

**T.C.  
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ETİL ALKOLE MARUZ KALAN RAT DOKULARINA 3-SÜBSTİTÜE  
KUMARİN BİLEŞİĞİNİN ANTIOKSİDAN VE YAĞ ASİT  
METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

**HASAN PEKTAŞ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ADYAMAN, 2021**

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

# ETİL ALKOLE MARUZ KALAN RAT DOKULARINA 3-SÜBSTİTÜE KUMARİN BİLEŞİĞİNİN ANTIOKSİDAN VE YAĞ ASİT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

## Hasan PEKTAŞ

Adıyaman Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA  
Yıl : 2021, Sayfa sayısı: IX+35  
Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA  
Prof. Dr. Adnan KURT  
Doç.Dr. Mustafa DURGUN

Bu tez çalışmasında, sıçanlarda etil alkol ile oluşturulan oksidatif strese karşı 3-asetil-6-bromo kumarin molekülünün koruyucu etkileri araştırıldı. Çalışmada dört grup oluşturuldu. Bu gruplar; Kontrol grubu (K), Kumarin grubu (C), Etil alkol grubu (E) ve Kumarin+Etil alkol (CE) grubudur. Kumarin 5 mg/kg ve Etil alkol 5 mg/kg/gün olarak uygulandı. Sıçanların karaciğer dokularında MDA, redükte GSH, AChE, GST, Ces, GR ve yağ asitleri belirlendi. Karaciğer dokusu biyokimyasal parametreleri incelendiğinde, E grubu MDA, GSH, Ces, AChE, GST düzeyleri kontrol grubuna göre arttı. Kumarin maddesinin etkisiyle kombinasyonlu grubun MDA, GSH ve Ces düzeyleri E grubuna göre azaldı. Karaciğer dokusu yağ asit düzeyleri incelendiğinde, E grubu 18:0 yağ asit düzeyi K grubuna göre artarken, 22:6n3, 18:2n6, 18:3n6, 18:1n9 yağ asit düzeyleri nispi olarak azaldı. Kumarin maddesinin etkisiyle, CE grubu doymamış yağ asit düzeyleri E grubuna göre nispi olarak arttığı gözlemlendi. Sonuç olarak etil alkol ile oluşturulan oksidatif strese karşı 3-asetil-6-bromo kumarin molekülünün düzeltici etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Etil alkol; Kumarin; MDA; Enzim Aktivitesi; Yağ Asitleri

## ABSTRACT

### MSc Thesis

# THE EFFECTS OF 3-SUBSTITUTED COUMARIN COMPOUND ON ANTIOXIDANT AND FATTY ACID METABOLISM OF THE RAT TISSUES EXPOSED TO ETHYL ALCOHOL

**Hasan PEKTAŞ**

Adiyaman University  
Graduate Education Institute  
Department of Chemistry

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA

Year : 2021, Number of pages: IX+35

Jury : Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA

Prof. Dr. Adnan KURT

Doç.Dr. Mustafa DURGUN

In this thesis study, the protective effects of 3-acetyl-6-bromo coumarin molecule against oxidative stress induced by ethyl alcohol in rats were investigated. Four groups were formed in the study. These groups are; Control group (K), Coumarin group (C), Ethyl alcohol group (E) and Coumarin + Ethyl alcohol (CE) group. Coumarin was administered at 5 mg/kg and also Ethyl alcohol as 5 mg/kg/day. MDA, reduced GSH, AChE, GST, Ces, GR and fatty acids were determined in the liver tissues of rats. When the liver tissue biochemical parameters were examined, the levels of MDA, GSH, Ces, AChE, GST in E group increased compared to the control group. MDA, GSH and Ces levels of the group combined with the effect of coumarin decreased compared to the E group. When the liver tissue fatty acid levels were examined, while the E group 18: 0 fatty acid level increased compared to the K group, 22: 6n3, 18: 2n6, 18: 3n6, 18: 1n9 fatty acid levels decreased relatively. It was observed that CE group unsaturated fatty acid levels increased relative to E group with the effect of coumarin substance. As a result, we think that 3-acetyl-6-bromo coumarin molecule has corrective effects against oxidative stress caused by ethyl alcohol.

Keywords: Ethyl alcohol; Coumarin; MDA; Enzyme Activity; Fatty Acids

## **DESTEKLER**

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Proje No: FEFYL/2019-0001 numaralı proje ile desteklenmiştir.



## BEYAN

**“Etil Alkole Maruz Kalan Rat Dokularına 3-Sübstitüe Kumarin Bileşğinin Antioksidan Ve Yağ Asit Metabolizması Üzerine Etkileri”** başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Hasan PEKTAŞ

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmanın her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle desteklerini esirgemeyen Deęerli Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA' ya, deneylerdeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Murat KOCA' ya, Prof. Dr. Adnan KURT' a, Dr. Öğr. Üyesi Miraç UÇKUN' a ve Doç.Dr Ertan YOLOĞLU' na teşekkür ederim. Ayrıca hayatımın her anında yanımda olan, ilgi ve alakalarıyla desteklerini esirgemeyen Babam H.Ömer PEKTAŞ'a, Annem Zeynep PEKTAŞ'a, kız kardeşlerim Gülcan PEKTAŞ ve Berna PEKTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hasan PEKTAŞ

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	I
ABSTRACT.....	II
DESTEKLER.....	II
BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Etil Alkol ve Zararları.....	2
2.2. Kumarinler.....	4
2.3. Redükte Glutasyon.....	7
2.4. Glutasyon-S-Transferaz .....	7
2.5. Karboksilesteraz Enzimi.....	7
2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi.....	8
2.7. Malondialdehit.....	8
2.8. Glutasyon redüktaz .....	9
2.9. Yağ asitleri.....	9
2.10. Çalışmanın Amacı .....	10
3. MATERYAL VE METOD .....	11
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	11
3.2. Deneysel İnceleme Materyali .....	11
3.3. Kullanılan Aletler ve Cihazlar .....	11
3.4. Deney Kullanılan Hayvanlar .....	11
3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Kullanılan Cihaz .....	12
3.6. Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri Uygulaması .....	12
3.7. GSH Düzeyinin Tespiti.....	13
3.8. GST Enzim Aktivitesi Tayini .....	13
3.9. MDA Düzey Tayini .....	13
3.10. Ces Enzim Aktivitesi Tayini.....	14
3.11. AChE Enzim Aktivitesi Tayini.....	14
3.12. Total Protein Analizi.....	14
3.13. Dokuların Lipitlerin Ekstraksiyonu .....	14
3.14. Dokularda Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması.....	15
3.15. 3-asetil-6-bromo kumarin molekülünün sentezi .....	15
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	17
5. BULGULAR.....	18
6.TARTIŞMA .....	21
KAYNAKLAR .....	27
KİŞİSEL BİLGİLER .....	35

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kumarin çeşitleri ve farmakolojik etkileri.....	6
Çizelge 5.1 Karaciğer dokusu MDA, GSH ve enzim aktivite düzeyleri .....	18
Çizelge 5.2 Karaciğer dokusu yağ asit düzeyi (%) .....	19



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Etil alkolün moleküler formülü.....	2
Şekil 3.1 3-asetil-6-bromo kumarin bileşiğinin sentezi .....	16



## SİMGELER VE KISALTMALAR

GR	: Glutasyon Redüktaz
AChE	: Asetilkolinesteraz
Ces	: Karboksilesteraz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-P <sub>x</sub>	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
HCl	: Hidroklorik Asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Sülfürik Asit
KHCO <sub>3</sub>	: Potasyum Bikarbonat
MDA	: Malondialdehit
NaCl	: Sodyum Klorür
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Trikloroasetik Asit
TCA	: Thiobarbiturik Asit
6:0	: Kaproik Asit
11:0	: Undekanoik Asit
14:0	: Myristik Asit
15:0	: Pentadekanoik Asit
15:1	: Cis-10 Pentadekanoik Asit
16:0	: Palmitik Asit
16:1	: Palmitoleik Asit
18:0	: Stearik Asit
18:1n9c	: Oleik Asit
18:2n6c	: Linoleik Asit
18:3n3	: Alpha Linolenik Asit
18:3n6	: Gamma Linolenik Asit
20:3n6	: Cis-8, 11, 14-Eicosatrienoik Asit
20:4n6	: Araşidonik Asit
22:6n3	: Dokosahekzanoik Asit
22:0	: Behenik Asit
24:1	: Nervonik Asit

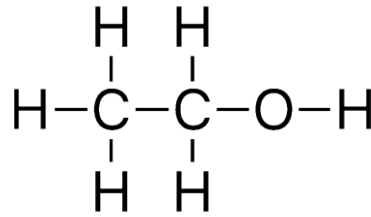
## 1. GİRİŞ

Etil alkolün insanlar tarafından kullanımı oldukça yaygındır. Dünyada yaklaşık iki milyar insan etil alkol tüketimini yapmaktadır ve yaklaşık seksen milyon insan etil alkol kullanımına bağlı olarak hastalık teşhisi konulmaktadır. Etil alkol metabolizmasındaki en önemli organ karaciğer dokusudur. Kronik düzeyde etil alkol kullanımı sonucunda hücrelerde reaktif oksijen üretimi artmaktadır. Bu radikaller proteinler, lipitler ve DNA ile tepkimeler sonucunda fibrojeniz olayı gelişmektedir. Ayrıca etil alkolün etkisiyle artan serbest radikaller hücredeki antioksidan düzeylerini de olumsuz etkilemektedir. Etil alkol özellikle karaciğer dokusunda yağlanma, hepatit ve siroz hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir [1,2]. Kumarin türevli moleküller bitkilerin yapılarında bulunduğu gibi laboratuvar şartlarında da sentezi yapılmaktadır. Bu moleküllerin, yapılan çalışmalarda birçok farmakolojik etkileri tespit edilmiştir. En önemli özellikleri arasında antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser etkileri mevcuttur [3].

Bu çalışmada etil alkole maruz kalan sıçan karaciğer dokuları üzerine 3-asetil-6-bromo kumarin molekülünün antioksidan ve yağ asit metabolizması üzerine etkileri araştırıldı.

**2. GENEL BİLGİLER****2.1. Etil Alkol ve Zararları**

Kimyasal yapısı C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH olan etil alkol berrak ve renksiz bir yapıdadır. Su ve organik çözücülerle her oranda karışabilen 0.789 g/ml yoğunluğunda, 78.4°C de kaynama noktasına sahip uçucu ve yanıcı bir sıvıdır [4].



Şekil 2.1 Etil alkolün moleküler formülü

Etil alkolün kullanılması sonucu çeşitli hastalıklar meydana gelmektedir. Dünyada etil alkolün kullanımı zamanla artmaktadır. Etil alkol kullanımı sağlık problemlerinin yanı sıra insanlar üzerinde sosyal hayatı da etkilemektedir [5].

Alkollü içkilerin tamamında değişik oranlarda bulunan etil alkol, çeşitli meyvelerin ve nişastanın mayalanması sonucu da elde edilmektedir. Aynı zamanda etilenden de kimyasal yollarla önemli miktarlarda üretilmektedir [6].

Aşırı alkol tüketimi, beyin, karaciğer, kalp, akciğerler, iskelet kasları ve kemikler gibi farklı organlara zarar vererek fiziksel ve zihinsel sağlığa zarar verebilir [7,8].

Alkol kaynaklı hasarın ilk hedef organı karaciğerdir ve alkolün toksik etkilerine karşı hassastır. Öte yandan oksidatif stres, alkol tüketiminden kaynaklanan karaciğer hasarının gelişiminde önemli bir rol oynar [9].

Ağız yoluyla alınan alkol sindirim kanalının tüm kısımlarından emilir. Emilim gerçekleşikten sonra etanol suda kolay çözünebildiği için hızlı bir şekilde kan dolaşımına katılarak tüm dokulara yayılır. Özellikle su oranı yüksek dokulara daha kolay ulaşır. Yağda çözünebilirlik etkisi de olduğundan hücre zarlarını önemli ölçüde

etkiler. Kan alkol düzeyi genellikle en üst seviyeye 45-60 dakikada ulaşılır. Bu düzeye ulaşma süresi midenin boş olmasına veya yemekle birlikte alınmasına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Midenin boş olması emilimi hızlandıran faktördür. Alkolün hızlı alımı da üst düzeye ulaşma zamanını kısaltır. Emilim, %10-30 yoğunluğunda olan alkollü içeceklerde daha hızlıdır. Kan alkol seviyesi ile ortaya çıkan klinik belirtiler arasında pozitif bir ilişki vardır. Yüksek alkol seviyeleri reflekslerde azalma ve kaslarda uyumsuzluklar ile kendini gösteren davranış bozukluklarına neden olur [10]. Etil alkol kullanılması sonucu karaciğer hücrelerinde etkileşime girip yüksek derecede toksik bir metabolit olan asetaldehitine dönüşür. Oluşan asetaldehit lipitler, proteinler ve membran lipitleri ile etkileşime girer ve zarar verir [11]. Etil alkolün biyotransformasyonundaki ana yol, karaciğerde asetaldehit ve hidrojene oksidasyonudur. Üç enzim etil alkolün asetaldehite oksitlenmesinden sorumludur. Bunlar alkol dehidrogenaz, cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) ve katalaz enzim sistemidir. Bu enzimlerden alkol dehidrogenaz enzimi etil alkolden NAD'ın NADH'a eş zamanlı olarak indirgenmesiyle etil alkolden asetalaldehit oluşumuna yol açar. Bu durum neticesinde ksantin oksidaz aktivitesi artar. Bununla birlikte süperoksit üretiminin artmasına neden olur. Etil alkolün asetaldehite oksitlenmesinden sorumlu ikinci enzim ise endoplazmik retikulumda yerleşmiş olan mikrozomal etil alkol oksitleyici sistemdir. Bu enzim NADPH'a bağımlı olup sitokrom P450 2E1 içermektedir. Diğer bir enzim sistemi katalaz enzimidir. Katalaz, oksidasyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanarak yapar [12-14]. Alkol kullanımında karaciğer üzerinde hasara yol açan diğer bir kronik vaka ve önemli etki gösteren fibrizosis oluşumudur. Karaciğer hastalıklarında %50 oranında tespit edilen fibrizosis alkolik karaciğer hasarında yaklaşık %10-15 civarında görülmektedir. Alkol temelli karaciğer doku hasarında fibrizosisin oluşmasındaki temel sebep olarak hepatik yıldız hücrelerinin aktivasyonu olarak görülmektedir. Toksik etkilerde, infeksiyöz durumlarında ve alkolik karaciğer hasarlarında hepatik hücreler miyofibroblasta benzeyen hücrelere proliferasyon olarak fibrizosis gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. Nitekim hepatik hücrelerini aktif hale getiren reaksiyonlar hakkında yeterli bilgi bulunmamasına karşın asetaldehit ve asetaldehit-protein yapıları "Transforming Growth Factor Beta"nın hücrelerin kollojen sentezlenmesine yol açtıkları tespit edilmiştir [15].

Etil Alkolün davranış üzerine de etkileri vardır. Alkol etkisi altında olan kişilerde kognitif yeteneklerde ve psikomotor testlerdeki başarı oranında azalma, zihinden yapılmak istenen aritmetik işlemleri ve beceri noktasındaki davranışları hatasız yapmada zorlanma, atletik performansta düşme gözlenmektedir. Aynı zamanda etil alkolün az miktarda alınması durumunda sedasyon, anksiyete, endişe, sıkılganlık ve sorumluluk duygusunun azalmasına neden olur. Diğer bir faktör ise yüksek doz alkol alındığında reflekslerde azalma, hipotermi ve koma gibi doza bağlı çeşitli bozukluklar gözlenmektedir [16]. Etil alkolün diğer bir etkisi ise midede hidroklorik asit ve gastrin salınımı arttırarak bulantı ve kusmaya neden olabilmektedir. Sempatik sinir sistemi etkisiyle birtakım hormonları uyararak kalp atım hızının artmasına, kan akımının hızlanmasına, damarların genişlemesine, solunum sayısı ve derinliğinin değişmesine ve ciltten hızlı bir şekilde ısı kaybına neden olur. Etil alkolün önemli bir etkisi de vazomotor etkisinden dolayı alkol alımından sonra yüz kızarmaları da görülebilir. Hormonal manada stimüle edici ve inhibe edici etkisi vardır. Antidiüretik hormonunu (ADH) baskılayarak diüretik etki yaparken, adrenalini salınımını uyararak kardiovasküler ve respiratör değişikliklere sebep verir [17,18].

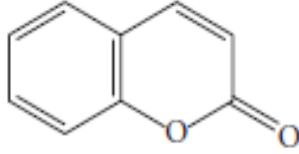
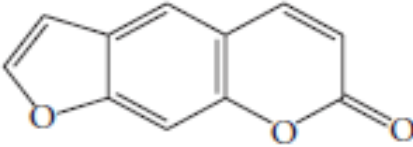
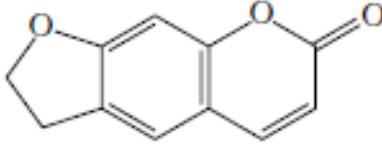
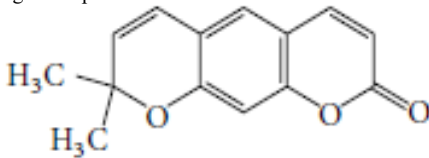
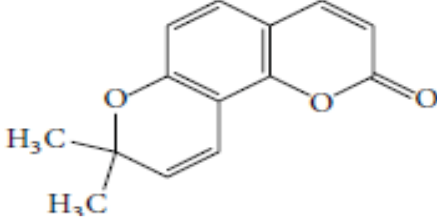
## **2.2. Kumarinler**

Tarih öncesi çağlardan günümüze kadar insanlar, çeşitli hastalıkların tedavileri için birçok ilacı doğal ürünlerden elde etmeye çalışmışlardır. Bu süreçte doğal ürünlerin sentetik ve yarı sentetik türevlerinin çeşitli biyolojik aktiviteleri bulunmuştur. Tıbbi kullanım için heterosiklik bileşiklerin yapısında bulunan oksijen içeriği moleküllerin önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Oksijen içeren heterosiklik bileşikler arasında kumarinlerin biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. İlk defa Vogel tarafından 1820 yılında Tonka fasülyelerinden kumarinler izole edilmiştir. Son zamanlarda ise yaklaşık 150 çeşit kumarin molekülü bulunmuştur. Kumarinlerin farmakolojik çalışmalarda birçok etkinliği tespit edilmiştir. Bunlar arasında antibakteriyel, anticoagulant, antiHIV, antioksidan, antituberkular, antihypertensiv, antikonvulsant, antifungal, antihyperglisemik ve antikanser etkileri mevcuttur.

Kumarin türevli moleküller kanser üzerinde birçok enzimin inhibisyonunu sağlar. Ayrıca kolinesteraz enzimlerinin katalitik aktivitesini bloke ederek beyin dokusundaki asetilkolin seviyesini korur ve Alzheimer hastalığına karşı bir koruma sağlamaktadır. Çeşitli kumarin türevli moleküllerin tüberküloz tedavisi için kullanıldığı bilinmektedir. Bu tür moleküllerin siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimlerini etkileyerek antiinflamatuar etkisi bilinmektedir. Çizelge 2.1’de bazı kumarinlerin çeşitleri ve farmakolojik etkileri gösterilmiştir [19].



Çizelge 2.1 Kumarin çeşitleri ve farmakolojik etkileri

Kumarin çeşitleri	Kumarinler	Farmakolojik aktiviteleri
Basit kumarinler 	Esculetin	Antiadipogenik, Antioksidan, Nöroprotektif
	Ammoesinol	Antibakteriyel
	Ostruthin	Antibakteriyel, Antifungal
	Osthole	Antibakteriyel, Antifungal, Antikanser, Antikonvülzan
	Novobiocin	Antibakteriyel
	Chartreusin	Antibakteriyel, Antitümör
	Fraxin	Antikanser, Antiadipogenik, Antioksidan
	Umbelliferon	Antitüberküler
	Fraxidin	Antihiperglisemik, Antiadipogenik
	Phellodenol A	Antitüberküler
	Esculin, fraxetin	Antiadipogenik
Furano kumarinler 	Imperatorin	Antiinflamatuvar, Antibakteriyel, Antifungal, Antiviral, Antikanser
	Psoralen	Antifungal, Anti-TB
	Bergapten	Anti-TB
	Methoxsalen	Sitokrom P450 Önleyici
Dihydrofurano Kumarinler 	Anthogenol	Antibakteriyel
	Marmesin	Anti-TB
	Rutaretin	Anti-TB
<b>Pyrano kumarinleri iki tiptir</b>		
Doğrusal tip 	Grandivittin	Antibakteriyel
	Agasyllin	Antibakteriyel
	Xanthyletin	Anti-TB
Açısal tip 	Inophyllum A, B, C, E, P, G1 ve G2	Antiviral
	Calanolide A, B ve F	Antiviral
	Pseudocordatolide C	Antiviral

**2.3. Redükte Glutatyon**

Hücreyi oksidatif strese karşı koruyan en önemli antioksidanlardan biri redükte glutatyon (GSH) dur [20-22]. Peroksitlerle ve serbest radikallerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan GSH, aynı zamanda hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde önemli rol alır. Oksidatif strese karşı GSH; karaciğeri, eritrositleri, lökositleri ve göz lensini korumada görev alır [23]. GSH-Px, GST gibi antioksidan enzimler için kofaktör olarak işlev gören GSH, direkt olarak hidroksil ve singlet oksijen radikalini temizleyerek etkisini gösterir. Oksidan moleküller ile redoks dengesinin kurulmasında hayati öneme sahip antioksidanlardandır [24]. Kimyasal maddelerin detoksifiye edildiği en önemli organ olan karaciğerde GSH'nın sağlıklı hücrelerinde en yüksek hücre içi konsantrasyonu yaklaşık olarak 20 milimolar'dır. Nitekim, karaciğerin GSH içeriği akciğerden üç kat, böbrek ve testislerden yaklaşık iki kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir [25]. GSH metabolizmada birçok dokuda bulunmasına rağmen en fazla karaciğer dokusunda bulunmaktadır [26]. GSH antioksidan olarak birçok enzimatik reaksiyonda koenzim olarak görev yapar [27]. Ayrıca, toksik maddelerle kompleks yaparak metabolizmadan atılmasını sağlar [28].

**2.4. Glutatyon-S-Transferaz**

Glutatyon-S-Transferaz (GST) enzimi zararlı kimyasallara karşı detoksifikasyon özelliğiyle öne çıkan bir enzimdir. GST enzimi birçok canlının karaciğer, eritrosit ve akciğer gibi dokularda bulunmaktadır. Bu enzim toksik metabolitlerin detoksifikasyonu olayı ile hücrede önemli görevler üstlenmektedir [29].

**2.5. Karboksilesteraz Enzimi**

Memeli hayvanların karaciğer, testis, böbrek ve plazmalarında tespit edilen karboksilesteraz (Ces) enzimi aynı zamanda esterlerin, amidlerin, tioesterlerin

hidrolizini katalizleyen esterazların serin hidrolazlar süper ailesinin bir üyesidir. Memeli karboksilesterazları, birçok dokuda hücrenin endoplazmik retikulumunda lokalize olduğu gözlenmiştir. Önemli miktardaki ilaçlar Ces enzimi tarafından metabolize edildiği için, bu enzimlerin her bir dokuda değişen aktiviteleri klinik açıdan son derece önemlidir [30-31].

### **2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi**

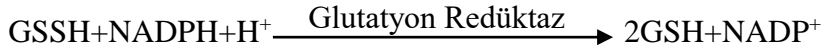
Sinaptik boşluklarda asetilkolini asetat ve koline parçalayarak inaktive eden enzim olarak görev yapan Asetilkolin Esteraz (AChE) enziminin diğer bir etkisi ise sinaptik boşluklarda asetilkolin çok fazla inaktive edilirse sinir iletimi kesilir ve kişide Alzheimer hastalığı görülür. Bu enzim vücutta merkezi ve periferik, kolinerjik ve adrenerjik, sinir ve kas dokusunda, eritrositlerde ve plasental dokuda bulunmaktadır. Aynı zamanda AChE böceklerdeki merkezi sinir sisteminin kolinerjik sinapsisinde nörotransmitter olan asetilkolini hidrolizler. Asetilkolin, AChE enzimi tarafından kolin ve asetik asite dönüştürülür [32].

### **2.7. Malondialdehit**

Metabolizmada var olan hücreler bazı olumsuz etkilere maruz kalmaktadırlar. Nitekim olumsuz radikaller hücre yapısında bulunan lipitleri oksidasyona uğratar. Hücrede alkol, aldehit ve pentan gibi moleküller lipit peroksidasyonu sonucunda oluşur. Lipit peroksidasyonu sonucu hücrede malondialdehit (MDA) oluşmaktadır. Oksidatif stres şartlarında hücrelerde  $H_2O_2$  molekülü,  $O_2^-$  ve  $OH^-$  radikalleri oluşmaktadır. Bu molekül ve radikaller hücrenin birçok yapısı ve organelleri ile reaksiyona girerek hücrenin yapısına zarar verir. Diğer bir faktör ise lipit peroksidasyonu sonucunda birçok yan ürün oluşmaktadır ve bunların en önemlisi MDA'dır. Bunlar hücre içerisinde birçok molekül ile reaksiyona girerek yapının bozulmasına bağlı olarak olumsuz etkilere neden olur [33-35].

**2.8. Glutasyon redüktaz**

Glutasyon redüktaz (GR)'ın en önemli görevi, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder [36].



Klinik olarak karaciğer ve kanser hastalıklarının teşhisinde, beslenmede, riboflavin yetersizliğinin ölçümünde kullanılan GR aynı zamanda bazı genetik bozuklukların belirlenmesinde de yararlanılmaktadır [37].

**2.9. Yağ asitleri**

Yağ asitleri katı ve sıvı yağlarda bulunmaktadır. Alifatik zincirin bir ucunda COOH grubu, diğer ucunda CH<sub>3</sub> grubu mevcut olan hidrokarbonlardır. Uzun zincir yapısında çifte bağlarda bulunur. Çift bağ içeren yağ asitleri, doymamış yağ asitleri olarak bilinir. MUFA olarak tanımlanan yağ asitlerinde bir çift bağı vardır. Palmitoleik (16:1) ve 18:1n9c yağ asitleri en önemli olanlarıdır. PUFA yağ asitlerinin yapısında birden fazla çift bağ içeren yağ asitleri olup, çoklu doymamış yağ asitleri olarak bilinir. En önemli PUFA yağ asitleri olarak 18:2n6c, 20:4n6 ve 22:6n3 yağ asitleri ön plandadır [38].

**2.10. Çalışmanın Amacı**

İnsanlar etil alkolü gerek endüstride gerekse içecek olarak yaygın olarak kullanmaktadır. Öncelikle içecek olarak alkol ürünlerinde bulunan etil alkolün insan metabolizmasına ciddi hasarlar verdiği bilinmektedir. İnsan metabolizmasının en önemli organı karaciğer dokusudur. Etil alkol kullanımı sonucunda karaciğer dokusu ilk hedeftedir. Bu doku etil alkolün oluşturduğu toksitiyeye karşı yoğun olarak çalışmaktadır. Etil alkolün karaciğer dokusu üzerinde oluşturduğu hasarlar sonucunda karaciğer yağlanması, karaciğer fibröz ve karaciğer sirözünün geliştiği bilinmektedir. Kumarin türevli maddelerin antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar gibi birçok etkileri vardır. Doğal kumarinlerin yanında laboratuvarlarda sentezlenen kumarinlerin biyokimyasal etkinliğin çalışması birçok alanda yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, etil alkole maruz kalan sıçan karaciğer dokuları üzerine 3-asetil-6-bromo kumarin türevli molekülün MDA, GSH, GR, Ces, GST, AChE ve yağ asit metabolizmaları üzerine etkinliği araştırıldı.

**3. MATERYAL METOD****3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, tiobarbiturik asit (TBA), etanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, trikloroasetik asit (TCA), fosfat tamponu, izopropanol, metanol, Tris-EDTA tamponu, redükte GSH, hekzan, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit, EDTA-Na<sub>2</sub>, yağ asitleri standardı ve fizyolojik su kullanıldı.

**3.2. Deneysel İnceleme Materyali**

Deneysel uygulamada erkek *Wistar albino* (250±10 g) sıçanların karaciğer dokuları incelendi.

**3.3. Kullanılan Aletler ve Cihazlar**

Santrifüj, homojenizatör, Gaz Kromatografisi (GC-FID) cihazı, mikrolate ataçmanlı UV/VIS cihazı, vorteks, otomatik pipetler, su banyosu, derin dondurucu, santrifüj tüpleri.

**3.4. Deney Kullanılan Hayvanlar**

Deneysel çalışmada, erkek *Wistar Albino* cinsi sıçanlar kullanıldı. Deneysel çalışmanın etik kurulu Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi ADYÜ DEHAM)'nden alındı (Etik Kurul No: 2019/27). Sıçanlar özel yapılmış kafeslerde beslendi. Yemleri çelik kaplarda, suları ise özel biberonlarda verildi. Sıçanların ortam sıcaklığı 22-25 °C arasındadır. Sıçanlar 12 saat ışıklı ve 12 saat karanlık ortamda takip edildi. Deneylerde 28 adet erkek *Wistar Albino* cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 4 gruba eşit olarak ayrıldı. Gruplar aşağıda belirtilmiştir.

- Kontrol grubu (K)
- Etil alkol grubu (E)
- Kumarin grubu (C)

- Kumarin + Etil alkol grubu (CE)

Sağlıklı ve normal beslenen sıçanlara 2 g/kg/gün veya daha aşağı dozlarda etanol verilirse sabit ve sınırlı bir hızda okside edilmektedir. Fakat 3 g/kg/gün ve daha yukarı dozda verilen etanol ile kronik etil alkol etkisi oluşturulabilmektedir [39]. Bu nedenle, 30 gün süre ile oral yolla 5g/kg/gün dozda %50'lik etanol uygulaması yapıldı. Yapılan literatür araştırmasında kumarin türevli bileşiklerin değişik konsantrasyonları ratlara uygulaması yapılmıştır. Genel olarak 10-35 mg/kg düzeylerinde uygulamaları yapılan bu tür bileşiklerin etkinlikler çalışması mevcuttur. Çalışmamıza uygun olarak düşündüğümüz konsantrasyon düzeyi 5 mg/kg'dır ve 3-asetil-6-bromo türevli kumarin türevli madde orol yolla verildi [40]. Deneysel uygulamalar tamamlanınca hayvanlar servikal dislokasyon uygulanarak elde edilen karaciğer doku örnekleri eksi 80 °C'de deneysel sürece kadar derin dondurucuda saklandı.

### **3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Kullanılan Cihaz**

Deneysel süreçte incelenen karaciğer dokularının enzim aktiviteleri Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında ölçümleri alındı. Her numune bu cihazda üç defa tekrarlı okuması yapıldı. Karaciğer dokularının enzimlerin aktiviteleri spesifik aktivite (nmol/dk/mg protein) olarak hesaplandı.

### **3.6. Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri Uygulaması**

Karaciğer dokusu için çelik uçlu homojenizatör kullanıldı. Karaciğer dokuları homojenizatörde 3000 rpm'de 30 saniye süresince parçalandı. Dokular homojenizasyon tamponu (0.1M pH: 7.4 olan potasyum fosfat tamponu içinde; 0.15 M KCl, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT) ile homojenizatörde parçalandı. Sonra, örnekler ependorf tüplerine alındı. Örnekler santrifüj cihazında 4 °C, 16000 xg devirde ve 20 dakika süresince santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kısımlarından enzim aktivite düzeyleri ölçümü yapıldı.

**3.7. GSH Düzeyinin Tespiti**

Karaciğer dokuları redükte glutatyon (GSH) düzeyleri Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında okuması yapıldı. Sedlak ve Lindsay metodu kullanılarak 412 nm de ölçümler alındı. Dokular %50 TCA ile çöktürüldükten sonra 5 dk 1000xg de santrifüj edildi. Örneklerin süpernatant kısmından 0.5 ml alınarak üzerine 2 ml Tris-EDTA tamponu ilave edildi. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 412 nm de absorbans değerleri ölçümü yapıldı [41]. GSH düzeyi birimi nmol/mg protein olarak hesaplanması yapıldı.

**3.8. GST Enzim Aktivitesi Tayini**

GST enzim aktivitesi Habig (1974) yöntemine göre yapıldı [42]. %96'lık etil alkol içinde 20mM 1-kloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB) substrat olarak hazırlandı. Redükte GSH kofaktör olarak deneyde kullanıldı. Fosfat tamponundan (0.1 M, pH:6,5) 100 µl, 0.002M GSH çözeltisinden 100 µl, CDNB çözeltisinden 10 µl alınarak mikrolpaka kuyucuklarına pipetlendi. Karışım 15 sn karıştırıldı. Sonra, 344 nm'de cihazda örnekler okutuldu. Sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak hesaplandı.

**3.9. MDA Düzey Tayini**

Karaciğer dokulardaki MDA düzeyi Placer (1966) yöntemine göre yapıldı. MDA analizinde 0.25 N HCl içerisinde %0.375 TBA ve %15 TCA çözeltisi kullanıldı. Karaciğer dokulardaki MDA miktarları 532 nm'de Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında okuması gerçekleştirildi. Sonuçlar nmol/g yaş doku ağırlığı olarak kaydedildi [43].

**3.10. Ces Enzim Aktivitesi Tayini**

Ces enzim aktivitesi ölçümünde, substrat olarak %96'lık etil alkol içinde 26 mM p-nitrofenol (PNPA) hazırlanarak kullanıldı. Reaksiyon çözeltisi içerisinde, 5 µl örnek ve 0.05 M trizma pH: 7,4 olan çözeltiden 250 µl bulunmaktadır. Karışım 25 °C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra, çözeltinin son konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde 5 µl PNPA ilave edildi. Örneklerin Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS spektrofotometrede 405 nm'de absorbans değişimleri okundu [44-45]. Sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak hesaplandı.

**3.11. AChE Enzim Aktivitesi Tayini**

AChE enzim aktivitesi Ellman (1961) ve Özmen vd. (1988) tarafından modifiye edilen yöntemle göre analizleri yapıldı [46-47]. Substrat olarak asetilkolin iodid kullanıldı. 10 µl süpernatant mikrolplaka kuyucuklarının içerisine ilave edildi. Üzerine 0.701 mM ACTI ve pH:8 olan 0.1 M trizma çözeltisi içinde hazırlanmış 0.136 mM DTNB çözeltisinden 200 µl ilave edildi. Ölçümler Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında gerçekleştirildi. Örneklerin ölçümleri 412 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak hesaplandı.

**3.12. Total Protein Analizi**

Örneklerin total protein analizi Bradford'a göre yapıldı [48]. Sonuçlar mg protein olarak verildi.

**3.13. Dokuların Lipitlerin Ekstraksiyonu**

Karaciğer dokuları lipit ekstraksiyonu Hara ve Radin metoduna göre yapıldı [49]. Karaciğer dokuları çelik uçlu homojenizatör kullanılarak parçalandı. Doku örneklerinden 1 g alınarak üzerine 3:2 (v/v) hekzan-izopropanol karışımından 5 ml ila-

ve edildi. Doku örnekleri 30 sn süreyle homojenize edilerek parçalandı. Örnekler santrifüj tüplerine alınarak 4500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı metilleştirme işlemi için 30 ml'lik tüplere alındı.

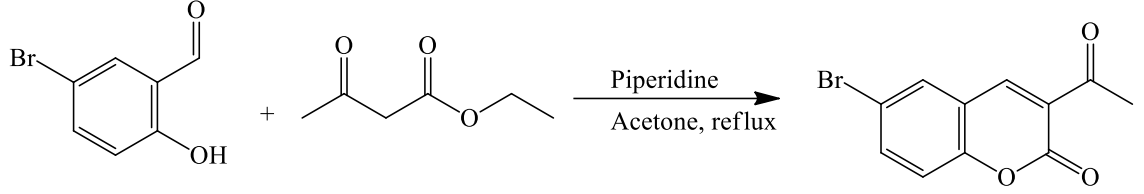
#### **3.14. Dokularda Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması**

Yağ asitlerinin gaz kromatografisinde analizinin yapılabilmesi için polar olmayan uçucu ve kararlı yapıya sahip metil esterlerine dönüştürülmesi gerekir [50]. Elde edilmiş olan lipit ekstratı üzerine %2'lik metanolik sülfirik asitten 5 ml ilave edildi ve 50 °C lik su banyosunda 15 saat süre ile metilleşmeye bırakıldı. Bu işlem tamamlandıktan sonra karışımın üzerine 5 ml %5 lik sodyum klorür ilave edildi. Daha sonra karışım üzerine 5 ml hekzan ilave edilerek ekstraksiyon işlemi yapıldı. Faz ayırımından sonra hekzan fazı pipetle alındı. Karışımın üzerine 5 ml %2 lik potasyum bikarbonat ilave edildi. Faz ayırımı için 4 saat karışım bekletildi. Ayrılan hekzan fazı tüplere alındı. Hekzan fazı uzaklaştırıldıktan sonra yağ asit metillerinin üzerine 2 ml hekzan ilave edildi. Hekzan fazındaki yağ asitleri viale alındı. Örneklerdeki yağ asitleri Shimadzu QP 2010 Ultra Gaz Kromatografisi cihazında okuması yapıldı. Örneklerin analizine başlamadan önce 37'lik yağ asit standardı GC-FID'de okunarak kalibrasyonları gerçekleştirildi.

#### **3.15. 3-asetil-6-bromo kumarin molekülünün sentezi**

3-Asetil-6-bromo kumarin bileşiğinin sentezi referans [51]'de belirtildiği şekliyle gerçekleştirildi. Bu amaçla; üç boyunlu bir reaksiyon balonuna 5-bromo-2-hidroksibenzaldehit (5.000 g, 24.87 mmol), etil asetoasetat (3.236 g, 24.87 mmol) ve 50 mL metanol üç boyunlu bir reaksiyon balonuna eklendi ve karışım çözelti haline getirildi. Katalizör olarak üç damla piperidin reaksiyon ortamına damla damla ilave edildi ve sonra karışım 24 saat boyunca manyetik bir karıştırıcı üzerinde riflaks edildi. Süre sonunda, reaksiyon karışımı aşırı metanol içerisine dökülerek 3-asetil-6-bromokumarin ürününün sarımsı çökelti halinde ayrılması sağlandı. Ürün daha sonra

süzüldü ve kurutuldu. 3-Asetil-6-bromo kumarin bileşiğinin sentezi aşağıdaki şekilde gösterildi.



Şekil 3.1 3-asetil-6-bromo kumarin bileşiğinin sentezi

**4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

İstatistiksel değerlendirme SPSS 20,0 programı kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmada Varyans analizi ANOVA'da yapıldı. Gruplar arasındaki farklılıklara Tukey testi uygulandı ve standart sapma olarak standart error (SE) alındı.



## 5. BULGULAR

Çizelge 5.1 Karaciğer dokusu MDA, GSH ve enzim aktivite düzeyleri

Parametreler	K	E	C	CE
MDA	38,22±3,82	75,43±6,81 <sup>c</sup>	42,56±5,36 <sup>z</sup>	54,89±5,76 <sup>az</sup>
GSH	0,11±0,01	0,16±0,01 <sup>b</sup>	0,12±0,01 <sup>x</sup>	0,11±0,01 <sup>y</sup>
Ces	1304,70±52,43	1843,12 ±53,96 <sup>c</sup>	1470,50±72,24 <sup>y</sup>	1313,16±93,15 <sup>z</sup>
AChE	3,94±0,24	5,85±0,55 <sup>b</sup>	4,51±0,17 <sup>x</sup>	5,28±0,21 <sup>a</sup>
GST	43,72±1,65	66,11±3,79 <sup>c</sup>	55,91±3,38 <sup>a</sup>	56,28±2,82 <sup>a</sup>
GR	2,74±0,38	4,16±0,59	4,03±0,69	4,59±0,55

K grubuna göre karşılaştırma a: p <0.05, b: p <0.01, c: p <0.001

E grubuna göre karşılaştırma x: p <0.05, y: p <0.01, z: p <0.001

Karaciğer dokusu MDA ve Enzim aktivite düzeyleri çizelge 1’de gösterilmiştir. E grubu MDA düzeyi diğer gruplara göre yüksek çıktığı tespit edildi (p<0.001). K ve C grupları MDA düzeyleri arasında istatistiksel fark olmadığı gözlemlendi (p>0.05). K, C ve CE grupları GSH düzeyleri arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edilirken (p> 0.05), E grubu GSH düzeyinin diğer gruplara göre arttığı saptandı (p<0.05, p<0.01). E grubu Ces enzimi aktivite düzeyi diğer gruplara göre arttığı gözlemlendi (p<0.001, p<0.01). K, C ve CE grupları Ces enzim aktiviteleri arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edildi (p>0.01). E ve CE grupları AChE enzim aktivite düzeyleri K grubuna göre arttığı saptandı (p<0.01, p<0.05). C grubu AChE enzim aktivite düzeyi K grubuna göre nispi oranda arttığı tespit edildi (p>0.05). K grubu GST enzim aktivite düzeyine göre diğer gruplarda artış gözlemlendi (p<0.05, p<0.001). Tüm grupların GR enzim aktivite düzeyleri arasında istatistiksel fark gözlenmezken (p>0.05), K grubuna göre diğer gruplarda nispi artış tespit edildi (p>0.05).

Çizelge 5.2 Karaciğer dokusu yağ asit düzeyi (%)

Yağ asitleri	K	E	C	CE
14:0	0,29±0,01	0,25±0,02	0,24±0,02 <sup>a</sup>	0,18±0,01 <sup>c</sup>
15:0	0,33±0,02	0,28±0,02	0,34±0,02	0,25±0,01 <sup>a</sup>
16:0	20,41±0,37	19,48±0,50	19,68±0,26	19,71±0,50
17:0	0,67±0,03	0,70±0,05	0,66±0,03	0,60±0,02
18:0	20,36±0,38	22,29±0,33 <sup>a</sup>	20,35±0,45 <sup>x</sup>	21,60±0,40
20:0	0,06±0,01	0,07±0,01	0,10±0,01 <sup>by</sup>	0,08±0,01
22:0	0,15±0,01	0,12±0,01	0,15±0,01	0,13±0,01
24:0	0,27±0,01	0,24±0,01	0,23±0,01	0,27±0,01
∑SFA	42,54±0,640	43,43±0,715	41,75±0,698	42,82±0,711
16:1	0,37±0,01	0,39±0,02	0,34±0,02	0,31±0,02 <sup>x</sup>
18:1n9c	5,38±0,26	4,75±0,20	5,00±0,36	3,99±0,29 <sup>a</sup>
20:1n9	0,12±0,01	0,11±0,01	0,14±0,02	0,12±0,01
24:1	0,11±0,01	0,09±0,01	0,08±0,01	0,09±0,01
∑MUFA	5,98±0,27	5,34±0,28	5,56±0,35	4,51±0,30 <sup>a</sup>
18:2n6c	17,68±0,50	16,80±0,50	17,03±0,53	17,07±0,20
18:3n6	0,23±0,002	0,20±0,002	0,24±0,002	0,20±0,002
18:3n3	0,32±0,01	0,33±0,01	0,35±0,02	0,32±0,01
20:2n6	0,75±0,03	0,69±0,01	0,81±0,02	0,70±0,04
20:3n6	0,54±0,01	0,52±0,01	0,47±0,01	0,55±0,03
20:4n6	27,38±0,41	28,46±0,63	28,87±0,27	29,24±0,33 <sup>a</sup>
20:5n3	0,12±0,01	0,11±0,01	0,09±0,01	0,11±0,01
22:6n3	4,46±0,22	4,15±0,29	4,83±0,23	4,48±0,16
∑PUFA	51,48±0,871	51,26±0,918	52,69±0,815	52,67±0,872
∑USFA	57,46±0,919	56,60±0,845	58,25±0,799	57,18±0,891

K grubuna göre karşılaştırma. a: p<0.05, b: p<0.01, c:p<0.001

E grubuna göre karşılaştırma. x: p<0.05, y: p<0.01, z:p<0.001

Karaciğer dokusu yağ asit düzeyleri Çizelge 5.2’de gösterilmiştir. K grubu 14:0 yağ asit düzeyine göre C ve CE gruplarında azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ). K grubu 15:0 yağ asit düzeyine göre CE grubunda azalma tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Majör yağ asitlerinden 16:0 düzeyi tüm gruplarda istatistiksel fark olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ). E grubu 18:0 yağ asit düzeyi K ve C gruplarına göre arttığı gözlendi ( $p<0.05$ ). E grubu  $\Sigma$ SFA düzeyi diğer gruplara göre nispi oranda arttığı saptandı ( $p>0.05$ ). CE grubu 16:1 yağ asit düzeyi E grubuna göre azaldığı tespit edildi ( $p<0.05$ ). K grubu 18:1n9c yağ asit düzeyine göre CE grubunda azalma tespit edildi ( $p<0.05$ ). E grubu 18:1n9c yağ asit düzeyi K ve C gruplarına göre nispi oranda azaldı ( $p>0.05$ ). CE grubu  $\Sigma$ MUFA düzeyi K grubuna göre azaldığı gözlendi ( $p<0.05$ ). E grubu 18:2n6c ve 22:6n3 yağ asit düzeyi diğer gruplara göre nispi oranda azaldığı tespit edildi ( $p>0.05$ ). CE grubu 20:4n6 düzeyi K grubuna göre arttığı gözlendi ( $p<0.05$ ).  $\Sigma$ PUFA ve  $\Sigma$ USFA yağ asit düzeyleri tüm gruplar arasında istatistiksel fark olmadığı gözlenirken ( $p>0.05$ ), E grubu  $\Sigma$ USFA yağ asit düzeyleri nispi oranda K grubuna göre azaldığı tespit edildi.

**6.TARTIŞMA**

Bu tez çalışmasında etil alkol ile oksidatif strese maruz bırakılan sıçan karaciğer dokuları üzerine 3-asetil-6-bromo kumarin türevli molekülün MDA, GSH, yağ asitleri düzeyleri ile Ces, AChE, GST VE GR enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırıldı. Etil alkolün neden olduğu oksidatif stres karaciğer hasarının patojenesinde önemli rol oynamaktadır. Etil alkolün ürettiği reaktif oksijen türleri metabolizmasında prooksidan-antioksidan dengesini bozmaktadır. Özellikle gastrointestinal sistemde karaciğer, kalp ve beyin gibi dokularda lipid peroksidasyonu arttırmaktadır. Etil alkol metabolizmada en fazla etkilediği organ karaciğer dokusudur. Çünkü etil alkol karaciğer dokusunda metabolizma olmaktadır [52-54].

Etil alkolün karaciğer dokusundaki antioksidan-oksidan dengesini bozduğu bilindiği için çeşitli moleküllerin koruyucu rolleri literatürlerde bildirilmiştir. Taurin, quercetin ve melatonin gibi moleküllerin etil alkolün negatif etkilerini gidermek için çalışmalar yapıldığı bilinmektedir [55-56].

Çalışmamızda etil alkole maruz bırakılan sıçan karaciğer dokularında yüksek düzeyde lipid peroksidasyon ürünü olan MDA tespit edildi. Literatürlerde etil alkolün karaciğerde üç yolla metabolizma olduğu açıklanmıştır. Etil alkol sitozolde alkol dehidrojenaz (ADH) enzimi endoplazmik retikulumda CYP2E1 enzimi ve peroksisomlarda katalaz enzimleri tarafından metabolize olmaktadır [57].

Yapılan birçok çalışmada etil alkolün lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyini arttırdığı rapor edilmiştir. Farelere uygulanan kronik etil alkolün karaciğer dokularında artan MDA düzeyini curcumin molekülünün azalttığı bildirilmiştir [58]. Etil alkole maruz bırakılan sıçan karaciğer dokularında resveratrol MDA seviyesini azalttığı rapor edilmiştir [59]. Ayrıca kronik etil alkol uygulaması yapılan karaciğer dokularında yeşil çay diyetinin artan MDA düzeyini azalttığı bildirilmiştir [60].

Çalışmada kontrol grubu MDA ve GSH düzeyi ile GST, AChE ve Ces enzim aktivite düzeylerine göre etil alkol grubunda artışlar tespit edildi. Ayrıca etil alkol grubu GR düzeyi ise nispi olarak kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi.

Etil alkolün karaciğer dokularında neden olduğu hepatotoksisiteye bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde değişimler olduğu bilinmektedir. Farklı modellerde etil alkol alımının dozu ve süresi antioksidan enzimler üzerine farklılık oluşturmaktadır [61-62].

Pathak ve arkadaşları yaptıkları çalışmada etil alkolün sıçan karaciğer dokularına etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında, sıçanlara günlük % 30'luk etil alkolden 3 ml 2, 4 ve 8 hafta boyunca uygulamasını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda etil alkol uygulanan gruplarda yüksek MDA düzeyi tespit etmişlerdir. Ayrıca etil alkol uygulanan gruplarda glutatyon peroksidaz (GSHP<sub>x</sub>), katalaz ve süperoksitdismutaz (SOD) enzim aktivitelerinde artışlar tespit edilmiştir [61].

Glutatyon-S-transferaz, hepatositlerde en önemli detoksifikasyon enzimidir. Yapılan bazı çalışmalarda sıçanların etanol tüketimi ile hepatik GST enzim aktivitelerinde önemli artışlar tespit edilmiştir [62]. Fakat farklı bir çalışmada ise 4 haftalık etil alkol kullanımında GST enzim aktivitelerinde farklılık tespit edilememiştir [63].

GR, indirgeyici bir güç olarak NADPH varlığında oksitlenmiş glutatyonu indirgenmiş forma katalize eder. Yapılan bir çalışmada 5 mg/kg etanol uygulanan sıçan hepatositlerinin GR aktivitelerinde artış tespit edilmiştir [64].

Yapılan başka bir çalışmada ise 12 haftalık etil alkol uygulanan farelerde GR aktivitelerinde değişiklik gözlenmemiştir [65].

Son yıllarda etil alkol uygulaması yapılan önemli bir çalışmada etil alkol uygulanan sıçan karaciğer dokularında MDA, GSH-P<sub>x</sub> ve SOD enzim aktivitelerinde artış gözlenirken GST ve GR enzim aktivitelerinde istatistiksel fark olmadığı rapor edilmiştir [66].

Çalışmamızda etil alkol uygulanan bireysel grubun enzim aktivitelerindeki artışlar yukarıda belirtilen literatürlerle uygunluk sağladığını görmekteyiz. Bu artışların etil alkolün neden olduğu oksidatif strese karşı karaciğer hücrelerindeki bu enzimlerin oksidatif stresi azaltmak için aktivitelerini arttırarak bir adaptasyon sağladığını düşünmekteyiz.

Memeli karboksilesterazları birçok dokunun endoplazmik retikulumlarında lokalize olan genler tarafından üretilmektedir. Ces enzimleri çeşitli ester ve amid içeren kimyasalların yanı sıra ilaçların serbest hidrolizini etkili bir şekilde katalize eder. Bu enzimlerin en önemli görevleri çeşitli ilaçları çevresel toksik maddeleri ve kanserojenlerin detoksifikasyonunda veya metabolik aktivasyonunda rol oynamaktadır. Ces enzimlerinin birçok izoenzimi bulunmaktadır. Bu izoenzimler birçok hayvan türlerinde bulunmaktadır ve kanserojenlerin metabolik aktivasyonlarında rol oynamaktadır [67].

Çalışmamızda en önemli sonuçlarımızdan biri Ces enzim aktivite düzeylerinde gözlemlendi. Etil alkol uygulanan bireysel grubun Ces enzim aktivite düzeyinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttığı tespit edildi. Etil alkolün toksik etkisini azaltmak için karaciğerde önemli düzeyde bulunan Ces enzimlerinin aktivasyonunu artırarak engellemeye çalıştığımızı düşünmekteyiz.

Ayrıca detoksifikasyon enzimleri olan GST ve Ces enzimlerinin her ikisinin birlikte artması sonuçlarımızın pozitif yönde olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızın önemli sonuçlarından biri de karaciğer dokusu AChE enzim aktivitesinin etil alkol grubunda artması olarak gözlemlendi. Bu enzim aktivitesi ile ilgili çalışmaların çoğu beyin dokusu ile ilgili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bu enzim aktivasyonunun beyin dokusundaki fonksiyonlar üzerine etkileri açıklanmıştır [68-73].

Yaptığımız literatür çalışmalarında etil alkole maruz kalan hayvanlarda AChE enzim aktive düzeyleri tespiti çalışmalarının sınırlı olduğu gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada wistar albino sıçanlara kronik etanol ve sükröz uygulamasının beyin ve karaciğer AChE üzerine etkileri araştırılmıştır. Kronik etil alkol uygulamasından sonra karaciğerde zara bağlı AChE aktivitesinin arttığı ve etil alkolün karaciğer dokusuna beyin dokusundan daha fazla zarar verdiği rapor edilmiştir. Ayrıca etil alkolün membran lipit bileşenleri modifiye ederek AChE aktivitesini etkileyebileceği belirtilmiştir [74].

Çalışmamızda bireysel kumarin grubu MDA, GSH düzeyleri ile Ces, AChE ve GR enzim aktivite düzeylerinin kontrol grubuyla arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edildi. Bireysel kumarin grubunun GST enzim aktivitesini anlamlı arttırdığı gözlenirken CeS, AChE ve GR enzim aktivitelerini nispi oranda arttırdığı gözlemlendi.

Etil alkol + kumarin gurubu MDA düzeyi kumarin maddesinin etkisiyle etil alkolün arttırdığı MDA düzeyini kombinasyonlu grupta azalttığı tespit edildi. Kombinasyonlu grup Ces enzim aktivite düzeyi etil alkol grubuna göre azalttığı gözlemlendi. Ayrıca kombinasyonlu grup AChE enzim aktive düzeyi etil alkol grubuna göre nispi oranda azalttığı tespit edildi. Etil alkolün arttırdığı GSH düzeyini kumarin maddesinin etkisiyle kombinasyonlu grupta kontrol grubu seviyesine göre düşürdü.

Kumarin türevli moleküllerin yapılarında bulunan fonksiyonel grupların antioksidan kapasiteyi arttırdığı belirtilmiştir. Kumarin moleküllerin antioksidan özelliği yapısında bulunan hidroksi, asetoksi ve metoksi gibi fonksiyonel grupların etkinliğinden kaynaklandığı bildirilmektedir. Ayrıca bu moleküllerin detoksifikasyon özellikleri de yapılan literatür çalışmalarında tespit edilmiştir [75].

Literatür çalışmalarında CCl<sub>4</sub> verilen sıçan karaciğer dokularında dört farklı kumarin molekülünün düzeltici etkinliği araştırılmıştır. Çalışmalarında esculetin ve scoparone kumarin moleküllerinin CCl<sub>4</sub>'ün oluşturduğu olumsuz etkilerini düzeltici yönde etkilediği rapor edilmiştir [76].

Başka bir literatürde ise ferrid nitritotriasetat (Fe-NTA) ile oksidatif strese maruz bırakılan sıçan dokuları üzerine 1,2 benzopyron kumarin molekülünün etkinliği araştırılmıştır. Çalışmalarında bu kumarin molekülünün lipit peroksidasyonu engellediği bozulan antioksidan sistemi düzelttiği rapor edilmiştir [75].

Özkaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada AlCl<sub>3</sub>'e maruz bırakılan sıçan karaciğer dokularında 3-benzoyl-7-hydroxy kumarin bileşiğinin biyokimyasal parametreler üzerine etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmalarında kumarin bileşiğinin AlCl<sub>3</sub>'ün oluşturduğu yüksek lipit peroksidasyonu azalttığı, AlCl<sub>3</sub>'ün azalttığı GSH ve GST enzim aktive düzeyini arttırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca kumarin bileşiğinin Ces enzim aktive düzeyinin kontrol grubuna yakın değerlerde buldukları açıklanmıştır. Özkaya ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmalarında AlCl<sub>3</sub>'ün oluşturduğu toksisiteye karşı 3-benzoyl-7-hydroxy molekülünün sıçan karaciğer dokuları üzerine düzeltici etkisi olduğu açıklanmıştır [77].

Çalışmamızda etil alkol uygulanan bireysel grupta 18:0 yağ asit düzeyinin istatistiksel olarak kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi ve ilgili literatürlerle örtüşüğünü görmekteyiz. Toplam yağ asit düzeyi incelendiğinde etil alkol bireysel grubun  $\Sigma$ SFA düzeyinin diğer gruplardan nispi olarak yüksek çıktığı saptanırken  $\Sigma$ MUFA,  $\Sigma$ PUFA ve  $\Sigma$ USFA düzeylerinde ise nispi oranda azaldığı tespit edildi. Yukarıda belirtilen literatürlerin çoğunda 22:6n3 yağ asit düzeyinin etil alkolün etkisiyle azaldığı rapor edildiğini görmekteyiz. Çalışmamızda 22:6n3 yağ asidinin nispi oranda azaldığı tespit edildi. Ayrıca 18:2n6c, 18:3n6, 20:2n6 ve 18:1n9c doymamış yağ asitlerinde nispi oranda azaldığı saptandı. Genel olarak etil alkolün karaciğer dokusu yağ asit bileşenleri üzerine olumsuz etkilerini literatürlerle uyuşturduğunu düşünmekteyiz.

Yapılan literatür araştırmalarında, çalışmamızda kullandığımız kumarin molekülünün yağ asit düzeylerine etkileri çalışmalarının olmadığı tespit edildi. Ayrıca etil alkolün oluşturduğu oksidatif strese karşı bu kumarin molekülünün yağ asit metabolizması üzerine çalışılmadığı da gözlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız kumarin molekülünün  $\Sigma$ SFA düzeyini etil alkol grubuna göre nispi oranda azalttığı,  $\Sigma$ PUFA ve  $\Sigma$ USFA düzeylerini ise nispi oranda arttırdığı tespit edildi. Etil alkolün yükselttiği doymuş 18:0 yağ asit düzeyini azalttığını görmekteyiz. Ayrıca doymamış yağ asitlerinden 18:2n6c, 18:3n6, 20:2n6, 20:4n6 ve 22:6n3 yağ asit düzeylerini nispi olarak arttırdığını tespit ettik.

Wistar sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada etil alkol (9 g/kg/gün) uygulaması 6 hafta boyunca yapıldı. Etil alkol uygulanan sıçan karaciğer dokularında 18:1n9 ve MUFA düzeyleri azalırken pufa düzeylerinde artış gözlenmiştir. Çalışmalarında etil alkol grubu 18:2n6, 18:3n3, 18:0, 20:4n6 yağ asit düzeylerinde nispi artış gözlenirken, 22:6n3, 22:5n3, 20:5n3, 16:0 ve 16:1 yağ asit düzeylerinde nispi azalış rapor etmişlerdir [78].

30 gün etil alkol (7.9 g/kg) uygulaması yapılan sıçanların karaciğer dokularında 16:0, 18:0, 18:1 ve 22:5 yağ asit düzeyleri karaciğer dokusunda artarken, 16:1 ve 20:4 yağ asit düzeylerinde azalmalar rapor edilmiştir [79].

45 günlük etil alkol (% 20) uygulaması yapılan sıçanların karaciğer dokularında 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 yağ düzeyleri artarken, 20:4 yağ asit düzeyi ise rapor edilmiştir [80].

Etanol alımı süresince karaciğerde fibröz, siroz, hepatit ve karaciğer yağlanması gözükür. Etanol'un alım miktarı, sıklığı ve süresi, diyet, beslenme durumu ve canlının genetik yapısı hastalık düzeyini etkilemektedir. Etanol alımından sonra yağ asidi biyosentezinde ve trigliserollerde esterleşme oranları belirgin bir şekilde artmaktadır. Etanol alımından sonra etanol adenozin monofosfat (AMP) kinazın aktivitesini inhibe ederek karaciğer yağ asidi biyosentezinde yer alan acetyl-CoA carboxylase (ACC) enzimini aktive etmektedir. Artan yağ sentezi oranlarına ilaveten alkolik yağlı karaciğerlerde mitokondriye yağ taşınması azalır ve ardından yağ asit metabolizmasında bozunmalar gözükür [81].

Rhesus maymunlarına 18 ay boyunca %7 8 (w/v) oranında etil alkol uygulaması yapılmış ve karaciğer dokuları yağ asit düzeyleri incelenmiştir. Etil alkol verilen rhesus maymunlarının karaciğer dokularında 18:1n9, 20:3n9, 22:4 yağ asit düzeyleri kontrol grubuna göre artarken, 22:6n3, 22:5n3, 20:4n6, ve 18:2n6 yağ asit düzeylerinde azalmalar tespit edilmiştir [82].

Wistor sıçanlarına bir aylık etanol (%25) uygulamasında birçok dokunun yağ asit bileşen düzeyleri araştırılmıştır. Çalışmalarında karaciğer, böbrek ve beyin dokularında etil alkol uygulaması ile 16:0,18:0, 18:1 düzeyleri artarken 16:1 ve 20:4 yağ asit düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir [83].

Sonuç olarak etil alkolün oluşturduğu oksidatif strese karşı kullanılan kumarin türevli molekülün karaciğer dokularında birçok kimyasal parametrelere pozitif etki gösterdiğini düşünmekteyiz. Kumarinler ile ilgili yapılacak ileriki bilimsel çalışmalara bu tez çalışmasının ışık tutabileceğini öngörmekteyiz.

**KAYNAKLAR**

- [1] Reddy, V.D., Padmavathi, P., Hymavathi, R., Maturu, P., Varadacharyulu, N.Ch., (2014). Alcohol-induced oxidative stress in rat liver microsomes: Protective effect of *Emblca officinalis*, *Pathophysiology*.
- [2] Zhang, F., Zhang, J., Li, Y., (2012). Corn oligopeptides protect against early alcoholic liver injury in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 50 :2149–2154.
- [3] A. Basile, S. Sorbo, V. Spadaro, M. Bruno, A. Maggio, N. Faraone, S. Rosselli, “Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (apiaceae),” *Molecules*, vol. 14, no.3, pp. 939–952, 2009.
- [4] Kaya S, Pirinçci İ, Traş B, Ünsal A, Bilgili A, Akar F, Doğan A, Yarsan E: Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayınevi. Ankara. Syf: 256-257, 2002.
- [5] R. Guo, J. Ren, “Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace”, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 1285-1301, 2010.
- [6] Yıldız, C. H., 2007, Karvakrol, Tymol ve Rosmarinic Asit İçeren Bitki Ekstraktlarının Etlik Piliçlerde Performans, Sindirim Kanali Histomorfolojisi ve Kan Parametreleri Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 31 s.
- [7] Moeller FG, Dougherty DM, Lane SD, Steinberg JL, Cherek DR. Antisocial personality disorder and alcohol-induced aggression. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22(9): 1898-902.
- [8] Moeller FG, Dougherty DM. Antisocial personality disorder, alcohol, and aggression. *Alcohol Res Health*. 2001; 25(1): 5-11.
- [9] Galicia-Moreno M, Gutiérrez-Reyes G. Role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease. *Rev Gastroenterol Mex*. 2014; 79(2): 135-44.
- [10] Can M, Gürpınar SS, İşler H, Varol N, Gürpınarlı Z: Alkol Alan Kişilerin Kan Alkol Düzeyinin Solunum Havasındaki Alkol Düzeyi İle Karşılaştırılması Ve Karaciğer Enzimlerinin Etkisinin Araştırılması. *Van Tıp Dergisi*: 15 (3): 75-80. 2008.
- [11] O. Niemelä, “Aldehyde-protein adducts in the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress”, *Frontiers in Bioscience*, 4, 506-513, 1999.

- [12] C.S. Lieber, "Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis", *Alcohol*, 34, 9-19, 2004.
- [13] C.S. Lieber, "Metabolism of alcohol", *Clinics in Liver Disease*, 9, 1-35, 2005.
- [14] B.U. Bradford, C.B. Seed, J.A. Handler, D.T. Forman, R.G. Thurman, "Evidence that catalase is a major pathway of ethanol oxidation in vivo: doseresponse studies in deer mice using methanol as selective substrate", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 172-176, 1993.
- [15] Çekin AH, Boyacıoğlu AS: Alkolik Karaciğer Hastalığı. Gastroenteroloji. Fersa Matbaacılık Ltd. Şti. 2002.
- [16] Özcan F. Gebelik sırasında uzun dönem etil alkol, metil alkol ve etilen glikol'e maruz kalmanın yenidoğan yavrular üzerine toksik etkisinin incelenmesi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 2008.
- [17] Coğkunol H, Altıntoprak E. Alkol kullanımının genetik yönleri. *Klinik Psikiyatri Derg.* 1999; 2:222-29.
- [18] Yalçın Ğ, Ğnan SY, Aksu F. Etanol ve santral sinir sistemi nöromediyatörleri. 2003; *ArGiv*12: 115, 2003.
- [19] K. N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 963248, 1-14.
- [20] Nordberg J, Arner ESJ, Reactive oxygen species, antioxidant and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31 : 1287– 1312.
- [21] Das SK, Vasudevan DM, Biochemical diagnosis of alcoholism, *Ind. J. Clin. Biochem.* 2005; 20 : 35–42.
- [22] Masella, R, Benedetto DI, Vari R, Filesi RC&Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems : Involvement of glutathione and glutathionerelated enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 2005; 16 : 577–586.
- [23] Wu G, Fang YZ, Yang S, et all. Glutathione metabolism and its implications for health, *J Nutr*, Mar 2004; 134(3) : 489-92.
- [24] Pastore A, Federici G, Bertini E & Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* 2003; 333 : 19–39.

- [25] Reed DJ. Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection, (E. Hodgson; R.C. Smart, Editörler). Introduction to biochemical toxicology. United States of America: Wiley and Sons Inc; 2000. s. 221-253.
- [26] D.J. Reed, ‘*Introduction to Biochemical Toxicology*’. United States of America: Wiley and Sons Interscience, 2000.
- [27] A.Z. Reznick, L. Packersen, C.K. Sen, J.O.Holloszy, M.J. Jackson, *Free Radical and Oxidative Damage in Biology and Medicine*. London: Birkhauser Publisher, 1998.
- [28] H.J Stein , M.M. Oosthuizen, R.A. Hinder, H. Lamprechts, ‘‘Oxygen free radicals and glutathione in hepaticischemia reperfusion injury’’, *Journal of Surgical Research*, vol. 50, no. 4, pp. 398-402, 1991.
- [29] M.A. Gyamfi, I.I. Ohtani, E. Shinno, Y. Aniya, ‘‘ Inhibition of glutathione s-transferases by Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea, in vitro’’, *Food Chemical Toxicology*, vol. 42, no. 9, pp. 1401-1408, 2004.
- [30] M.K. Ross, A. Borazjani, C.C. Edwards, P.M. Potter, ‘‘Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases’’, *Biochemical pharmacology*, 71(5): 657-669, 2006.
- [31] T. Satoh, ‘‘Toxicological implications of esterases from molecular structures to functions’’, *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2): 11-18, 2005.
- [32] Melanson, S.W., Chang-Hyon, Y., Pezzementi, M.L. ve Pezzementi, L., 1985, *Comparative Biochemistry and Physiology, Comp. Phar.*, 81:87-96.
- [33] N.A. Porter, ‘‘Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids’’, *Acc Chem Res*, 19: 262–268, 1986.
- [34] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, Oxford. Clarendon Press, 1989.
- [35] J.M. Lawrence, B. Adrienne, ‘‘Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients’’, *FASEB J*, 1: 441–445, 1987.
- [36] Akkuş İ, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, 1. Baskı, Konya, Mimoza Yayınları 1995.
- [37] Beütler E., 1969. Effect of flavin compound on Glutathione Reductase Activity; In vivo and in vitro studies. *J Clin Invest*. 48: 1957– 1966.

- [38] D.Voet, J.G. Voet, *Biochemistry*. New York: John Wiley and Sons Interscience, 1990.
- [39] Lieber, C.S., DeCarli, L.M., and Sorrel, M.F.: Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology*. 1989; 10(4): 501-51.
- [40] Naghma Khan, Sonia Sharma, Sarwat Sultana. Attenuation of potassium bromate-induced nephrotoxicity by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats: chemoprevention against free radical-mediated renal oxidative stress and tumor promotion response.. Vol. 9, No. 1, 2004 DOI 10.1179/135100004225003860. 2004.
- [41] J. Sedlak, R.H. Lindsay, ‘‘Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent’’, *Analytical Biochemistry*, vol.25, no. 1, pp. 192-205, 1968.
- [42] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, ‘‘Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation’’, *Journal of biological Chemistry*, vol. 249, no. 22, pp. 7130-7139, 1974.
- [43] Z.A. Placer, L.L Cushman, B.C. Johnson, ‘‘Estimation of product of lipid peroxidation (malony dialdehyde) in biochemical systems’’, *Analytical Biochemistry*, vol.16, no. 2, pp. 359-364, 1996.
- [44] U. Nousiainen, R. Törrönen, ‘‘Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by in vivo and in vitro inhibition’’, *General Pharmacology; The Vascular System*, vol.15, no. 3, pp. 223-227, 1984.
- [45] P. Santhoshkumar, T. Shivanandappa, ‘‘In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver’’, *Chemico-biological interactions*, vol.119, pp. 227-282, 1999.
- [46] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, ‘‘A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity’’, *Biochemical Pharmacology*, vol.7, no. 2, pp. 88-95, 1961.
- [47] M. Özmen, S.E. Dominguez, A.Fairbrother, ‘‘Effects of dietary azinphos methyl on selected plasma and tissue biomarkers of the gray-tailed vole’’, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, vol.60, no. 2, pp. 194-201, 1998.

- [48] M.M. Bradford, ‘‘A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding’’, *Analytical Biochemistry*, vol.72, no. 1-2, pp. 248-254, 1976.
- [49] A. Hara, N.S. Radin, ‘‘Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent’’, *Analytical Biochemistry*, vol. 90, no. 1, pp. 420-426, 1978.
- [50] W.W. Christie, ‘‘*Gas Chromatography and Lipids*’’, Glasgow: The Oil Press, 1992.
- [51] A. Kurt, B. Gunduz, Z. İltir, M. Koca, ‘‘Optoelectronic Properties of 3-acetyl-6-bromocoumarin Compound in Various Solvents and Concentrations’’, *Kuwait Journal of Science*, 46(3), pp.60-70, 2019.
- [52] Balkan J, Kanbagli O, Aykac-Toker G, Uysal M. Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol treated rats. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1231-1233.
- [53] Ozel Turkcü U, Bilgihan A, Biberoglu G, Mertoglu Caglar O. Carnosine supplementation protects rat brain tissues against ethanol-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 2010; 339 (1-2): 55-61.
- [54] Zhou Z. Zinc and alcoholic liver disease. *Dig Dis* 2010; 28: 745- 750.
- [55] Molina FM, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. Quercetin, a flavonoid antioxidant prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 1398-1402.
- [56] Genc S, Gurdol F, Oner-İyidođan Y, Onaran I. The effect of melatonin administration on ethanol induced lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 1998; 37: 37-40.
- [57] Carmen HM, Exposito A, Palma JM, Higuera M. Oxidative stress generated by dietary zinc deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 183-193.
- [58] S. Rong, Y. Zhao, W. Bao, X. Xiao, D. Wang, A.K. Nussler, H. Yan, P. Yao, L. Liu, ‘‘Curcumin prevents chronic alcohol-induced liver disease involving decreasing ROS generation and enhancing antioxidative capacity’’, *Phytomedicine*, 19, 545– 550, 2012.

- [59] A. Kasdallah-Grissa, B. Mornagui, E. Aouani, M. Hammami, M. El May, N. Gharbi, A. Kamoun, S. El-Fazaâ, “Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver”. *Life Sciences* 80, 1033–1039, 2007.
- [60] A. Augustyniak, E. Waszkiewicz, E. Skrzydlewska, “ Preventive action of green tea from changes in the liver antioxidant abilities of different aged rats intoxicated with ethanol”. *Nutrition*, 21, 925–932, 2005.
- [61] Pathak A, Mahmood A, Pathak R, Dhawan D. Effect of zinc on hepatic lipid peroxidation and antioxidative enzymes in ethanol fed rats. *J Appl Toxicol* 2002; 22: 207-210.
- [62] Aykac G, Uysal M, Yalcin SA, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 1985; 36: 71-76.
- [63] Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French S W, Morimoto M, Nordmann R. Effect of ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997; Feb 25 (2): 351-355.
- [64] Macdonald C M. The effect of ethanol on hepatic lipid peroxidation and on the activities glutathione reductase and peroxidase. *FEBS Lett* 1973; 32: 227-230.
- [65] Zhou Z, Sun X, Lambert JT, Kang JY. Metallonein-independent zinc protection from alcoholic liver injury. *Am J Pathol* 2002; 160: 2267-2274.
- [66] Oznur Mertoglu Caglar<sup>1</sup>, Ayse Bilgihan<sup>1</sup>, Ummuhani Ozel Turku<sup>4</sup>, Gursel Biberoglu<sup>2</sup>, Gulnur Take<sup>3</sup>. The effect of zinc on ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]* 2012; 37 (4) ; 437–444. doi:10.5505/tjb.2012.49469.
- [67] Masakiyo Hosokawa. Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs.. *Molecules* 2008, 13, 412-431.
- [68] G. Qi-Hai, W. Qin, H. Xie-Nan, S. An-Sheng, N. Jing, S. Jing-Shan, “Protective effect of Ginkgo biloba leaf extract on learning and memory deficit induced by aluminium in model rats”, *Chinese Journal of Integrative Medicine*, vol.12, no.1, pp. 37–41, 2006.

- [69] P.P. Goncalves, V.S. Silva, ‘‘Does neurotransmission impairment accompany aluminium neurotoxicity?’’, *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol.101, no. 9, pp.1291–1338, 2007.
- [70] P. Zatta, M. Ibn-Lkhatay-Idrissi, P. Zambenedetti, M. Kilyen, T. Kiss, ‘‘In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase’’, *Brain Research Bulletin*, vol.59, no. 1, pp. 41–45, 2002.
- [71] S.V. Thirunavukkarasu, S. Venkataraman, S. Raja, L. Upadhyay, ‘‘Neuroprotective effect of Manasamitra vatakam against aluminium induced cognitive impairment and oxidative damage in the cortex and hippocampus of rat brain’’, *Drug and Chemical Toxicology*, vol.35, no. 1, pp. 104–115, 2012.
- [72] K. Blennow, M.J. de Leon, H. Zetterberg, ‘‘Alzheimer's disease’’, *Lancet*, vol.368, no. 9533, pp. 387–403, 2006.
- [73] V. Kakkar, I.P. Kaur, ‘‘Evaluating potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles in aluminium induced behavioral, biochemical and histopathological alterations in mice brain’’, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 11, pp. 2906–2913, 2011.
- [74] María José Ruano, Manuel Mario Sánchez-Martín, Josefa María Alonso, Pablo Hueso. Changes of Acetylcholinesterase Activity in Brain Areas and Liver of Sucrose- and Ethanol-Fed Rats. . *Neurochemical Research*, Vol. 25, No. 4, 2000, pp. 461–470.
- [75] N. Khan, S. Sharma, S. Sultana, ‘‘Amelioration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced renal oxidative stress and tumor promotion response by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats’’, *Cancer Letters*, vol.210, no. 1, pp.17-26, 2004.
- [76] M. Atmaca, H.M. Bilgin, B.D. Obay, H. Diken, M. Kelle, E. Kale, ‘‘The hepatoprotective effect of coumarin and coumarin derivatives on carbon tetrachloride-induced hepatic injury by antioxidative activities in rats’’, *Journal of Physiology and Biochemistry*, vol. 67, no. 4, pp. 569-576, 2011.
- [77] Ahmet Özkaya, Kenan Türkan. Protective Effects of 3-benzoyl-7-hydroxy Coumarin on Liver of Adult Rat Exposed to Aluminium Chloride. *Acta Chim. Slov.* 2021, 68, *in press*. DOI: 10.17344/acsi.2020.6390

- [78] Danijela RISTIC-MEDIC, Gordana RISTIC, Vesna TePSIC and Gordana N. RISTIC. Effects of Different Quantities of Fat on Serum and Liver Lipids, Phospholipid Class Distribution and Fatty Acid Composition in Alcohol-Treated Rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 49, 367-374, 2003.
- [79] Rajagopal Senthilkumar and Namasivayam Nalini. Effect Of Glycine On Tissue Fatty Acid Composition In An Experimental Model Of Alcohol-Induced Hepatotoxicity. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2004) 31, 456–46.
- [80] Aruna Kode Rukkumani Rajagopalan Suresh Varma Penumathsa Venugopal P. Menon. Effect of Ethanol and Thermally Oxidized Sunflower Oil Ingestion on Phospholipid Fatty Acid Composition of Rat Liver: Protective Role of *Cuminum cyminum* L. . *Ann Nutr Metab* 2005;49:300–303 DOI: 10.1159/000087333.
- [81] Byoung-Joon Song, Kwan-Hoon Moon, Nils U. Olsson, Norman Salem Jr. Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Hepatology* 49 (2008) 262–273.
- [82] Robert J. Pawlosky and Norman Salem Jr. Alcohol Consumption in Rhesus Monkeys Depletes Tissues of Polyunsaturated Fatty Acids and Alters Essential Fatty Acid Metabolism. Vol. 23, No. 2. 311-317. 1999.
- [83] V.Rajakrishnan and V.P. Menon. Potential role of antioxidants during ethanol-induced changes in the fatty acid composition and arachidonic acid metabolites in male wistar rats. *Cell Biology and Toxicology*. 2001;17;11-22.