 100-1000 µl otomatik pipet, ISOLAB
- 21-200 µl otomatik pipet, ISOLAB
- 0-20 µl otomatik pipet, ISOLAB
- Mini Vorteks, SCIENTIFICA
- Dijital Hassas terazi, METTLER TOLEDO
- Manyetik Karıştırıcı, HANNA
- PH Metre, HANNA
- Su Banyosu, JULABO
- Spektrofotometre UV/VIS, NANOCOLOR

3.2.Yöntem

3.2.1. Deney hayvanları

Tez çalışmasında, 250-350 gram ağırlığında Wistar Albino erkek sıçanlar (36 adet), su ve yeme ulaşımın serbest olduğu ortamda, 22-24 ºC koşullarında tutuldu. Sıçanlar 4 farklı deney ve 2 kontrol grubuna ayrıldıktan sonra kontrol grubuna (n=6) serum fiziyolojik intraperitoneal (i.p) yolla altı gün boyunca verilirken ikinci kontrol grubuna (n=6) %10 etanol aynı yöntemle verildi.

3.2.2. Toluen maruziyetinin gerçekleştirilmesi ve resveratrol uygulaması

Toluenin LD50 dozu 1,64 g/kg'dır (Ikeda ve Ohtsuji, 1971). Deney grubuna ise ilk gruba altı gün boyunca 900 mg/kg dozunda toluen i.p yolla uygulandı. İkinci deney grubuna (n=6) aynı dozda toluen ile birlikte 5 mg/kg resveratrol; üçüncü deney grubuna (n=6) 10 mg/kg; dördüncü deney grubuna (n=6) 20 mg/kg resveratrol i.p yolla uygulandı (resveratrol %10 etanol içerisinde hazırlandı). Altı günün sonunda sıçanlar servikal dislokasyon yoluyla öldürülerek beyin dokusu süratle alındı.

3.2.3. Beyin doku örneklerinin toplanması

Elde edilen beyin dokuları pH=7,4 soğuk fosfat tamponu çözeltisi ile yıkanarak üzerindeki kan temizlendi ve doku kaplar içinde toplandı. Beyin dokuları ölçümler için kullanılan kitlerin talimatlarına göre homojenize ve santrifüj edilerek örnekler analize hazır hale getirildi (Elabscience, 2018). Hazırlanan örnekler aktivite ölçümleri gerçekleşinceye kadar -20 ºC'de saklandı.

3.2.4. Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

- BSA Standartlarının Hazırlanması

Protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albumin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 mg) ultra saf su (dH_2O) ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi.

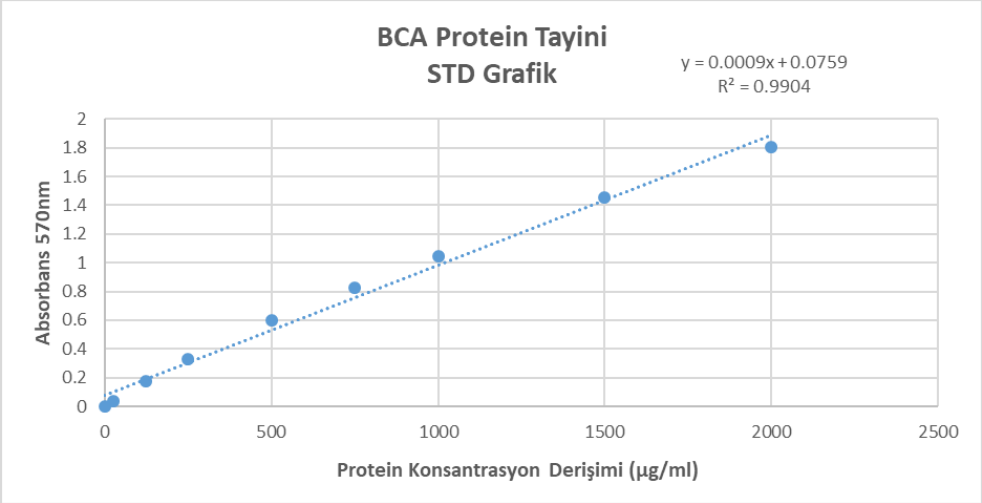
- Protein Konsantrasyonunun Ölçümünün Yapılması

BCA protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon, protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinler ile etkileşir ve Cu^{++} iyonları Cu^{+} iyonlarına dönüşür. Sonuç olarak kompleksin rengi mor tonuna dönüşür.

Ölçüm için Biçinkoninik Asit Kit (Sigma-Aldrich) ve 96 kuyuluk hücre kültür kapları (Orange Scientific) kullanıldı. Her bir kuyuya 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µl standart ve 10 µl konsantrasyonu örnekler pipetlendi. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler 10 kat dH_2O ile seyreltildikten sonra ölçüm yapıldı, bu nedenle 10 µl örnekler 90 µl, standartlar ise 100µl'ye tamamlanacak şekilde ultrasaf dH_2O ile tamamlandı. Bu seyreltme katsayısı, hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 200 µl çalışma ayıracı pipetlendi ve plate 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometde 570 nm'de (Biotek) okundu. Protein konsantrasyonlarını belirlemek üzere bir standart eğri grafiği hazırlandı. Örnek protein konsantrasyonları bu grafikten elde edilen formül yardımıyla hesaplandı (Şekil 3.1).

y =0.0009 x + 0.0759

- y: 570 nm'de standardın mutlak absorbans değeri
- x: standart derişimi
- a: standart grafiğinin eğimi
- b: ekseni kesim noktası (intercept)



Şekil 3.1. Protein standart eğri grafiği

3.2.5. Asetilkolinesteraz (AChE) Aktivite Ölçümü

AChE aktivite ölçümü, manuel talimate göre Ellman reaktifi (DTNB) (Ellman ve diğerleri, 1961) tepkimelerile asetiltiyokolin iyodür (ATCI) substrat olarak ve spektrofotometre yöntem ile gerçeklestirildi.

Ellman yöntemi Tiol (-SH) gruplarıyla etkileşime giren suda çözünür ve nötr pH'ta kolayca kullanılabilir bir reaktiftir. Proteinler, peptitler ve dokulardaki serbest sülfhidril içeriğini ölçmek için hassas bir reaktiftir. Bu reaktif özellikle Asetilkolinesteraz mekanizmasındaki sistein kalıntılarını etiketlemek için kullanılır.

Ellman'ın yöntemi iki reaksiyonlu bir tahlildir. İlk reaksiyonda, kolinesteraz (AChE veya BChE) tiyoester (ATC) vasitesile bir tiyokolini (TCh) hidrolize eder. İkinci reaksiyonda TCh, [5,5’ -ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)] (DTNB) ile etkileşime girerek sarı bir ürün, 2-nitro-5-tiyobenzoik asit (TNB) verir. Rengin yoğunluğu, TCh’in hidroliz seviyesi ile orantılıdır (Dingova ve diğerleri, 2014). Deneysel işlemler Çizelge 3.1’de gösterilen

adımlar takip edilerek yapıldı ve enzimin aktivasiyonu spektrofotometre cihazile 412 nm dalga boyunda okundu.

Çizelge 3.1. AChE aktivite ölçümünde uygulanan deneysel işlemleri

Kullanılan Çözeltiler	Çözeltme Hazırlanma	Miktar
Fosfat Tampon (67 mM)(PH=7)	80ml K_2HPO_4 +19.2ml KH_2PO_4'ın karışımı	1540 µl
Asitilkolin (75 mM)	Fosfat Tamponda hazırlandı	32 µl
DTNB (0.267 mM)	Distile suda hazırlandı	320 µl
Beyin Homojenatlar X2	0.20 ml Asitilkolin tamponda hazırlandı	132 µl
Kör (Fosfat Tampon)		1666 µl
Çözelti karışımı, örnekleri koymadan önce 37℃, 10 dakika sürede su banyoda beklendi.		
Çözelti karışımı ve beyin homojenatları 2 ml hacim oranında uygulandı.		
Her deneysel karışımı cihaza koymadan önce fosfat tampon ve ara sıra distile su ile 412 nm dalga boyunda sıfırlandı.		
Absorbans değişimi 412 nm dalga boyunda, her dakikada bir kez toplam 5 dakika boyunca kaydedildi.		

Aktivite Hesaplama:

AChE, kolin oluşturmak için asetilkolini katalize eder ve kolin, TNB oluşturmak için DTNB ile reaksiyona girer. TNB, 412nm'de bir emilim zirvesine sahiptir. AChE'nin aktivitesi, 412nm'de artan absorbans oranının ölçülmesiyle hesaplanır. Dakikada bir mg protein ile bir nmol TNB üretimini katalize eden enzimatik miktar bir birim olarak tanımlanır.

$$\text{AChE Aktivitesi (U/mg)} = (\Delta A \times \frac{V\,t}{\varepsilon \times d} \times 10^9) \div (Cpr \times V_s) \div T \times f$$

ΔA : ilk ve son absorbansın arasındaki fark
V_t : toplam reaksiyon hacmi ; 2ml
ε : TNB'nin 412 nm dalga boyunda Absorbsiyon Katsayısı ; 14,15 $mM^{-1}cm^{-1}$
d: kuvet'in uzunluğu; (1 cm)
Cpr : Örneğin protein konsantrasyonu (mg/ml)
Vs : Kullanılan örnek hacmi; (0,132ml)
T : reaksiyon süresi ; (1 dakika)
f : sulandırma katsayısı ; X2

3.2.6. Katalaz (CAT) Aktivite Ölçümü

CAT aktivite ölçümü, manuel talimate göre spektrofotometre yöntem ile gerçeklestirildi. CAT rolü, H_2O_2'i oksijen ve suya dönüştürmektir.

Deneysel işlemler Çizelge 3.2'de gösterilen adımlar takip edilerek yapıldı ve CAT'ın aktivasiyonu H_2O_2'nin ayrışma hızı göre, spektrofotometre cihaz ile 240 nm dalga boyunda ve 34,9 $mM^{-1}cm^{-1}$ absorbsiyon katsayısıda okundu.

Çizelge 3.2. CAT aktivite ölçümünde uygulanan deneysel işlemleri

Kullanılan Çözeltiler	**Çözeltme Hazırlanma**	**Miktar**
Fosfat Tampon (0.05 M) (PH=7)	80ml K_2HPO_4 +19.2ml KH_2PO_4'ın karışımı	1200 µl
H_2O_2(%30) (0.06 M)	KH_2PO_4'tan hazırlandı	600 µl
Beyin Homojenatlar X2		200 µl
Kör (Fosfat Tampon)		1660 µl
Absorbans değişimi 240 nm dalga boyunda, her dakikada bir kez toplam 5 dakika boyunca kaydedildi.		
Çözelti karışımı ve beyin homojenatları 2 ml hacim oranında uygulandı.		
Her deneysel karışımı cihaza koymadan önce fosfat tampon ve ara sıra distile su ile 240 nm dalga boyunda sıfırlandı.		

Aktivite Hesaplama:

Her denysel karışımı 240 nm dalga boyunda, bir dakika süresinde, okundu.

CAT'ın spesifik aktivite ise Cuellar-Cruz ve diğerleri (2009) aşağıdakı förmgül ile elde edildi:

$$\text{CAT Aktivitesi (U/mg)} = \frac{(A_{0-}A_{60})\times V_t}{\varepsilon_{240} \times d \times V_s \times C_t \times 0{,}001}$$

$A_0 - A_{60}$: ilk ve son absorbansın arasındaki fark
V_t : Reaksiyonun toplam hacmi; (2ml)
ε_{240} : 240 nm dalga boyunda H_2O_2 Absorbsiyon Katsayısı ; 34,9 $mM^{-1}cm^{-1}$
d: kuvet'in uzunluğu; (1 cm)
V_s : Kullanılan örnek hacmi; (0,2ml)
C_t : Örneğin protein konsantrasyonu (mg/ml)
0,001: Dakikada mmol H_2O_2 ayrışımı

3.2.7. Glutatyon S-transferaz (GST) Aktivite Ölçümü

Bu çalışmada GST aktivitesi, Habig ve diğerleri (1974) metodüyle 340 nm dalga boyunda spektrofotometrisi ve 25ºC oda sıcaklığı ile ölçüldü.

GSH ile ilişkili oksidatif strese karşı koruma konusunda iki tip enzim; GPx ve GST'e bağlıdır. GST, glutatyon tiyolat anyonların bir nükleofil olarak dahil olduğu çok çeşitli reaksiyonları katalize eder. GST'ın genel substratı, 1-kloro-2,-4-dinitrobenzen (CDNB) kombinasyonudur. Bu sebeple GSH reaksiyonunu girer ve GST etkisile 340 nm dalga boyunda, GSH-CDNB kombinasyonu (dinitrofenol tieter) üretimini sağlamaktadır.

Böylece çalışmada GST aktivitesi, potasyum fosfat tamponu ve GSH çözeltisinin indirgenmesi ve CDNB substratı, 340 nm dalga boyunda spektrofotometrisi ile ölçüldü (Mannervik, 1985; Boyland ve Chasseaud, 1969).

GST'lerin ilk karakterize edilen aktivitesi, metabolik detoksifikasyonlarında önemli bir adım olan GSH ksenobiyotik konjugatlarının oluşumunu katalize etme yetenekleriydi. Bu süreç, sıralı olarak entegre bir şekilde hareket eden üç aşamadan oluşur:

Faz I, esas olarak CYP sistemi tarafından katalize edilen oksidasyon reaksiyonları yoluyla, ksenobiyotiğin aktivasyonunu içerir ve onları suda çözülen halına getirebilmek için _NH_2 ve _OH gibi bileşikleri bağlanır.

Faz II, GST'ler, glutatyonun (GSH) çok çeşitli endojen ve eksojen elektrofilik bileşiklere konjugasyonunu katalize eder.

Faz III, konjugatların ATP'ye bağımlı GS-X pompaları tarafından atılım yoluyla sitoplazmadan elimine edilmesini görür (Coleman ve diğerleri, 1997). Çizelge 3.3'de gösterilen adımlar takip edilerek deneysel işlemler gerçekleştirildi.

Çizelge 3.3. GST aktivite ölçümünde uygulanan deneysel işlemleri

Kullanılan Çözeltiler	**Çözeltme Hazırlanma**	**Miktar**
Fosfat Tampon (50 mM) (PH=6.5)	80ml K_2HPO_4 +19.2ml KH_2PO_4'ın karışımı	1670 µl
CDNB (0.5 mM)	10ml hacimde, %99 alkol ile hazırlandı	80 µl
GSH (5 mM)	10ml hacimde, Fosfat Tampondan hazırlandı	200 µl
Beyin Homojenatlar X2		50 µl
Kör (Fosfat Tampon)		1660 µl
Absorbans değişimi 340 nm dalga boyunda, her dakikada bir kez toplam 5 dakika boyunca kaydedildi.		
Çözelti karışımı ve beyin homojenatları 2 ml hacim oranında uygulandı.		
Her deneysel karışımı cihaza koymadan önce fosfat tampon ve ara sıra distile su ile 340 nm dalga boyunda sıfırlandı.		

Aktivite Hesaplama:

Her denysel karışımı 340 nm dalga boyunda, bir dakika süresinde okundu. Absorbans değişimi (ΔA_{340}) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$(\Delta A_{340})/\text{dak} = \frac{A_{340}\ (\text{sonraki okuma}) - A_{340}\ (\text{birinci okuma})}{\text{okuma zamanı (dak)}}$$

GST'ın spesifik aktivite ise aşağıdaki formul ile elde edildi:

$$\text{GST Aktivitesi (U/mg)} = \frac{\frac{\Delta A_{340}}{\text{dak}} \times V \times \text{sulandırma katsayısı}}{\varepsilon_{mM} \times V_{enz}}$$

$\frac{\Delta A_{340}}{\text{dak}}$: 340 nm dalga boyunda absorbans değişimi
V: Kuvet Hacmi (ml) ; 2 ml
sulandırma katsayısı: X2
ε_{mM} :Absorbsiyon Katsayısı ; 9,6 $mM^{-1}cm^{-1}$
V_{enz}: Kullanılan örnek hacmi (ml) ; 0,05

3.2.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism 9.4.1 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlendi. Sonuç ortalama değer ve standart hata (SH) olarak ifade edildi. Farklar, $p \leq 0,05$ ve $p \leq 0,01$ ile istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tez çalışmasında, sıçanlar 4 farklı deney grubuna ayrıldıktan sonra ilk gruba altı gün boyunca 900 mg/kg dozunda toluen i.p yolla uygulandı. İkinci deney grubuna (n=6) aynı dozda toluen ile birlikte 5 mg/kg resveratrol; üçüncü deney grubuna (n=6) 10 mg/kg; dördüncü deney grubuna (n=6) 20 mg/kg resveratrol i.p yolla uygulandı (resveratrol %10 etanol içerisinde hazırlandı). Altı günün sonunda sıçanlar servikal dislokasyon yoluyla öldürülerek beyin dokusu süratle alındı. Beyin dokularında AChE, CAT ve GST enzim aktiviteleri araştırıldı. Sonuçlar ortalama ve standart hata (Ort $\pm$ SH) olarak hesaplandı. Tüm sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

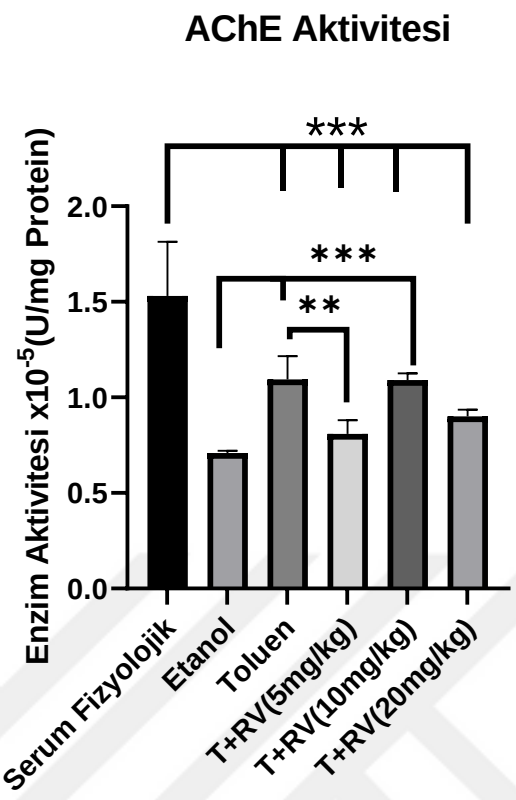
Çizelge 4.1. Toluen ve Toluen + Resveratrol kombinasyonunun sıçan beyin dokularında AChE, CAT ve GST özgül aktivitelerine etkisi.

Enzimler	Kontrol		Toluen	Toluen+Resveratrol		
	SF Ort±*SH*	Etanol Ort±*SH*	Ort±SH	5mg/kg Ort±SH	10mg/kg Ort±SH	20mg/kg Ort±SH
AChE	1,56±0,31	0,70±0,01	1,09±0,13***	0,80±0,08	1,09±0,04***	0,9±0,04
CAT	0,92±0,06	1,43±0,17	3,56±0,14***	2,03±0,04***	1,28±0,11	1,71±0,10***
GST	3,27±0,01	9,73±1,06	13,75±0,95***	11,45±1,05**	10,07±0,12	10,9±0,2*

SF: Serum Fizyolojik
Ort: Ortalama
SH: Standart Hata
Tablodaki veriler (U/mg protein $\times 10^{-5}$) olarak ifade edilmektedir.
*: $p<0,05$
**: $p<0,01$
***: $p<0,001$ kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.1 Beyin Dokularında Asetilkolin estereaz (AChE) Aktivitesi

Toluen ve resveratrolün farklı konsantrasyonlarda kombinasyon uygulamasının sıçan beyin dokularında AChE aktivitesi üzerine etkisi serum fizyolojik ve etanol kontrol grupları ile karşılaştırılarak Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Serum fizyolojik kontrol grubunda AChE aktivitesi $1,56\times10^{-5}$ U/mg.protein; etanol kontrol grubunda AChE aktivitesi $0,70\times10^{-5}$ U/mg.protein olarak belirlendi. Toluen uygulanan grupta AChE aktivitesi $1,09\times10^{-5}$ U/mg.protein olduğu ve kontrol gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gözlenmiştir ($p<0,001$). Toluen+5 mg/kg resveratrol uygulanan grupta AChE aktivitesi $0,80\times10^{-5}$ U/mg.protein; toluen+10 mg/kg resveratrol uygulanan grupta AChE aktivitesi $1,09\times10^{-5}$ U/mg.protein; toluen+20 mg/kg resveratrol uygulanan grupta AChE aktivitesi $0,9\times10^{-5}$ U/mg.protein olduğu bulunmuştur. Çalışılan resveratrolün 10 mg/kg derişimde AChE aktivitesinin etanol kontrol değerlerine göre artış göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı olduğunu görülmüştür ($p<0,001$). Aynı zamanda resveratrolün 5 mg/kg ve 10 mg/kg derişimlerde AChE aktivitesinin etanol kontrol değerlerine göre anlamlı olmadığı alınmıştır ($p>0,05$). Bunun yanı sıra AChE aktivitesinin toluen uygulanan grupta toluen+resveratrolün 5 mg/kg değerleri karşılaştırıldığında, artış gösterildi ve istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirlenmiştir ($p<0,01$). Toluen+ resveratrolün 10 mg/kg ve toluen+ resveratrolün 20 mg/kg değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını fark gösterdiği belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.1).

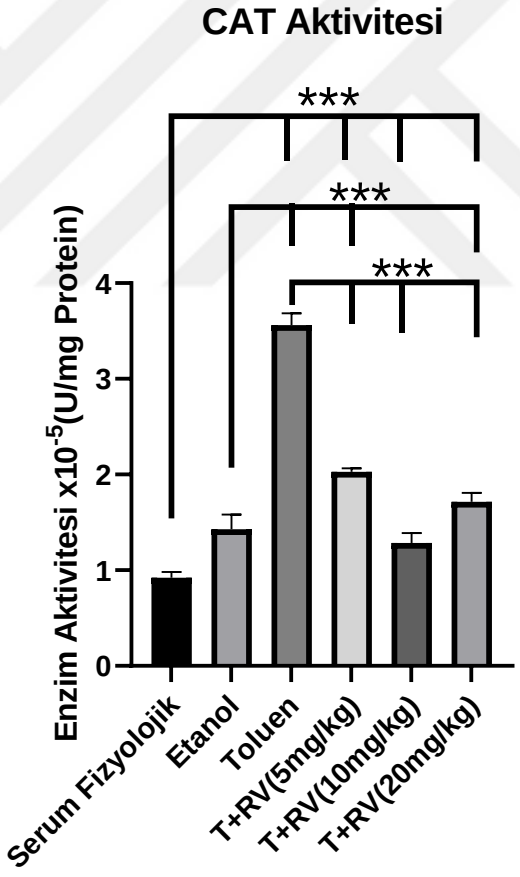


Şekil 4.1. Toluen ve toluen+resveratrol (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) kombinasyonunun sıçan beyin dokularında AChE enzim aktivitesi $\times 10^{-5}$ (U/mg.protein) üzerine etkisi (n=6). *Kontrol ve toluen grubundaki verilere göre farklı gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*:p<0,05, **:p<0,01 ve ***:p<0,001) ifade etmektedir.

4.2 Beyin Dokularında Katalaz (CAT) Aktivitesi

Toluen ve resveratrolün farklı konsantrasyonlarda kombinasyon uygulamasının sıçan beyin dokularında CAT aktivitesi üzerine etkisi serum fizyolojik ve etanol kontrol grupları ile karşılaştırılarak Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Serum fizyolojik kontrol grubunda CAT aktivitesi $0{,}92\times10^{-5}$ U/mg.protein; etanol kontrol grubunda CAT aktivitesi $1{,}43\times10^{-5}$ U/mg.protein olarak belirlendi. Toluen uygulanan grupta CAT aktivitesi $3{,}56\times10^{-5}$ U/mg.protein olduğu ve kontrol gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0{,}001$). Toluen+5 mg/kg resveratrol uygulanan grupta CAT aktivitesi $2{,}03\times10^{-5}$ U/mg.protein; toluen+10 mg/kg resveratrol uygulanan grupta CAT aktivitesi $1{,}28\times10^{-5}$ U/mg.protein; toluen+20 mg/kg resveratrol

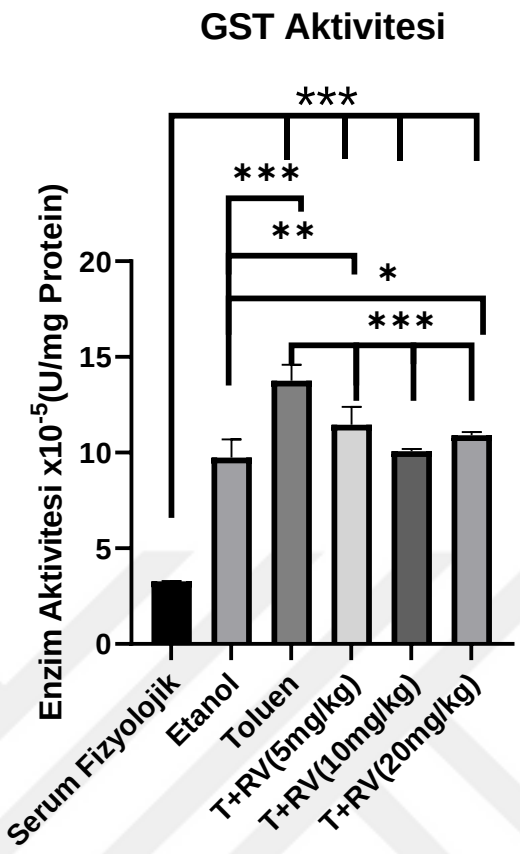
uygulanan grupta CAT aktivitesi $1,71\times10^{-5}$ U/mg.protein olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışılan toluen+resveratrolün 5 mg/kg derişimlere CAT aktivitesinin serum fizyolojik ve etanol kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur ($p<0,001$). Toluen+resveratrolün 10 mg/kg derişimlere CAT aktivitesinin etanol kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Toluen+resveratrolün 20 mg/kg derişimlere CAT aktivitesinin serum fizyolojik ve etanol kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,001$). Bunun yanı sıra CAT aktivitesinin toluen uygulanan grupta toluen+resveratrolün 5 mg/kg, toluen+resveratrolün 10 mg/kg ve toluen+resveratrolün 20 mg/kg değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu fark gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Toluen ve toluen+resveratrol (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) kombinasyonunun sıçan beyin dokularında CAT enzim aktivitesi$\times10^{-5}$ (U/mg.protein) üzerine etkisi (n=6). *Kontrol ve toluen grubundaki verilere göre farklı gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*:$p<0,05$, **:$p<0,01$ ve ***:$p<0,001$) ifade etmektedir.

4.3 Beyin Dokularında Glutatyon S transferaz (GST) Aktivitesi

Toluen ve resveratrolün farklı konsantrasyonlarda kombinasyon uygulamasının sıçan beyin dokularında GST aktivitesi üzerine etkisi serum fizyolojik ve etanol kontrol grupları ile karşılaştırılarak Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Serum fizyolojik kontrol grubunda GST aktivitesi $3,27\times10^{-5}$ U/mg.protein; etanol kontrol grubunda GST aktivitesi $9,73\times10^{-5}$ U/mg.protein olarak belirlendi. Toluen uygulanan grupta GST aktivitesi $13,75\times10^{-5}$ U/mg.protein olduğu ve kontrol gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gözlenmiştir ($p<0,001$). Fakat toluen+5 mg/kg resveratrol uygulanan grupta GST aktivitesi $11,45\times10^{-5}$ U/mg.protein; toluen+10 mg/kg resveratrol uygulanan grupta GST aktivitesi $10,07\times10^{-5}$ U/mg.protein; toluen+20 mg/kg resveratrol uygulanan grupta GST aktivitesi $10,9\times10^{-5}$ U/mg.protein olduğu bulunmuştur. Toluen+resveratrolün 5 mg/kg derişimlere GST aktivitesinin serum fizyolojik kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak oldukça anlamlı ($p<0,001$) ve etanol kontrol değerlerine göre de istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) gösterilmiştir. Bunun yanı sıra çalışılan resveratrolün derişimlere 10 mg/kg'da GST aktivitesinin serum fizyolojik kontrol değerine göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu görülmüştür ($p<0,001$) ve etanol kontrol değerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Bunlara birlikte resveratrolün derişimlere 20 mg/kg'da GST aktivitesinin serum fizyolojik kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu ($p<0,001$) ve etanol kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ($p<0,05$) gösterilmiştir. GST aktivitesinin toluen uygulanan grupta toluen+resveratrolün 5 mg/kg, toluen+ resveratrolün 10 mg/kg ve toluen+ resveratrolün 20 mg/kg değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu fark gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Toluen ve toluen+resveratrol (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) kombinasyonunun sıçan beyin dokularında GST enzim aktivitesi×10^{-5} (U/mg.protein) üzerine etkisi (n=6). *Kontrol ve toluen grubundaki verilere göre farklı gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p<0,05$ **:$p<0,01$ ***:$p<0,001$) ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada toluen maruziyetine neden olan sıçanların beyin dokusundaki, nörotransmitter oksitleyici enzim olarak bilinen AChE ve antioksidan olan enzimler CAT ve GST aktiviteleri ile resveratrolün koruma etkileri araştırılmıştır.

Beyin, ağırlık bazında en yüksek oksijen tüketim oranlarından birine sahip, aerobik bir organdır. Bu nedenle, radikallerin oksidatif hasarına daha duyarlı doku olarak düşünülebilmektedir (Haider ve diğerleri, 2014). Aynı zamanda antioksidan enzimlerin diferansiyel ekspresyonu, farklı sinir hücre tiplerinde ve beyin bölgelerinde bildirilmiştir (Kodavanti ve diğerleri, 2011).

AChE, santral ve periferik sinir sistemlerinde önemli bir nörotransmitter olan asetilkolinin hidrolizinde yüksek katalitik aktiviteye sahip bir enzimdir (Chatonnet ve diğerleri, 2003). AChE sadece kolinerjik nörotransmisyonun modüle edilmesinde kritik rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda nörodejeneratif hastalıklar ve bazı nöromüsküler bozukluklar gibi çeşitli nörolojik bozukluklarla ilişkili nörogelişim sırasında önemli bir enzimdir (Colovic ve diğerleri, 2013). AChE ayrıca bazı kirleticilerin nörotoksisitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçtir (Lionetto ve diğerleri, 2013; Jalady ve Dorandeu 2013; Zhao ve diğerleri, 2016).

Morero ve diğerleri (1972) tarafından yapılan çalışmada membran integral proteinler AChE'in allosterik özellikleri membran akışkanlığı ile ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada alkol ve toluen gibi organik çözücülerin, membrandaki lipid/protein oranı akışkanlığını değiştirdiğini göstermiştir. Euler ve diğerleri (1990) tarafından yapılan başka *in vitro* çalışmada, toluen ilavesinden sonra sinaptozomal membran akışkanlığında doza bağımlı bir artış olduğunu ve sitozolik Ca^{2+} seviyesinin arttığını belirlenmiştir. Bu sonuçlardan sonra 2,5 mM toluen ilavesinin membran akışkanlığının arttığını Edelfors ve Ravn-Jonsen (1989) tarafından göstermiştir. Sonuç olarak toluen maruzyeti sinaptozomal membran akışkanlığının doğrusal olarak artırması ve AChE aktivitesinin doğrusal olarak azaltması ile korelasyon göstermiştir (Engelke ve diğerleri, 1992). Honma (1983) tarafından toluen ve n-hekzan'a kısa süreli maruz kaldıktan sonra sıçan beyninde asetilkolin metabolizmasındaki değişiklikler adlandıran yapılan araştırmada hem toluen ve hem n-hekzan uygulamasında AChE aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Bu tez

çalışmamızda da, beyin dokularında toluen uygulanması ile AChE aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.

Oksidatif hasar, ROS üretimindeki ve hücresel antioksidan savunma mekanizmalarındaki dengesizliğin son ürünüdür (Kodavanti ve diğerleri, 2011). Bu alanda birkaç rapor, etanol ve toluen gibi çözücülerin sinir sisteminde hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak aşırı ROS ürettiğini göstermiştir (Rouach ve diğerleri, 1987; Mattia ve diğerleri, 1991). Yayınlanan raporlara göre, Tiol-Disülfür Sistemi SH grubunun proteinlerdeki ve düşük moleküler bileşiklerin oksidasyona karşı kararsızlığı nedeniyle ROS faktörlere karşı son derece hassas olduğu bilinmektedir. İki antioksidan enzim, GST ve CAT, oksidatif stres hasarlarının önlenmesinde önemlidir. GST, glutatyonun organofosforlu pestisitler ve lipit peroksidasyonu sırasında üretilen sitotoksik aldehitler de dahil olmak üzere ksenobiyotiklerle konjugasyonunu katalize etmektedir (Booth ve O'Halloran 2001). CAT, tüm aerobik olarak solunum yapan organizmalarda bulunan oksidoredüktaz enzimdir. Temel aerobik metabolizmanın bir yan ürünü olan hidrojen peroksitin (H_2O_2) neden olduğu hücresel bileşenlerin oksidatif hasarını ve ayrıca yüksek oranda reaktif ürünlerin önlenmesinde çok önemli koruyucu rol oynamaktadır. CAT peroksidik bağın heterolitik bölünmesini katalize eder, bu nedenle hücrelerde ROS birikmesini önler ve ayrıca hücresel sinyal yollarındaki konsantrasyonlarını düzenler (Somogyi ve diğerleri, 2007). Bu iki enzimin aktivitelerinin azalması durumunda, organizma'ya çok yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerine maruz kalabilir ve bu da lipitler, proteinler ve DNA gibi ana hücresel bileşenlerin oksidatif hasarlarına yol açabilir (Halliwell ve Gutteridge 1986).

Coskun ve diğerleri (2005) tarafından yapılan çalışmada, sıçanlar onaltı hafta boyunca toluene yüksek doz inhelasyon yoluyla maruz bırakılmış ve kan ve doku örnekleri biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmiştir. Çalışmada kan ve siyatik sinirlerde toluen miktarı artması ile (SOD, GSH-Px) gibi antioksidanların aktivitesini azalmalar belirlenmiştir. Fakat dokularda CAT aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar, tez çalışmamızda destekler nitelikte olup, tez çalışlmamızda da toluen etkisiyle beyin dokusunda CAT aktivitesinde artış belirlenmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada sıçanlarda toluen uygulamasının beyin dokularında hasara, SOD ve GPx enzim aktivitelerinde artışa neden olduğu, resveratrolün ise bu hasara karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Moawad ve diğerleri, 2021).

El-Nabi Kamel ve Shehata (2008) tarafından yapılan çalışmada toluen maruziyetinin GSH metabolize edici enzimlerin (GPx ve GST) aktivitelerinde değişikliğe neden olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmada, GST aktivitesinin toluen maruziyet süresi ile küçük bir kademeli artış gösterdiği belirtilmiştir. Tez çalışmamızda, toluen maruziyeti sonrasında kontrol grubuna oranla GST aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.

Resveratrol doğal bir polifenol olarak, çok yüksek antioksidan potansiyeline etilen köprüsü ile iki fenolik halka bağlanma yapısını sahiptir. Aromatik halkaların varlığı nedeniyle, resveratrolün C vitamini ve E vitamini gibi bilinen antioksidanlara kıyasla daha etkili radikal süpürme özellikleri sergilediği bilinmektedir (Soares, Andreazza ve Salvador, 2003).

Kumar ve diğerleri, 2007 yılında yaptıkları çalışmada, sıçanlarda trans resveratrol'ün kolşisin (mikrotübül bozucu, kolinerjik nöronların kaybına ve aşırı radikal üretimi ile ilişkili bilişsel işlev bozukluğuna neden olan bir ajan) kaynaklı kognitif bozukluk ve oksidatif stresin önlenmesindeki etkili olduğunu belirtmişlerdir. Kolşisin uygulaması AChE aktivitesini belirgin bir azalmaya neden olduğu, ancak kolşisin ile resveratrol'ün (10 mg/kg ve 20 mg/kg) uygulaması AChE aktivitesinin önemli ölçüde restore edildiği belirtilmiştir. Tez çalışmamızın aksine toluen maruziyetine karşı toluen+resveratrol (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) derişimler'de AChE aktivitesinin azalttığı gözlenmiştir.

Kumar ve diğerleri, 2007 yılındaki çalışmasında, kolşisin toksisitesine karşı kolşisin ile resveratrol'ün (10 mg/kg ve 20 mg/kg) uygulaması GSH seviyesini yükseldi ve bununla birlikte GST aktivitesi artması sebep olunmuştur. Sonuçlarımızda beyin dokusunda uygulanan GST, toluene karşı toluen ile resveratrol'ün (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) artış görünmemiştir.

Mokni ve diğerleri (2007) tarafından yapılan çalışmada, resveratrol'ün sağlıklı sıçanların beyninde doza bağımlı olarak SOD, CAT ve peroksidaz aktivitelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışması sonuçlarımızda bu artış toluene karşı toluen ile resveratrol'ün (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) CAT aktivitesinde etki gözlenmedi.

Dere ve diğerleri, 2022 yılında yapılan bir çalışma erkek sıçanların kan, karaciğer ve kas dokularında toluen maruziyetinin laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi üzerine etkisini baktığında kontrol gruplara göre anlamlı artış gözlenmiştir ki bu artış toluen ile resveratrol'ün (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) dozlar uyguladıktan sonra tüm dokularda toluen group ile karşılaştırıldığında anlamlı derece kuruyucu etki gösterildi, LDH aktivite azalması neden olduğunu belirlemiştir. Bu etkiler bizim tez çalışmamızda benzer etkiler gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, sıçanlara uygulanan toluen maruziyetinin sıçan beyin dokularında AChE enzim aktivitesinde istatistiksel anlamlı bir değişime neden olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Benzer şekilde toluen+resveratrol 5 mg/kg derişimde toluen değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı değişimler bulunmuştur ($p<0,01$). Toluen+resveratrol 10 mg/kg uygulanan etanol kontrol grupla AChE enzim aktivite baktığında istatistiksel olarak anlamlı değişimler bulundu ($p<0,001$).

CAT aktivitesinde toluen maruziyeti sonrasında istatistiksel olarak anlamlı yükseldiği bulunmuştur ($p<0,001$). Toluen ile birlikte resveretrol uygulanmasında gerek (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) değerler toluen grubuna göre azaldığı gözlenmiştir ve CAT aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Toluen ile birlikte resveretrolün (5 mg/kg ve 20 mg/kg) değerlerde etanol kontrol grup baktığında CAT aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).

GST aktivitesinin toluen maruziyeti sonrasında arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Toluen ile birlikte resveretrol uygulanmasında gerek (5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg) değerler toluen grubuna göre azaldığı gözlenmiştir ve GST aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Benzer şekilde GST enzim aktivite baktığında toluen+resveratrol 5 mg/kg derişimde etanol kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı değişimler bulunmuştur ($p<0,01$). Toluen+resveratrol 10 mg/kg uygulanan etanol kontrol grup kıyasla ise istatistiksel olarak anlamlı değişimler bulundu ($p<0,05$).

Sonuç olarak bu çalışmada toluene maruz kalmanın beyin dokusunda AChE, CAT ve GST enzimler aktivitesini arttırdığı sonuçlanmıştır. Toluen ile birlikte resveratrol uygulaması ile AChE, CAT ve GST enzim aktivitelerinde değişikliğe yol açarak toluene

karşı kuruyucu etki gösterebilmektedir. Bu etkinin daha net bir şekilde gözlenebilmesi için daha ileri analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

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.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2000). Toxicological profile for toluene.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2013). Toluene Chemical and Physical Properties.

Akinwumi, B. C., Bordun, K. M., and Anderson, H. D. (2018). Biological activities of stilbenoids. *Internatinal journal of molecular sciences*, 19(3), 792. https://doi.org/10.3390/ijms19030792

Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357, 593-615. https://doi.org/10.1042/bj3570593

Alfonso-Prieto, M., Biarnes, X., Vidossich, P., Rovira, C. (2009). The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. *American Chemical Society,* 131(33), 11751–11761. https://doi.org/10.1021/ja9018572

Anderews, L. S., Lee, E. W., Witmer, C. M., Kocsis, J. J., Snyler, R. (1977). Effects of toluene on the metabolism: Disposition and hemopoietic toxicity of Hbenzene. *Biochemical Pharmacology,* 26(4), 293-300. https://doi.org/10.1016/0006-2952(77)90180-0

Andersson, R., Carlsson, A., Nordqvist, M. B., Sollenberg, J. (1983). Urinary excretion of hippuric acid and o-cresol after laboratory exposure of humans to toluene. *International Archives of Occupational and Environmental Health,* 53(2), 101-108. https://doi.org/10.1007/BF00378422

Angerer, J. (1979). Occupational chronic exposure to organic solvents. VII. Metabolism of toluene in man. *Int Arch Occup Environ Health,* 43(1), 63-67. https://doi.org/10.1007/BF00454281

Angerer, J., Schildbach, M., and Kramer, A. (1998). Gas chromatographic method for the simultaneous determination of S-p-toluylmercapturic acid and S-phenylmercapturic acid in human urine. *Journal of Analytical Toxicology,* 22(3), 211–214. https://doi.org/10.1093/jat/22.3.211

Aprioku, J. S. (2013). Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. *Journal of Reproduction & Infertility,* 14(4), 158–172.

Aydemir, B., ve Karadağ Sarı, E. (2009). Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. Kocatepe *Veterinary Journal,* 2, 56-60.

Bakke, O. M., and Scheline, R. R. (1970). Hydroxylation of aromatic hydrocarbons in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*,16, 691-700. https://doi.org/10.1016/0041-008X(70)90074-8

Balser, J. R. (2001). The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33, 599–613. https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1346

Balster, R. L., Cruz, S. L., Howard, M. O., Dell, C. A., Cottler, L. B. (2009). Classification of abused inhalants. *Addiction*, 104(6), 878–882. https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2008.02494.x

Baud, I., and Ardaillou, R. (1986). Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. *The American Journal of Physiology*, 251, 765–776. https://doi.org/10.1152/ajprenal.1986.251.5.F765

Beekwilder, J., Wolswinkel, R., Jonker, H., Hall, R., Vos, C. H., Bovy, A. (2006). Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5670–5672. https://doi.org/10.1128/AEM.00609-06

Bellier, J. P., and Kimura, H. (2011). Peripheral type of choline acetyltransferase: Biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 42(4), 225–235. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.02.005

Birben, E ., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense.*The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613

Boocock, D. J., Patel, K. R., Faust, G. E. S., et al. (2007). Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 848(2), 182–187. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.017

Booth, L.H., and O' Halloran, K. (2001). A comparison of biomarker responses in the earthworm Aporrectodea caliginosa to the organophosphorous insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2494–2502. https://doi.org/ 10.1897/1551-5028(2001)020<2494:acobri>2.0.co;2

Bowen, S. E., Batis, J. C., Mohammadi, M. H., Hannigan, J. H. (2005). Abuse pattern of gestational toluene exposure and early postnatal development in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 27(1), 105–116. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.09.007

Boyland, E., and Chasseaud, L. F. (1969). The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 32, 173-219. https://doi.org/10.1002/9780470122778.ch5

Cao, G., and Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44, 1309– 1315.

Cara, J., Mattia Syed, F., Ali., Stephen, C., Bondy. (1992). Toluene-Induced Oxidative Stress in Several Brain Regions and Other Organs. Mol Chem Neuropathol, 18(3), 313-328. https://doi.org/ 10.1007/BF03160122

Carlsson, A. (1982). Exposure to toluene: Uptake, distribution and elimination in man. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 8(1), 43-55. https://doi.org/10.5271/sjweh.2497

Chastang, T., Pozzobon, V., Taidi, B., Courot, E., Clement, C., Pareau, D. (2018). Resveratrol production by grapevine cells in fed-batch bioreactor: Experiments and modelling. *Biochemical Engineering Journal*, 131, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.12.009

Chatonnet, F., Boudinot, E., Chatonnet, A., Taysse, L., Daulon, S., Champagnat, J., Foutz, A. S. (2003). Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse. *The European Journal of Neuroscience*, 18(6), 1419-1427. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02867.x

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), 1381. https://doi.org/10.3390/ijms20061381

Coleman, J. O. D., Blake-Kalff, M. M. A., Davies, T. G. E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Science*, 2(4), 144–151.

Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315-335. https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006

Coskun, O., Oter, S., Korkmaz, A., Armutcu, F., and Kanter, M. (2005). The Oxidative and Morphological Effects of High Concentration Chronic Toluene Exposure on Rat Sciatic Nerves. *Neurochemical Research*, 30(1), 33-38. http://doi.org/10.1007/s11064-004-9683-6

Cosnier, F., Brochard, C., Burgart, M., 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

Costa, L.G., Cole, T. B., Vitalone, A., Furlong, C. E. (2005). Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *International Journal of Clinical Chemistry*, 352, 37–47. https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.09.019

Cruz, S. L., Rivera-Garcia, M. T., and Woodward, J. J. (2014). Toluene Actions: Clinical Evidence, Animal Studies, and Molecular Targets. *Journal of Drug and Alcohol Research*, 3, 235840. https://doi.org/10.4303/jdar/235840

Cuellar-Cruz, M., Castano, I., Arroyo-Helguera, O., De Las Penas, A. (2009). Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen Candida glabrata. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,*104(4), 649-654. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000400020

Daniels, G. (2007). Functions of red cell surface proteins. *Vox Sanguinis*, 93(4), 331–340. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00970.x

Delmas, D., Aires, V., Limagne, E., et al. (2011). Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 48–59. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05871.x

Dere, E., Tuna, G., and El Arfaoui, A. (2022). The protective properties of resveratrol on lactate dehydrogenase activity in toluene exposed rats. *Research Square*, https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1985840/v1

Dingova, D., Leroy, J., Check, A., Garaj, V., Krejci, E., Hrabovska, A. (2014). Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. *Analytical Biochemistry*, 462, 67–75. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.05.031

Dong, S. Ch., Sha, H. H., Xu, X. Y., Hu, T. M., Lou, R., Li, H., Wu, J. Z., Dan, Ch., Feng. J. (2018). Glutathione S-transferase π: a potential role in antitumor therapy. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 3535-3547. https://doi.org/10.2147/DDDT.S169833

Dutkiewicz, T., and Tyras, H. (1968). Skin absorption of toluene, styrene and xylene by man. *British journal of industrial medicine*, 25(3), 243. http://dx.doi.org/10.1136/oem.25.3.243

Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 187, 10–22. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042

Edelfors, S., And Ravn-Jonsen, A. (1989). The effect of toluene exposure for up to 18 months (78 weeks) on the (Ca^{2+}/Mg^{2+}) ATPase and fluidity of synaptosomal membranes isolated from rat brain. *Pharmacology & Toxicology,* 65(2), 140-142. https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1989.tb01144.x

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Feather Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95. https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9

El-Nabi Kamel, M. A., and Shehata, M. (2008). Effect of toluene exposure on the antioxidant status and apoptotic pathway in organs of the rat. *British Journal of Biomedical Science*, 65(2), 75-79. https://doi.org/10.1080/09674845.2008.11732801

Engelke, M., Diehl, H., and Tahti, H. (1992). Effects of Toluene and n-Hexane on Rat Synaptosomal Membrane Fluidity and Integral Enzyme Activities. *Pharmacology & Toxicology*, 71(5), 343-347. https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1992.tb00559.x

Euler, G. V., Fuxe, K., and Bondy, S. C. (1990). Ganglioside GM prevents and reverses toluene-induced increases in membrane fluidity and calcium levels in rat brain synaptosomes. *Brain Research,* 508(2), 210-214. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90398-U

Faffli, P., Savolainen, H., Kalliomiki, P. L., Kalliokoski, P. (1979). Urinary o-cresol in toluene exposure. *Scand J Work Environ Health,* 5(3), 286-289. https://doi.org/10.5271/sjweh.3103

Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., and Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology,* 14(1), 101-115. https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726

Frahm, S., Antolin-Fontes, B., Gorlich, A., Zander, J. F., Ahnert-Hilger, G., Ibanez-Tallon, I. (2015). An essential role of acetylcholineglutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence. *Elife,* 4, 11396. https://doi.org/10.7554/eLife.11396

Gambini, J., Ingles, 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. *Oxidative medicine and cellular longevity,* 2015, 837042. http://dx.doi.org/10.1155/2015/837042

Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling,* 19(9), 1807–1819. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009

Gerarde, H. W. (1959). Toxicological studies on hydrocarbons: III. The biomorphology of the phenylalkanes and phenylalkenes. *A.M.A.archives of industrial health,* 19(4), 403-418.

Getman, D. K., Eubanks, J. H., Camp, S., Evans, G. A., Taylor, P. (1992). The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *American Journal of Human Genetics,* 51(1), 170–177.

Glushakov, A.V., Glushakova, H.Y., and Skok, V.I. (1999). Modulation of nicotinic acetylcholine receptor activity in submucous neurons by intracellular messengers. *Journal of the autonomic nervous system,* 75(1), 16-22. http://dx.doi.org/10.1016/S0165-1838(98)00165-9

Gotohda, T., Nishimura, A., and 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

Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y. R., Harrison, D. G., Bhatnagar, A. (2016). Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation Research,* 119, 39–75. https://doi.org/10.1161/RES.0000000000000110

Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry,* 264(3), 672–686. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00693.x

Gusman, J., Malonne, H., and Atassi, G. (2001). A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis,* 22(8), 1111–1117. https://doi.org/10.1093/carcin/22.8.1111

Haam, J., and Yakel, J. L. (2017). cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *Journal of Neurochemistry,* 142(2), 111-121. https://doi.org/10.1111/jnc.14052

Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of biological chemistry,* 249(22), 7130-7139.

Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry,* 249(22), 7130–7139.

Haider, S., Saleem, S., Perveen, T., Tabassum, S., Batool, Z., Sadir, S., Liaquat, L., Madiha, S. (2014). Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age*, 36(3), 9653. https://doi.org/10.1007/s11357-014-9653-0

Halder, N., and Lal, G. (2021). Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 12, 660342. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660342

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 246(2), 501-514. https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90305-X

Honma, T. (1983). Changes in acetylcholine metabolism in rat brain after a short-term exposure to toluene and n-hexane. *Toxicology Letters*, 16(1-2), 17-22. http://doi.org/10.1016/0378-4274(83)90004-8

Hrbac, J., and Kohen, R. (2000). Biological redox activity: Its importance, methods for its quantification and implication for health and disease. *Drug development Research*, 50, 516–527.

Ikeda, M., and Ohtsuji, H. (1971). Phenobarbi-tal-induced protection against toxicity of toluene and benzene in the rat. *Toxicology and applied pharmacology*, 20(1), 30-43. https://doi.org/10.1016/0041-008X(71)90086-X

Jakoby, W. B. (1978). The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 46, 383-414. https://doi.org/10.1002/9780470122914.ch6

Jalady, A. M., and Dorandeu, F. (2013). Interest of the cholinesterase assay during organophosphate poisonings. *Annales francaies d anesthesise et de reanimation*, 32(12), 856-862. https://doi.org/10.1016/j.annfar.2013.08.018

Kamm, A., Przychodzen, P., Kuban-Jankowska, A., Jacewicz, D., Dabrowska, A. M., Nussberger, S., Wozniak, M., Gorska-Ponikowska, M. (2019). Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield, Nitric Oxide. *Journal Pre-proof*, https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.005

Kang, S. K., Rohlman, D. S., Lee, M. Y., Lee, H. S., Chung, S. Y., Anger, W. K. (2005). Neurobehavioral performance in workers exposed to toluene. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(3), 645-650. https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.049

Karabulut, H., Şükrü Gülay, M. (2016). Antioksidanlar. *MAE Vet Fak Derg*, 1, 65-76. Makale Kodu: 5000185894

Karuppagounder, S. S., Pinto, J. T., Xu, H., Chen, H. L., Beal, M. F., Gibson, G. E. (2009). Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 54(2), 111-118. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.10.008

Kloot, W. V., and Molgo, J. (1994). Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiological Reviews*, 74(4), 899-991. https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.4.899

Knowles, R. G., and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical Journal*, 298(2), 249–258. https://doi.org/10.1042/bj2980249

Kodavanti, P. R. S., Royland, J. E., Richards, J. E., Besas, J., Macphail, R. C. (2011). Toluene effects on oxidative stress in brain regions of young-adult, middle-age, and senescent Brown Norway rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(3), 386-398. https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.04.012

Kohen, R., and Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650. https://doi.org/10.1080/01926230290166724

Kolisnyk, B., Al-Onaizi, M. A., Hirata, P. H. F., Guzman, M. S., Nikolova, S., Barbash, S., Soreq, H., Bartha, R., Prado, M. A. M., Prado, V. F. (2013). Forebrain deletion of the vesicular acetylcholine transporter results in deficits in executive function, metabolic, and RNA splicing abnormalities in the prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 33(37), 14908–14920. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1933-13.2013

Kumar, A., Naidu, P. S., Seghal, N., Padi, S. S. V. (2007). Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Pharmacology*, 79(1), 17-26. https://doi.org/10.1159/000097511

Lawler, H. C. (1961). Turnover time of acetylcholinesterase. *The Journal of Biological Chemistry*, 236, 2296–2301.

Laza-Knoerr, A. L., Gref, R., and Couvreur, P. (2010). Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 18(9), 645–656. https://doi.org/10.3109/10611861003622552

Lester, D. B., Rogers, T. D., Blaha, C. D. (2010). Acetylcholine–Dopamine Interactions in the Pathophysiology and Treatment of CNS Disorders. *CNS neuroscience and therapeutics*, 16(3), 137-162. https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00142.x

Li, M., Kildegaard, K. R., Chen, Y., Rodriguez, A., Borodina, I., Nielsen, J. (2015). De novo production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered Saccharomyces cerevisiae. *Metabolic Engineering,* 32, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.08.007

Li, M., Schneider, K., Kristensen, M., Borodina, I., Nielsen, J. (2016). Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants. *Scientific Reports,* 6, 36827. https://doi.org/10.1038/srep36827

Limon-Pacheco, J., and Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research,* 674, 137-147. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.015

Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E. Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed Research International,* 2013, 321213. https://doi.org/10.1155/2013/321213

Liu, D., Li, B., Liu, H., Guo, X., Yuan, Y. (2017). Profiling influences of gene overexpression on heterologous resveratrol production in Saccharomyces cerevisiae. *Front. Chem. Sci. Eng.*, 11, 117–125. https://doi.org/10.1007/s11705-016-1601-3

Liu, H., He, J., Zhao, R., Chi, C., Bao, Y. (2015). A novel biomarker for marine environmental pollution of pi-class glutathione S-transferase from Mytilus coruscus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 47–54. https://doi.org/10.1016/j. ecoenv.2015.04.012

Lof, A., Hjelm, E. W., Colmsjo, A., Lundmark, B. O., Norstrom, A., Sato, A. (1993). Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to 2H8-toluene. *British Journal of Industrial Medicine,* 50(1), 55-59. http://dx.doi.org/10.1136/oem.50.1.55

Malhotra, A., Bath, S., and Elbarbry, F. (2015). An organ system approach to explore the antioxidative, anti-inflammatory, and cytoprotective actions of resveratrol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 803971. https://doi.org/10.1155/2015/803971

Mannervik, B. (1985). The isoenzymes of glutathione transferase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology,* 57, 357-417. https://doi.org/10.1002/9780470123034.ch5

Massoulie, J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neuro-Signals*, 11(3), 130–143. https://doi.org/10.1159/000065054

Mattia, C. J., LeBel, C. P., and Bondy, S. C. (1991). Effect of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochemical Pharmacology,* 42(4), 879–882. https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90048-A

Mattia, C.J., Ali, S. F., Bondy, S. C. (1993). Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Molecular and Chemical Neuropathology,* 18(3), 313–328. https://doi.org/10.1007/BF03160122

Mei, Y. Z., Liu, R. X., Wang, D. P., Wang, X., Dai, C. C. (2015). Biocatalysis and biotransformation of resveratrol in microorganisms. *Biotechnology Letters,* 37(1), 9–18. https://doi.org/10.1007/s10529-014-1651-x

Meshorer, E., and Soreq, H. (2006). Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends in Neurosciences,* 29(4), 216–224. https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.02.005

Moawad, R. S., Abd El Fattah, E. R., and Alsemeh, A. E. (2021). Deleterious Effect of Toluene on Rat Cerebrum Cortex and the Exert Effect of Resveratrol: (Histological, Immunohistochemical and Ultrastructural Study). *Egyptian Journal of Histology,* 44(3), 855-872. https://doi.org/10.21608/ejh.2021.71825.1459

Morero, R. D., Bloj, B., Farias, R. N., Trucco, R. E. (1972). The allosteric transitions from membrane bound enzymes: behaviour of erythrocyte acetylcholinesterase from fat deficient rats. *Biochimica et Biophysica Acta,* 282(1), 157-165. https://doi.org/10.1016/0005-2736(72)90319-7

Mulle, C., Lena, C., and Changeux, J. P. (1992). Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron,* 8(5), 937-945. http://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90208-U

Nawaz, W., Zhou, Z., Deng, S., Ma, X., Ma, X., Li, C., Shu, X. (2017). Therapeutic versatility of resveratrol derivatives. *Nutrients,* 9(11), 1188. https://doi.org/10.3390/nu9111188

Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry,* 178, 687-704. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010

Nieslanik, B. S., Dabrowski, M.J., Lyon, R. P., Atkins, W. M. (1999). Stopped-flow kinetic analysis of the ligand-induced coil-helix transition in glutathione S-transferase A1-1: evidence for a persistent denatured state. *Biochemistry,* 38(21), 6971-6980. https://doi.org/10.1021/bi9829130

[Occupational Safety and Health Administration (OSHA)] (2013). https://www.osha.gov/SLTC/toluene/ exposure limits.html.

Park, S. E., Kim, N. D., and Yoo, Y. H. (2004). Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Research,* 64(8), 2652–2655. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0649

Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science,* 4(2), 89-96.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0

Picciotto, M. R., Higley, M. J., and Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116–129. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036

Pick, M., Flores-Flores, C., Grisaru, D., Shochat, S., Deutsch, V., Soreq, H. (2004). Blood-cell-specific acetylcholinesterase splice variations under changing stimuli. *International Journal of Developmental Neuroscience,* 22(7), 523–531. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.07.016

Piotrowska, H., Kucinska, M., and Murias, M. (2012). Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research*, 750(1), 60–82. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.11.001

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763 https://doi.org/10.1155/2017/8416763

Powers, S. K., Ji, L. L., Kavazis, A. N., Jackson, M. J. (2011). Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*, 1(2), 941–969. https://doi.org/10.1002/cphy.c100054

Prado, V. F., Janickova. H., Al-Onaizi, M. A., Prado, M. A. (2017). Cholinergic circuits in cognitive flexibility. *Neuroscience*, 345, 130–141. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.09.013

Prior, R. L., and Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(11_12), 1173– 1181. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00203-8

Pyykko, K., Tahti, H., and Vapaatalo, H. (1977). Toluene concentrations in various tissues of rats after inhalation and oral administration. *Archives of toxicology*, 38(3), 169-176. https://doi.org/10.1007/BF00293651

Raedler, T. J., Bymaster, F. P., Tandon, R., Copolov, D., Dean, B. (2007). Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 12(3), 232–246. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001924

Role, L.W., and Berg, D. K. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*, 16(6), 1077-1085. http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80134-8

Rouach, H., Park, M. K., Orfanelli, M. T., Janvier, B., Nordmann, R. (1987). Ethanol-induced oxidative stress in the rat cerebellum. *Alcohol and Alcoholism.* Supplement, 1, 207–211.

Sagara, J., and Sugita, Y. (2001). Characterization of cytosolic glutathione S-transferase in cultured Astrocytes. *Brain Research,* 902(2), 190-197. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02384-8

Salehi, B., Mishra, A. P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Tsouh Fokou, P. V., Martins, N., Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines,* 6(3), 91. https://doi.org/10.3390/biomedicines6030091

Salisbury, D., and Bronas, U. (2015). Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. *Nursing Research,* 64(1), 53–66. https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000068

Sanders, L. M., and Zeisel, S. H. (2007). Choline: Dietary Requirements and Role in Brain Development. *Nutrition Today,* 42(4), 181–186. https://doi.org/10.1097/01.NT.0000286155.55343.fa

Schafer, F. Q., and Buettner, G. R. (2001). Redox environments of the cell as viewed throughthe redox state ofthe glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine,* 30(11), 1191–1212. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4

Schmatz, R., Melazzo-Mazzanti, C., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierres, J., Acosta Maldonado, P., Corrêa, M., Saydelles da Rosa, C., Becker, L., Bagatini, M., Fabbrin Gonçalves, J., Dos Santos Jaques, J., Schetinger, M. R., Morsch, V. M. (2009). Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. *Brain Research Bulletin,* 80(6), 371–376. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.019

Shen, T., Tai, K., Henchman, R. H., McCammon, J. A. (2002). Molecular Dynamics of Acetylcholinesterase. *Accounts of Chemical Research,* 35(6), 332-340. https://doi.org/10.1021/ar010025i

Singh, R., Devi, S., and Gollen, R. (2015). Role of free radicals in atherosclerosis, diabetes and dyslipidemia Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidemia: Larger-than-life. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews,* 31(2), 113-126. https://doi.org/10.1002/dmrr.2558

Siqueira, I. R., Fochesatto, C., Silva-Torres, I. L., Dalmaz, C., Netto, C. A. (2005). Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Science,* 78(3), 271–278. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.044

Soares, D. G., Andreazza, A. C., and Salvador, M. (2003). Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 51(4), 1077-1080. https://doi.org/10.1021/jf020864z

Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., and Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement,* 28, 41-55. http://doi.org/10.1088/0967-3334/28/4/R01

Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28, 41–55, https://doi.org/10.1088/0967-3334/28/4/R01

Szczurowska, E., Szánti-Pintér, E., Randáková, A., Jakubík, J., Kudova, E. (2022). Allosteric Modulation of Muscarinic Receptors by Cholesterol, Neurosteroids and Neuroactive Steroids. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13075. https://doi.org/ 10.3390/ijms232113075

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. *Archives of Toxicology*, 67(9), 647–650. https://doi.org/10.1007/BF01974072

Tardif, R., Plaa, G.L., and Brodeur, J. (1992). Influence of various mixtures of inhaled toluene and xylene on the biological monitoring of exposure to these solvents in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 70(3), 385-393. https://doi.org/10.1139/y92-048

Taylor, P., and Radic, Z. (1994). The cholinesterases: from genes to ´proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34, 281–320. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.34.040194.001433

Tew, K. D., Manevich, Y., Grek, C., Xiong, Y., Uys, J., Townsend, D. M. (2011). The role of glutathione s- transferase P in signaling pathways and s-glutathionylation in cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(2), 299–313. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.013

Townsend, D. M., Tew, K. D., and Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicne & Pharmacotherapy*, 57(3-4), 145-155. https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00043-X

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001

Wang, L. X., Heredia, A., Song, H., Zhang, Z., Yu, B., Davis, C., Redfield, R. (2004). Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(10), 2448–2457. https://doi.org/10.1002/jps.20156

Wang, Y., Halls, C., Zhang, J., Matsuno, M., Zhang, Y., Yu, O. (2011). Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast Saccharomyces cerevisiae by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 13(5), 455–463. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.04.005

Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., and Racke, K. (1999). The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clinical and*

Experimental Pharmacology & Physiology, 26(3), 198-205. https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.03016.x

Wille, S. M. R., and Lambert, W. E. E. (2004). Volatile substance abuse–post-mortem diagnosis. *Forensic Science International*, 142(2-3), 135–156. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.015

Woiwode, W., Wodarz, R., Drysch, K., Weichardt, H. (1979). Metabolism of toluene in man: gas-chromatographic determination of o-, m-, and p-cresol in urine. *Archives of Toxicology*, 43(2), 93-98. https://doi.org/10.1007/BF00333615

Yang, X., Wei, J., Wu, Z., Gao, J. (2019). Effects of Substrate-Binding Site Residues on the Biochemical Properties of a Tau Class Glutathione S-Transferase from Oryza sativa. *Genes*, 11(1), 25. https://doi.org/10.3390/genes11010025

Zhang, C., Zhou, P., and Yuan, T. (2016). The cholinergic system in the cerebellum: from structure to function. *Reviews in the neurosciences*, 27(8), 769-776. https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0008

Zhao, F., Wan, Y., Zhao, H., Hu, W., Mu, D., Webster, T. F. Hu, J. (2016). Levels of Blood Organophosphorus Flame Retardants and Association with Changes in Human Sphingolipid Homeostasis. *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8896-8903. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02474