

**T.C.  
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ETİL ALKOLE MARUZ KALAN SIÇANLARIN BAZI BİYOKİMYASAL  
PARAMETRELER ÜZERİNE NAR SUYUNUN ETKİSİ**

**CANSU BAKIR ŞAHİN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ADYAMAN, 2019**

**T.C.  
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİL ALKOLE MARUZ KALAN SIÇANLARIN BAZI BİYOKİMYASAL  
PARAMETRELER ÜZERİNE NAR SUYUNUN ETKİSİ**

**CANSU BAKIR ŞAHİN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

Bu tez 25/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA**  
**Danışman**

**Prof. Dr. Erol ASİLTÜRK**  
**Üye**

**Dr. Öğr. Üyesi Hasan KARADAĞ**  
**Üye**

**Prof. Dr. Murat KOCA**  
**Enstitü Müdür V.**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

#### ETİL ALKOLE MARUZ KALAN SIÇANLARIN BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ÜZERİNE NAR SUYUNUN ETKİSİ

**Cansu BAKIR ŞAHİN**

Adıyaman Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA  
Yıl: 2019, Sayfa sayısı: VIII+24

Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA  
Prof. Dr. Erol ASİLTÜRK  
Dr. Öğr. Üyesi Hasan KARADAĞ

Etil alkol toksin bir maddedir. Nar suyunda birçok polifenol bileşik vardır. Polifenol türevli maddelerin antioksidan etkileri bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, ratlarda etil alkol ile oluşturulan oksidatif strese karşı nar suyunun koruyucu etkileri incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, kontrol grubu (K), etil alkol grubu (E), nar suyu grubu (N) ve etil alkol + nar suyu grubu (EN) oluşturuldu. Ratların testis, beyin ve karaciğer dokularında malondialdehit (MDA), redükte glutasyon (GSH), asetilkolin esterase (AChE), karboksilesteraz (CaE) ve glutasyon-S-transferaz (GST) parametreleri araştırıldı. E grubunun MDA düzeyleri her üç dokuda arttı. Karaciğer ve testis dokularının GST enzim aktivite düzeyleri E grubunda azaldı. E grubunun GSH düzeyi karaciğer dokusunda azaldı. E grubunun CaE enzim aktivite düzeyleri her üç dokuda azaldı. Nar suyu grupların MDA düzeyleri E grubundan az çıktı. Nar suyu grupların CaE enzim aktiviteleri tüm dokularda E grubuna göre arttı. Beyin dokusu AChE enzim aktivitesini nar suyu arttırdı.

Sonuç olarak etil alkolün oluşturduğu oksidatif stresi nar suyunun engellediğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Nar suyu; MDA; Enzim aktivitesi

## ABSTRACT

### MSc Thesis

# THE EFFECT OF POMEGRANATE JUICE ON THE SOME BIOCEMICAL PARAMETERS OF RATS INDUCED ETHYL ALCOHOL

**Cansu BAKIR ŞAHİN**

Adiyaman University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA  
Year: 2019, Number of pages: Hata! Yer işareti tanımlanmamış. +  
24

Jury : Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA  
Prof. Dr. Erol ASİLTÜRK  
Asst. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ

Ethyl alcohol is a toxin substance. There are many polyphenol compounds in pomegranate juice. The antioxidant effects of polyphenol-derived substances are known. The aim of this study was to investigate the protective effects of pomegranate juice against oxidative stress induced by ethyl alcohol in rats. In the study, control group (K), ethyl alcohol group (E), pomegranate juice group (N) and ethyl alcohol + pomegranate juice group (EN) were formed. Malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), acetylcholine esterase (AChE), carboxylesterase (CaE) and glutathione-S-transferase (GST) parameters in testis, brain and liver tissues of rats were investigated. MDA levels of group E increased in all three tissues. GST enzyme activity levels of liver and testis tissues decreased in group E. GSH levels of group E decreased in liver tissue. CaE enzyme activity levels of group E decreased in all three tissues. MDA levels of pomegranate juice groups were lower than E group. CaE enzyme activities of the pomegranate juice groups increased in all tissues compared to the E group. AChE enzyme activity in brain tissue increased pomegranate juice.

As a result, we think that pomegranate juice prevents the oxidative stress caused by ethyl alcohol.

**Key Words:** Pomegranate juice; MDA; Enzyme activity

## BEYAN

“Etil Alkole Maruz Kalan Sıçanların Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Nar Suyunun Etkisi” 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.

Cansu BAKIR ŞAHİN

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim esnasında engin bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen ve çalışmalarım boyunca desteğinden ve gösterdiği yakın ilgiden dolayı Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarına katkılar sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Ertan YOLOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Miraç UÇKUN Hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen tüm Kimya Bölümü hocalarına da teşekkür ederim.

Cansu BAKIR ŞAHİN

## İÇİNDEKİLER

|                                                         |     |
|---------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET.....                                               | I   |
| ABSTRACT.....                                           | II  |
| BEYAN.....                                              | III |
| TEŞEKKÜR.....                                           | IV  |
| İÇİNDEKİLER.....                                        | V   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                  | VI  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                            | VII |
| 1. GİRİŞ.....                                           | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                  | 2   |
| 2.1. Alkol.....                                         | 2   |
| 2.2. Narın Biyokimyasal Özellikleri.....                | 3   |
| 2.3. Enzimler.....                                      | 4   |
| 2.4. GSH.....                                           | 5   |
| 2.5. MDA.....                                           | 6   |
| 2.6. Çalışmanın Amacı.....                              | 6   |
| 3. MATERYAL ve METOD.....                               | 7   |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....                  | 7   |
| 3.2. Deneysel Süreçte Kullanılan Materyal.....          | 7   |
| 3.3. Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar.....       | 7   |
| 3.4. Deney Hayvanlarının Temini ve Uygulama İşlemi..... | 7   |
| 3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....            | 8   |
| 3.6. Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri.....         | 8   |
| 3.7. Glutasyon S-transferaz Aktivitesi.....             | 9   |
| 3.8. Karboksilesteraz Aktivitesi.....                   | 9   |
| 3.9. Asetilkolinesteraz Aktivitesi.....                 | 9   |
| 3.10. Malondialdehit Tayini.....                        | 10  |
| 3.11. Redükte Glutasyon Tayini.....                     | 10  |
| 3.12. Toplam Protein Miktarı Tayini.....                | 10  |
| 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....                            | 11  |
| 5. BULGULAR.....                                        | 12  |
| 6. TARTIŞMA.....                                        | 15  |
| KAYNAKLAR.....                                          | 18  |
| KİŞİSEL BİLGİLER.....                                   | 24  |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 5.1 Karaciğer dokusu biyokimyasal parametreleri..... | 12 |
| Çizelge 5.2 Beyin dokusu biyokimyasal parametreleri.....     | 13 |
| Çizelge 5.3 Testis dokusu biyokimyasal parametreleri.....    | 14 |





## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                                |                                                               |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| ACh                            | : Asetilkolin                                                 |
| ACTI                           | : Asetilkolin iovid                                           |
| AChE                           | : Asetilkolin esteraz                                         |
| CaE                            | : Karboksilesteraz                                            |
| CDNB                           | : 1-kloro-2,4-dinitrobenzen                                   |
| CAT                            | : Katalaz                                                     |
| DTNB                           | : 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoik asit)                        |
| FÜTDAM                         | : Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi |
| GR                             | : Glutasyon redüktaz                                          |
| GST                            | : Glutasyon-S-transferaz                                      |
| GSH                            | : Redükte Glutasyon                                           |
| GSH-P <sub>x</sub>             | : Glutasyon Peroksidz                                         |
| GSSG                           | : Okside Glutasyon                                            |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | : Sülfirik asit                                               |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | : Hidrojen Peroksid                                           |
| HCl                            | : Hidroklorik Asit                                            |
| MDA                            | : Malondialdehit                                              |
| PNPA                           | : p-nitrofenil asetat                                         |
| ROT                            | : Reaktif Oksijen Türleri                                     |
| SOD                            | : Süperoksid Dismutaz                                         |
| TBA                            | : Trikloro Asetik Asit                                        |
| TC                             | : Thiobarbiturik Asit                                         |

## 1. GİRİŞ

Etil alkolü insanlar birçok alanda kullanılmaktadır. Laboratuvarlarda, fabrikalarda, kozmetik endüstrisinde ve içecek olarak kullanımı yaygındır. Dünyada insanlar içki tüketimini oldukça yüksek düzeyde yapmaktadır. İçki ürünlerinde etil alkol oransal olarak yüksektir. Dünyada 2 milyardan daha fazla insan alkol tüketimi yapmaktadır. Etil alkol kullanımı sonucunda yıllık 80 milyon insanın hastalığa yakalandığı rapor edilmiştir. Etil alkolün kullanımı sonucunda insanlarda solunum, sindirim ve karaciğer sirozu gibi hastalıklar oluşmaktadır [1].

Nar birçok kültürde yaygın olarak kullanılan bir meyvedir. Nar suyunda bulunan birçok polifenolik bileşikler mevcuttur. Bu bileşiklerin serbest radikalleri temizlemede önemli rolleri vardır. Nar suyunun yüksek antioksidan kapasitesi bu meyvenin önemini daha da artırmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda nar suyu içeriğindeki fenolik bileşiklerin antiaterojenik etki gösterdiği bildirilmiştir. Nar ile yapılan birçok çalışmada nar içeriğindeki biyomoleküllerin kemoterapotik, antiaterosklerotik, infalamatuar ve kemopreventif etkileri rapor edilmiştir [2-5].

Bu tez çalışmasında; kronik etil alkol uygulanan rat dokularında oluşturulan oksidatif strese karşı nar suyunun düzeltici etkileri araştırılmıştır.

**2. GENEL BİLGİLER****2.1. Alkol**

Dünya çapındaki en büyük sağlık problemlerinden biride etil alkolün kullanılmasından kaynaklı hastalıklardır. Dünyada etil alkolün kullanımı gitgide artmaktadır. Etil alkolün oluşturduğu sağlık problemlerinin yanında sosyal olarak kabul edilen problemlerde artmaktadır [6]. İnsanlarda etil alkolün aşırı tüketimi sonucunda karaciğer sirozu, kalp hastalığı, alzheimer hastalığı, felçlik, akciğer solunum hastalığı, diyabet, kemik hastalıkları ve kanser hastalıkları oluşmaktadır [7-15]. Etil alkol alımından sonra metabolizmadaki etkilenen ilk organ karaciğer dokusudur. Karaciğer dokusu dışında böbrek, akciğer, beyin ve testis gibi dokularda etil alkolün toksititelerinden etkilenmektedir [16,17]. Etil alkol kullanımında karaciğer hücrelerinde etkileşime girerek yüksek derecede toksik bir metabolit olan asetaldehitine dönüşür. Asetaldehit lipitler, proteinler ve membran lipitleri ile etkileşime girerek zarar verir [18]. Etil alkolün asetaldehite oksitlenmesinde üç enzim sistemi vardır. Bunlar alkol dehidrogenaz, cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) ve katalaz enzim sistemidir. Alkol dehidrogenaz enzimi etil alkolden NAD'ın NADH'a eş zamanlı olarak indirgenmesiyle etil alkolden asetalaldehit oluşumuna yol açar. Bu durum sonucunda ksantin oksidaz aktivitesi artar ve süperoksit üretiminin artmasına neden olur. Etil alkolün asetaldehite oksityen ikinci enzim endoplazmik retikulumda yerleşmiş olan mikrozomal etil alkol oksitleyici sistemdir. Bu enzim NADPH'a bağımlı olup sitokrom P450 2E1 içermektedir. Üçüncü enzim sistemi katalaz enzimidir. Katalaz, oksidasyonu  $H_2O_2$  kullanarak yapar [19-21]. Etil alkol metabolizması sonucunda oksidatif stres artar [22]. Etil alkolün oluşturduğu oksidatif stres sonucunda reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif azotun üretimini artırır [23].

**2.2. Narın Biyokimyasal Özellikleri**

Antioksidanlar hücrede oksidasyonu önleyen moleküllerdir [24]. Epidemiyolojik çalışmalarda meyve ve sebzelerin bazı kanser türlerine karşı pozitif etkiler gösterdiği bildirilmiştir [25,26]. Meyveler ve sebzeler içeriğindeki askorbik asit, karotenoidler, flavonoidler ve tanenlerin birçok hastalığın önlenmesinde rol oynamaktadır [27,28]. Nar insanların yaygın olarak kullandığı meyvelerden biridir [29]. Nar suyu ve fermente edilmiş nar suyunun antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir [30]. Nar suyunun farelerde ve insanlarda antiaterojenik etki gösterdiği belirtilmiştir. Nar suyunun bu etkileri içeriğinde bulunan ellagik asit, antosiyaninler, delphinidin, siyanidin, pelargonidin 3-glukozitler ve 3,5-diglukositler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklandığı bu çalışmalarda belirtilmiştir [2,3]. Ayrıca nar kabuğunun Çin’de yaygın olarak kullanılan 28 çeşit meyve kabuğu içerisinde en etkin antioksidan kapasiteye sahip olduğu rapor edilmiştir [31].

Nar suyunda %85 su, %11 toplam şeker (früktöz ve glukoz), %1,4 pektin, %0,2-1polifenoller ve askorbik asit, sitrik asit gibi organik asitleri mevcuttur [32]. Ayrıca fenolik bileşiklerden antosiyaninler [33], az oranda yağ asitleri ve  $\alpha$ -tokoferol içermektedir [34].

Nar suyu ile ilgili birçok deneysel çalışma mevcuttur. Çeşitli çalışmalarda nar suyunun hipertansiyonda kan basıncını azalttığı, diyabetik hastaların lipid profilini iyileştirdiği rapor edilmiştir [2,4]. Ayrıca kemoterapotik, antiaterosklerotik, infalamatuar ve kemopreventif etkileri bildirilmiştir [2-5]. Nar suyunun insan sağlığı üzerinde yukarıda belirtilen tüm faydalı etkilerini, nar suyu içeriğinde bulunan moleküllerin güçlü antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı açıklanmıştır [35,36]. Bu etkinin nar suyu içeriğinde bulunan antosiyaninler (3-glukozitler, delphinidin, siyanidin ve pelargonidin), ellagitaninler, flavonoidler (quercetin, kaemferol ve luteolin glikozitleri) ve polifenolik asitlerden (ellagik asit ve gallik asit) kaynaklandığı rapor edilmiştir [30,37,38].

Ayrıca nar suyunun in vitro antioksidan aktivitesinin kırmızı şarap ve yeşil çaylardan üç kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [39].

**2.3. Enzimler**

Asetilkolinesteraz (AChE) (E.C. 3.1.1.7) enzimi, 1991 yılında yapısı aydınlanmıştır. AChE'nin moleküler yapısında 14 alfa sarmal ile çevrili 12 beta levhadan ibarettir [40,41]. Bu enzimin yapısı X – ışını analiz yöntemiyle açıklanmıştır. Bu enzim saniyede 250.000 asetilkolin (ACh) molekülünü hidroliz etmektedir. Yapısında 537 amino asit bulunmaktadır. AChE aktif bölgesinde iki adet bağlanma alt ünitesinden oluşur. Birinci alt ünite, katalitik anyonik site olarak bilinir ve Ser200, His440 ve Glu327'den oluşan amino asitler mevcuttur. Bu yapılar ACh'deki ester bağlarının hidrolizinde görev yaparlar. Yapılan *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarında AChE enziminin sinir sistemindeki hücreler üzerine etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu hücrelerin sinaptojenizinde, adezyonunda, göçünde ve apoptotik olarak etkili olduğu belirtilmiştir. AChE enziminin en önemli görevi ACh'ni asetat ve koline hidrolizini katalize ederek sinaptik boşluktan ACh'ni kaldırmasıdır. Bu reaksiyon asit-baz katalizli reaksiyonlar sonucunda oluşmaktadır [42]. Yapılan bazı çalışmalarda; AChE enziminin tümör baskılayıcı rolleri olabileceği rapor edilmiştir [43,44].

Glutatyon S-transferaz (GST) enzimleri, molekül ağırlıkları 20.000-25.000 daltondur ve 200-240 aminoasitten oluşur. GST enzimi oksidatif stres ile oluşan ürünlerin ve toksik maddelerin, hücrede bulunan biyomoleküller ile birleşmesini önler. GST enzimi, hücrede koruyuma görevi yapan önemli bir enzimdir [45]. GST enzimi peroksidaz aktivitesiyle lipid peroksitlere karşı hücreyi korur. GST enzimi pestisidler, kanserojenler ve çevresel kirlilikler gibi zararlı etkilere karşı hücrenin korunmasında önemli bir role sahiptirler [46]. GST enzimi, yapısında bulunan hidrofobik gruplar sayesinde farklı bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bu özelliği sayesinde, kanserojenik molekülleri ve çevresel kirleticiler gibi birçok bileşiği substrat olarak kullanmaktadır. GST enziminde yedi izoenzim mevcuttur ve bu izoenzimlerin aktiviteleride farklıdır. GST enzimleri kataliz ettiği substrat ile GSH arasında bir tiyoester bağı oluşturur [47].

GST enziminin önemli görevlerinden biride, hücrede oluşan hidroksialkenaller, propenaller ve hidroperoksitler gibi bileşiklere karşı antioksidan

etki göstermektedir. Bu bileşikleri yok etmede etkili olan GST enzimi GSH molekülüne gereksinim duyar [48].

Karboksilesteraz (CaE) (E.C. 3. 1. 1. 1) enzimi, memeli hayvanların karaciğer, testis, böbrek ve plazmalarında tespit edilmiştir. CaE enzimi esterlerin, amidlerin ve tioesterlerin hidrolizini katalizleyen esterazların serin hidrolazlar süper ailesinin üyesidirler [49]. CaE'lar, esterleri benzer karboksilik asit ve hidroksillenmiş ürünlere dönüştürebilme kapasitesine sahip enzimlerin büyük bir grubudur. Memeli karboksilesterazları, birçok dokuda hücrenin endoplazmik retikulumunda lokalize olmuşlardır. Hayvanların çeşitli dokuları arasında, en yüksek substrat hidroliz aktivitesi tipik olarak karaciğerde bulunmuştur. Fakat testis, böbrek ve plazma gibi bazı dokularda da aktivite gözlenmiştir. Önemli miktardaki ilaçlar CaE tarafından metabolize edildiği için, bu enzimlerin her bir dokuda değişen aktiviteleri klinik açıdan da önemlidir [49,50].

## **2.4. GSH**

Glutatyon (GSH) molekülü nonprotein tiyol yapısındadır. Hücredeki en önemli görevi antioksidan savunma yapmasıdır. Molekül üzerindeki sistein grubu aktif rol oynamaktadır. GSH molekülü özellikle karaciğerde dokularında yoğun olarak sentezlenmektedir [51]. GSH molekülü, hücrede serbest veya proteinlere bağlı olarak bulmaktadır. Oksidatif stres şartlarında GSH molekülü redükte formdan okside forma dönüşmektedir. Hastalık durumlarında GSH molekülünün seviyesinin ölçülmesi önemlidir [52]. GSH serbest radikallere karşı savaşan moleküllerdir. Hücrede oluşan  $H_2O_2$  ve radikallere karşı etkilidir. Oksidatif stresin şartlarında oluşan  $H_2O_2$ 'i, GSH ve glutatyon peroksidaz (GSH- Px) enzimi ile birlikte suya dönüştürürler. GSH antioksidan enzimler tarafından indüklenerek oksidatif stresin azaltılmasında rol oynamaktadır. GSH'ın hücrede protein sentezi, nükleik asit sentezi ve bazı enzimlerin aktivitesinde rol oynamaktadır. Ayrıca, hücrenin radyasyon ve toksinlere maruz kalmaları durumunda koruyucu etkileri bildirilmiştir [53].

**2.5. MDA**

Metbolizmada hücreler, gerek dış etkenlerle gerekse hücre içinde oluşan radikallere maruz kalmaktadır. Bu radikaller hücre yapısında bulunan lipitleri oksidasyona uğratırlar. Lipit peroksidasyon sonucunda hücrede alkol, aldehit ve pentan gibi moleküller oluşur. Serbest radikallerin oluşturduğu lipit peroksidasyon sonucu hücrede molandialdehit (MDA) oluşmaktadır. Oksidatif stres şartlarında hücrelerde  $H_2O_2$  molekülü,  $O_2\cdot$  ve  $OH\cdot$  radikalleri oluşmaktadır. Bu molekül ve radikaller hücrenin birçok yapısına ve organelleri ile reaksiyona girerek hücrenin yapısına zarar verirler. Lipit peroksidasyon sonucunda birçok yan ürün oluşmaktadır ve bunların en önemlisi MDA'dır. Oluşan bu yan ürünler hücre içerisinde birçok molekül ile reaksiyona girerek yapının bozulmasına neden olur [54-56].

**2.6. Çalışmanın Amacı**

Günümüzde insanlar nar meyvesini doğrudan tükettiği gibi birçok ürünleride kullanmaktadır. İnsanlar narın kabuğu, suyu, fermente ürünleri ve geleneksel yöntemlerle elde edilen ürünlerini yüzyıllardır kullanmaktadır. Literatürlerde narın insan metabolizmasına faydalı etkilerine çokça rastlanmaktadır. Etil alkolün insan metabolizmasına zararları çok fazladır. Günümüzde bu zararlı etkilere karşı laboratuvarıda sentezlenmiş ilaçların yanısıra geleneksel tıpta kullanılan doğal maddelerde kullanılmaktadır. Bu çalışmada Adıyaman ilinde yetiştiriciliği yapılan ve halk arasında Hicaz narı olarak nitelendirilen, koyu kırmızı -bordo renkli narın etil alkolün oluşturduğu oksidatif strese karşı etkinliği amaçlanmıştır. Çalışmada karaciğer, beyin ve testis dokularında bazı biyokimyasal parametreler çalışılmış olup, değerlendirilmesi yapılmıştır.

### **3. MATERİYAL ve METOD**

#### **3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Deneyisel süreçte birçok kimyasal madde kullanılmıştır. Bunlar; izopropil alkol, etil alkol, metil alkol, hidroklorik asit (HCl), tiobarbiturik asit (TBA), trikloroasetik asit (TCA), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fosfat tamponu, EDTA-Na<sub>2</sub>, redükte glutatyon (GSH), n-hekzan, Tris-EDTA tamponu, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit ve fizyolojik su.

#### **3.2. Deneyisel Süreçte Kullanılan Materyal**

Deneyisel çalışmada ağırlıkları birbirine yakın erkek *Wistar albino* ratlar kullanıldı. Rat dokularından karaciğer, beyin ve testis dokularının bazı biyokimyasal parametreleri incelendi.

#### **3.3. Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar**

Dokuların biyokimyasal parametreleri, mikrolaka okuyuculu spektrofotometre cihazında okundu. Dokuların parçalanma işlemi ise homojenizatör cihazında gerçekleştirildi. Ayrıca deneyisel çalışma süresince santrifüj, vorteks, otomatik pipetler, derin dondurucu (-50 °C) ve santrifüj tüpleri kullanıldı.

#### **3.4. Deney Hayvanlarının Temini ve Uygulama İşlemi**

Deneyisel çalışmada, *Wistar albino* cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneyisel Araştırma Merkezi (FÜTDAM)'nden satın alındı. Ayrıca deneyisel çalışmanın etik kuruluda bu kurumdan alındı. Ratlar Elazığ Yem Fabrikasından ratlar için özel yapılmış yemlerle beslendi. Ratlar standart havalandırma sistemi ortamında ve temizliği günlük yapılan özel çelik kafeslerde tutuldu. Rat yemleri çelik kaplarda, su ise özel biberonlarda verilerek beslenildi.

Ratların yaşamsal koşulları standart hale getirildi. Ratlar 22 - 25 °C arasında, 12 saat ışıklı ve 12 saat karanlık ortamda bir ay süresince takibi yapıldı. Her grupta 7 rat rastgele seçildi. Sonra ratlar 4 gruba ayrıldı. Deneysel süreç aşağıda açıklanmıştır.

Çalışma 30 gün sürdü. Deneyde 28 adet yetişkin, ortalama ağırlıkları  $250 \pm 10$  g olan erkek *Wistar albino* rat kullanıldı. Deneysel çalışma dört gruptan oluşmaktadır. Bunlar;

1. Kontrol grubu (K)
2. Nar suyu grubu (N)
3. Etil alkol grubu (E)
4. Etil alkol+ nar suyu grubu (EN)

Etil alkol ratlara 2 g/kg/gün veya daha aşağı dozlarda uygulaması yapıldığında sabit ve sınırlı bir hızda okside edilmektedir. Ancak, 3-5 g/kg/gün ve daha yukarı dozda ratlara verilen etil alkol ile kronik etil alkol etkisi oluşturulmaktadır [57]. Bu nedenle, 30 gün süre ile oragastrik yolla 5g/kg/gün dozda %50'lik etil alkol ratlara uygulaması yapıldı. Kontrol grubundaki ratlara ise 1 ml % 0,9'luk sodyum klorür (NaCl) uygulaması yapıldı. Nar meyvesi Adıyaman ilinde yetiştiriciliği yapılan ve halk arasında Hicaz narı olarak nitelendirilen, meyvesi koyu kırmızı renkte olan narlar meyve suyu sıkacağından sıkılarak elde edildi. Nar suyu 4 ml/kg olacak şekilde oragastrik gavaj yöntemiyle ratlara uygulaması yapıldı [58].

### **3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Çalışmada incelenen enzimlerin aktiviteleri mikropilaka okuyucu sistem cihazında ölçümleri gerçekleştirildi. Her örnek için üç ölçüm alındı. Çalışmada incelenen enzimlerin aktiviteleri spesifik aktivite (nmol/dk/mg protein) olarak ifade edildi.

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

Bütün dokuların homojenizasyonunda homojenizatör kullanıldı. Homojenizatörde dokular 2000 rpm'de 30 saniye süreyle parçalandı.

Homojenizasyon işleminde alınan toplam doku ağırlığının 4 katı hacminde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (0.1 M, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu içinde; 0.15 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) içinde yapıldı. Homojenizasyon işlemi sonrası homojenatlar ependorf tüplerine aktarıldı. Homojenat 16,000 *xg* devirde 4°C’de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımlarında enzim aktiviteleri ölçüldü.

### **3.7. Glutasyon S-transferaz Aktivitesi**

GST aktivitesi mikrolaka okuyucu sisteminde ölçümleri yapıldı. Habig ve arkadaşları (1974) tarafından belirtilen yöntemle göre GST aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü [59]. % 96’lık etanol içinde hazırlanan 20 mM 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) substrat olarak, redükte GSH ise kofaktör olarak kullanıldı. 10 µL süpernatant, 0.1 M, pH 6.5 100 µL fosfat tamponu ve 0.002 M 100 µL GSH karışımı, 10 µL CDNB mikrolaka kuyucuklarına sırası ile pipetlendi. Karışım 15 sn karıştırıldı ve 2 dakika süre ile 25 °C’de 344 nm’de absorbans değişimleri kaydedildi.

### **3.8. Karboksilesteraz Aktivitesi**

CaE aktivitesinde ölçümünde, substrat olarak, 26 mM %96’lık etanol içinde hazırlanan *p*-nitrofenol asetat (PNPA) kullanıldı. Reaksiyon çözeltisi, 5 µL örnek ve 250 µL, 0.05 M trizma pH 7.4 tamponu içermektedir. Reaksiyon karışımı 3 dakika 25°C’de ön inkübasyona bırakıldı. Son olarak, son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde 5 µL PNPA ilave edildikten sonra absorbans değişimi kaydedildi. Enzim aktivitesi 405 nm’de okuması yapıldı [60,61].

### **3.9. Asetilkolinesteraz Aktivitesi**

AChE aktivitesi Ellman vd. (1961) tarafından yapılan [62] ve Özmen vd. (1998) tarafından modifiye edilmiş yöntemle göre ölçümleri mikrolaka okuyucu

sisteminde gerçekleştirildi [63]. Asetilkolin iodid (ACTI) substrat olarak kullanıldı. 10 µl süpernatant üzerine hazırlanmış karışım (0.701 mM ACTI ve 0.136 mM DTNB, 0.1 M trizma pH 8.0 tamponu içerisinde hazırlanmış karışımdan 200 µl) ilave edildi. Karışım 25°C’de 1 dakika süre ile 412 nm dalga boyunda absorbans değişimleri ölçüldü.

### **3.10. Malondialdehit Tayini**

Dokuların MDA düzeyleri mikrolaka okuyucu sisteminde ölçümleri gerçekleştirildi. Placer (1966) tarafından önerilen yönteme göre yapıldı. Reaktif olarak 0,25 N HCl içerisinde %0,375 thiobarbiturik asit ve %15 trikloroasetik asit kullanıldı. Doku örneklerindeki MDA düzeyleri 532 nm’de absorbans değerleri okundu. MDA miktarı nmol/mg protein doku olarak belirtildi [64].

### **3.11. Redükte Glutasyon Tayini**

GSH miktarı mikrolaka okuyucu sisteminde gerçekleştirildi. Moron (1979) tarafından geliştirilen yönteme göre işlemler yapıldı. 5 µl süpernatant üzerine 120 µl 0.5 mM pH 6.8 DTNB çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımının 25°C’de 412 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü GSH miktarı nmol/mg protein doku olarak ifade edildi [65].

### **3.12. Toplam Protein Miktarı Tayini**

Doku homojenatlarında toplam protein miktarları Bradford (1976) tarafından geliştirilen yönteme göre, mikrolaka okuyucu sisteme uyarlanarak tespit edildi [66].

**4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

İstatistiksel değerlendirme programı olarak SPSS 22,0 programında gerçekleştirildi. Değerlendirmede kullanılan yöntem Varyans analizi ANOVA testidir. Farklılıkların tespitinde Tukey testi kullanıldı. Standart sapma olarak standart error alındı.



## 5. BULGULAR

Çizelge 5.1 Karaciğer dokusu biyokimyasal parametreleri

| Gruplar | MDA<br>(nmol/mg<br>protein) | GST<br>(nmol/dk/mg<br>protein) | CaE<br>(nmol/dk/mg<br>protein) | GSH<br>(nmol/mg<br>protein) |
|---------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| K       | 0,205±0,005                 | 57±1,92                        | 2744±196                       | 99±4                        |
| E       | 0,246±0,015 <sup>a</sup>    | 51±2,00 <sup>a</sup>           | 2110±84 <sup>b</sup>           | 85±1 <sup>a</sup>           |
| N       | 0,203±0,003 <sup>x</sup>    | 68±3,40 <sup>az</sup>          | 2632±83 <sup>x</sup>           | 123±4 <sup>cz</sup>         |
| EN      | 0,160±0,013 <sup>az</sup>   | 57±1,88                        | 2758±66 <sup>x</sup>           | 87±2                        |

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<0.00

Karaciğer dokusu biyokimyasal parametrelerden MDA düzeyi incelendiğinde, E grubu MDA düzeyi diğer gruplara göre yüksek çıktığı tespit edildi (p<0.05, p<0.001). E grubu GST enzim aktivite düzeyi K grubuna göre azaldığı gözlemlendi (p<0.05). N grubu GST enzim aktivite düzeyi K ve E grubuna göre arttı (p<0.05, p<0.001). E grubu CaE enzim aktivite düzeyi K, N ve EN gruplarına göre azaldı (p<0.05, p<0.01). E grubu GSH düzeyi K grubuna göre azaldığı tespit edilirken (p<0.05), N grubu GSH düzeyi E grubuna göre arttığı gözlemlendi (p<0.001)

Çizelge 5.2 Beyin dokusu biyokimyasal parametreler

| Gruplar | MDA<br>(nmol/mg<br>protein) | AChE<br>(nmol/dk/mg<br>protein) | GST<br>(nmol/dk/mg<br>protein) | CaE<br>(nmol/dk/mg<br>protein) | GSH<br>(nmol/mg<br>protein) |
|---------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| K       | 0,30±0,02                   | 163±7,56                        | 40±2,06                        | 363±15,57                      | 85±7                        |
| E       | 0,44±0,3 <sup>b</sup>       | 160±4,00                        | 43±1,62                        | 315±8,86 <sup>a</sup>          | 80±9                        |
| N       | 0,34±0,01 <sup>x</sup>      | 181±7,62                        | 53±2,52 <sup>bx</sup>          | 456±15,70 <sup>bz</sup>        | 120±8 <sup>ax</sup>         |
| EN      | 0,38±0,02                   | 236±13,28 <sup>cz</sup>         | 64±3,41 <sup>cz</sup>          | 449±26,19 <sup>az</sup>        | 150±12 <sup>cx</sup>        |

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

Beyin dokusu MDA düzeyi K grubuna göre E grubunda artış saptandı (p<0.01). K ve E grupları AChE enzim aktivite düzeylerine göre EN grubunda artış tespit edildi (p<0.001). N ve EN grupları GST düzeyleri E ve K gruplarına göre arttığı gözlemlendi (p<0.05, p<0.01, p<0.001). E grubu CaE enzim aktivite düzeyi K grubuna göre azalırken (p<0.05), N ve EN grupları CaE enzim aktivite düzeyleri K ve E gruplarına göre arttığı gözlemlendi (p<0.05, p<0.01, p<0.001). N ve EN grupları GSH düzeyleri K ve E grubuna göre arttığı tespit edildi (p<0.05, (p<0.001).

Çizelge 5.3 Testis dokusu biyokimyasal parametreler

| Gruplar | MDA<br>(nmol/mg<br>protein) | GST<br>(nmol/dk/mg<br>protein) | CaE<br>(nmol/dk/mg<br>protein) | GSH<br>(nmol/mg<br>protein) |
|---------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| K       | 0,140±0,013                 | 114±5,03                       | 1459±38,71                     | 83±5                        |
| E       | 0,189±0,017 <sup>a</sup>    | 93±3,46 <sup>a</sup>           | 1227±35,21 <sup>b</sup>        | 75±4                        |
| N       | 0,123±0,010 <sup>y</sup>    | 100±3,75                       | 1398±25,90 <sup>x</sup>        | 79±3                        |
| EN      | 0,138±0,011 <sup>x</sup>    | 114±5,35 <sup>x</sup>          | 1720±44,51 <sup>bz</sup>       | 82±2                        |

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

E grubu MDA düzeyi K grubuna göre arttığı tespit edildi (p<0.05). N ve EN grupları MDA düzeyleri E grubuna göre azaldığı saptandı (p<0.01, p<0.05). E grubu GST enzim aktivite düzeyi K grubuna göre azaldı (p<0.05). EN grubu GST enzim aktivite düzeyi E grubuna göre arttı (p<0.05). E grubu CaE enzim aktivite düzeyi K,N ve EN gruplarına göre azaldığı gözlemlendi (p<0.01, p<0.05, p<0.001). Tüm grupların GSH düzeyleri istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edildi (p>0.05).

**6. TARTIŞMA**

Çalışmada, etil alkolün ratlara uygulanmasıyla oluşturulan oksidatif strese karşı nar suyunun rat karaciğer, testis ve beyin dokuları üzerine etkinliği araştırıldı. Araştırmada rat dokularında incelenen parametreler MDA, GSH, GST, CaE ve AChE'dir.

Çalışmada, karaciğer dokusu MDA düzeyi E grubunda yüksek çıktığı tespit edildi. Nar suyu uygulanan rat gruplarında, etil alkolün yükselttiği MDA düzeyini azalttığı gözlemlendi. Karaciğer dokusu GST ve CaE enzim aktivite düzeylerini etil alkolün azaltıcı etkisi gözlemlendi. GST ve CaE enzim aktivite düzeylerini nar suyu uygulanan gruplarda arttırdığı tespit edildi. Karaciğer dokusu GSH düzeyini etil alkol azaltırken, nar suyu grubunda artış tespit edildi.

Çalışmada, beyin dokusu MDA düzeyini etil alkol uygulanan rat gruplarında önemli düzeyde yüksek çıktığı gözlemlendi. Nar suyu uygulanan rat gruplarında ise Etil alkolün yükselttiği MDA düzeyini azalttığı tespit edildi. Beyin dokusu CaE enzim aktivite düzeyini Etil alkol grubunda azaltıcı etkisi gözlenirken, nar suyu uygulanan bireysel ve kombinasyonlu grupta CaE enzim aktivitesinin önemli düzeyde arttığını görmekteyiz. Kontrol ve etil alkol grubu GSH düzeyleri arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edilirken, nar suyu uygulanan gruplarda GSH düzeyini arttırdığı saptandı. AChE ve GST enzim aktivitelerinin nar suyu uygulanan gruplarda arttığı tespit edildi.

Testis dokusu MDA düzeyini etil alkol arttırırken, nar suyu uygulanan gruplarda azaldığı gözlemlendi. Etil alkolün bu dokuda GST ve CaE enzim aktivitelerini önemli düzeyde azalttığı tespit edildi. Nar suyu uygulanan gruplarda ise GST ve CaE enzim aktivitelerinin nispi ve anlamsal olarak arttırdığı saptandı. Testis dokusu GSH düzeyleri tüm grupların arasında istatistik fark olmadığı gözlemlendi.

Nar suyu tüketimi sonucunda plazma MDA düzeylerinde azalmalar olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. 14 sağlıklı yetişkin insanlara nar suyu uygulaması sonucunda plazma ve eritrositlerde protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyon düzeylerinde azalmalar olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, nar suyu tüketimi sonucunda GSH düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir [67].

Nar suyu ile ilgili benzer çalışmalarda, iki haftalık [2] ve üç haftalık [35], tüketimi sonucunda plazmada lipit peroksidasyon düzeylerinde azalmalar bildirilmiştir. Nar suyu tüketiminin kardiovasküler gibi hastalıklara karşı koruyucu etkinliği bu çalışmalarda belirtilmiştir [2]. Nar suyu üç haftalık tüketimi sonucunda serum GSH düzeylerinde artışlar tespit edilmiştir [35].

Diyabet oluşturulan ratların plazma ve eritrositleri üzerine nar suyunun etkinliği araştırması yapılmıştır. Diyabet oluşturulan ratların plazma ve eritrositlerinde SOD ve CAT enzim aktivitelerinde azalma tespit edilirken, MDA düzeylerinde önemli düzeyde artış olduğu rapor edilmiştir. Nar suyunun diyabetik ratlardaki bu olumsuzlukları pozitif yönde düzenlediği açıklanmıştır [68]. Nar meyvesi içeriğinde antioksidan özellikli birçok polifenolik moleküller mevcuttur. Nar suyunun antioksidan düzeyi portakal, yabanmersini ve kıvılcıktan daha yüksek olduğu bildirilmiştir [35]. Bu antioksidanların serbest radikalleri ve oksidanları yok ettiği rapor edilmiştir [69].

Narın kullanımını tarihsel süreçte yaygın olarak görmekteyiz. Narın metabolizma üzerine birçok pozitif etkileri vardır. Bu etkiler antiaterosklerotik [70], kemopreventif [5], antiproliferatif [71], aterosklerotik [72,4], antiobesite [73], antidiyabetik [74], antilipidemik [75] ve yüksek düzeyde antioksidan kapasite [72,76] etkileri bildirilmiştir.

Etil alkol ile oksidatif strese maruz bırakılmış rat beyin ve karaciğer dokularında GSH-Px, CAT ve GSH düzeylerinde azalmalar olduğu bildirilmiştir. Etil alkolün oluşturduğu oksidatif stres parametrelerine siyah frenk üzümünün bu parametrelere düzeltici etkisi olduğu rapor edilmiştir [77].

Etil alkol verilen rat karaciğer dokularında CAT, SOD, GSH-Px ve GSH düzeylerinde azalmalar tespit edilirken, bir üzüm çeşidi olan *Emblica officinalis*'in bu parametreleri düzelttiği rapor edilmiştir [78].

Zerdaçal tıbbi alanda kullanılan önemli bir bitkidir. Zerdaçalın ana bileşen maddesi curcumin molekülüdür. Kronik etil alkol verilen fare karaciğer dokuları üzerine curcumin'in etkinliği araştırması yapılmıştır. Bu çalışmada kronik etil alkol uygulaması yapılan fare karaciğer dokularında GST, GSH-Px ve GSH düzeyleri

azalırken, MDA düzeylerinde artışlar rapor edilmiştir. Curcumin'in etkisiyle etil alkolün oluşturduğu olumsuz etkileri düzelttiği bildirilmiştir [79].

Etil alkol ile yapılan başka bir çalışmada, etil alkol uygulanan rat karaciğer dokularında birçok enzim aktivitelerinde azalmalar tespit edilirken, lipit peroksidasyon düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Çalışmada resveratrol'un etil alkolün oluşturduğu zararlı etkiyi düzelttiği rapor edilmiştir [80].

Yeşil çay içeriğinde birçok polifenolik bileşikler mevcuttur. Kronik etil alkol uygulaması yapılan rat karaciğer dokularında birçok enzim aktivitelerinin azaldığı bildirilmiştir. Yeşil çay uygulaması ile kronik etil alkolün oluşturduğu zararlı etkilerin düzeltildiği rapor edilmiştir [81].

Etil alkol metabolizmada en çok karaciğer dokusunu hedef almaktadır. Ancak üreme sistemi üzerinde olumsuz etkileri bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada kronik etil alkol uygulaması yapılan rat testis dokularında lipit peroksidasyon düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca testis dokusundan antioksidan enzim sistemini bozduğu bildirilmiştir [82-88].

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, etil alkolün rat dokularında oluşturduğu yüksek lipit peroksidasyonu nar suyu takviyesiyle düşürdüğü gözlemlendi. Ayrıca antioksidan-oksidasyon denge sistemini sağlayan enzimlere nar suyunun pozitif yönde etki gösterdiği tespit edildi. Adıyaman bölgesinde yetiştirilen bu narın ileriki tıbbi araştırmalarda kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- [1] F. Zhang, J. Zhang, Y. Li, “Corn oligopeptides protect against early alcoholic liver injury in rats”, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2149–2154, 2012.
- [2] M. Aviram, L. Dornfeld, M. Rosenblat, N. Volkova, M. Kaplan, R. Coleman, “Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1062–1076, 2000.
- [3] M. Kaplan, T. Hayek, A. Raz, R. Coleman, L. Dornfeld, J. Vaya, M. Aviram, “Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis”, *J. Nutr*, 131 (8), 2082–2089, 2001.
- [4] O. Rozenberg, A. Howell, M. Aviram, “Pomegranate juice sugar fraction reduces macrophage oxidative state, whereas white grape juice sugar fraction increases it”, *Atherosclerosis* 188, 68–76, 2006.
- [5] A. Malik, F. Afaq, S. Sarfaraz, V.M. Adhami, D.N. Syed, H. Mukhtar, “Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (41), 14813–14818, 2005.
- [6] 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.
- [7] M.R. Lucey, R.M. Weinrieb, “Alcohol and substance abuse”, *Seminars in Liver Disease*, 29, 66-73, 2009.
- [8] A. George, V.M. Figueredo, “Alcohol and arrhythmias: a comprehensive review”, *Journal of Cardiovascular Medicine*, 11, 221-228, 2010.
- [9] V. Marinho, J. Laks, E. Engelhardt, D. Conn, “Alcohol abuse in an elderly woman taking donepezil for Alzheimer disease”, *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 26, 683-685, 2006.
- [10] T. Ohkubo, H. Metoki, Y. Imai, “Alcohol intake, circadian blood pressure variation, and stroke”, *Hypertension*, 53, 4-5, 2009.
- [11] A.I. Cederbaum, Y. Lu, D. Wu, “Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury”, *Archives of Toxicology*, 83, 519-548, 2009.
- [12] M.J. Morris, “Alcohol breath testing in patients with respiratory disease”, *Thorax*, 45, 717-721, 1990.
- [13] D.O. Baliunas, B.J. Taylor, H. Irving, M. Roerecke, J. Patra, S. Mohapatra, “Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis”, *Diabetes Care*, 32, 2123-2132, 2009.
- [14] Y. Chen, L. Cui, J. Liao, L. Huang, “Effects of alcohol on bone metabolism and biomechanical property of mice”, *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 26, 780-782, 2009.
- [15] H.K. Seitz, P. Becker, “Alcohol metabolism and cancer risk”, *Alcohol Research & Health*, 30, 38-47, 2007.

- [16] C.S. Lieber, "Biochemical and molecular basis of alcohol induced injury to liver and other tissues", *New England Journal of Medicine*, 319, 1639-1650, 1988.
- [17] D.M. Guidot, J. Roman, "Chronic ethanol ingestion increases susceptibility to acute lung injury", *Chest*, 122, 309-314, 2002.
- [18] O. Niemelä, "Aldehyde-protein adducts in the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress", *Frontiers in Bioscience*, 4, 506-513, 1999.
- [19] C.S. Lieber, "Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis", *Alcohol*, 34, 9-19, 2004.
- [20] C.S. Lieber, "Metabolism of alcohol", *Clinics in Liver Disease*, 9, 1-35, 2005.
- [21] 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: dose-response studies in deer mice using methanol as selective substrate", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 172-176, 1993.
- [22] A.I. Cederbaum, "Introduction serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury", *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1524-1526, 2001.
- [23] G.E. Arteel, "Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease", *Gastroenterology*, 124, 778-790, 2003.
- [24] B. Halliwell, "Antioxidant characterization: methodology and mechanism", *Biochemical Pharmacology*, 49, 1341-1348, 1995.
- [25] S. Johnsen, K. Overvad, C. Stripp, A. Tjønneland, S.E. Husted, H.T. Sørensen, "Intake of fruit and vegetables and the risk of ischemic stroke in a cohort of Danish men and women", *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 57-64, 2003.
- [26] T.H. Rissanen, S. Voutilainen, J.K. Virtanen, B. Venho, M. Vanharanta, J. Mursu, J.T. Salonen, "Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor (KIHD) study", *Journal of Nutrition*, 133, 199-204, 2003.
- [27] R.R. Huxley, H. Neil, "The relationship between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a metaanalysis of prospective cohort studies", *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 904-908, 2003.
- [28] P. Knekt, J. Kumpulainen, R. Jarvinen, H. Rissanen, M. Heliovaara, A. Reunanen, "Flavonoid intake and the risk of chronic diseases", *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560-568, 2002.
- [29] R. Longtin, "The pomegranate: nature's power fruit?", *Journal of National Cancer Institute*, 95, 346-348, 2003.
- [30] M.I. Gil, F.A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pierce, D.M. Holcroft, A.A. Kader, "Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581-4589, 2000.
- [31] C.J. Guo, J.J. Yang, J.Y. Wei, Y.F. Li, J. Xu, Y.G. Jiang, "Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay", *Nutrition Research*, 23, 1719-1726, 2003.
- [32] B. Cemeroglu, N. Artik, S. Erbas, "Extraction and composition of pomegranate juice", *Fluessiges Obst*, 59, 335-340, 1992.

- [33]C. Narr Ben, N. Ayed, M. Metche, "Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel, Z. Lebensm. Unters", *Forsch.* 203, 374–378, 1996.
- [34]E.P. Lansky, G. Harrison, P. Froom, W.G. Jiang, "Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel", *J. Investig. New Drugs* 23, 121–122, 2005.
- [35]M.Rosenblat, T. Hayek, M. Aviram, "Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages". *Atherosclerosis*, 187, 363–371, 2006.
- [36]N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses", *Food Chem*, 99, 191–203, 2006.
- [37]N.P. Seeram, L.S. Adams, S.M. Henning, "In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice", *J. Nutr. Biochem.* 16, 360–367, 2005.
- [38]E.P. Lansky, "Beware of pomegranates bearing 40% ellagic acid" *J. Med. Food*, 9, 119–122, 2006.
- [39]P. Castilla, A. Davalos, J. Teruel, F. Cerrato, M. Fernandez-Lucas, J. Merino, "Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients", *Clin. Nutr*, 87, 1053–1061, 2008.
- [40]J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolo, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, "Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein", *Science*, 23; 253 (5022): 872-879, 1991.
- [41]J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolo, L. Varon L. Toker, A.H. Futerman, I. Silman "Purification and crystallization of a dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* subsequent to solubilization with phosphatidylinositol-specific phospholipase C", *J Mol Biol*, 5; 203 (3): 821-823, 1988.
- [42]M. Schumacher, S. Camp, Y. Maulet, M. Newton, K. MacPhee-Quigley, S.S. Taylor, T. Friedmann, P. Taylor, "Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence", *Nature*, 5;319 (6052): 407-409, 1986.
- [43]J. Stephenson, B. Czepulkowski, W. Hirst, G.J. Mufti, "Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML)", *Leuk Res*, 20 (3): 235-241, 1996.
- [44]M.F. Montenegro, F. Ruiz-Espejo, F.J. Campoy, E. Muñoz-Delgado, M.P. de la Cadena, F.J. Rodríguez-Berrocal, C.J. Vidal, "Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma", *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2175–2182, 2006.
- [45]R.N. Armstrong, "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases", *Chemical Research in Toxicology*, 10(1): 2-18, 1997.
- [46]M.A. Gyamfi, I.I. Ohtani, E. Shinno, Y. Aniya, "Inhibition of glutathione transferases by Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro", *Food Chemical Toxicology*, 1401-1408, 2004.

- [47] N.H.P. Cnubben, I.M.C.M. Rietjens, H. Wortelboer, J. van Zanden, P.J. Bladeren, "The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense", *Environ Toxicol Pharmacol*, 10: 141–152, 2001.
- [48] P.J. Sherratt, J.D. Hayes, "Glutathione S-transferases In Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics (Ionnides C, Editor). John Wiley and Sons", *Ltd. West Sussex, UK*, 319–352, 2002.
- [49] 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.
- [50] T. Satoh, "Toxicological implications of esterases from molecular structures to functions", *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2): 11-18, 2005.
- [51] A. Meister, A. Larsson, "Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the  $\gamma$ -glutamyl cycle. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors". *The metabolic basis of inherited disease. 6th ed. New York: McGraw-Hill*; 855–868, 1989.
- [52] D.J. Reed, M.W. Fariss, "Glutathione depletion and susceptibility", *Pharmacol Rev*, 36: 235–335, 1994.
- [53] J.D. Hayes, L.I. McLellan, "Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress", *Free Radic Res*, 31: 273– 300, 1999.
- [54] N.A. Porter, "Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids", *Acc Chem Res*, 19: 262–268, 1986.
- [55] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, Oxford. Clarendon Press, 1989.
- [56] J.M. Lawrence, B. Adrienne, "Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients", *FASEB J*, 1: 441–445, 1987.
- [57] C.S. Lieber, L.M. DeCarli, M.F. Sorrel, "Experimental methods of ethanol administration", *Hepatology*. 10(4): 501-510, 1989.
- [58] A. Yüce, M. Aksakal, "Ratların karaciğer ve testis dokusundaki antioksidan aktivite üzerine nar suyunun etkisi". *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, Cilt 21, Sayı 6, Sayfa(lar) 253-256, 2007.
- [59] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, "Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation", *Journal of biological Chemistry*, 249 (22): 7130-7139, 1974.
- [60] 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*, 15(3): 223-227, 1984.
- [61] P. Santhoshkumar, T. Shivanandappa, "In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver", *Chemico-biological interactions*, 119: 277-282, 1999.
- [62] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochem Pharmacol*. 1961; 7:88-95, 1961.
- [63] 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*, 60(2): 194-201, 1998.

- [64] Z.A. Placer, L.L. Cushman, B.C. Johnson, "Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems", *Anal Biochem.*, 16 (2), 359–364, 1966.
- [65] M.S. Moron, J.W. Depierre, B. Mannervik, "Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver", *Biochimica et Biophysica Acta*, 582(1): 67-78, 1979.
- [66] 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*, 72(1-2): 248-254, 1976.
- [67] C.M. Matthaiou, N. Goutzourelas, D. Stagos, E. Sarafoglou, A. Jamurtas, S.D. Koulocheri, S. A. Haroutounian, A.M.Tsatsakis, D. Kouretas, "Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood", *Food and Chemical Toxicology* 73: 1–6, 2014.
- [68] A. Aboonabia, A. Rahmata, F. Othman, "Antioxidant effect of pomegranate against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats", *Toxicology Reports*, 1:915–922, 2014.
- [69] M.K. Reddy, S.K. Gupta, M.R. Jacob, S.I. Khan, D. Ferrira, "Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* 73 (5), 461–467, 2007.
- [70] M. Aviram, L. Dornfeld, "Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure", *Atherosclerosis* 158(1): 195–198, 2001.
- [71] N.P. Seeram, L.S. Adams, S.M. Henning, Y. Niu, Y. Zhang, M.G. Nair, D. Heber, "In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice", *J Nutr Biochem*, 16(6): 360–367, 2005.
- [72] L.S. Adams, N.P. Seeram, B.B. Aggarwal, Y. Takada, D. Sand, D. Heber, "Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells", *J Agric Food Chem.* 54(3): 980–985, 2006.
- [73] F. Lei, X.N. Zhang, W. Wang, D.M. Xing, W.D. Xie, H. Su, L.J. Du, "Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice", *Int J Obes (Lond)*. 31(6): 1023–1029, 2007.
- [74] Y. Li, Y. Qi, T.H. Huang, J. Yamahara, B.D. Roufogalis, "Pomegranate flower: A unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR- $\alpha$ /- $\gamma$  activator properties", *Diabetes Obes Metab*, 10(1): 10–17, 2008.
- [75] T.H. Huang, G. Peng, B.P. Kota, G.Q. Li, J. Yamahara, B.D. Roufogalis, Y. Li, "Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: Role of lowering circulating lipids", *British Journal of Pharmacology*, 145(6): 767–774, 2005.
- [76] G. Kaur, Z. Jabbar, M. Athar, M.S. Alam, "Punica granatum (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice", *Food Chem Toxicol*, 44(7):984–993, 2006.

- [77] E. Ambrozewicz, A. Augustyniak, A. Gegotek, K. Bielawska, E. Skrzydlewska, "Black-Currant Protection Against Oxidative Stress Formation", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76:1293–1306, 2013.
- [78] V.D. Reddy, P. Padmavathi, R. Hymavathi, P. Maturu, NCh. Varadacharyulu, "Alcohol-induced oxidative stress in rat liver microsomes: Protective effect of *Emblica officinalis*", *Pathophysiology*, 21(2):153-159, 2014.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] 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.
- [82] G.E.M.L. Siervo, H.R. Vieira, F.M. Ogo, C.D.B. Fernandez, G.D. Gonçalves, S.F.P. Mesquita, J.A. Anselmo-Franci, R. Cecchini, F.A. Guarnier, G.S.A. Fernandes, "Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: Influence of lipid peroxidation but not testosterone", *Toxicology* 330: 1–8, 2015.
- [83] K. Nishi, S. Ramakrishnan, V.P. Gunasekaran, K. Parkash, A. Ramakrishnan, N. Vijayakumar, M. Ganeshan, 2018. Protective effects of p-coumaric acid on ethanol induced male reproductive toxicity. *Life Sciences* 209: 1–8, 2018.
- [84] O.O.Dosumu, F.L.O. Duru, A.A. Osinubi, A.A. Oremosu, C.C. Noronha, "Influence of virgin coconut oil (VCNO) on oxidative stress, serum testosterone and gonadotropic hormones (FSH, LH) in chronic ethanol ingestion", *Agric. Biol. J. N. Am.* 1: 1126–1132, 2010.
- [85] E.C. Schlorff, K. Husain, S.M. Somani, "Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes", *Alcohol* 18:203–214, 1999.
- [86] J.R. Aitken, S.D. Roman, "Antioxidant systems and oxidative stress in the testes", *Oxidative Med. Cell. Longev.* 1 (1): 5–24, 2008.
- [87] A. Agarwal, I. Ikemoto, K.R. Loughlin, "Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens", *Journal of Urology* 152:107–110, 1994.
- [88] A.H. Colagar, F. Karimi, S.G. Jorsaraei, "Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno-and oligoasheno-teratospermic men", *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15(9), 780-785, 2013.

**KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı : Cansu BAKIR ŞAHİN

Doğum Yeri : Adıyaman

Doğum Tarihi : 28.06.1986

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : bakır.cansu2806@gmail.com

**Eğitim Durumu**

| Derece | Alan               | Üniversite            | Mezuniyet Yılı |
|--------|--------------------|-----------------------|----------------|
| Lisans | Kimya              | Adıyaman              | 2015           |
| Lise   | Fen /Fen Bilimleri | Rekabet Kurumu Lisesi | 2003           |