

T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK ALKOLİK RATLARDA SERUM MANGAN-SOD (Mn-SOD),  
ÇİNKO-BAKIR-SOD (Zn-Cu-SOD) VE NİTRİK OKSİT  
DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BOKÜMANTASYON MERKEZİ

Gonca OTLU  
Biyokimya Anabilim Dalı

T 107683

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

MALATYA  
2001

## İÇİNDEKİLER

<b>Giriş ve Amaç</b> .....	1
<b>Genel Bilgiler</b> .....	3
Alkolün Tarihçesi.....	3
Alkolün Kimyası ve Metabolizması.....	3
Alkolün Vücutta Emilimi ve Dağılımı.....	5
Alkolün Vücuttan Atılımı.....	6
Kan Alkol Düzeyi.....	6
Alkolün Vücuttaki Etkileri.....	7
Alkolün Beyin (Merkezi Sinir Sistemi ) Üzerine Etkisi.....	7
Alkolün Karaciğere Etkisi.....	7
Alkolün Kalp Damar Sistemi Üzerine Etkisi.....	8
Alkolün Sindirim Sistemine Etkisi.....	9
Üreme Sistemine Etkisi.....	9
Kanser Gelişimi Üzerine Etkisi.....	10
Alkolün Diğer Vücut Sistemlerine Etkisi.....	10
Dünyada ve Türkiye’de Alkol Kullanımı.....	13
Serbest Radikaller.....	14
Hücrede Serbest Radikallerin Oluşumu.....	14
Serbest Radikallerin Etkileri.....	14
Antioksidan Savunma Sistemleri.....	15
Süperoksit Dismutaz.....	16
Nitrik Oksidin Kimyası ve Fizyopatolojik Etkileri.....	16
Nitrik Oksit ile İlgili Reaksiyonlar.....	17
Nitrik Oksitin Temel Fizyolojik Etkileri.....	17
<b>Materyal ve Metod</b> .....	19
Materyal.....	19
Kronik Alkolik Rat Modeli.....	19
Prosedür.....	19
Metodlar.....	20
Zn-Cu SOD Aktivite tayini.....	20
Mn-SOD aktivite tayini.....	21
Total Nitrit (NO <sub>2</sub> ) düzeylerinin ölçümü.....	22

İstatistiksel Analizler.....	23
<b>Bulgular</b> .....	<b>24</b>
<b>Tartışma ve Sonuç</b> .....	<b>28</b>
<b>Özet</b> .....	<b>34</b>
<b>Summary</b> .....	<b>35</b>
<b>Kaynaklar</b> .....	<b>36</b>



## Tablolar

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> Alkol Tüketimine Bağlı Olarak Oluşan Kanserler.	10
<b>Tablo 2.</b> Alkol Bağımlılarında Sık Görülen Hastalıklar.	12
<b>Tablo 3.</b> 1970 ve 1985 Yıllarında Türkiye’de ve Bazı Gelişmiş Ülkelerde Toplam Nüfusta Kişi Başına Düşen Alkol Tüketim Miktarı.	13
<b>Tablo 4.</b> Zn-Cu SOD aktivite tayini.	21
<b>Tablo 5.</b> Serum Protein, Mn-SOD, Zn-SOD, Total Nitrit (NO), Total Testosteron Düzeyleri	24
<b>Tablo 6.</b> Biyokimyasal Parametrelerin İstatistiksel Anlamlılık Durumları	26

## Grafikler

	<b>Sayfa</b>
<b>Grafik 1.</b> Gruplar arası protein düzeylerinin karşılaştırılması.	25
<b>Grafik 2.</b> Gruplar arası Mn-SOD düzeylerinin karşılaştırılması.	25
<b>Grafik 3.</b> Gruplar arası Zn-SOD düzeylerinin karşılaştırılması.	26
<b>Grafik 4.</b> Gruplar arası total nitrit düzeylerinin karşılaştırılması.	26
<b>Grafik 5.</b> Gruplar arası total testosteron düzeylerinin karşılaştırılması.	27

## TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleőmesinde büyük katkıları olan tez danıőmanım sayın Doç. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalıőmalarıma olanak sağlayan Biyokimya Anabilim Dalı Baőkanı Prof. Dr. Engin GÖZÜKARA'ya, bölümdeki diğer hocalarıma, istatiksel analizlerin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. İ. Halil ÖZEROL'a, çalışma arkadaşlarıma ve sevgili eőime teőekkür ederim.

## Kısaltmalar

Alkoksil	RO <sup>-</sup>
Alkol Dehidrogenaz	ALD
Asetaldehit Dedihrogenaz	ACD
Asetil Koenzim A	Asetil-Co A
Çinko Süperoksit Dismutaz	Zn-SOD
Deoksiribonükleikasit	DNA
Amerikan Psikiyatri Derneği Sınıflandırması	DSM-3
Endothelial Nitrik Oksit Sentaz	eNOS
Endothelium-derived relaxing factor	EDRF
Folikül stimulating Hormone	FSH
Glutasyon Peroksidaz	GSH-PX
Hidrojen Peroksit	H <sub>2</sub>
Hidroksil	OH <sup>-</sup>
High-Density Lipoprotein	HDL
Indusibl Nitrik Oksit Sentaz	iNOS
İndirgenmiş glutasyon	GSH
Katalaz	CAT
Ksantin Oksidaz	XO
Luteinizing Hormone	LH
Luteinizing Hormone-Releasing Hormone	LH-RH
Malondialdehit	MDA
Mangan Süperoksit Dismutaz	Mn-SOD
Redükte nikotinamid adenin dinükleotid	NADH
Okside nikotinamid adenin dinükleotid	NAD
Nikotinamid adenindinükleotit fosfat	NADP
Nitrik Oksit	NO
Nitrit	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Nitrik oksit metabolitleri	NO <sub>x</sub>
Nitrik Oksit Sentaz	NOS
Nitro blue tetrazolium	NBT
Nitrosonium	NO <sup>+</sup>
Nöranal Nitrik Oksit Sentaz	nNOS
Peroksil	ROO <sup>-</sup>
Peroksinitrit	ONOO <sup>-</sup>
Siklik Guanozin Monofosfat	cGMP
Thiyl	RS <sup>-</sup>

## **GİRİŞ ve AMAÇ**

Alkol, insanlar tarafından kolaylıkla temin edilebilmesi ve yaygın olarak kullanılması nedeni ile vücut için zararlı olan maddelerin başında gelmektedir. Ağızla alınıp sonrası kolaylıkla emilen alkol, vücutun tüm dokularına dağılarak kısa sürede çok yüksek düzeylere ulaşır. Vücutta hiçbir engel ile karşılaşmaksızın tüm doku ve hücrelere kolaylıkla girmesi de, alkolün genel toksik etkilerinin meydana gelmesini artıran çok önemli bir diğer faktördür. Vücuda alınan alkol, başlıca karaciğerde metabolize edilerek detoksifiye edilmektedir. Ancak, karaciğerin detoksifikasyon kapasitesini aşan dozlardaki alkol, vücutun değişik dokularında farklı bozukluklara neden olmaktadır.

Yüksek dozda ve uzun süreli alkol kullanımı, siroz, karaciğer kanseri, kısırlık, anemi, kemik erimesi gibi değişik bozuklukların meydana gelmesine yol açmaktadır. Tüm bunların yanı sıra; dünyada alkole başlama yaşının gelişme çağındaki çocuklara kadar düşmesi, olayı daha da vahim hale getirmektedir.

Alkol ve asetaldehit gibi alkol metabolitlerinin hücrelerdeki direkt hasarlayıcı etkilerinin yanı sıra vücutta, süperoksit, hidrojen peroksit, ve hidroksil gibi reaktif oksijen radikallerinin üretimini artırarak oksidatif strese yol açmaktadırlar. Fizyolojik şartlarda vücutta oluşan reaktif oksijen radikalleri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi hücrenin enzimatik; vitamin E, C ve GSH gibi non-enzimatik mekanizmaları tarafından ortadan kaldırılarak hücrenin oksidan/antioksidan dengesi korunur. Oksidatif stres, vücutun oksidan/antioksidan dengesinin bozulması sonucu meydana gelmektedir. Bu durumda proteinler, enzimler, lipidler ve DNA gibi hücrenin en önemli yapısal ve fonksiyonel molekülleri oksitlenerek hasarlanmaktadır. Hücre membranını oluşturan protein ve lipidlerin oksidasyonu; membranın geçirgenliğinin, elastikiyetinin ve yapısal bütünlüğünün bozulması ile hücrenin canlılığının yitirmesine yol açmaktadır. Enzimlerin oksidasyonu ise, ilgili biyokimyasal reaksiyonların aksaması ile sonuçlanmaktadır.

Nitrik oksit (NO), vücutun hemen hemen tüm hücrelerince sentez edilen ve yarı ömrü çok kısa olan bir moleküldür. Bir serbest radikal olan NO'nin fizyolojik düzeyleri, vücut için yararlı iken aşırı üretimi hücrelerde hasarlanmalara neden olmaktadır. Fizyolojik düzeyde üretilen NO, lokal ve genel kan dolaşımının regülasyonu, trombosit agregasyonunun ve lökosit aktivasyonunun inhibisyonu, lökosit adezyonunun engellenmesi, hücresel immünitede antibakteriyel etkinin

şekillenmesi ve bazı hormonların sekresyonunun düzenlenmesi gibi olaylarda aktif rol oynamaktadır.

Yapılan araştırmalar, vücudun oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğu durumlarda NO'in sentez ve biyoaktivitesinin azaldığını ve NO'in katkıda bulunduğu fizyolojik işlevlerin aksadığını ortaya koymaktadır.

Bu araştırmada, 6 ay süreyle alkol verilen erkek ratların serum Mn-SOD, Zn-SOD, total nitrit ve testosteron düzeylerinin ölçülmesi ve değişikliklerin yorumlanması amaçlanmıştır.





## GENEL BİLGİLER

### ALKOLÜN TARİHÇESİ

Alkolün tarihi neredeyse insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanlığın yerleşik hayata geçmesiyle alkol üretimi de başlamıştır. İlk bira bundan 8 bin yıl önce Mezopotamyalıların arpayı ekmek yapmak için ilk ıslah etmesiyle yapılmıştır. Sümerlerin 6 bin yıl önce Godin Tepelerinde (Batı İran ve Anadolu) bira ve şarap içtiği bilinmektedir. Daha sonra fermente edilmiş meyve, tahıl ve baldan elde edilen alkol insanoğlunun tüketimine sunulmuştur. Alkol kimi zaman kutsal sayılıp, dini törenlerde kullanılmış, kimi zaman eğlencenin ayrılmaz bir olmuştur. Alkolün icat edilmesiyle birlikte, alkol alışkanlığı da ortaya çıkmıştır (1).

Alkol alışkanlığının bir hastalık olarak kabul edilmesi eski çağlara dayanmaktadır. Roma filozofu Seneca, alkolizmi bir akıl hastalığı olarak tanımlamıştır. Alkolizm terimi, ilk defa İsveçli hekim Magnus Huss tarafından, "Alcoholismus Chronicus" (1849) isimli makalede kullanılmıştır. Bu makalenin ardından, kronik alkolizm tıbbi bir terim haline gelmiş ve bir hastalık olarak kabul edilmeye başlanmıştır (2).

Alkol ve uyuşturucu kullanımına bağlı problemlerin genellikle modern hayatın getirdiği değişikliklere ve strese bağlı olduğu düşüncesi oldukça yaygındır. Geleneksel toplumdaki modern toplum yapısına geçişin, aile yapısının zayıflayışının, şehir hayatının sosyoekonomik baskısının bunda etkili olduğu düşünülmektedir(3).

### ALKOLÜN KİMYASI VE METABOLİZMASI

Alkoller kimyasal olarak, diğer üç bağı dolu olan bir karbon atomuna bağlı bir ya da daha fazla hidroksil (OH) bağlanması ile oluşan organik bileşiklerdir. Doğadaki bir çok bitki serbest ya da bağlı alkol içerir. Doğada bulunan en önemli alkoller arasında metanol ya da metil alkol, etanol ya da etanol ilk sırada yer alır(4).

Etanol, insanlar tarafından tüketilen, içkilerde kullanılan alkoldür. İyi bir enerji kaynağıdır (7 kal/g= 29kj). Renksiz, özel kokusu ve tadı olan uçucu bir maddedir. Ancak, tüketimi ciddi sağlık problemlerine yol açar. Çünkü etanol sıklıkla suistimal edilir ve alınması beslenmeyi birçok açıdan etkileyebilir. Etanol gastrointestinal kanalın bütün kısımlarından emilir, bu yüzden kanda konsantrasyonu tüketimden

sonra hızla yükselir. Hücre zarları arasında hızla dağılır ve hem hücre içi hem de hücre dışı sıvıya geçer. Metabolizması karaciğerde gerçekleşir; etanol, önce asetaldahite okside olur, ardından asetata ve nihayet CO<sub>2</sub> ve suya dönüşür. Alınan etanolün %95'i CO<sub>2</sub> ve suya okside olmaktadır.

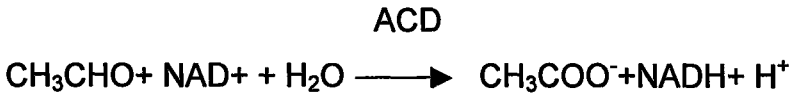
Etanol ne karbonhidrattır ne de karbonhidrat sentezi için öncül maddedir. Ancak, etanol fazla miktarda alındığında enerji kaynağı olarak karbonhidratların yerine geçebilir. Alkol, birçok insanın intestinal florası tarafından oluşturulduğundan, kanda eser miktarda bulunur. İnsanlar etanolü değişik içeceklerle ve fermente olmuş meyvelerle alırlar. Karaciğerde asetata metabolize edilen etanol diyetin kalorik içeriğine ilave olur. Etanolün tamamen okside olması, 7kcal/g (29,3kj)'lık enerji açığa çıkartır (5).

İçkilerde kullanılan alkol, etanoldür. Renksiz, özel kokusu ve tadı olan uçucu bir maddedir. Çeşitli tahıl, meyve ve köklerindeki karbonhidratların fermantasyonu (mayalanması) ile elde edilir. İnsana ağızdan veya damardan verildiği zaman vücut ağırlığının kilogramı başına saatte 100 mg'ı elimine edilir. Bu eliminasyonun çok büyük bir kısmı oksidasyon reaksiyonları ile gerçekleşir. Az bir miktarı solunumla ve idrarla atılır. Bu miktar alınan alkolün %10'undan fazla değildir.

Alkolün Metabolizması: etanol ilk önce karaciğerde sitozolik bir enzim olan alkol dehidrogenazla (ALD) asetaldahite okside edilir.



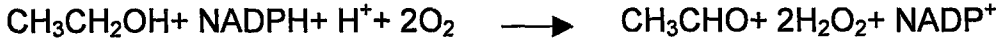
Daha sonra asetaldehit asetata okside edilir.



Bu oksidasyon, mitokondride yer alan ve sitozolik enzimden (1,0 mM) daha düşük Km'e sahip (10 $\mu$ M) asetaldehit dehidrogenaz (ACD) enziminin gerçekleştirilir.

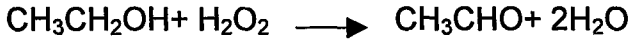
Alkolün küçük bir kısmı, etanol tarafından indüklenen ve birçok ilacın detoksifikasyonunu da sağlayan, mikrozomal sitokrom P450 oksidaz sistemi tarafından okside edilebilir.

#### Sitokrom P-450



Etanolü okside eden diğer bir sistem peroksizomlarda bulunan katalazdır (CAT).

#### CAT



Etanolden üretilen asetat büyük ölçüde karaciğerden diğer dokulara difüze olur. Karaciğer dışı dokularda asetaldehit önce asetata daha sonra asetil KoA'ya ve sonunda da Krebs siklusuyla CO<sub>2</sub>'e kadar dönüştürülür. Karaciğerde sentezlenen asetil KoA'lar, daha çok lipid biyosentezi için öncül bir molekül olarak rol oynar (6).

Etanolün karaciğerdeki metabolizması sonucu oluşan NADH, hücre içi NADH/NAD<sup>+</sup> oranını 2 veya 3 kez artırır. Sonuç olarak, stoplazmik NADH konsantrasyonu yükselir, NAD<sup>+</sup> düzeyi ise düşer. Bu durum etanolün oksidasyonunu sınırlar, çünkü oksidasyon için yüksek NAD<sup>+</sup> düzeyleri gereklidir. Ayrıca, glukoneogenez gibi diğer metabolik yolların fonksiyonları da engellenir (5).

### ALKOLÜN VÜCUTTA EMİLİMİ VE DAĞILIMI

Alkol ağızdan, solunumla akciğerlerden ve iğne ile damar yolundan vücuda girerse de bunlar arasında ağızdan alım en yaygın yoldur. Alkol, sindirim kanalının iç (ağız, yemek borusu, mide ve incebarsağın yukarı kısmı) yüzeyini kaplayan mukozadan kolayca absorbe edilerek kana geçer ve bütün vücuda dağılır. Alkol, doğrudan mide duvarından emilerek kana karışabilen az sayıdaki maddelerden biridir. Rakamsal bir değer vermek gerekirse, ağız yoluyla alınan alkolün dörtte biri 15-30 dakika içinde mide yoluyla kana geçer. Mideden 12 parmak barsağına geçen alkol, buradan hızla emilerek kana verilir. İngiltere'de yapılan bir araştırmaya göre, 12 parmak bağırsağına geçen alkolün 20 dakika gibi çok kısa bir sürede kanda en yüksek düzeye çıktığı ve sonrasında da süratle kana geçerek karaciğer ve beyne dağıldığı tespit edilmiştir (7). Alkollü bir içki alındığında, alınan içkideki alkol yoğunluğuna, midenin başka yiyeceklerle doluluk durumuna göre değişmek üzere, genellikle bunun % 20'si mideden, geri kalan % 80'i incebarsaklardan kana emilir. Alkolün mideden emilimi normalde barsaklardan emiliminden daha yavaş olduğundan mide boşken bu süreç daha da hızlanır. Yağlı yiyecekler midenin boşalmasını geciktirerek, yüksek alkol konsantrasyonlu içkiler ise pilorospazm,

gastrik atoni ve gastrik dilatasyon yaparak alkol emilim hızını azaltırlar. Yağlı, karbonhidratlı ve proteinli besinlerin alkolün ince barsaktan emilimini de azalttığı, bu besinleri içeren bir yemekle birlikte alkol alındıktan sonra yapılan ölçümlerde kan alkol düzeylerinin beklenenin yarısı düzeyine kadar çıkabildiği belirtilmektedir (4).

Alınan alkolün türü ve konsantrasyonu ne olursa olsun % 90'ı 1-1.5 saatte sindirim sisteminden kana geçmekte, 3. saatin sonunda ise sindirim sisteminde hiç alkol kalmamaktadır. Emilim süresince arteriyal kanda, venöz kana oranla % 60 kadar yüksek alkol bulunur. Emilim ve diffüzyon tamamlandıktan sonra bu fark ortadan kalkar.

### **ALKOLÜN VÜCUTTAN ATILIMI**

Kana geçen alkolün % 90'ı karaciğerde metabolize edilir. Geri kalan %10'un yarısı akciğer yoluyla, yarısı da böbreklerden değişmeksizin atılır. Tükürük ile atılan miktar mideye geri döndüğünden, ter ve dışkı ile atılan miktar da çok düşük olduğundan dikkate alınmamaktadır. Karaciğer, alınan alkolün miktarı ne olursa olsun, saatte 10-15 ml kadar alkolü katabolize edilerek detoksifiye eder. Ancak, yıkım hızını aşan miktarda alınan alkol ile alkolün yıkım ürünleri önce pulmoner dolaşım ile akciğere, sonra da kalpten tüm doku ve organlara dağılır (4).

### **Kan Alkol Düzeyi**

Emilim, yıkım ve atılma dönemlerini etkileyen faktörler nedeniyle kan alkol düzeyi yavaş yavaş yükselir. Maksimum düzeye ulaştıktan sonra, doku seviyesinde 10-15 dakika süren hafif bir düşme, bundan sonra ise tüm alkol vücuttan atılınca kadar sabit hızla çizgisel bir düşüş görülür. İnsanda alkol düzeyinin belirlenmesi için en uygun materyal kandır. Kan alkol düzeyleri 100 mililitrede mg (% mg) cinsinden belirtilir ve alkolün kandaki düzeyini belirlemek için kullanılan terim "alkolemi"dir. Kandaki alkol düzeyi %30 mg olunca sarhoşluk belirtileri görülür. %200 mg'da herkes sarhoştur. 100 ml'de 50 mg, kişinin alkol aldığını kabul etmeyi gerektirir. 550 mg kan alkol düzeyine rağmen hayatta kalabilen vakalar bildirilmesine karşın, 400 mg öldürücü düzey olarak kabul edilmektedir (2,4).

## **ALKOLÜN VÜCUTTAKİ ETKİLERİ**

### **Alkolün Beyin (Merkezi Sinir Sistemi ) Üzerine Etkisi:**

Alkolün vücutta en süratli etkilediği yer beyin, yani merkezi sinir sistemidir. Alkol başlangıçta beyin faaliyetini (elektroansefalografik alfa aktivitesini) hızlandırır da bu hızlanma giderek azalarak beyin faaliyetlerinin yavaşlamasına yol açar. Ppoham ve Schmidt 1962'de yaptıkları araştırmalarında, alkolün beyindeki etkisinin beyinin retiküler ağ sistemi üzerinden olduğunu ve böylece çevreden beyne gelen algılamayı geciktirerek yatıştırıcı etki yaptığını ileri sürmüşlerdir. İsrail ve Salaz'a göre ise, beyin mikrozomal adenosine trifosfatlarının etanol tarafından şiddetle etkilendiğini ve buna bağlı olarak beyin faaliyetlerinin yavaşladığını göstermişlerdir. Uyuşturucu etkisi gösteren depresanların da, adenosine trifosfatların sentezini inhibe ederek sinirden aktif geçişi önlediği bilinmektedir (8). Akut veya kronik alkol verilmesi sinir sisteminde bazı yapısal, fizyolojik ve nörokimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Alkol aynı zamanda bilinen tüm santral nörobiyolojik sistemlerle etkileşir. Kronik alkol kullanımı alkolün santral etkilerine tolerans gelişimi ve fiziksel bağımlılıkla sonuçlanır (9).

Alkol önce beyni etkileyerek algılama, heyecan, zeka, uyum, muhakeme ve davranışı etkiler. Böylece alkol, kişiyi insan yapan özellik ve yeteneklere yönelik zararlar verir. Daha fazla alkol alımı, algılama ve hareket işlevlerinin trafiğini düzenleyen omuriliği etkileyerek beceri, refleks ve hareket gücünü bozar. Çok aşırı alkol alımı ise, özellikle beynin altında bulunan ve bulbus denilen yeri etkileyerek solunumun durması ve ölüme neden olabilmektedir (7).

### **Alkolün Karaciğere Etkisi**

Alkol, karaciğerde metabolize edilmesi nedeni ile karaciğer hücrelerine doğrudan toksik etkisi olan bir maddedir. Karaciğerde alkolün zararlı etkileri; alkolik hepatit, karaciğer yağlanması, ve karaciğer sirozu olmak üzere 3 farklı şekilde görülebilir.

Karaciğer yağlanması ve alkolik hepatit geri dönüşümlü iken, siroz geri dönüşümsüzdür (9). Bu üç farklı klinik durum, alkolün karaciğer hücreleri üzerine doğrudan zararlı etkisi ile oluşmaktadır. Alkolün karaciğerde enzim, vitamin ve protein metabolizmasını olumsuz yönde etkilemesi nedeniyle, sistin, E vitamini ve diğer vitamin eksiklikleri, selenyum ve diğer elementlerin eksikliği, az miktarda protein almak, hormonal bazı etkiler ve viral enfeksiyonlar gibi etkenler de bu patolojilere

değişik oranlarda katkıda bulunurlar. Karaciğerde yağ birikimine, alkolün karaciğer hücrelerinde karbonhidrat, lipid ve protein gibi moleküllerin oksidasyonunu bozmasının yol açtığı öne sürülmüştür ( 10).

Alkole bağlı karaciğer sirozunun gelişmesi için günlük alınan alkol düzeyinin 50 mg'ın üstünde olması ve bunun 10 yıl kadar sürmesi gerektiği bildirilmektedir. İçki tüketiminin yüksek olduğu A.B.D ve Fransa gibi ülkelerde alkole bağlı siroz, ençok görülen karaciğer sirozu tipidir. İngiltere'de içki fiyatlarının çok pahalı oluşu nedeniyle alkole bağlı sirozun bütün sirozlular içinde %30 oranında olduğu bildirilmektedir. Kadınlarda alkole bağlı karaciğer sirozu daha erken ve daha sık olmaktadır. Bir oran vermek gerekirse 10 yıldır günde 50 mg'dan fazla alkol alan erkeklerde karaciğer sirozu sıklığı %10 civarında iken, kadınlarda bu oran %16-18 arasındadır (11).

### **Alkolün Kalp Damar Sistemi Üzerine Etkisi**

Alkolün etkilediği en önemli organlardan biri de kalptir. Cilt ve kalp damarları alkol alımı ile vazodilatasyona uğratarak yüzde kırmızimsı görünüşe, kalpten çıkan kan hacminde geçicide olsa bir artışa neden olur. Koroner damar bozukluğu olanların hafif içki alması önerilmişse de, aynı konuda yapılan diğer araştırmalarda damar genişlemelerinin ani spazmlara neden olduğu ve sonrasında ağır sonuçlara yol açtığı gösterilmiştir (7). Bu nedenle önce kan basıncı artar, fakat uzun süreli ve fazla miktarda alkol alınması durumunda ise kalp durmasına kadar varan kötü sonuçlar oluşabilir. Koroner kalp hastalığı riskini azaltan HDL türü yönünden alkol, daha yararlı olan HDL<sub>2</sub>'yi değil, alkole duyarlı olan HDL<sub>3</sub>'ü artırmaktadır. Alkolün yağ metabolizmasını bozarak kan kolesterol ve lipidlerinin artışına ve dolaylı olarak damar sertliğine ve ateromlara neden olduğu artık bilinen bir gerçektir (9).

Alkol bağımlılarında kalp hastalığı 3 grupta toplanabilir (4):

- 1- B grubu vitaminlerinin eksikliğine bağlı olanlar (beri-beri kalbi)
- 2- Ritim bozuklukları (bol alkol alımını izler, sıklıkla atrial ekstrasistoller, atrial fibrilasyon, daha seyrek olarak ventriküler ekstrasistoller, hatta öldürücü ventriküler taşikardi ve fibrilasyon görülebilir.)
- 3- Konjestif kardiomyopati. Bu tablo en önemlisidir. Alkol, aktin ve miyozin bağlanmasını ve kalp kası içindeki bir çok enzimlerin aktivitesini azaltarak kardiomyopatiye yol açar. Esansiyel hipertansiyon, kalp kapağı hastalıkları gibi kalp



yetersizliği gelişmesine aday kimselerin aşırı alkol alımından kaçınmaları gerekmektedir

### **Alkolün Sindirim Sistemine Etkisi**

Fazla miktarda alkol alınımı mide mukozasında dağınık erozyonlar, kanamalar ve kılcıl damarlarda genişlemelerle kendini gösteren akut gastrit gelişimine neden olur. Düzenli alkol tüketimi özafajit ve bir gastrik karsinom öncülü olan kronik atrofik gastrite yol açabilir. Özafagal kanser riski de göreceli olarak yükselir (9). Alkolün etkisiyle barsaklarda emilim bozulabilir. Alkol bağımlılarında sıklıkla görülen beslenme bozukluklarının oluşmasında kalorinin çoğunun alkolden alınması ve diğer besin kaynakların ihmal edilmesi gibi etkenlerin yanında emilimin güçleşmiş olmasının da etkisi vardır (1). Yoğun alkol kullanımı, akut ve kronik pankreatit oluşumu için ana sebeptir. Besinsel eksiklikler de anemi, nöropati, Wernicke hastalığı, malabsorbsiyon, hücre sel ve hormonal işlevlerde azalmaya katkıda bulunur. Pankreatit ilerleyince pankreas enzimlerinin salgılanması önemli ölçüde azalabilir. Böylece karbonhidrat, protein ve yağların sindirim ve emilimleri bozulur (9).

### **Üreme Sistemine Etkisi**

Alkolün erkek üreme sistemindeki en önemli etkisi, testis dejenerasyonuna yol açarak testosteron sentezini baskılaması ve kısırlığa neden olmasıdır. Alkol, cinsel duyguyu kamçılar fakat cinsel gücü azaltır. Erkek ve dişide hormon dengesini bozar. Kronik alkoliklerde alkol, erkeklerde spermelerin kadınlarda ise ovumun olgunlaşmasını bozarak anormal sperm ve yumurta oluşumuna ve bunun sonucunda da kısırlığa neden olmaktadır (12). Ayrıca alkol, anne ve babadan çocuğa geçen kromozomları da etkileyerek kromozom anomalileri şekillendirir, bunun sonucunda da zihinsel ve bedensel olarak özürlü doğumlar meydana gelir (13).

Diğer çok önemli bir noktada alkolün gebe annelerde yaptığı zarardır. Gebelik sırasında alkol kullanımı fetal alkol sendromuna yol açabilir (9).

Annenin aldığı alkol anne kanından, göbek bağı damarları ile bebeğe geçerek onu zehirler. Özellikle gebeliğin ilk üç ayında alınan alkol, bebeğin beyin gelişimini etkileyerek kasıtlılı beyin felci tablosu ile karakterize felçli ve zeka geriliği olan bebeklerin doğumuna neden olur.

Emzirme döneminde alınan alkol 20-40 dakika gibi çok kısa bir sürede anne sütüne karışır ve yavruya geçer. Alınan alkolün miktar ve yoğunluğuna göre yavru da toksik etkiler ortaya çıkar (13).

## Kanser Gelişimi Üzerine Etkisi

Alkol, kanserin kanıtlanmış nedenleri arasında önem açısından sigaradan sonra ikinci gelmektedir. Çeşitli kanser tiplerine ilişkin riskin, yaşam boyu hiç alkol almayanlara göre alkol alanlarda alınan alkol miktarıyla orantılı olarak 10 mislinden fazla artış göstermesi ve alkolü bırakanlarda kanser insidansının azalması alkolün insanlarda karsinojenik olduğunu kanıtlamaktadır. Tablo 1’de, alkole bağlı olarak meydana gelen kanser tipleri gösterilmektedir. Alkolün tütünle sinerjik etki gösterdiğine ilişkin güçlü bulgular vardır. Oral, farengeal ve özafagal kanserlerle ilişkili çalışmalar, alkol ve tütünün bir araya geldiğinde etkinin kat kat arttığını; dolayısıyla hem sigara, hem de sigarayla alkol kullananların, bunları kullanmayanlara göre yüksek riskte altında olduğunu ortaya koymaktadır. Alkolün karsinojenik etkileri malnütrisyonun bazı yönleriyle de sinerji gösterebilmektedir (1,14).

**Tablo 1.** Alkol Tüketimine Bağlı Olarak Oluşan Kanserler (14).

<i>Kesin Olarak</i>	Ağız kanseri Farenks kanseri Larenks kanseri Özafagus kanseri Karaciğer kanseri
<i>Olasılıkla</i>	Meme kanseri Rektum kanseri

Sebze ve meyveyi az tüketen alkol bağımlılarında bu kanserlerin gelişim riski daha da artmaktadır. Dolayısıyla iyi beslenen ve sigara içmeyenlerde alkol tüketimiyle ilişkili kanser riski daha düşüktür (4).

## Alkolün Diğer Vücut Sistemlerine Etkisi

Alkolün karaciğer, merkezi sinir sistemi, kalp damar sistemi, sindirim sistemi, üreme sistemi üzerindeki bu kötü etkilerine ek olarak diğer vücut sistemlerine de etkisi olmaktadır.

Alkol alımıyla mide asidinin azalması, alyuvar oluşumunu etkileyen folik asitin eksikliğine yol açarak eritrosit yapımını baskılar ve anemiye neden olur. Ayrıca alkol, eritrosit yapımını etkilemekle kalmaz aynı zamanda hemoglobinin sentezini de etkileyerek vücudun oksijenlenmesini ve buna bağlı ileri fizyolojik işlevleri de



bozmaktadır. Alkol alanların fazla idrara çıkması, alkolün hipofizi etkileyerek antidiüretik hormon salgısını azaltması ile ilgilidir (15).

Alkolün bir bölümü metabolize edilmeksizin böbreklerden idrar yoluyla vücut dışına atılır. Ancak alkol böbreklerden geçerken hücrelerde hasarlanmalara ve sonrasında da böbrek iltihaplarına ve büzüşmelerine neden olmaktadır (7).

Alkol, yaranın iyileşmesini, kemiğin mineralizasyonunu ve iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Trombosit sayısını azaltarak pıhtılaşma mekanizmasını zayıflatır (1).

Alkolün, patogenezinde direkt veya indirekt olarak rol aldığı hastalıklar Tablo 2'de özetlenmiştir (16).



**Tablo 2. Alkol Bağımlılarında Sık Görülen Hastalıklar (16).**

Organ Yada Sistem	Temel Belirtiler	Etki Mekanizması
	Anemi Trombositopeni Lökopeni	Kemik iliğinin bastırılması Folat metabolizmasının bozulması Beslenme eksikliği Folik asit Riboflavin Başka vitaminler
Karaciğer	Yağlı karaciğer Alkol hepatiti, Siroz	Karaciğer hücrelerine toksik etki Beslenme eksikliği yoluyla etki
Pankreas	Pankreatit (akut ve kronik)	Pankreas hücrelerine toksik etki
Barsak	Özofajit Gastrit Duodenit Peptik ülser Mallory-Wiess sendromu İshal	İrritasyon etkisi Motilite ve salgı üzerine etki
Endokrin	Hipoglisemi	Glikoneogenezisin inhibisyonu
	Kardiomyopati Kardiomagali Kalp yetmezliği	Miyokarda toksik etki Tiamin eksikliği
	Kas zayıflığı	Kas üzerine toksik etki
Sinir sistemi Bırakma belirtileri Halüsinasyonlar		SSS'ne toksik etki Kanda alkol düzeylerinin hızlı düşmeleri
Sinir sisteminde Özel Lezyonlar Serebral atrofi	Ataksi, ayakta durma güçlüğü Serebral işlev bozukluğu Duygulanım ve düşüncede bozukluklar Psödobulber felç Uçlarda paresteziler, ayak düşmesi	Beslenme eksikliği Nöronlara toksik etki
	Görme bulanıklığı, skotoma	
Beslenme bozuklukları Beriberi Riboflavin eksikliği Folik asit eksikliği	İshal Dermatit Bunama VI. sinir felci, nistagmus, ataksi Dolaşım kollapsı, yüksek atıma bağlı kalp yetmezliği Dermatit, kelozis, stomatit, Anemi (sderoblastik) Anemi (makrositik) Perifoliküler kanamalar Diş eti kanamaları	Niasin eksikliği Tiamin eksikliği Riboflavin eksikliği B12 eksikliği Folik asit eksikliği Vitamin C eksikliği

## DÜNYA'DA VE TÜRKİYE'DE ALKOL KULLANIM SIKLIĞI

Alkol tüm dünyada en çok kullanılan psikoaktif maddedir. Son yıllarda ülkemizde alkol tüketimi hızla artmaktadır. Ülkemiz için alkol tüketimindeki artış 1974-1980 yılları arasında %600 olarak bildirilmekteyken, bir çok ülke için bu artış %50-200 arasında kalmış, dünya ortalaması ise %125 olarak saptanmıştır. Türkiye ve bazı gelişmiş ülkelerde yıllara göre kişi başına alkol tüketim miktarı Tablo 3'de verilmektedir.

**Tablo 3.** 1970 ve 1985 Yıllarında Türkiye'de ve Bazı Gelişmiş Ülkelerde Toplam Nüfusta Kişi Başına Düşen Alkol Tüketim Miktarı (litre/kişi başı) (16).

Ülke, Yıl	Yüksek alkollü içki	Bira	Şarap	Saf alkol
<b>1970</b>				
Türkiye	0.29	1.26	0.85	0.5
A.B.D	2.87	70.00	4.97	6.7
Fransa	2.30	41.25	109.13	16.1
Japonya	1.07	28.04	0.32	4.6
<b>1985</b>				
Türkiye	0.67	4.0	1.00	1.0
A.B.D	2.72	90.3	9.15	8.0
Fransa	2.30	90.3	80.00	13.3
Japonya	2.40	38.0	0.70	5.7

A.B.D'de 1946-1982 arasında yapılan 12 alan çalışmasının sonuçlarına göre, erkeklerin %70-79'u, kadınların %56-6'si alkol kullanmaktadır. A.B.D'de, 1981-1983 yılları arasında DSM-3 (Amerikan Psikiyatri Derneği Sınıflandırması) ölçütleri kullanılarak yapılan bir alan çalışmasına göre yetişkinlerin %13'ü yaşamlarının herhangi bir zamanında alkol bağımlılığı ya da kötüye kullanımı sorunuyla karşılaşmaktadırlar.

A.B.D.'de yılda 20.000 kişinin alkol kullanımına bağlı organik hastalıklardan dolayı öldüğü bildirilmektedir. Alkol tüketiminin yalnızca İngiltere ve Galler'de her yıl yaklaşık 28.000 ölüme yol açmaktadır. Ayrıca Avrupa 'da bütün ölümlerin %3'ünün aşırı alkol tüketimiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Yine Avrupa'da kansere bağlı tüm ölümlerin %10'undan alkolün sorumlu olduğu bildirilmektedir (4,16).

## SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir (17).

Vücutta üretilen en önemli serbest oksijen radikalleri süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil ( $OH^-$ ) radikalleridir.

Süperoksit anyonu, moleküler oksijenin bir elektron alıp indirgenmesi ile; hidrojen peroksit, moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron ve iki proton alması yada süperoksit anyonunun bir elektron ve iki proton alması ile, hidroksil radikali ise; hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi ile meydana gelirler.

Serbest oksijen radikallerinin etkisi ile karbon merkezli peroksil ( $ROO^0$ ), alkoksil ( $RO^-$ ) ve thiyil ( $RS^-$ ) radikalleri de oluşabilmektedir. Normal fizyolojik fonksiyonlar sırasında vücutta düşük düzeylerde de olsa serbest radikal üretimi söz konusudur, ancak bunlar antioksidanlarca ortadan kaldırılırlar.

Serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimine yol açan alkolizm ve sigara tiryakiliği gibi durumlar, hücrenin oksidan/antioksidan dengesini bozacağından, detoksifiye edilemeyen radikaller hücrenin değişik yapılarını oksidasyona uğratarak farklı patofizyolojilere yol açabilmektedir (18).

### Hücrede Serbest Radikallerin Oluşumu

Endojen ve eksojen kaynaklar radikal oluşturabilir. Endojen olarak mitokondrial elektron transport zinciri, metal katalizli otooksidasyon reaksiyonları, prostaglandin sentezi ve oksidazlar (ksantin oksidaz, NADPH oksidaz) oksijenazların (sitorom p450 sistemi) katalizlediği reaksiyonlar ve oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma, alkol) başlıca radikal oluşturan kaynaklardır.

Eksojen olarak UV, X ışınları, iyonize radyasyon, bazı kimyasal ajanlar ( $CCl_4$ ), alışkanlık yapan maddeler (alkol, uyuşturucular), aktive olmuş fagositler (Respiratory Burst) radikal oluşumuna neden olmaktadır.

### Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller ve özellikle oksijen türevi serbest radikaller nükleik asitler, serbest aminoasitler, proteinler, enzimler, lipitler, lipoproteinler, başta olmak üzere

hemen hemen bütün sınıflara dahil bileşiklerle reaksiyona girerek geriye dönüşlü veya dönüşsüz hasar meydana getirebilirler.

Serbest radikaller, bu etkilerinden dolayı çok çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynarlar. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psoriasis, romatoid artrit ve bir çok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hastalıkların çoğunda serbest radikallerin hastalığın sebebi mi yoksa bir sonucu olarak mı meydana geldikleri tam olarak bilinmemektedir (19).

## **ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ**

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma sistemi gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunurlar.

### **Doğal (Endojen) Antioksidanlar**

Enzimler:

Süperoksid dismutaz

Katalaz

Glutasyon peroksidaz

Glutasyon -S- transferaz

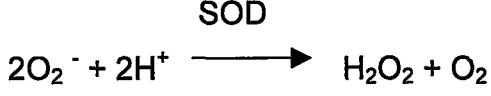
Hidroperoksidaz

Enzim olmayanlar:

a-Lipid fazda bulunanlar: Alfa-tokoferol, Beta karoten

b-Sıvı fazda bulunanlar: Askorbik asid, melatonin, urat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferin, myogloblin, hemogloblin, ferritin, metionin, albumin, bilirubin, glutasyon (19,20).

**Süperoksid Dismutaz:** İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksid dismutaz enzimi süperoksidin, hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.



SOD'un katalize ettiği reaksiyonun hızı spontan reaksiyonun yaklaşık 4000 katıdır. İnsanda SOD'un iki tipi bulunmaktadır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerdirler (MnSOD). Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-ZnSOD'dur. Her iki SOD'un katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksid serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku PO<sub>2</sub> artışı ile artar. SOD'nin ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (21).

SOD, fagosite edilmiş bakterilerinin öldürülmesinde de aktif olarak rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de, granülositlerden çok daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır (19,22).

### **Nitrik Oksidin (NO) Kimyası ve Fizyopatolojik Etkileri**

Nitrik oksit (NO) insan biyolojisinde çeşitli etkileri son yıllarda tanımlanan küçük molekül ağırlıklı (30 Dalton) ve heterodiatomik molekülü, zehirli serbest radikal bir gazdır. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi aracılığıyla L-arginin'den enzimatik kataliz ile üretilir. NOS'ın 3 izoformu (NOS1, NOS2, NOS3) vardır. NO, başlangıçta endotelial hücre relaksasyonunda fizyolojik mediatör olarak tanımlanmış ve vazoregülasyonda (hipertansiyon), trombosit agregasyonunda ve nörotransmisyonunda rol aldığı gösterilmiştir (23,24). Sonraki yıllarda ise penis ereksiyonunda rolü olduğu (25), nöronlarda uzun süreli potansiyalizasyona neden olduğu (26), suprakiasmik nükleusta biyolojik saat üzerinde aktivite gösterdiği (27) ve antitümoral etkileri olduğu bildirilmiştir (28).

1980'de Furchgott ve Zawadzki isimli araştırmacılar endotel hücrelerinin ürettiği bir faktörün damar gevşemesine neden olduğunu ve bu faktöre endoteliumdan elde edilen gevşeme faktörü "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF) adını vermişlerdir (24). Daha sonra bu faktörün NO olduğu gösterilmiştir. Günümüzde

NO'in farklı tipte bir çok hücre tarafından üretildiği ve çok çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu bilinmektedir.

### **Nitrik Oksit ile İlgili Reaksiyonlar**

NO, lipid ve suda çözünen bir gazdır. Oksijen ve oksijen radikalleri ile su içinde reaksiyona girer ve: 1- çok dayanıklı anyonlar ( $\text{NO}_3^-$ ), 2- dayanıksız oksitler ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), 3- orta dereceli stabil anyonlar ( $\text{NO}_2^-$ ) 4-diğer radikaller ( $\text{NO}_2$ ) ve 5- dayanıksız peroksinitritler ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşturur (29). Düşük pH'da biriken nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) proton kazanarak nitroz asite ve daha sonra dismutasyonla NO'e döner. NO, tiollerle reaksiyona girerek depo formlar oluşturur. Bunların bir elektron kaybetmesiyle sülfhidrilik reaktanlar, nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ) oluşur. Biyolojik anlamda bu formların bir çoğu NOS'ın katalitik olarak aktif hale geçmesinden sonraki birkaç saniyede ortaya çıkmaktadır (30).

NO, kolayca hem proteinlerine ve hemoglobine bağlanabilmektedir. Hem demiri ile reaksiyona girerek nitrozillenmiş bir ürün oluşturmaktadır. Guanil siklazın prostetik hem grubu ile reaksiyona girerek bu enzimi aktive ederler. NO, hemoglobindeki hem grubu ile kolaylıkla reaksiyona girerek, biyolojik olarak inaktif hale dönüşür. Böylece, ferröz hemoglobini ferrik hemoglobine dönüştürür, ayrıca sitokrom oksidaz enzimlerinin prostetik hem grupları ile reaksiyona girerekte oksidatif fosforilasyonu bloke eder.

### **Nitrik Oksitin Temel Fizyolojik Özellikleri**

NO'in çok çeşitli fizyolojik özellikleri vardır. Kardiyovasküler sistemde NO'in temel efektör reaksiyonu guanil siklazdaki hem grupları ile NO arasındaki reaksiyondur. Bu reaksiyon sonunda guanil siklaz aktive olur. Düz kas hücrelerinde siklik guanozin monofosfat (cGMP) artırarak cGMP'a bağımlı protein kinazların aktive olmasını sağlar ve böylece myozin hafif zincirli kinazlar fosforillenir. Fosforillenmiş myozin hafif zincirli kinazların kalsiyum-kalmodulin kompleksine afinitesi azalır ve daha az miyozin hafif zinciri fosforillenir. Miyozinin regülatör hafif zincirinin fosforile edilememesi enzimin inaktif formda kalmasına ve düz kas kontraksiyonunun azalmasına neden olur. Vasküler tonusda azalır. Endotel hücrelerinde kalsiyum konsantrasyonunun artması ile eNOS aktive olur. Ayrıca egzersiz sırasında kan akımına bağlı olarak ortaya çıkan vazodilatasyon sonucu endotel hücrelerinin kan



dolaşımına hassas kısımlarında kalsiyum konsantrasyonu artarak eNOS aktivitesinde artışa neden olmaktadır (31).

Diğer organ sistemlerinin düz kas hücrelerinde de benzer NO etkileri görülür. Gastrointestinal sistemde düz kaslarda gevşemeye, motilite azalmasına, Oddi sfinkterinde ve alt özafagus sfinkterinde gevşemeye neden olur. Solunumla alınan NO, bronşlardaki düz kasları gevşetir. Endojen olarak üretilen NO, bazal pulmoner ve bronşiyal arterlerin tonusunun ayarlanmasına yardım edebilir (31).

Endotelial NOS'ın; damar bütünlüğünün korunması, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasını düzenleme, lökositlerin düz kas hücrelerine göçünü inhibe etme ve lökosit proliferasyonunu sağlama gibi diğer etkileri vardır. Endotelial NO, hemostazda da kritik rollere sahiptir. anormal trombosit fonksiyonunun inhibe edilmesini sağlar. Endotelial NOS tarafından bazal NO üretilmesi ile damar içindeki trombositlerin adezyon ve agregasyonu inhibe olur. Trombosit adezyonunun inhibe edilmesi, sadece NO'de görülür.

Endotelial NO serebral kan akımının düzenlenmesini sağlar. Nöronal ve glia hücrelerdeki nNOS serebrovasküler tonusun düzenlenmesini, santral sinir sistemine etki ile uzun süreli hafıza ve öğrenme fonksiyonlarının güçlenmesine ve hipotalamo-hipofizer akisten hormon salınımının düzenlenmesine katkıda bulunur. NO; non-adrenerjik ve non-kolinerjik nöronlarda transmitterdir. Bu nedenle myokard kontraktilesi, kalp hızı, gastrointestinal motilite, bronşiyal tonus ve penil ereksiyonunun düzenlenmesine katılabilir (23,27).

NO kalbi korur, beyni stimüle eder, bakterileri öldürür.

Kalp: nitrogliserin, koroner dilatasyon, myokard depresyonu

Kan: vazoregülasyon, pıhtılaşma engellenir.

Akciğerler: bronkodilatasyon

SSS: bir çok fonksiyonu regüle eder.

Şok: NO inhibisyonu letaliteyi azaltır.

İnfeksiyon: antimikrobiyal

Kanser: sitotoksik

Makrofaj, lenfosit ve nötrofillerdeki NO, iNOS tarafından üretilir. İmmün ve inflamatuvar cevapların önemli bir elemanıdır. Makrofajların bakterisid, fungusid, virusid, parazitik ve tümörosit aktiviteleri iNOS tarafından üretilen NO'ye bağlıdır. Benzer bir mekanizmayla, iNOS tarafından üretilen NO, çeşitli hücre tiplerinde apoptotik cevaplara da katılabilir (32).



## **MATERYAL ve METOD**

### **Materyal**

Bu araştırmada; İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırma Merkezinden temin edilen 180-220 gram ağırlığında 12 yetişkin Wistar türü erkek ratlar kullanıldı. Bu ratlar, 6 kontrol ve 6 çalışma grubu olarak ikiye ayrıldı. Ratlar sessiz, sıcaklık ve nemin ( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  ve  $\%60\pm 5$ ) olduğu 12 saatlik aydınlık/karanlık siklusunun kontrol edildiği (08:00-20:00 saatleri arası ışık verildi) odalara yerleştirildi.

### **Kronik Alkolik Rat Modeli**

Rodentlerde (rat, sıçan, vb) etanolün kronik alımı etanol toleransı ve bağımlılığına yol açmaktadır. Bu amaç için etanol, inhalasyon (solunum), mide içine sonda ile ve en çok tercih edilen; sıvı bir diyet ile oral yollarla verilebilir.

Tamamen sıvı bir diyetin bir parçası olarak etanolla beslenme tekniği ilk kez Lieber ve arkadaşları (33) tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra sıvı diyet tekniği, deneysel etanol bağımlılığını indüklemek için en çok tercih edilen pratik bir metod olmuştur.

Süt, memelilerin büyümesi için temel bir besin olarak bilinmektedir. Inek sütü, düşük vitamin A içermesi haricinde, ideal bir sıvı diyetin önemli karışımlarını içerir. Inek sütü,  $\%1$  (w/v) şeker ya da sentetik bir tatlandırıcı ve vitamin A ilavesinden sonra ratlarda alkolik model geliştirilmesinde sıvı diyet olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, Uzbay ve ark. (34)'nin kronik alkolik rat modeli kullanılmış ve bu amaçla; inek sütüne belli dozda etanol, vitamin A ve şeker ilave edilerek hazırlanan sıvı diyet, 6 ay süreyle ratlara içirilmek suretiyle kronik alkolik rat modeli oluşturulmuştur.

### **Prosedür**

Ratlar tekli kafeslere alınarak 7 gün süreyle sığır sütü, vitamin A ve şükrozdan oluşan 1000 kcal/L' lik sıvı bir diyetle beslendi. Diyet, dökülmeyi engellemek için özel cam şişşelerde verildi. 7. günün sonunda çalışma grubu ratlar 3 gün süreyle  $\% 2,4$ 'lük etanol içeren sıvı diyetle beslendi (v/v). Daha sonra etanol konsantrasyonu 3. günün sonunda  $\% 4,8$ 'e ve 14. günün sonunda ise  $\% 7,2$ 'e yükseltildi. Ratlara  $\% 7,2$  etanol

İçeren bu diyet 6 ay süreyle verilmeye devam edildi. Etanol konsantrasyonunun artırıldığı sürede diyetin izokaloritesini ayarlamak için sukroz miktarı azaltıldı. Aynı süre zarfında, kontrol grubu ratlara ise etanol içermeyen kalorisi 1000 kcal/L'e ayarlanmış sıvı diyet verildi.

Sıvı diyet günlük hazırlandı ve aynı gün verildi. Her hayvanın günlük diyet alım miktarı sıkı şekilde kontrol edildi ve ratların ağırlığı her gün kaydedildi.

## KİMYASALLAR

Glisin, sodyum hidroksit (NaOH), bakır sülfat, çinko sülfat, sülfanilamid, N-naftil etilendiamin, sodyum nitrit (NaNO<sub>2</sub>), potasyum nitrat (KNO<sub>3</sub>), bovin serum albumin, nitro blue tetrazolium (NBT), ksantin, ksantin oksidaz ve bakır klorür sigmadan; EDTA, sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), amonyum sülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kloroform ve etanol ise Merck'den temin edilmiştir. Kadmiyum (Cd) granülleri Fluka'dan satın alınmıştır.

## ARAÇ VE GEREÇLER

Numune hazırlanması ve çalışmalarda Gilson marka (20µl, 200µl, 1000µl'lik) otomatik pipetler, Cenco whirlmix vortex, Shimadzu Libror AEG 320 model hassas terazi, Hermle Z 383 K santrifüj cihazı, Clifton manyetik karıştırıcı, Hanna marka digital pH metre, Shimadzu 1201 UV/visible spektrofotometre kullanıldı.

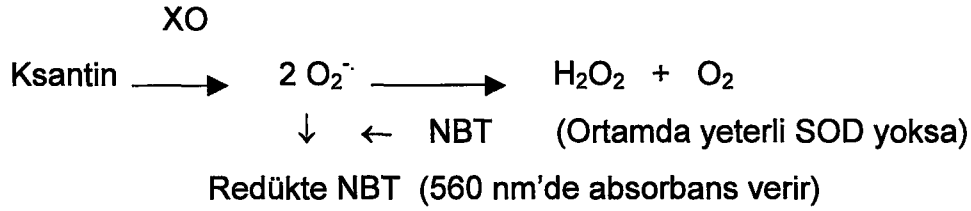
## METODLAR

### SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

1- Çinko-Bakır Süperoksit Dismutaz aktivite tayini:

Zn-Cu SOD aktivite ölçümü Sun ve Oberley'in metoduna göre yapıldı (35).

**Prensip** ; ksantin → ksantin oksidaz (XO) sistemiyle üretilen süperoksit radikallerinin, SOD tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' ye dönüştürülmesi yada nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. İndirgenen NBT, 560 nm'de maksimum absorban veren mavi renkli formazona dönüşür. SOD ise süperoksiti dismute ederek hidrojen peroksite dönüştürür. Belli miktarda NBT'yi içeren deney ortamında, oluşan süperoksitin miktarı standardize edildiğinde, ortamda bulunan SOD aktivitesiyle ters orantılı olarak mavi renkli formazon oluşacaktır. Yani ortamda ne kadar fazla SOD varsa, o kadar fazla süperoksit yıkılacak ve mavi renk oluşumu azalacaktır. Oluşan formazonun 560 nm'de verdiği absorbanstan SOD aktivitesi hesap edilir (36).



#### Kullanılan reaktifler :

1 – Assay reaktifi : 0,3 mmol / L ksantin (200 ml), 0,6 mmol / L EDTA (disodyum EDTA) (100 ml), 150  $\mu$ mol / L NBT (100 ml), 400 mmol / L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (60 ml) ve 1 g / L bovine serum albumin (30 ml) çözeltileri hazırlanarak karıştırıldı (toplam 490 ml).

2 – Ksantin oksidaz : (167 Ü / L) . 2 M soğuk  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile dilüe edildi.

3 –  $\text{CuCl}_2$  : 0,8 mmol / L (100 ml)

4 – Kloroform /etanol (CE) : 3 / 5 v/v

**Deneyin yapılışı :** Serum örnekleri önce 1/10 sulandırıldı. Dilüe serum örneklerine eşit hacimde kloroform/etanol (3/5; v/v) çözeltilisi konularak iyice vortekslendi ve +4 °C'de 5000 rpm de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar tablo 4'de belirtildiği şekilde, Cu-Zn SOD aktivite tayininde kullanıldı. Kloroform/etanol ekstraksiyonu, serumdaki hemoglobin ve Mn-SOD'un çöktürülmesini sağlamaktadır.

**Tablo 4.** Zn-Cu SOD aktivite tayini.

Reaktif.	Kör	Numune
Assay reaktifi (ml)	2,45	2,45
Numune (ml)	.....	0,5
Distile su (ml)	0,5	....
Ksantin oksidaz ( $\mu$ l)	50	50
20dk, 25 °C'de inkübe edildi.		
$\text{CuCl}_2$ (ml)	1,0	1,0
eklenerek reaksiyon durduruldu		

Spektrofotometre 560 nm de assay reaktifi ile sifira ayarlanarak, kör ve numunelerin absorbandsları kaydedildi.

## 2- Mangan SOD (Mn-SOD) Aktivite tayini:

Prensip: Sodyum siyanür (NaCN), Zn-Cu SOD aktivitesini inhibe ederken Mn-SOD aktivitesini etkilememektedir. Dilue edilmiş serum numuneleri önce 150 milimol (mM)'lük NaCN ile muamele edilerek Zn-Cu SOD aktivitesi inhibe edildi. Daha sonra, Zn-Cu SOD aktivite tayininde olduğu gibi Mn-SOD aktivitesi ölçüldü.

### Enzim Aktivitesinin Hesaplanması:

1 ünite SOD, NBT redüksiyonunu % 50 inhibe eden enzim aktivitesi olarak tarif edilmektedir.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Kör absorbansı (A}_k\text{)} - \text{Numune absorbansı (A}_n\text{)}}{\text{Kör absorbansı (A}_k\text{)}} \times 100$$

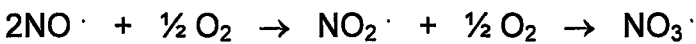
$$\text{SOD (Ü/ml)} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{\%50 \text{ inhibisyon} \times 0,5} \times 10 \text{ (dilüsyon faktörü)}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (Ü/mg protein)} = \frac{\text{Ü/ml}}{\text{mg protein/ml}}$$

## NİTRİK OKSİT METABOLİTLERİNİN (NO<sub>x</sub>) ÖLÇÜMÜ

Radikal yapısı ve çok kısa yarı ömründen dolayı direkt NO' in ölçümü oldukça zordur. Doku ve hücre homojenatlarında NOS enzim aktivitesi de ölçülebilir, ancak gelişmiş bir laboratuvar ve radyoizotop çalışmalar gerektirir (37). Bu yüzden NO konsantrasyonu, NO'in serumdaki stabil son ürünü olan nitratın kadmiyum ile nitrite indirgenerek total nitrit olarak ölçülmesi suretiyle tespit edilmektedir. Biyolojik sıvılardaki Nitrit ve nitrat düzeylerinin, NO sentezinin önemli bir indeksi olduğu bildirilmiştir (38).

NO, üretildikten kısa bir süre sonra (2-30 sn gibi), nitrit (NO<sub>2</sub><sup>·</sup>) ve ardından nitrata (NO<sub>3</sub><sup>·</sup>) oksitlenir. Nitrat formu, NO türevlerinin en kararlı yapısıdır (39).



### Kullanılan reaktifler :

1 – Glisin- NaOH Buffer : 15 g glisin bir miktar distile suda çözüldü , 2 mol/L NaOH ile pH = 9,7' ye ayarlandı. Son hacim 1 L' ye tamamlandı.

2 – Bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>) çözeltisi : 5 mmol/L

2 – Sülfanilamid : 5 g sülfanilamid, 3 M sıcak HCl içinde eritilerek son hacim 500ml' ye tamamlandı.

3 – N- Naphthyletylene diamine (NED) çözeltisi : 50 mg NED 250 ml distile su içinde çözüldü.

4 – Standartlar : Çözücü olarak 10 mM sodyum borat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) kullanılarak, 0,1 mol/L stok sodyum nitrit ve potasyum nitrat standartları hazırlandı. Çalışma sırasında 0,5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı.

5 - Sodyum hidroksit çözeltisi : 55 mmol/L NaOH .

6 – Çinko sülfat çözeltisi : 75 mmol/ L  $\text{ZnSO}_4$  olacak şekilde hazırlandı.

#### **Deneyin yapılışı :**

0,5 ml serum üzerine 2 ml  $\text{ZnSO}_4$  ve 2,5 ml NaOH eklenerek vorteks ile iyice karıştırıldı ve 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant redüksiyon işleminde kullanıldı. Sonuçta deproteinize edilmiş plazma 10 kez dilüe edilmiş oldu.

Numuneler deproteinize edildikten sonra her tüpe 2,5-3 g Kadmiyum granülü konularak aktive edildi. Bunun için 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içinde saklanan granüller önce üç kez distile su ile yıkandı. 1-2 dakika  $\text{CuSO}_4$  içinde karıştırılarak bekletildi. Solüsyon dökülüp üç kez glisin buffer ile yıkandı ve kadmiyumlar iyice kurulandı. Daha sonra 1 ml glisin buffer, 1 ml deproteinize numune eklenip, arasına karıştırılarak 90 dakika inkübe edildi. Inkübasyon süresinin bitiminde her numune ve standartdan 1'er ml alınarak uygun tüplere konuldu. Üzerine 0,5 ml sülfanilamid ve 0,5 ml NED çözeltisi eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra yine oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Seri nitrit standartlarının oluşturduğu renk şiddetleri spektrofotometre de 545 nm'de okunarak standart konsantrasyon grafiği hazırlandı ve numunelerin total nitrit konsantrasyonları bu grafikten hesaplandı. Böylece  $\text{NO}_x$  (nitrit+nitrat) konsantrasyonları bulunmuş oldu.

#### **İstatistiksel analizler**

Çalışmada istatistiksel analizler, SPSS Windows 10.0 ile yapıldı. Non parametrik testlerden "two-independent samples" ve "Mann-Witney U" testleri kullanıldı.

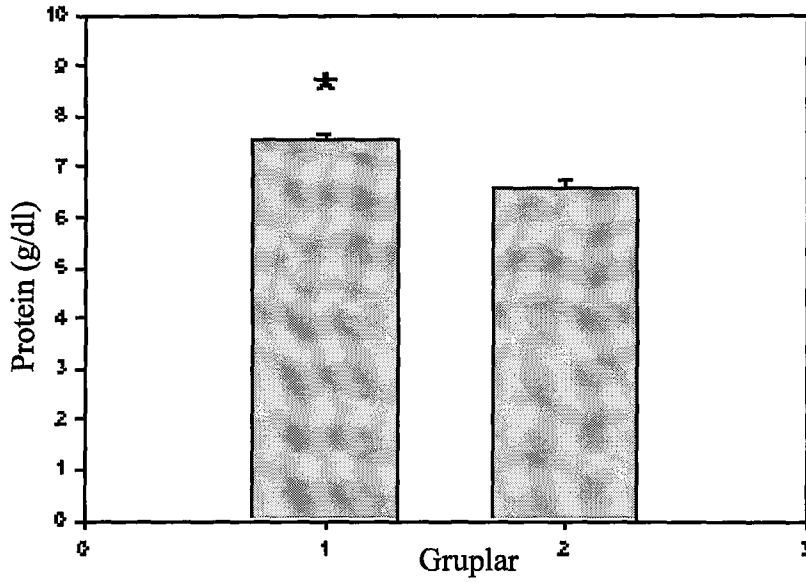
## BULGULAR

Kontrol ve alkolik gruptaki protein, Mn-SOD, Zn-Cu-SOD, total Nitrit (NO<sub>2</sub>), total Testosteron düzeyleri Tablo 5'de verilmiştir.

**Tablo 5.** Serum Protein, Mn-SOD, Zn-SOD, Total Nitrit (NO), Total Testosteron Düzeyleri

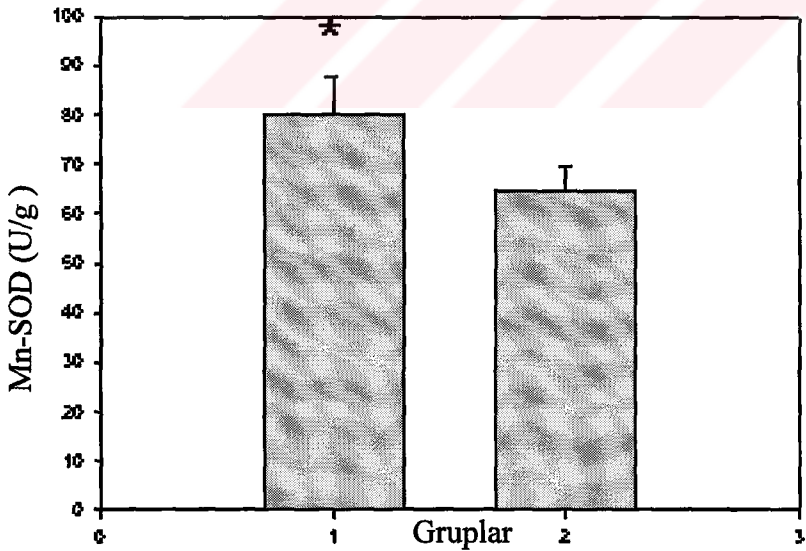
<b>Kontrol Grubu n=6</b>	<b>Protein (g/dl)</b>	<b>Mn-SOD (U/g protein)</b>	<b>Zn-SOD (U/g protein)</b>	<b>Total Nitrit (NO<sub>2</sub>) µmol/L</b>	<b>Total Testosteron (ng/dl)</b>
n=1	7.7	41.5	53.7	27.5	405
n=2	8.0	29.0	88.0	36.0	351
n=3	7.5	38.1	103.4	31.4	460
n=4	7.0	40.0	61.4	25.1	533
n=5	7.6	46.2	85.8	29.7	380
n=6	7.3	39.5	87.2	41.0	363
<b>Alkolik Grup n=6</b>					
n=1	6.9	71.0	47.7	26.9	189
n=2	6.5	59.0	70.7	31.0	220
n=3	7.2	61.5	53.7	18.5	145
n=4	6.0	90.2	69.9	35.5	295
n=5	6.7	87.5	65.9	19.0	195
n=6	6.1	55.5	81.2	24.0	201

Kontrol grubu ile alkolik grubun protein düzeyleri karşılaştırıldığında alkolik grupta protein düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük bulundu (6.5±0.4 vs 7.5±0.3 g/dl, p<0,002).



**Grafik 1.** Gruplar arası protein düzeylerinin karşılaştırılması. (Grup 1, kontrol grubu; grup2, alkol grubu)

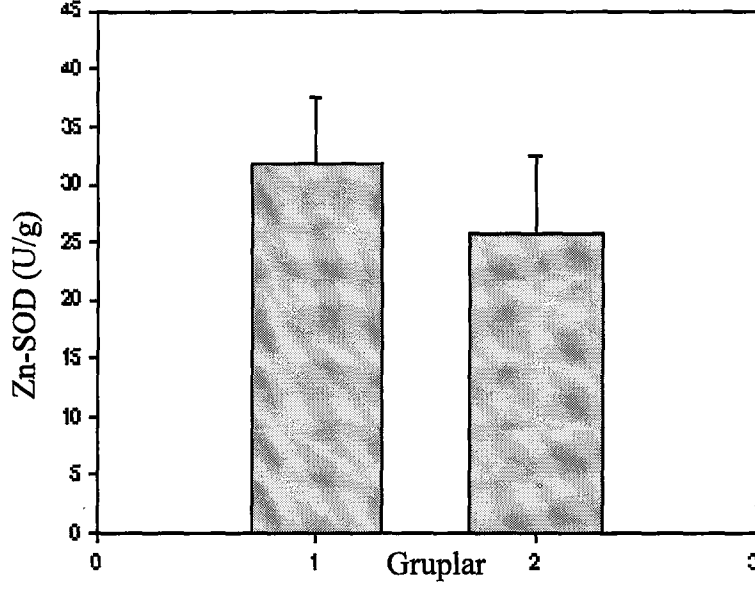
Kontrol grubu ile alkolik grubun Mn-SOD düzeyleri karşılaştırıldığında alkolik grubun Mn-SOD düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olarak bulundu ( $70.7 \pm 14.9$  vs  $39.0 \pm 5.6$  U/g protein,  $p < 0.001$ ).



**Grafik 2.** Gruplar arası Mn-SOD düzeylerinin karşılaştırılması. (Grup 1, kontrol grubu; grup2, alkol grubu)

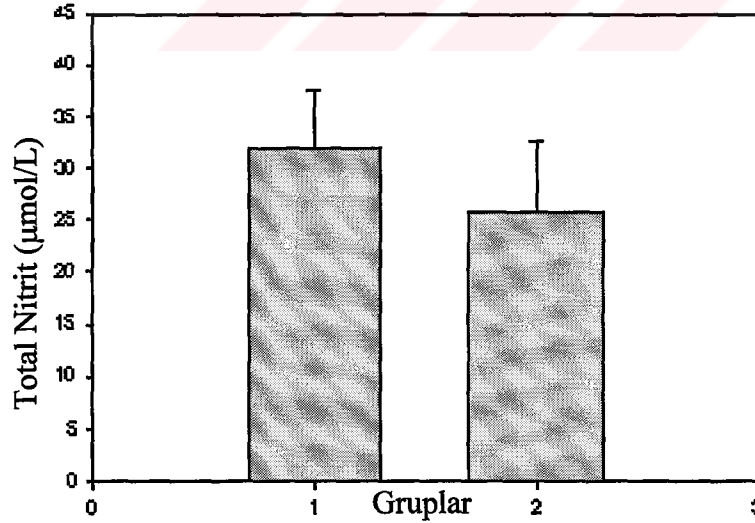
Kontrol grubu ile alkolik grubun Zn-Cu-SOD düzeyleri karşılaştırıldığında Zn-Cu-SOD düzeyleri alkolik grupta daha yüksekti. Fakat istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. ( $70.0 \pm 8.3$  vs  $59.9 \pm 8.9$  U/g protein,  $p > 0.05$ ).





**Grafik 3.** Gruplar arası Zn-SOD düzeylerinin karşılaştırılması. (Grup 1, kontrol grubu; grup2, alkol grubu)

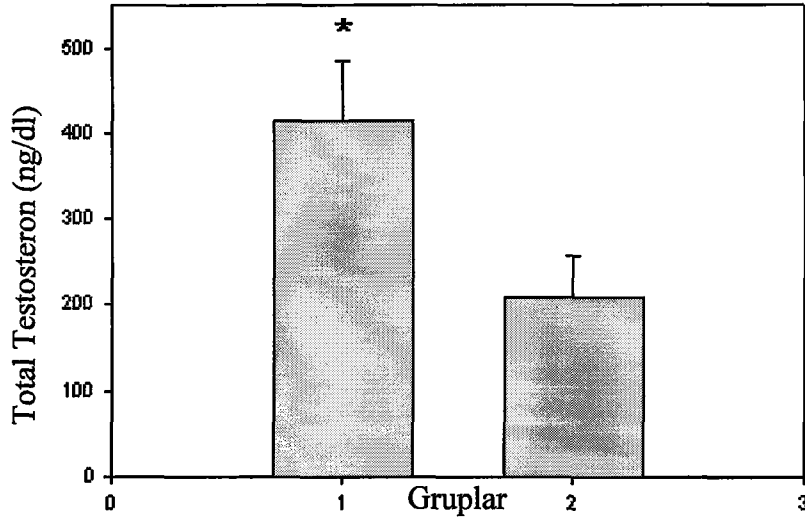
Kontrol grubu ile alkolik grubu total nitrit ( $\text{NO}_2$ ) düzeyleri açısından karşılaştırıldığında alkolik grupta  $\text{NO}_2$  düzeyleri daha düşüktü. Fakat istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. ( $25.8 \pm 6.7$  vs  $31.8 \pm 5.8$  mikromol/L,  $p > 0,05$ ).



**Grafik 4.** Gruplar arası Total nitrit düzeylerinin karşılaştırılması. (Grup 1, kontrol grubu; grup2, alkol grubu)

Kontrol grubu ile alkolik grubun total Testosteron düzeyleri karşılaştırıldığında alkolik grupta total testosteron düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük bulundu. ( $207.5 \pm 49.5$  vs  $415.3 \pm 69.3$  ng/dl  $p < 0.005$ ).





**Grafik 5.** Gruplar arası total testosteron düzeylerinin karşılaştırılması. (Grup 1, kontrol grubu; grup2, alkol grubu)

**Tablo 6.** Biyokimyasal Parametrelerin İstatistiksel Anlamlılık Durumları

	Protein (g/dl)	Mn-SOD (U/g protein)	Zn-SOD (U/g protein)	Total Nitrit (NO <sub>2</sub> ) µmol/L	Total Testosteron (ng/dl)
Kontrol grubu	7.5 ± 0.3	39.0 ± 5.6	59.9 ± 8.9	31.8 ± 5.8	415.3 ± 69.3
Alkolik grubu	6.5 ± 0.4	70.7 ± 14.9	70.0 ± 8.3	25.8 ± 6.7	207.5 ± 49.5
Kontrol grubu ile Alkolik grubun karşılaştırılması	p < 0.002	P < 0.001	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.005

P < 0.05, istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

## TARTIŞMA

Oksidatif reaksiyonlar, bir maddeden hidrojen uzaklaştırılması yada maddeye oksijen ilave edilmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Enzimler tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonları hücre komponentlerinin sentezi, metabolik atıkların oluşumu, ve enerji için makromoleküllerin yanması gibi birçok metabolik yolda anahtar bir basamaktır. Bununla birlikte, alkolün vücutta oksidasyonu sırasında zararlı oksidanlar meydana gelmektedir. Alkolün metabolize edilmesi sırasında meydana gelen oksidan yapılar; süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi reaktif oksijen radikalleridir (40).

Serbest radikallerden bazılarının yararlı işlevleri de vardır. Vasküler tonusun düzenlenmesinde NO'in, bakterilere karşı hücrel immünitinin şekillendirilmesinde süperoksit anyonu ve NO'in rolleri buna örnektir (41). Bununla birlikte, bu oksidanların aşırı miktarlarda üretilmesi ise, hücrenin hayati bileşenlerinden proteinlerin, bazı enzimlerin, lipidlerin, ve genetik materyalin hasarlanmasına yol açabilmektedir (40). Özellikle lipidlerin oksidasyonu ile meydana gelen lipid peroksitlerin (özellikle malondialdehit; MDA) artışı, dokulardaki oksidatif hasarı gösteren önemli bir indeks olarak kabul edilmektedir (42).

Fizyolojik şartlarda hücreler bu zararlı oksidanları detoksifiye edebilmektedirler. Hücrelerin antioksidan mekanizmaları; süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren SOD, hidrojen peroksidi'i suya dönüştüren CAT ve GSH-Px enzimlerinden ve vitamin E, C, ve indirgenmiş Glutasyon (GSH) gibi nonenzimatik yapılardan oluşmaktadır (43). GSH, geniş bir alanda farklı metabolik yollara katılarak antioksidan etki meydana getirmektedir. GSH, enzimatik etki olmaksızın, hidrojenleri direkt olarak oksidanlara aktararak onları detoksifiye etmektedir. Bununla beraber GSH, GSH-Px'in koenzimi olan nikotinadenin dinükleotit fosfat (NADP)'ın indirgenmiş formda tutulmasını sağlayarak ta indirekt olarakta antioksidan etki göstermektedir.

Oksidanların aşırı üretimine neden olan durumlar, hücrenin oksidan/antioksidan dengesini bozularak oksidatif strese yol açmaktadır. Oksidatif stres, vücudun tüm sistemlerini etkileyebilen ve değişik bozukluklara yol açabilen zararlı bir durumdur. Oksidatif streste hücrenin enzimatik ve nonenzimatik defans mekanizmalarının yetersiz kalması ve zararlı oksidanların detoksifiye edilememesi sonucu hücrelerde hasarlanmalar şekillenmektedir. Ayrıca, süperoksit radikalının aşırı üretildiği durumlarda, süperoksit radikali çok yüksek bir afinite ile NO'e bağlanarak

onu peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) radikaline dönüştürmekte, böylece NO'in biyoaktivitesi tamamen ortadan kalkmaktadır (44). NO'in tamamen ortadan kaldırılması, farklı patofizyolojilerin gelişimine neden olan çok önemli bir etkidir. Bu durum, NO'in kontrol ettiği fizyolojik olayların direkt etkilemesi nedeni ile araştırmaların odağı haline gelmiştir.

Alkol; ağız, mide ve barsaklardan kısa sürede emilerek vücudun tüm doku ve hücrelerine difüze olmaktadır. Ayrıca alkolün yüksek derecede lipofilik olması vücudun tüm hücrelerine kolaylıkla girmesini sağlamaktadır. Bu özelliklerden dolayı alkol, vücudun tüm doku ve hücrelerinde toksik etkiler meydana getirmektedir.

Alkolün uzun süreli kullanımı, vücutta genel bir serbest radikal üretim (Süper oksit;  $\text{O}_2^-$ , hidrojen peroksit;  $\text{H}_2\text{O}_2$  gibi) artışı ile sonuçlanmaktadır. Uzun süre ve aşırı miktarda serbest radikal üretimi, vücudun antioksidan kapasitesini azaltır ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser, DNA hasarı sonrası genetik bozukluklar, iktidarsızlık ve kısırlık gibi çok değişik patofizyolojilerin gelişimine zemin hazırlar. Alkolün insan ve hayvanlarda reaktif oksijen radikallerinin üretimini artırarak, patogeneze katkıda bulunduğu bozukluklarla ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Araştırmalar daha çok beyin, karaciğer ve üreme sistemi üzerinde yoğunlaşmıştır.

Agar ve arkadaşları (45) kronik alkolik ratlarda yaptıkları araştırmada alkolün, doza bağlı olarak lipid peroksidasyonunu arttırdığını, GSH düzeylerini ise önemli derecede düşürdüğünü ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar, alkole bağlı olarak beyinde oksidatif stresin arttığı şeklinde yorumlanmışlardır.

Motoliu ve arkadaşları (46), alkolik rat modelinde alkolün, beyinde sitokrom P-450 sistemini indükleyerek reaktif oksijen radikallerinin üretimini artırdığını, GSH düzeylerini azalttığını ve bunun sonucunda da hücrelerde hasarlanmalar meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Diğer bir araştırmada da, kronik alkolik ratların beyin dokusunda lipid peroksidasyonunun aşırı arttığı, bununla beraber Zn,Cu-SOD aktivitesinin önemli derecede düştüğü ortaya konmuştur (47).

Alkolün akut olarak verilmeside, beyin dokusu antioksidan enzim düzeylerinde çok ciddi değişikliklere neden olmaktadır. Somani ve ark. (48), akut olarak alkol verilen ratların beyin dokusunda, antioksidan enzim düzeylerinin önemli derecede artış gösterdiğini ve bu artışın, alkol kaynaklı oksidatif strese karşı bir kompenzasyon mekanizması olabileceğini rapor etmişlerdir.

Alkolün beyinde meydana getirdiği oksidatif stres kaynaklı bozukluklardan biriside, büyük damarların vasodilatasyon yeteneklerinin azalmasıdır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan kronik alkolik rat çalışmasında, baziller arterin önemli derecede daraldığı, ancak SOD enjeksiyonu ile bu bozukluğun normal hale getirildiği ortaya konmuştur. Bu araştırmacılar, alkol kaynaklı oksidatif stresin endotel hücrelerini hasarlayarak ve aynı zamanda endotel kaynaklı NO'in biyoaktivitesini ortadan kaldırılarak beyindeki büyük damarların dilatasyon yeteneklerini bozduğunu, SOD enjeksiyonunun ise oksidatif stresi azaltarak baziller arterin dilatasyon yeteneğinin tekrar sağladığını bildirmişlerdir (49).

Alkolün antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi daha çok doku düzeyinde yoğunlaşmıştır. Kan antioksidan enzim düzeylerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunun nedeni muhtemelen, dokularda meydana gelen oksidatif hasarın kana tam olarak yansiyıp yansımadiğının bilinmemesidir.

Thome ve ark. (50), kronik alkolik insanlarda yaptıkları araştırmada, serum Mn-SOD aktivitesinin önemli derecede artış gösterdiğini, Zn,Cu-SOD aktivitesindeki artışın ise çok önemli olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu araştırmacılar, Mn-SOD aktivitesindeki bu artışın, alkol kaynaklı oksidatif strese karşı bir kompenzasyon olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Kronik alkolik ratlarda yaptığımız bu çalışmada, serum Mn-SOD aktivitesinin önemli derecede yükseldiği, buna mukabil Zn,Cu-SOD aktivitesindeki değişikliklerin önemli olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlarımız literatürle uyumluluk göstermektedir.

Alkolün beyinde meydana getirdiği akut ve kronik toksik etkilerin, NOS izoenzimlerinin inhibe olması ve aynı zamanda da sentez edilen NO'in biyoaktivitesinin ortadan kaldırılması sonucu meydana geldiği bildirilmektedir (51-53). Beyinde, NO'in sentez ve biyoaktivitesinin azalması; sinirlerden uyarı geçişinin, öğrenme ve hafıza işlevlerinin, kan dolaşımının, bazı hormonların salınımının aksayacağını göstermektedir (54,55).

Çünkü NO, merkezi sinir siteminde hafıza oluşumu, denge, uyarı geçişi, koku alma gibi bir çok fonksiyonları destekleyen bir nörotransmitter olarak fonksiyon göstermekte ve etki etmektedir (56).

Alkol etkisi ile beyinden bazı hormonların salınımının azalması çok önemli bir bozukluktur, çünkü hormonlar çok sayıda doku ve hücreyi etkileyerek metabolik etki meydana getiren maddelerdir.

Bu konuyla ilgili yapılan araştırmalarda özellikle alkolün hipotalamik-hipofizer gonadal aksisteki meydana getirdiği patofizyoloji ortaya konulmaya çalışılmıştır. Canteros ve ark. (57,58) kronik alkolik rat modeli oluşturarak alkolün beyinde NO metabolizmasına etkisini incelemişlerdir. Bu araştırmacılar, kronik alkol alımının nNOS aktivitesini azaltarak NO üretimini düşürdüğünü, düşük konsantrasyondaki NO üretiminin ise nöronlarda cGMP sentezinin azaltarak LH-RH salınımını bloke ettiğini tespit etmişlerdir. LH-RH salınımının bloke edilmesi hipofizden LH salınımını baskılayarak kan LH konsantrasyonunu düşürdüğünü, böylece azalan LH'nin testislerdeki biyolojik aktivitesinin, yani testosteron sentezinin azaldığını rapor etmişlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmada Adams ve ark. (59) kronik alkolik ratlarda, NOS inhibitörleri ve alkolün steroid hormon sentezine etkisini incelemişlerdir. Bu araştırmacılar, alkolün ve NOS inhibitörlerinin; erkek ratlarda hipofizden LH salınımını ve sonrasında da testislerde testosteron yapımını bloke ederek kan LH ve testosteron düzeylerini ciddi derecede azalttığını bunun ise üreme fonksiyonlarını önemli derecede etkilediğini bildirmişlerdir.

Rettori ve ark. (60) nitrik oksidin testosteron sentezine etkisinin, beyinde LH-RH seviyesini azaltarak mı, yoksa direkt testisleri etkileyerek mi meydana geldiğini araştırmak amacıyla erkek ratları kastre etmişler ve kastre ratlara nNOS inhibitörü uygulamışlardır. nNOS inhibitörü verilen ratlarda, kontrol grubuna göre plazma LH-RH, LH ve FSH düzeylerinin önemli derecede azaldığını göstermişlerdir. Bu sonuç, NO'in beyinden LHRH salınımını regüle ettiğini göstermektedir.

İmmunohistokimyasal yöntem kullanılarak yapılan bir çalışmada, kronik alkolik ratlarda nNOS immünoreaktivitesinin önemli derecede azaldığı rapor edilmiştir (51). Bu sonuç, beyinde NO sentezinin azaldığını ve bunun sonucunda da hipofizden LH-RH salınımının azalmasına bağlı olarak serum testosteron düzeyinin düştüğünü göstermektedir.

Bu konuyla ilgili yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (61,62).

Kronik alkol alımının insanlarda erektil fonksiyonları olumsuz yönde etkilediği, iktidarsızlığa yol açtığı bilinmektedir. Ancak bu etkinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Damar endotel kaynaklı NOS (eNOS), sentezlediği NO'le damar düz kaslarında gevşemeye yani vazodilatasyona ayol açar, net sonuç damarların genişlemesiyle organlara giden kan miktarının artması olacaktır. Ayrıca üreme

organlarında bulunan nitrerjik (NO sentezleyen sinirler) sinirlerden sentezlenen ve salınan NO, sinir sinapslarında uyarı iletimini ve damar düz kaslarını gevşeterek kan akımını regüle eder (63,64). Özellikle penis dokusunda nitrerjik sinirlerden salınan NO, damar düz kaslarını gevşeterek bu organa bol miktarda kan gelmesini ve sonuçta ereksiyonu sağlar (65). Bu mekanizmanın aksadığı, yani nöronal NOS'un inhibisyonu ve sentezlenen NO miktarının azaldığı durumlarda penis ereksiyonu meydana gelmeyecektir. Bu etkiler üreme organları için çok önemlidir. Çünkü üreme organlarına giden kan miktarını azaltan etkiler, bu organların normal fizyolojik fonksiyonlarını bozar hatta bu etkinin uzun sürmesi testis atrofisi, iktidarsızlık ve kısırılığa kadar giden sonuçlara yol açabilir.

Akut ve kronik alkolizmin testisler üzerine etkisiyle ilgili çalışmalar çok eski yıllara dayanmaktadır. Bu çalışmalarda alkolün; testis atrofisine yol açtığı, seminifer tubül morfolojisini hasarladığı, germinal ve sertoli hücre sayısını azaltarak spermatogenezisi bozduğu, leyding hücrelerini etkileyerek testosteron salınımını azalttığı rapor edilmiştir. Hatta , yüksek dozda bir defa alkol alınmasının bile serum testosteron seviyesini anormal derecede düşürdüğü tespit edilmiştir. (66-71).

Kronik alkolik erkek ratlarda alkolün, serum Mn-SOD, Zn,Cu-SOD, Nitrik Oksit ve total Testosteron düzeylerine etkisini incelemek amacıyla yaptığımız bu araştırmada şu sonuçlar bulunmuştur:

1- Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, alkolik grubun serum Mn-SOD düzeyleri önemli derecede artış göstermiştir (alkolik grupta  $70,7 \pm 14,9$ , kontrol grubunda  $39,0 \pm 5,6$  U/g protein,  $p < 0,001$ ). Zn,Cu-SOD seviyelerindeki artışlar ise düşük düzeylerde kalmıştır (alkolik ratlarda  $70,0 \pm 8,3$ , kontrol grubunda  $59,9 \pm 8,9$  U/g protein ,  $p > 0,05$ ).

2-Alkolik ratlarda serum total Testosteron düzeyleri kontrol grubu ratlara göre, ciddi derecede düşmüştür (alkolik ratlarda,  $207,5 \pm 49,5$ ; kontrol grubunda,  $415,3 \pm 69,3$  ng/dl;  $p < 0,005$ )

3- NO üretiminin önemli bir indeksi olan total nitrit düzeyleri, alkolik ratlarda azalım göstermiştir (alkolik ratlarda  $25,8 \pm 6,7$ ; kontrol grubu ratlarda  $31,8 \pm 5,8$   $\mu\text{mol/L}$  ;  $p > 0,05$ ).

Serum Mn-SOD, Zn,Cu-SOD düzeylerindeki artış, muhtemelen alkol kaynaklı reaktif oksijen radikallerinin artışına karşı gelişen bir kompenzasyon mekanizmasıdır. Total nitrit seviyelerindeki düşme, alkol kaynaklı oksidatif stresin NO'in sentez ve



biyoaktivitesinde meydana getirdiği bozukluktan kaynaklanmaktadır. Serum total Testosteron düzeylerinin ciddi derecede azalması ise, alkol ve metabolitlerinin testislerdeki direkt toksik etkisinden ve/veya beyinde NO sentezinin bozulması sonucu hipotalamik-hipofizer gonadal aksisten LHRH salınımının aksamasından kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, alkoliklerde bir beslenme bozukluğunun bulunduğu da dikkate alınırsa, antioksidan etkili Vitamin E ve C gibi maddelerin düzenli olarak alınmasının alkolün toksik etkilerini azaltmada kısmende olsa etkili olabileceği görüşündeyiz.



## ÖZET

### **Kronik Alkolik Ratlarda Serum Mangan-Süperoksit Dismutase (Mn-SOD), Çinko-Bakır Süperoksit Dismutaz (Zn-SOD) ve Nitrik Oksit Düzeylerinin İncelenmesi.**

Alkol bağımlılığı, sıklıkla ciddi doku hasarlanmalarının yanısıra testis ve beyin atrofisi, alkolik karaciğer hastalığı, kanser, infertilite gibi ikincil hastalıklarla beraberdir. Alkolün direkt toksik özelliklerinin yanısıra, oksidatif strese yol açarakta hücrelerde indirekt etkiler meydana getirmektedir. Alkol metabolizması esnasında meydana gelen oksidatif stres, artmış reaktif oksijen radikal üretimi ve/veya azalmış antioksidan savunma kapasitesinden kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, erkek ratlarda kronik alkol tüketiminin serum Mn-SOD, Zn-Cu-SOD, NO ve total Testosteron düzeylerine etkilerini araştırmak, NO ve SOD ve total Testosteron düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir.

Başlangıç ağırlıkları 170-185 gr olan 12 adet Wistar cinsi erkek ratlar iki gruba ayrıldı. Birinci grup (Alkolik grup), 6 ay boyunca 7.2% (v/v) oranında etanol içeren sıvı bir diyetle (1 kcal/ml) beslendi. İkinci grup (Kontrol grubu), deneysel periyod süresince etanol içermeyen aynı sıvı diyetle beslendi. Bu periyodun sonunda tüm ratlar başları kesilerek öldürüldü. Kan örnekleri toplanarak serum Mn-SOD, Zn-Cu-SOD, Nitrik oksit ve total Testosteron düzeyleri ölçüldü.

Alkolik grupta serum Mn-SOD aktivitesi kontrol grubundan anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ( $70,7 \pm 14.9$  vs  $39.0 \pm 5.6$  U/g protein,  $p < 0.001$ ). Zn-Cu-SOD düzeyleri alkolik grupta yüksekti fakat istatistiki bakımdan anlamlı değildi ( $70.0 \pm 8.3$  vs  $59.9 \pm 8.9$  U/g protein,  $p > 0.05$ ). Serum Nitrik oksit ve total Testosteron düzeyleri alkolik grupta kontrol grubuna göre daha düşük bulundu (her biri sırayla;  $25.8 \pm 6.7$  vs  $31.8 \pm 5.8$  mikromol/L;  $p > 0.05$  ve  $207.5 \pm 49.5$  vs  $415.3 \pm 69.3$  ng/dl;  $p < 0.005$ ). Fakat her iki grupta da NO düzeylerindeki bu farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı değildi.

Artmış Mn-SOD düzeyleri, kronik alkol tüketiminden kaynaklanan artmış oksidatif strese karşı bir savunma mekanizması olabileceğini göstermektedir. Bu yüzden biz, vitamin E, C gibi antioksidan ilavelerinin kronik alkol toksisitesini önlemede uygun bir farmakoteröpatik strateji olabileceğini düşünmekteyiz.



## SUMMARY

### **Investigation of Serum Manganese-Superoxide Dismutase (Mn-SOD), Zinc-Copper Superoxide Dismutase (Zn,Cu-SOD), and Nitric Oxide (NO) levels in Chronic Alcoholic Rats.**

Alcohol dependence is often associated with severe tissue damages and secondary disorders such as testis and brain atrophy, alcoholic liver disease, cancer, infertility. Alcohol itself has direct toxic properties, but also influences various cellular pathway indirectly by causing oxidative stress. Oxidative stress results from increased reactive oxygen radical production and/or decreased antioxidant defence capacity during alcohol metabolism.

The aim of the present study was to investigate the effects of chronic alcohol consumption on the levels of serum Mn-SOD, Zn-Cu-SOD, NO, and total Testosterone and to evaluate the relationships between NO and SOD and total Testosterone levels in male rats.

A total of 12 male Wistar rats (170-185 g initial weight) was divided into two groups. The first group (Alcoholic group) was fed for 6 months a liquid diet (1 kcal/ml) including 7.2% Ethanol (v/v). The second group (control group) was fed the same liquid diet without ethanol throughout the experimental period. On the end of this period, all rats were sacrificed by decapitation between 09<sup>00</sup> and 11<sup>00</sup> h on the same day to minimize the circadian cycle effects. Blood samples collected to measure Mn-SOD, Zn-Cu-SOD, Nitric Oxide and total Testosterone levels.

Serum Mn-SOD activity was found to be significantly higher in alcoholic group than in that of control group ( $70.7 \pm 14.9$  vs  $39.0 \pm 5.6$  U/g protein,  $p < 0.001$ ). The Zn-SOD levels in alcoholic group was high, but not significant ( $70.0 \pm 8.3$  vs  $59.9 \pm 8.9$  U/g protein,  $p > 0.05$ ). Serum Nitric oxide and total testosterone levels were found to be lower in alcoholic group compared to control group. ( $25.8 \pm 6.7$  vs  $31.8 \pm 5.8$  mikromol/L;  $p > 0.05$ , and  $207.5 \pm 49.5$  vs  $415.3 \pm 69.3$  ng/dl;  $p < 0.005$ , respectively). But, the differences of NO levels in both groups were not statistically significant.

The increased Mn-SOD levels could represent a defence mechanism against the increased oxidative stress caused by chronic alcohol consumption. Therefore, we suggest that antioxidant supplementation, such as vitamin E,C may be a beneficial pharmacotherapeutic strategy for preventing the chronic alcohol toxicity.

## KAYNAKLAR

- 1- Ünal M, Özpoyraz N. Psikiyatri temel kitabı (eds. Güleç C ve Köroğlu E), Hekimler Yayın Birliği. Cilt 1, Ankara 1997, s:265-298.
- 2- Berger, E.D. ve Snortum J. R. A structural model of drinking and driving : Alcohol consumption; social norms and moral commitments. Criminology 1986; 24 (1): 139-153.
- 3- Donovan JM. A etiological model of alcoholism. Am. J. Psychiatry. 1986;143:1-11.
- 4- Bilgin N. Elazığ sanayi sitesinde çalışan çıraklarda sigara içme, alkol kullanma ve uçucu madde bağımlılığı prevalans araştırması. Doktora Tezi, F. Ü Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Elazığ 1996.
- 5- Ongun Ö. Beslenme. Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım. (Çeviri Ed. Altan N) Palme Yayıncılık, Ankara 2000 s:23.
- 6- Morris JB. Dosimetry, toxicity and carcinogenicity of inspired asetaldehyde in rat. Mutat Res 1997; 380: 113-124.
- 7- Yılmaz, T. Trafik kazaları ve alkol . Şoför ve Trafik Dergisi. 1996; 524(32): 12-15.
- 8- Webster WS, Walsh DA, Lipson AH, Mcewen SE. Teratogenesis after acut alcohol exposure in inbred and outbred mice. Neurobeha and Toxicol. 1980; 2: 227-234.
- 9- Gökden O, Saygılı R. Alkol kullanım bozukluklarında tıbbi komplikasyonlar. alkol kullanım bozuklukları ve tedavisi. (eds. Saygılı R ve Çelikel A) Ege Psikiatri Süreli Yayınları. İzmir 1997, 1(2):157-185.
- 10-Sheron N, Bird G, Koskinos J, Portmann B, Ceska M, Lindley I, Williams R. Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. Hepatology 1993; 18: 41-46.
- 11-Southren AL, Gordon GS, Olive J, Rafii F, Rosenthal WS. Androgen metabolism in cirrhosis of the liver. Metabolism 1973; 22: 695-702.
- 12-Gill J. The Effects Of moderate alcohol consumption on female hormone levels and reproductive function. Alcohol & Alcoholism 2000; 35(5): 417-423.
- 13-Astley SJ, Clarren SK. A case definition and photographic screening tool for the facial phenotype of fetal alcohol syndrome. J. Pediatrics 1996; 129(1): 33-41.

- 14-Austeker J. Cancer Prevention in Primary Care: Reducing alcohol intake. *BMJ* 1994;308(6943):1549-1552.
- 15-Emanuele MA. Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health & Research World*. 1998; 22(3):195-201.
- 16-Öztürk MO. Ruh sağlığı ve bozuklukları. 4. Basım. Hekimler Birliği Yayını. Ankara. (1992).
- 17- Preedy VR, Reilly ME, Mantle D, Peters TJ. Oxidative damage in liver disease. *JIFCC* 1998; 10:1.
- 18-Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 479-480.
- 19- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basın Yayın Dağıtım, Konya 1995, s:32-42.
- 20-Halliwel B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human. *Am J Med* 1991; 91: 314-322.
- 21-Marklund SL. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem. J.* 1984; 220: 269-272.
- 22-Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991; 91: 302-313.
- 23-Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327(6122): 524-526.
- 24-Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373-376.
- 25-Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS, Chang TS, Synder SH. Nitric oxide: a physiological mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401-404.
- 26- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(24): 11285-11289.
- 27-Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR, Gillette MU. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci* 1997; 17(2): 667-675.

- 28-Nathan CF, Arrrick BA, Murray HW, Desantis NM, Cohn ZA. Tumor cell antioxidant defenses. Inhibition of the glutathione redox cycle enhances macrophage-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1981; 153(4): 766-782.
- 29-Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(8): 3308-3312.
- 30-Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, Le J, Koh SI, Kimura T, Green SJ, et al. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 1994; 263(5153): 1612-1615.
- 31-Loscalzo J. Nitric oxide: biologic and medical implications. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th ed. Vol1. 1998: 442-444.
- 32-MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 323-350.
- 33- Lieber CS, DeCarli LM . Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 Update. *Alcohol Alcohol*. 1989; 24:197-211.
- 34-Uzbay İT, Kayaalp SO. A modified liquid diet of chronic ethanol administration: validation by ethanol withdrawal syndrome in rats. *Pharmacol Res*. 1995; 31(1):37-41.
- 35-Sun Y Oberley LW and Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem*. 1988; 34(3): 497-500.
- 36-İşlekel H, Uğurlu B, Hazan E, Saydam N. Evaluation of lipid peroxidation and antioxidant status in myocardial tissue and coronary sinus blood of patient undergoing cardio-pulmonary by-pass. *Bioyokimya Dergisi*. 1999; 24(4): 5-13.
- 37-Mashage H, Koke B, Huizenga JR. Critical evaluation. *Clin. Chem*. 1995; 41(6): 892-896.
- 38-Cortos NK, Wakid NW: Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium reduction method. *Clin. Chem*. 1990; 36(8): 1440-1448.
- 39-Bories TN, Bories C. Nitrate determination in biological fluid by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin. Chem*. 1995; 41(6): 904-907.

- 40- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Colell A, Garcia-Ruiz C. Oxidative Stress and alcoholic liver disease. *Alcohol Health & Research World*.1997; 21(4): 321-324.
- 41- Preedy VR, Reilly ME, Mantle D, Peters TJ. Oxidative damage in liver disease. *JIFCC*. 1998; 10 (1); 16-20.
- 42-Bird RP, Silas SO, Hadley M, Draper HH. Determination of malonaldehyde in biological materials by High-Pressure Liquid Chromatography. *Anal Biochem* 1983; 128: 240-244.
- 43- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979; 59:795-805.
- 44-Kojda G, Harrison D. Interaction between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular Res*. 1999; 43: 562-571.
- 45-Agar E, Bosnak M, Amanvermez R, Demir S, Ayyildiz M, Celik C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. *Neuroreport* 1999; 10: 1799-1801.
- 46- Motoliu C, Valles S, Renau-Piquieras J, Guerri C. Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J Neurochem* 1994; 63: 1855-1862.
- 47-Omodeo-Sale F, Gramigna D, Campaniello R. Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *Nuerochem Res* 1997; 22: 577-582.
- 48-Somani SM, Husain K, Diaz-Philips L, Lanzotti DJ, Kareti KR, Trammell GL. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. *Alcohol* 1996; 13:603-610
- 49-Sun H, Mayhan WG. Superoxide dismutase ameliorates impaired nitric oxide synthase-dependent dilatation on the basilar artery during chronic alcohol consumption. *Brain Res* 2001; 891: 116-122
- 50-Thome J, Foley P, Gsell W, Davids E, Wodarz N, Wiesbeck GA, Böning J, Riederer P. Increased concentrations of manganese superoxide dismutase in serum of alcohol-dependent patients. *Alcohol & alcoholism* 1996; 32 (1): 54-69.
- 51-Fitzgerald W, Charlton ME, Duman RS, Nestler EJ. Regulation of neuronal nitric oxide synthase by chronic ethanol ingestion. *Synapse* 1995; 21: 93-95.

- 52- Syapin PJ. Alcohol and nitric oxide production by cells of the brain. *Alcohol* 1998; 16(2): 159-165.
- 53- Kimura KA, Reynolds N, Brein J. Ethanol neurobehavioral teratogenesis and the role of the hippocampal glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor-nitric oxide synthase system. *Neurotoxicol and Teratol* 2000; 22: 607-616.
- 54-McCann SM, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH. Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, Cytokines, and Leptin. *Domestic Animal Endocrinol* 1998; 15 (5): 333-344.
- 55-Fataccioli V, Gentil M, Nordmann R, Rouach H. Inactivation of cerebellar nitric oxide synthase by ethanol in vitro. *Alcohol & alcoholism* 1997; 32(6): 683-691.
- 56-Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992; 32:297-311.
- 57-Canteros G, Rettori V, Franchi A, and et al. Ethanol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) secretion by blocking the response of LH-Rh neuronal terminals to nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92(8):3416-3420.
- 58- McCann SM, Rettori V. The role of nitric oxide in reproduction. *Pro Soc Exp Biol Med* 1996; 211: 7-15
- 59-Adams ML, Nock B, Truong R, Cicero TJ. Nitric oxide control of steroidogenesis: endocrine effects of NO-nitro-L-arginine and comparisons to alcohol. *Life sci* 1992; 50(6):35-40
- 60-Rettori V, Belova N, Dees WL, and et al. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:10130-10134
- 61-McCann SM, Karanth S, Kimura M, Yu WH, Rettori V. and et al. The role of nitric oxide (NO) in control of hypothalamic-pituitary function. *Rev Bras Biol* 1996; 56(1):105-112
- 62- Persson MG, Gustafsson LE. Ethanol can inhibit nitric oxide production . *Eur J Pharmacol* 1992; 224:99-100.
- 63-Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120:227-237.
- 64-Snyder SH. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 1992; 257:494-496.



- 65-Burnett AL, Tillman SL, Chang TS, Epstein JI, Lowenstein CJ, Bredt DS, Snyder SH, Walsh PC. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol* 1993; 150:73-78.
- 66-Addler RA. Clinically important effects of alcohol on endocrine function. *Clin Endocr and Metab* 1992; 74:957-960.
- 67- Zhu Q, Van Thiel DH, Gavaler JS. Effects of ethanol on rats sertoli cell function: studies in vitro and in vivo. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21:1409-1417.
- 68-Villalta J, Balleca JL, Nicolas JM, Martinez de Osaba MJ, Antunez E, Pimentel C. Testicular function in a symptomatic chronic alcoholics: relation to ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:128-133.
- 69-Emanuelle N, Emanuelle MN. The endocrine system: alcohol alter critical hormonal balance. *Alcohol Health & Res World* 1997;21(1): 53-64.
- 70- Emanuelle N, Emanuelle MN. Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health & Res World* 1998;22(3): 155-201.
- 71- Rosenblum EP, Gavalar JS, Van Thiel DH. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injuri. *Free Rad Biol and Med* 1989; 7: 569-577.