

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ASETALDEHİDİN KARACİĞER, KALP VE BEYİN GİBİ
DOKULARDA TOKSİK EKİLERİNİN İNCELENMESİ:
N-ASETİLSİSTEİN VE TAURİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

ZEYNEP DİCLE YILDIZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. PERVİN VURAL**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Zeynep Dicle YILDIZ tarafından hazırlanan Asetaldehidin Karaciğer, Kalp ve Beyin Gibi Dokularda Toksik Etkilerinin İncelenmesi: N-Asetilsistein ve Taurinin Koruyucu Etkisi. başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

14 / 07 / 2016

Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u> | <u>İmzası</u> |
|---|---|
| 1.Prof.Dr. Semra Doğru ABBASOĞLU (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |
| 2.Prof.Dr. Pervin VURAL (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |
| 3.Prof.Dr. Yıldız Öner İYİDOĞAN (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |
| 4.Prof.Dr. Jale ÇOBAN (Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |
| 5.Doç.Dr. Pınar A. SAĞIRLI (Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı) |  |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etiğe uygun davrandığımı, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine dahil ettiğimi, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ZEYNEP DİCLE YILDIZ



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında ve eğitimim boyunca bana yol gösteren, emeklilik günlerinde dahi desteğini esirgemeyip benim için emek harcayan çok değerli hocam, eski Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Müjdat Uysal'a,

Yüksek lisans eğitimin sırasında desteğini her daim hissettiğim değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Necla Koçak-Toker'e

Yüksek lisans serüvenim boyunca destek ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen ve aynı zamanda tez danışmanlığımı büyük bir özveri ile yüklenen çok sevgili hocam Prof. Dr. Pervin Vural'a

Gerek tez çalışmam boyunca gerek eğitimim sırasında yardım ve desteğini her zaman hissettiğim, sabır ve ilgi ile bana yol gösteren sevgili hocam Prof. Dr. Semra Doğru-Abbasoğlu'na,

Başta Doç. Dr. Canan Küçükgergin ve Araşt. Gör. Merve Baki olmak üzere tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen, haklarımı asla ödeyemeyeceğim arkadaşlarıma,

Hiçbir sorumu yanıtızsız bırakmayan, yüce gönüllü İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Yüksek lisans serüvenimde teşvik kaynağım olan babama bütün öğrenim hayatım boyunca destek ve sevgisini her zaman hissettiğim anneme, ve zor zamanlarımda yanımda olan kardeşlerime,

En içten teşekkürlerimi sunarım...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 42685

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	II
BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LISTESİ	VI
ŞEKİLLER LISTESİ.....	VII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ.....	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Gereçler	17
3.2. Çalışma protokölü.....	17
3.3. Serumda/plazmada yapılan incelemeler.....	18
3.4. Karaciğer, kalp ve beyinde yapılan incelemeler.....	18
3.5. İstatistik incelemeler	25
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	32
KAYNAKLAR	36
ETİK KURUL KARARI	51
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Doku hasarı mekanizması, etanol, asetaldehit ve lipit peroksidasyon ürünleri

Tablo 2.2: N-Asetilsisteinin antioksidan etkileri

Tablo 4.1: N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda ALT ve AST üzerine etkisi (Ortalama \pm SEM; herbir grup için n=8)

Tablo 4.2: N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda karaciğerde reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), dien konjugat (DK), protein karbonil (PK), antioksidan aktivite (ferric reducing activity; FRAP) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SEM; herbir grup için n=8)

Tablo 4.3: N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda beyinde reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), dien konjugat (DK), protein karbonil (PK), antioksidan aktivite (ferric reducing activity; FRAP) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SEM; herbir grup için n=8)

Tablo 4.4: N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda kalpte reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan aktivite (ferric reducing activity; FRAP) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SEM; herbir grup için n=8)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Asetaldehidin yapısı

Şekil 2.2: Etanolün asetaldehite dönüşümü

Şekil 2.3: Etanol metabolizmasındaki enzimler: 1. Alkol dehidrogenaz (ADH), 2. Sitokrom p450 (CYP2E1), 3. Katalaz ve 4. Aldehit dehidrojenaz (ALDH2)

Şekil 2.4: Etanolün CO₂ ve H₂O'ya kadar metabolize edilmesi

Şekil 2.5: Etanolün normal metabolizması ve Aldehit dehidrojenaz (ALDH2) *2 genotipi varlığında asetaldehit birikimi

Şekil 2.6: Alkol ve asetaldehitin hepatoselüler karsinom gelişme mekanizması

Şekil 2.7: N-Asetilsisteinin yapısı

Şekil 2.8: Taurinin yapısı

Şekil 4.1: N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda karaciğer (A) ve beyin (B) dokularında reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), dien konjugat (DK) ve protein karbonil (PK) düzeyleri üzerine etkisi (ortalama ± SEM ; herbir grup için n=8)

Şekil 4.2: N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda karaciğer (A) ve beyin (B) dokularında antioksidan aktivite (ferric reducing antioxidant power; FRAP), glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz aktivitesi (GSH-Px) üzerine etkisi (Ortalama ± SEM ; herbir grup için n=8)

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

4- HNE	4-hidroksinonenal
AA	Asetaldehit
ALT	Alanin aminotransferaz
ALD	Alkolik karaciğer hastalığı
ALDH	Aldehit dehidrojenaz
AST	Aspartat aminotransferaz
CYP2E1	Sitokrom P ₄₅₀ 2E1
DCF	2,7-diklorofloresein
DCFH	2,7-diklorodihidrofloresin
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
DTNB	Elman ayıracı
FRAP	Antioksidan aktivite (<i>ferric reducing antioxidant power</i>)
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-R	Glutasyon redüktaz
GSSG	Okside glutasyon
HO •	Hidroksil
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HSC	Karaciğer stellat hücreleri
KAT	Katalaz
MAA hibrid adduktu	MDA-AA-protein adduktları
MEOS	Mikrozomal etanol oksitleyici sistem
MDA	Malondialdehit
N ² -Et-dG	N ² -etildeoksiganosin
NADH/NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NAC	N-Asetilsistein
NO •	Nitrik oksit
ONOO ⁻	Peroksinitrit
PdG	1,N(2)-propano-2'-deoksiganozin
PK	Protein karbonil
ROOH	Organik hidroperoksit

ROS	Reaktif oksijen türleri
RO [•]	Alkoksil
ROO [•]	Peroksil
SOD	Süperoksit dismutaz
TAU	Taurin
TBA	Tiyobarbütirik asit
TEP	1,1,3,3-tetraepoksiopropan
TNF α	Tümör nekroz faktör- α



ÖZET

Yıldız, Z. D. (2016). Asetaldehidin karaciğer, kalp ve beyin gibi dokularda toksik etkilerinin incelenmesi: N-asetilsistein ve taurinin koruyucu etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 42685

Asetaldehit (AA) alkol metabolizmasında oluşan ilk metabolittir. AA aşırı alkol kullanımından sonra kanda ve karaciğerde birikmekte, farmakolojik ve toksik etkilere, davranış bozukluklarına neden olmaktadır. Karaciğer dokusu, AA'in oluşumu ve asetata oksidasyonunun başlıca yeri olup, kalp ve beyin gibi diğer organlarda da oluşmaktadır.

AA birikmesi oksidatif stres oluşturarak organizmadaki lipid, protein DNA gibi makromoleküllerin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır.

Çalışmamızda karaciğerde ve beyinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun arttığı görüldü. Karaciğerde lipid peroksit, beyinde ise protein karbonil (PK) düzeylerinde bir artış bulundu. Antioksidan sistem elemanlarında ise belirgin bir değişiklik saptanmadı. Üç dokuda da AA etkisiyle prooksidan bir durum geliştiği bulundu.

N-Asetilsistein (NAC) ve taurine (TAU) hücreleri koruyucu etkilere sahip, antioksidan özellikleri olan iki bileşiktir. Dokularda AA'e bağlı değişikliklere NAC ve TAU etkileri araştırıldı ve NAC uygulamasının karaciğerde ROS ve PK düzeylerinde, beyinde ise ROS, MDA ve PK düzeylerinde anlamlı bir azalma yaptığı bulundu. TAU'nun ise karaciğer ve beyin dokularında ROS düzeylerini azalttığı gözlemlendi. NAC uygulaması karaciğer GSH düzeylerinde anlamlı bir artış oluştururken, TAU karaciğer ve beyinde GSH düzeylerini arttırdı ve artmış olan beyin GSH-Px aktivitesini azalttı.

Kronik AA uygulamasının karaciğer, beyin ve kalp dokularında prooksidan bir durum yarattığını, NAC veya TAU uygulamalarının AA ile uyarılan oksidatif stresi baskılamada yararlı olabildiği görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Asetaldehit, N-Asetilsistein, Taurin, Oksidatif stres, Antioksidan sistem

ABSTRACT

Yıldız, Z. D. (2016). Examination of the toxic effects of Acetaldehyde in liver, heart and brain tissues and protective effects of N-acetylcysteine and taurine. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biochemistry. Master Thesis. Istanbul.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 42685

Acetaldehyde (AA) is the first metabolite in the metabolism of alcohol. AA accumulates in the liver after extreme abuse of alcohol and causes pharmacological and toxic effects and behavioral disorders. AA formation and its oxidation to acetate take place mainly in liver. AA occurs also in other organs such as heart and brain.

Accumulation of AA causing oxidative stress which affects the structure and function of macromolecules such as lipids, proteins and DNA. In our study, Reactive oxygen species (ROS) formation increased in liver and brain. Lipid peroxides levels in liver and protein carbonyl (PK) levels in brain were elevated. There was no significant increase in antioxidant system component. Prooxidant status was found to be accentuated in three tissue after AA application.

N-acetyl cysteine (NAC) and taurine (TAU) exhibit protective effect having antioxidant properties. NAC was found to cause decreases in ROS and PK levels in liver and ROS, MDA and PK in brain. TAU caused a decrease in ROS in brain. NAC cause an increase in hepatic GSH and TAU demonstrated similar actions for liver and brain and also decreased the elevated GSH-Px activity in brain.

The application of chronic AA has created a prooxidant status in liver , brain and heart tissues, and it appears that the application of NAC or TAU may be useful in suppression of the developed oxidative stress.

Key Words: Acetaldehyde, N - acetylcysteine, taurine, oxidative stress, antioxidant system

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Asetaldehit (AA) alkol metabolizmasında ilk basamakta oluşan bir metabolittir. Ayrıca, birçok gıda maddelerinin imalatında katkı maddesi ve tatlandırıcı olarak kullanılmakta ve gıdaların bir bileşeni olarak vücuda alınmaktadır (8). Ev yapımı bira, likör, sirke, yoğurt, kefir, turşu, kavrulmuş kahve gibi gıdalarda, hatta anne sütünde de az da olsa bir miktar AA bulunur (8, 119). Önemli miktarda AA'nın sigara dumanında da bulunduğu bildirilmiştir (62). Ayrıca, AA kimya endüstrisinde boya, plastik, yapıştırıcı, dezenfektan, pestisit üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Etanolün ilk oksidasyon ürünü olan AA aşırı alkol kullanımından sonra kanda ve karaciğerde birikmekte, farmakolojik ve toksik etkilere, davranış bozukluklarına neden olmaktadır (82, 84, 86, 136). Çok aktif bir metabolit olan AA, asetata hızla dönüşmeden önce, hücrelerde ve dokularda hasar oluşturma kabiliyetine sahiptir (82, 136). Karaciğer dokusu AA'nın oluşumu ve asetata oksidasyonunun başlıca yeridir, ancak kalp, pankreas, gastrointestinal sistem ve beyin gibi diğer organlarda da AA oluşmaktadır (70, 137). Mide mukoza hücrelerinde ve bağırsak bakterilerinde bulunan alkol dehidrojenaz enzimi de önemli miktarda AA oluşumuna neden olmaktadır (70, 137). Gastrointestinal sistemde oluşan AA'nın hızla emildiği, portal ven yoluyla karaciğere giderek alkolik karaciğer hasarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (137). Hepatositlere ulaşan AA mitokondri disfonksiyonuna da yol açarak daha fazla AA birikimine yol açmaktadır (98).

Alkolün karaciğer ve diğer dokulardaki toksik etkileri ayrıntılı bir biçimde incelenmiştir. Bu toksisitede etkili faktörlerden birinin AA olduğu kabul edilmektedir. Ancak AA'nın bu toksisiteye katkısı ve ayrıca direkt toksik etkisinde rol oynayan faktörler yeterince bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar AA'yı inhalasyon, gavaj veya periton içi yollarla uygulayarak veya aldehit dehidrojenaz inhibitörleri kullanarak AA'nın toksik etkilerini araştırmak istemişlerdir (19, 43, 59, 123, 157). AA'nın amino, hidroksil ve sulfidril grupları ile kovalan etkileşimler yaparak, lipid, protein ve DNA gibi makromoleküllerin yapı ve fonksiyonlarını etkilediği bildirilmiştir (69). Ayrıca, aldehit oksidaz ve ksantin oksidaz indüksiyonu vasıtasıyla reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumunu arttırdığı, glutatyon (GSH) düzeylerinin azalmasına yol açtığı ve oksidatif stresi indüklediği ileri sürülmektedir (99, 177). AA'nın apoptozisi uyardığı (180), direkt sitotoksik etkilerinin yanısıra, inflamatuvar

sitokinlerin artışına yol açarak organ hasarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (34, 108). AA'nın alkolik kardiyomiyopati patojenezinde de rol oynadığı saptanmıştır (99, 177). Yaygın organ hasarı yapma dışında, AA beyin fonksiyonlarını etkileyerek davranışsal bozukluklara da neden olur. AA deney hayvanlarına verildiğinde koordinasyon ve hafıza bozukluğuna, uykuya eğilime neden olur (123). Ayrıca, alkole bağımlı kişilerde karsinogenezin indüklenmesinde rol aldığı ileri sürülmüştür (110). Benzer şekilde, AA'dan krotonaldehit oluşumunun da karsinogenezde etkili olduğu bildirilmiştir (22).

AA'nın stabil olmayan yapısı ve hızla metabolize olması nedeniyle, AA ile ilgili çalışmalar bir duraksama göstermiştir. Bunun nedeni AA'nın toksik etkilerini araştırmak için uygun deneysel modeller geliştirilememiş olmasıdır. Bu nedenle daha çok *in vitro* deneyler ile bu konu araştırılmaya çalışılmış ve AA ile çalışmalar 1990'lı yılların sonlarında tekrar hız kazanmıştır (31, 67, 69, 98, 112). Matysiak-Budnik ve ark. (98) içme suyunda AA uygulamasının AA'nın toksik etkilerini incelemek için uygun bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar içme suyu ile AA verildiğinde, gastrointestinal sistemde yoğun bir AA birikiminin olduğunu, bağırsak bakterileri tarafından bir kısmı asetata dönüşse bile, önemli miktarının vena porta yolu ile karaciğere geldiğini ve sistemik dolaşıma katıldığını ve AA'nın karaciğer ve diğer dokulardaki toksik etkilerini araştırmak için uygun bir yöntem olabileceğini ileri sürmüştür (98).

Bilindiği gibi, prooksidan-antioksidan dengedeki değişimler sonucu gelişen oksidatif stres hücrelerde apoptotik ve nekrotik değişimlere yol açmakta ve doku hasarında etkin bir rol oynamaktadır (7, 161, 163). Serbest radikal oluşumundaki artış organizmada lipit, protein, DNA gibi makromolekülleri etkilemekte ve bunlarla ilgili yapı ve fonksiyonlarda değişimlere yol açmaktadır. Antioksidan sistem bu değişimleri engellemekte önemli bir rol oynamaktadır. Bu çerçevede antioksidan enzimler ve moleküller önem kazanmaktadır. Enzimler arasında superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz ve glutatyon redüktaz sayılmaktadır (161, 163).

Çalışmamızda ilk amacımız Matysiak-Budnik ve ark (98) tarafından önerilen şekilde içme suyu ile uygulanan AA'nın kronik koşulda karaciğer, kalp ve beyin gibi dokularda toksik etkisini incelemek ve bu etkide prooksidan-antioksidan dengedeki değişimlerin rolünü araştırmaktır. Bu çerçevede AA'nın ROS üretimi, lipit peroksidleri ve protein karbonil düzeyleri ile antioksidan moleküller üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca sıçanların serumlarında alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktiviteleri ölçülmüştür.

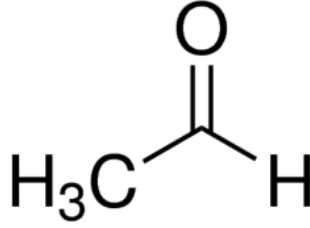
N-asetil sistein (NAC) ve taurin hücreleri koruyucu etkilere sahip, antioksidan özellikleri olan iki bileşiktir. NAC bir serbest radikal tutucusu gibi davranır ve ayrıca GSH rejenerasyonundan sorumlu enzimleri aktive ederek hücre içi GSH düzeylerinin artışına neden olmaktadır (3). Taurin (2-aminoetansulfonik asit) birçok memeli dokusunda bulunan, detoksifikasyon, membran stabilizasyonu, ozmoregülasyon gibi önemli fizyolojik fonksiyonları olan protein yapısına katılmayan bir amino asittir (64, 127, 171). Taurin lipit peroksidasyonunu baskılayarak oksidatif stresle ilgili birçok koşulda etkin bir rol oynamaktadır (127, 171). Çalışmamızda ikinci olarak AA'ya bağlı dokulardaki olası değişiklikleri NAC ve taurinin azaltıcı/engelleyici bir potansiyeli olup olmadığı araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. AA yapısı ve oluşumu

AA, alkol metabolizmasında ilk basamakta oluşan bir metabolittir. Kimyasal formülü CH_3CHO olarak gösterilen AA, etanal olarak da bilinir. Renksiz ve çok uçucu bir sıvıdır. Hoş olmayan, keskin, rahatsız edici bir kokusu vardır (28, 135).



Şekil 2.1 Asetaldehidin yapısı

AA endüstriyel alanda büyük oranda üretilen aldehitlerden biridir. Kimya endüstrisinde asetik asit ve vinil asetat, selüloz asetat gibi asetik asit esterlerini oluşturmak üzere katalizör olarak kullanılmaktadır (66, 150, 170). Aynaların gümüşlenmesinde, deri tabaklanmasında, yakıt karışımlarında (alkolü denatüre etmek için), yapıştırıcı, dezenfektan, boya, pestisit ve kazein ürünlerinde (jelatini sertleştirmek için), kağıt endüstrisinde ve sentetik kauçuk olarak kullanımı yaygındır (150).

AA birçok gıda maddesinin imalatında katkı maddesi ve tatlandırıcı olarak da kullanılmakta ve gıdaların bir bileşeni olarak vücuda alınmaktadır (8). Ev yapımı bira, şarap, likör, sirke, yoğurt, kefir, turşu, kavrulmuş kahve gibi gıdalarda bulunur (8; 119). Anne sütünde bile çok az miktarlarda AA saptanmıştır (8, 119, 150).

AA doğada pirüvik asit dekarboksilazın etkisiyle pirüvik asidin fermentasyonu ile oluşur. Ayrıca, soya fasulyesi, tahıllar, laktik asit ve alkolün fermentasyonu yolu ile de oluşabilir (48). Laktobasil ve streptokokların çeşitli suşları da L-treonin asetaldehit liyazların (aldolazlar) aktivitesine bağlı olarak treoninin AA ve glisine dönüşümü ile AA üretebilir (28, 88, 169). Bu nedenle ekmek, çabuk hazırlanan çay ve kahveler, kavrulmuş kahve taneleri, süt, yoğurt, süzme peynir gibi mandıra ürünleri (40, 102), alkollü ve alkolsüz içecekler (26, 102, 105) gibi diyetel ürünlerde farklı miktarlarda AA bulunmaktadır. Örneğin yoğurttaki AA miktarı, evde ve/veya fabrikada sağlanan ısı koşulları (ısı ne kadar yüksekse asetaldehit o kadar fazla oluşur), sütün yağ içeriği ve süt proteini takviyeleri gibi faktörlere bağlı olarak

değişmektedir (28, 151). AA yoğurt, süzme peynir gibi mandıra ürünlerine meyvemsi bir aroma ve lezzet verir (151, 40). AA düşük konsantrasyonlarda dengeli bir tat vermek için gerekli gibi görünürken, yüksek konsantrasyonları lezzet bozukluğuna yol açar. Benzer bir kriter şaraplarda ve şarap yapım endüstrisinde de geçerlidir. Şaraplardaki AA konsantrasyonları “şarapların yıllanması”nı değerlendirmek için bir belirteç olarak kullanılmaktadır (105).

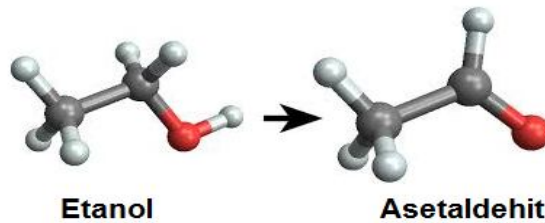
AA doğal ürünlerin yanması ve hidrokarbonların foto-oksidasyonu yoluyla da oluşabilmektedir. Hava, su, toprak ve yeraltı sularında farklı miktarlarda AA saptanmıştır (150). Odun ateşi, sigara dumanı ve araç egzozları potansiyel AA kaynaklarıdır. AA yakıtın oksidatif pirolizi ile yanma işlemi sırasında oluşur. Egzoz borusu emisyon ölçümlerinde - yakıtın türüne bağlı olmak üzere- konsantrasyonu 0.39-0.81 mg/km miktarına ulaşabilmektedir (72, 140). Sigara dumanındaki AA tütünde bulunan selüloz gibi doğal ve tütüne eklenen sentetik mono- ve disakkaritlerin pirolizi sonucu oluşmaktadır (61).

AA organizmada alkol metabolizmasının önemli bir ara ürünüdür. Etanolün alkol dehidrojenaz enzimi ile karaciğerde oksidasyonu sonucunda üretilir ve alkol alımından sonraki “akşamdan kalmalık” olarak tanımlanan semptomlara neden olur. Mide mukoza hücrelerinde ve barsak bakterilerinde bulunan alkol dehidrojenaz enzimi de önemli miktarda AA oluşumuna yol açar (70, 137).

AA'nın yarı-ömrü çok kısadır, plazmadan dakikalar içinde elimine edilir (28). Bununla birlikte, çok aktif elektrofilik bir metabolit olan AA, asetata hızla dönüşmeden önce, hücrelerde ve dokularda hasar oluşturma kabiliyetine sahiptir (82, 136).

2.2. Alkol metabolizmasında AA oluşumu

AA etanolün oksidatif metabolizmasının ilk ürünüdür (Şekil 2.2).

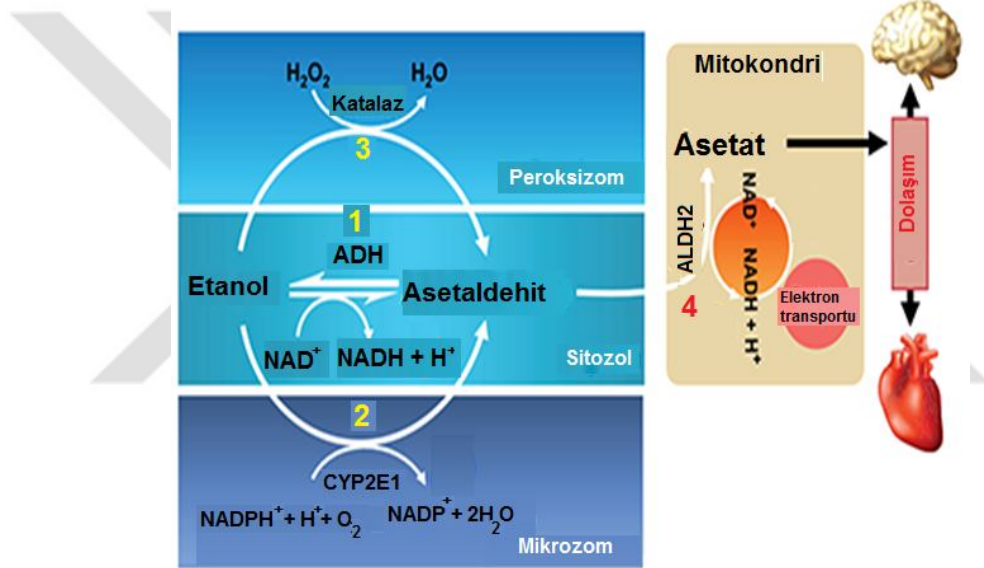


Şekil 2.2 Etanolün asetaldehite dönüşümü

Alkolün metabolizması ve eliminasyonunda rol alan en önemli organ karaciğerdir. Bu oksidasyon reaksiyonları 3 ana adımda gerçekleştirilir:

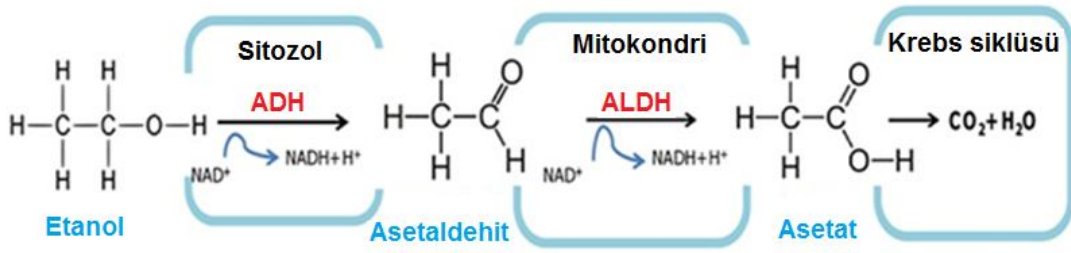
- 1) Alkolün toksik özelliklerine neden olan AA'ya oksidasyonu;
- 2) Toksik etkili AA'nın geri dönüşümsüz metabolizma ile asetat oluşturması;
- 3) Su ve karbondioksit oluşturmak üzere asetatın yıkılımı.

Alkolün oksidatif metabolizmasındaki ilk adım alkol dehidrojenaz (ADH), mikrozomal etanol oksitleyici sistem (MEOS) ve bu sistemde başlıca rol oynayan sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) ile katalaz gibi anahtar enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir (85). Ana okside edici enzim sitoplazmada etanolün yıkılımını sağlayan ve alkole yüksek afinite (49) ile bağlanan ADH dir. CYP2E1 kronik alkol kullanımında daha aktiftir ve mikrozomlarda AA oluşumunu sağlar. Birinci adımdaki oksidasyon reaksiyonlarının katalizini sağlayan üçüncü anahtar enzim ise peroksisomlarda bulunan katalaz'dır (13, 29) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Etanol metabolizmasındaki enzimler: 1. Alkol dehidrojenaz (ADH), 2. Sitokrom p450 (CYP2E1), 3. Katalaz ve 4. Aldehit dehidrojenaz (ALDH2)

Etanol metabolizmasında ikinci adım mitokondride bulunan ve AA'nın asetata dönüşümünü sağlayan aldehit dehidrojenaz (ALDH)'dır (37). Ayrıca AA, NADPH-bağımlı mekanizma ile (mikrozomal AA-okside edici sistem) CYP2E1 tarafından da metabolize edilebilmektedir (78). Oluşan asetat oldukça kararsız bir moleküldür ve su ile karbon dioksit oluşturmak üzere spontan olarak yıkılır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Etanolün CO₂ ve H₂O'ya kadar metabolize edilmesi

Bu 3 oksidatif adımın kapasitesi aşılnca, vücutta AA birikir ve toksik etkilere neden olur. AA elektrofilik özelliği nedeni ile protein, lipit ve DNA gibi makromoleküller ile kovalan olarak bağlanır ve kimyasal adduktlar oluşturur (109, 141, 158, 159). Oluşan adduktlar oldukça patojeniktir, protein ve lipitlerde fonksiyon kaybına, DNA hasarına ve mutasyona neden olabilirler (158).

AA karaciğer dışında kalp, pankreas, gastrointestinal sistem ve beyin gibi diğer organlarda da oluşmaktadır (70, 137). Mide mukoza hücrelerinde ve barsak bakterilerinde bulunan alkol dehidrojenaz enzimi de önemli miktarda AA oluşumuna neden olmaktadır (70, 137). Gastrointestinal sistemde oluşan AA'nın hızla emildiği, portal ven yoluyla karaciğere giderek alkolik karaciğer hasarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (137). Hepatositlere ulaşan AA mitokondri disfonksiyonuna da yol açarak daha fazla AA birikimine yol açmaktadır (98).

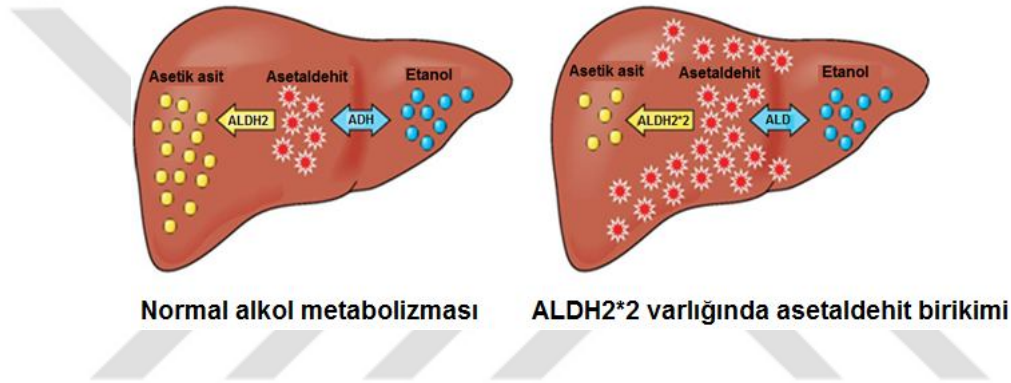
Kronik alkol kullanımı basit yağlanmadan steatohepatit, fibroz ve siroza kadar gelişebilen bir karaciğer hastalığına yol açar. Kronik alkol kullanımı aynı zamanda hepatosellüler karsinomun patojenezinde önemli bir kofaktör olarak görev yapmaktadır. Alkole bağlı bu etkilerin oluşumunda AA'nın katkısı çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (43, 57, 122).

2.3. Alkol metabolizmasından sorumlu enzimlerin gen polimorfizmleri ve AA üretimi

Etanol metabolizması ile ilgili enzimler (ADH ve ALDH) vücutta AA üretimi ve metabolizma hızını etkiler; dolayısıyla AA toksisitesinden sorumludur. Alkol kullanımı sonrası yüksek miktarlarda AA üretimi yüz kızarıklığı, terleme, taşikardi, bulantı ve kusma gibi klinik belirtilere yol açmaktadır. İnsanlarda ADH'nin en az 8, ALDH'nin ise 4 izoenzimi bulunmaktadır. ADH'nin en önemli izoenzimleri ADH1A, ADH1B ve ADH1C genleri tarafından kodlanırlar (85, 143). ADH1B ve ADH1C genlerinin farklı alleleri enzimin aktivitesinin farklı olmasını belirler. Örneğin, ADH1B*2 ve ADH1C*1 alleleri yüksek

enzimin aktivitesi ile ilişkilidir ve kısa zamanda yüksek miktarlarda AA üretilmesine neden olur. ADH1B*2 allelinin görülme sıklığı Asyalı popülasyonlarda diğer toplumlardan daha fazladır. Ayrıca, ADH1C*1 homozigotlarda hepatoselüler karsinoma riskinin de 3.6 kat arttığı gösterilmiştir (63).

ALDH2 geninin ise ALDH2*1 ve ALDH2*2 olmak üzere iki alleli vardır. ALDH2*2 alleli enzimin inaktif formu ile ilişkilidir ve vücutta yüksek miktarda AA birikmesine sebep olmaktadır (Şekil 2.5). ALDH2*2 allelinin sıklığı beyaz ırkta fazladır. Asyalı popülasyonlarda ise bu allelin sıklığı homozigot formda % 10, heterozigot formda ise %40'dır (143). Japon popülasyonunda düşük ALDH aktivitesinin üst aero-gastrointestinal kanser riskini arttırdığı gösterilmiştir (143).



Şekil 2.5 Etanolün normal metabolizması ve Aldehit dehidrojenaz (ALDH2) *2 genotipi varlığında asetaldehit birikimi

2.4. Alkol, AA ve karsinojenez ilişkisi

Alkol ve AA'nın bir karsinojen olarak davranabildiği çeşitli deney hayvanı modellerinde gösterilmiştir (13, 62, 95, 155, 158). Alkol ve AA, özellikle üst aero-gastrointestinal sistem kanserlerin patogeneğinde önem kazanmaktadır. Bu etkiler:

- AA-protein "addukt"ların oluşumu,
- Artmış oksidatif stres,
- Bağırsak kaynaklı endotoksinler tarafından Kupffer hücrelerinin indüksiyonu ve TNF α salgılanması,
- DNA metilasyonunun inhibisyonu,
- Hücre diferensiyasyonunda önemli olan retinol metabolizmasında bozulma ile gösterir.

Demirin de bağımsız veya sinerjik bir mekanizmayla AA'nın toksik etkilerini arttırdığı ileri sürülmektedir (17, 75). AA, DNA ile direkt olarak etkileşerek de mutajenik etki gösterir

ve nokta mutasyonlarından yaygın kromozomal hasara kadar değişen lezyonlara sebep olur. Örneğin AA ile indüklenen hipoksantin guanin fosforibozin transferaz 1 (HPRT1) enzimini kodlayan gendeki nokta mutasyonlar DNA sentezini, DNA tamir mekanizmalarını (özellikle de nükleotid eksizyon tamiri), DNA stabilitesini ve bütünlüğünü sürdüren “eksizyon-tamir” süreçlerini bozar (20). Ek olarak “*sister chromatid exchange*”i indükleyerek DNA hasarına yol açar (20). Bu mutajenik etkilerin her biri kanser oluşturan yollarını aktifleyebilir veya siroza götüren karaciğer hasarına katkıda bulunabilir.

2.5. Alkol ve AA adduktlarının karsinojenezdeki indirekt etkileri

AA proteinlerle, lipitlerle ve DNA ile adduktlar oluşturarak hücre fonksiyonlarını ve gen ekspresyonunu bozar (142, 158)(Şekil 2.6)(Tablo 2.1).

1) AA-protein adduktları: AA, lizinin ϵ -amino veya proteinlerin N-terminalindeki amino grupları ile etkileşerek protein adduktlarını oluşturur. Bu stabil adduktlar, enzimler dahil pek çok proteinin yapı ve fonksiyonlarını etkiler (49). Örneğin, O⁶-metilguanin metiltransferaz ile oluşan adduktlar DNA tamirinde bozukluğa neden olur ve karsinojeneze aracılık eder (27). AA için diğer hedef proteinler tubulin, kollajen, ketosteroid redüktaz, CYP2E1 ve koagülasyon faktörleridir. AA'nın glutatyon (GSH)'a bağlanması GSH'm radikal toplayıcı fonksiyonunu bozar, oksidatif stres gelişir ve lipit peroksidasyonunda artışa yol açar.

2) AA-DNA adduktları: AA, DNA ile de adduktlar oluşturmaktadır. En çok rastlanılan N²-etildeoksiguanosin (N²-Et-dG)'dir. N²-Et-dG, alkole maruz kalan farelerin karaciğerinde, alkolik bireylerin lökositlerinde (143), ALDH2 genotipli kişilerde ve alkol ile ilişkili baş-boyun kanserlerinde yüksek bulunmuştur (9, 97, 107). Stabil bir molekül olan N²-Et-dG alkol bağımlılığının bir göstergesi olarak da kullanılmaktadır. Başka bir AA-DNA adduktu olan 1,N(2)-propano-2'-deoksiguanozin (PdG), çapraz bağlar oluşturarak DNA da sekonder lezyonlara neden olur. Böylece DNA replikasyonunu bozarak hücre ölümüne yol açar (20). Ayrıca, AA-DNA adduktlarının onkojen ve supresör genlerde replikasyon hataları oluşturarak karsinojenezi başlattığı bildirilmiştir.

3) Lipit peroksidasyonu adduktları: Lipit peroksidasyonu alkol ile indüklenen karsinojenezde en önemli mediatördür. Alkolün mutajenik etkileri CYP2E1'in indüksiyonu ile yürütülür (92, 143). Bu indüksiyon ROS oluşumunda artış ile birlikte ve oksidatif stres ile hücre ölümüne yol açar. Süperoksit ve hidroksietil radikali dahil ROS'lar oldukça aktif olup lipitler, proteinler ve DNA ile adduktlar oluşturur (20, 92, 158). CYP2E1 enzimin aktivasyonu sonucu oluşan H₂O₂ de demir gibi metal iyonlar ile reaksiyona girerek hidroksil

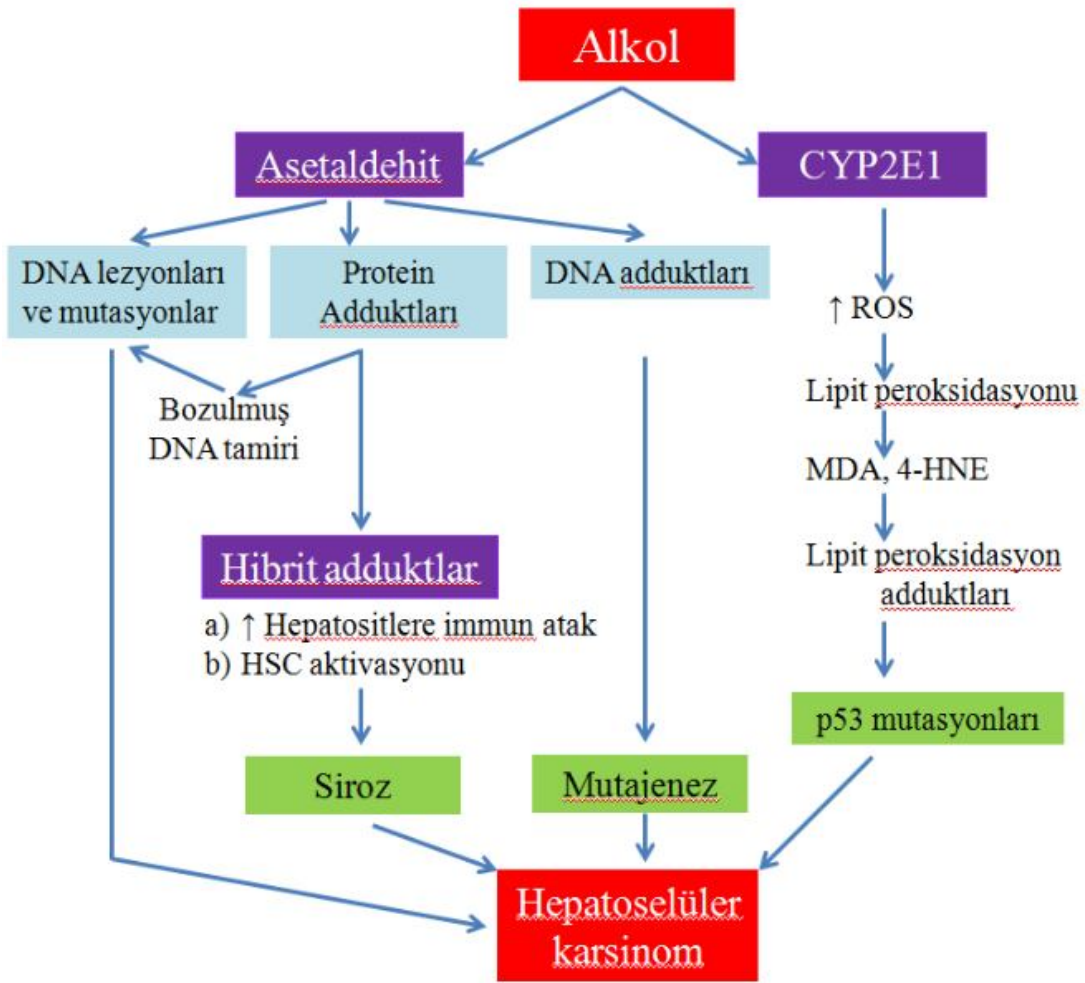
radikal oluşturur (20, 24). Kronik alkol alımı karaciğerde demir birikimini artırır ve CYP2E1 ile H₂O₂ oluşumunda artışa neden olur (5, 144). Bu olaylar sinerjik etki ile alkol ile indüklenen karaciğer hasarını artırır. ROS, malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi lipid ürünlerinde artışa neden olur. Bunlar alkoliklerde oral skuamöz hücre karsinomu veya lökoplakide'de yoğun CYP2E1 immunoreaktivite ile birlikte. MDA ve 4-HNE ekzosiklik DNA adduktları oluşturmak üzere DNA bazları ile reaksiyona girer. MDA deoksi-guanozin ile, 4-HNE ise deoksiadenozin ve deoksisitidin ile reaksiyona girer (143, 144). Oluşan adduktlar (EdA, EdC) kronik alkol ile ilişkili karaciğer hasarının patojenezinde önemlidir (110, 159). Ek olarak, gerek EdA ve gerekse EdC oldukça mutajeniktir ve p53 geninde mutasyonlara sebep olabilir (143).

4) Hibrid adduktları: AA gibi hücrelerde oluşan çeşitli aldehytler hibrid adduktları oluşturmak üzere birbirleriyle reaksiyona girerler. Örneğin MDA-AA-protein adduktları (MAA hibrid adduktu) MDA-protein ve AA-protein adduktlarının kombinasyonu sonucu oluşur. Hibrid adduktlar oluşturdukları adduktlar ile sinerjik etki gösterir ve karsinogenezi indükler (76, 156, 159, 160).

Tablo 2.1: Doku hasarı mekanizması, etanol, asetaldehit ve lipit peroksidasyon ürünleri

Bileşik	Hasar/Hastalık	Mekanizma
Etanol	Steatoz	Trigliserit birikimi
	Oksidatif stres	ER Stres, insülin direnci, mitokondriyal işlev bozukluğu; CYP2E1 indüklenmesi
	Siroz	Asetaldehit birikimi
	Karsinojenez	DNA hasarı
Asetaldehit	Protein/Enzim fonksiyon bozukluğu	Protein, DNA ve hibrit addüktların oluşumu
	Oksidatif stres	Lipit peroksidasyon addüktların oluşumu, proinflamatuvar sitokin aktivasyonu, glutatyonun radikal tutucu fonksiyonunun inhibisyonu, ROS üretiminde artış
	Fibrinojenez/Siroz	HSC ve miyofibroblastlarda addüktların oluşumu
	Karsinojenez	DNA'ya bağlanarak mutajenez
	Ateroskleroz	LDL'nin oksidasyonu
	Kardiyomiyopati	Kardiyomiyositlerin kasılma fonksiyonunun bozulması
	Eritrosit makrositozu	Asetaldehit-modifiye eritrosit zar proteinleri
	Anemi ve karaciğerde aşırı demir birikimi	Bağışıklık sistemi aracılığıyla eritrositlerde değişiklikler
Koagülasyon fonksiyon bozukluğu	Trombin, fibrinojen, Faktör II, VII, X, Xa, XIIIa gibi pıhtılaşma faktörlerinde inaktivasyon	
Lipit addüktları (MDA, 4HNE)	Hücre ölümü	Oksidatif/ER stres
	Karaciğer fibrozu/siroz	Kollajen 1 sentezinin indüksiyonu, HSC aktivasyonu ve pro-kollajen negatif geri besleme döngüsünün inhibisyonu
	Karsinojenez	Mutajenez ve p53 gibi tumor supresör genlerinin inhibisyonu
	Ateroskleroz	Modifiye edilmiş proteinlere karşı oto-immün cevap Plakları oluşturan lipoproteinlerin oksidasyonunu

Kısaltmalar: ER stresi, endoplazmik retikulum stresi; CYP2E1, sitokrom P450 2E1; ROS, reaktif oksijen türleri; HSCs, hepatic stellat hücreleri; LDL, düşük yoğunluklu lipoproteinler; MDA, malondialdehit; 4HNE, 4hidroksinonenal



Şekil 2.6 Alkol ve asetaldehitin hepatoselüler karsinom gelişme mekanizması

2.6. AA'nın kardiyovasküler sistem üzerine etkisi

Alkolün aşırı tüketimi ateroskleroz sürecine katkıda bulunur ve kardiyovasküler hastalık riskini artırır. AA ve diğer aldehit adduktları LDL dahil olmak üzere lipitlerin oksidasyonuna yol açarak ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynar. Çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyon ürünlerinden biri olan MDA aterosklerotik plakların bir bileşenidir ve LDL'yi modifiye edebilir. Gerek MDA, gerekse AA apolipoprotein B-100 dahil değişik proteinler ile de reaksiyona girebilir ve endotel hücrelerinden aterosklerozun kritik mediatörleri olan pro-inflamatuar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin oluşumunu ve salgılanmasını sağlar. Aterosklerozun oksitlenmiş LDL'ye karşı oluşturulan rekombinant antikolar ile inhibe edilebildiği gösterilmiştir (154). Aterosklerotik damarlarda hibrit MAA adduktlarının miktarı yüksektir ve MAA'nın pro-inflamatuar özellikleri –MDA'ya benzer şekilde- ateroskleroz sürecini hızlandırır (60).

Preinflamatuar sitokinlerin sentezi ve salgılanmasını artırır. Alkol ayrıca oksitlenmiş LDL'nin köpük hücrelerinde intimal birikimini de arttırmaktadır (118).

AA'nın alkol ile ilişkili kardiyomiyopati patogenezinde de rol oynadığı düşünülmektedir (2, 23, 80, 129). Alkolik kardiyomiyopati tablosu, kardiyomegali, myofibril yapısında değişiklikler, miyokard kontraktilesinde azalma, miyokardial fibroz, artmış hipertansiyon, aritmi ve infarktüs riski ile tanımlanmaktadır. Alkole kıyasla daha aktif olan AA, aktin ve myozin dahil birçok proteine kovalan bağlanarak proteinlerin fonksiyonunu bozar ve miyositlerin kasılma fonksiyonunu baskılar. Deney hayvanı modellerinde miyokard tabakasında AA birikiminin kasılma fonksiyonunu etkilediği (80, 128), eksitasyon-kasılma eşleşmesini bozduğu, sarkoendoplazmik retikülumdan Ca^{2+} salgılanmasını baskıladığı ve oksidatif stresi arttırdığı gösterilmiştir (129). AA oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve protein hasarını da tetikler. Kalp debisinin azalması sonucu kronik pasif kan birikimi (konjesyon) gelişir ve karaciğer hasarı gelişiminde katkıda bulunur.

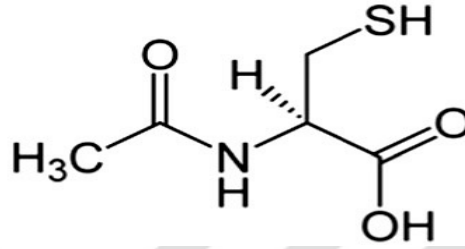
2.7. Beyinde etanol AA metabolizması ve AA'nın beyindeki etkileri

Beyinde etanolü AA'ya metabolize eden ana enzimler katalaz ve CYP2E1'dir (179). *In vitro* çalışmalarda beyinde AA'nın % 60-70'inin katalaz, % 15-20'sinin ise CYP2E1 tarafından oluştuğu bildirilmiştir (25, 179). Kronik alkol kullanımında CYP2E1 indüksiyona uğrar ve etanolün eliminasyonunda önem kazanır (87). CYP2E1, NADPH/ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentazın etkisi ile beyinde ROS ve nitrik oksit birikir (56, 178) ve oksidatif strese neden olur (56; 58; 30; 65; 93). Oksidatif stresin artması ile nöronların canlılığını bozan MDA ile 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi biyoaktif aldehitler oluşur (6, 121, 130) ve hücre içi indirgenmiş GSH düzeyleri azalır (89). 4-HNE oluşumu ile birlikte mitokondrial membranda bulunan kardiopilin yıkılır, membran bütünlüğü ve mitokondrial fonksiyonlar bozulur (120, 133). Mitokondrial membranın geçirgenliği etkilenir, sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesini sağlar ve kaspazların aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümü başlatılır (47, 96, 124, 126).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, AA'nın beyine direkt olarak uygulanmasının alkolün birçok etkisini taklit eden bir tabloya yol açtığı bildirilmiştir. Yüksek doz AA uygulanması uykuya eğilim, koordinasyon ile bellek bozukluklarına neden olurken, düşük doz AA ise bağımlılık yapan ilaçlara özgü stimulasyon ve çeşitli davranışsal etkilere yol açar. Beyin dışında yani periferde AA biriktiğinde kan-beyin engelini kolayca aştığı bilinmektedir.

2.8. N-Asetilsistein (N-Acetylcysteine; NAC) yapısı, metabolizması ve etkileri

NAC, L-sisteinin asetillenmesi ile oluşan bir sülfidrilli bir amino asittir. Sülfidril grubu molekülün metabolik aktivitesini belirlerken asetil grubu ise NAC'ı oksidasyona karşı dirençli kılmaktadır. Sisteinin asetilasyonu arttıkça polaritesi azalır ve dokulara girişi kolaylaşır. NAC ağız yolu ile alındığında barsaklardan hızla emilerek vena porta ile karaciğere ulaşır ve karaciğerde deasetilasyonla sisteine dönüşür (81, 138, 175)



Şekil 2.7 N-Asetilsisteinin yapısı

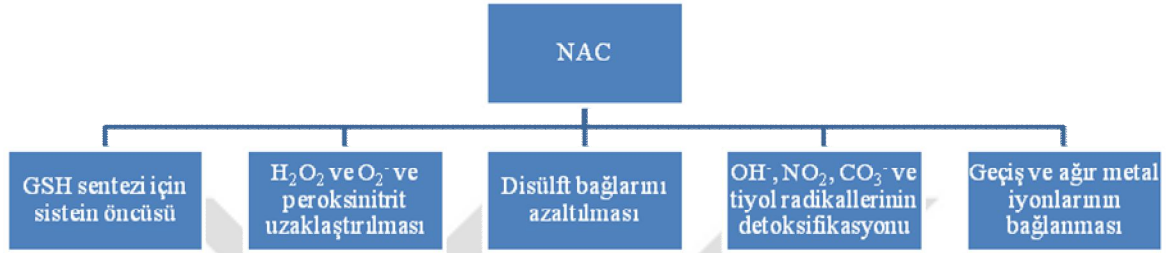
NAC, parasetamol zehirlenmesi, anjina pectoris, doksorubisine bağlı kardiyotoksisite, bronşit, radyokontrast maddelere bağlı nefropati, kardiyak iskemi-reperfüzyon hasarı, ağır metal zehirlenmesi, şizofreni ve bipolar bozukluk gibi psikiyatrik hastalıklar dahil birçok hastalığın tedavisinde yıllardır kullanılmaktadır (4, 73, 81, 138, 175).

NAC antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar, ve immunomodülatör etkilere sahiptir (81, 138, 175). Biyolojik etkinliğinde antioksidan yapısı özellikle önem kazanmaktadır. NAC bu etkisini doğrudan ve dolaylı olarak gerçekleştirebilir. Bir elektron vericisi olarak görev yapan NAC, serbest sülfidril grubu ile hidroksil, karbon trioksit, nitrojen dioksit ve tiyil gibi güçlü oksitleyici radikallerle reaksiyona girer. Ayrıca bakır ve demir gibi metal iyonlarını bağlayarak da etkili olur. NAC antioksidan potansiyelini, bir GSH öncüsü olarak da gösterir. Metabolizmada GSH sentezi için sistein sağlar. GSH'ın oral yoldan emiliminin düşük olması sebebi ile GSH düzeylerini arttırmak için NAC verilmesi GSH'ın kendisinden daha etkili bir yöntemdir. NAC ayrıca, proteinlerde disülfid köprülerini indirgeyerek sülfidril gruplarının korunmasında etkili bir görev yapar (81, 138, 175).

NAC, proinflamatuvar interlökinlerin (IL-6 ve IL-10) düzeylerini azaltıcı özelliği nedeniyle antiinflamatuvar etkiye de sahiptir. Bu etkisinde nükleer faktör kappa B (NF-kB) gibi redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu baskılanması rol oynamaktadır. NAC'ın apoptozisi önlediği ve çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücrenin yaşam sürecini uzattığı ileri sürülmektedir. Bu özellikleri sebebiyle çeşitli deneysel çalışmalarda

NAC'ın inflamasyonun ve oksidatif stresin indüklendiği doku hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (42, 81, 146, 173).

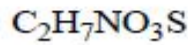
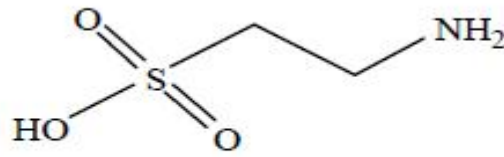
NAC'ın etanol ve AA ile indüklenmiş hücre hasarı sonucu ROS üretimi, mitokondrial membran potansiyeli depolarizasyonu ve kaspaz-3 enzimi aktivasyonu sebebi ile apoptoza gitmesini azalttığı bildirilmiştir (145).



Tablo 2.2 N-Asetilsisteinin antioksidan etkileri

2.9. Taurin yapısı, metabolizması ve etkileri

Taurin protein yapısına katılmayan bir amino asittir. Tiyol içeren amino asitlerden biri olan bu bileşik ilk defa yaklaşık 150 yıl kadar önce sığır safrasından izole edilmiştir (74).



Şekil 2.8 Taurinin yapısı

Taurin esansiyel olmayan amino asit olan sistein veya esansiyel metyoninden sentezlenmektedir. Sistein sırasıyla önce sülfonik aside oksitlenir, sonra dekarboksilasyona uğrayarak hipotaurine dönüşür ve son basamakta hipotaurin bir dehidrojenaz etkisi ile taurin

meydana getirir. Sistein sülfonik asit dekarboksilaz enzimi bu sentez sırasında hız sınırlayıcı basamak olarak görev almaktadır (55, 111).

Taurin hayvansal kökenli besinlerde fazla miktarda bulunurken, bitkisel kökenli besinlerde ise hiç bulunmamaktadır. Taurinin özellikle karaciğer, kalp, çizgili kas ve sinir sistemi gibi dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu gösterilmiştir (55, 111). Taurin organizmada çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonların sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Bunlar arasında safra asitlerinin konjugasyonu, kolesterol ekskresyonu, iyon transportu (Na^+ , Cl^- , Na^+ - Ca^{2+} değiş tokuşu), retina fonksiyonlarının düzenlenmesi, aktif karbonil bileşiklerinin etkisizleştirilmesi (*scavenger*), protein fosforilasyonunun inhibisyonu sayılabilir (55, 103, 111). Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda taurinin karaciğer ve kardiyovasküler sistem üzerine olumlu etkilerine dikkat çekmiştir (55, 111). Sıçanlarda karaciğer yağlanması, akut karaciğer nekrozu ve karaciğer sirozu (10, 44, 96) vakalarında taurinin karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir. Karaciğerin yanı sıra taurinin kalp üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğu da deneysel miyokard infarktüsü (148) ve kalp yetmezliği modellerinde (116) gösterilmiştir. Sıçanlarda taurin depresyonunun oksidatif stresin gelişmesine sebep olduğu (51), kalpte ve çizgili kaslarda yapısal ve fonksiyonel bozukluklar yarattığı ve taurin verilmesi ile bu bozukluklarda düzelmeye gözlemlendiği bildirilmiştir (55, 111). Taurinin oksidatif stresi azaltıcı/radikal toplayıcı özelliğinin (1, 55, 111) yanısıra, antiapoptotik (115, 168) ve endoplazmik retikulum stresini (68, 176) azaltıcı etkilerinin olduğu da bildirilmiştir. Terapötik olarak uygulandığında kan-beyin bariyerini geçebilmektedir (101).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

1. Hassas terazi (A&R HR-120)
2. Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı (IKA-Werke MSC basic C)
3. Pipet takımı (Eppendorf)
4. Masaüstü soğutmalı santrifüj (Heraeus Instruments Megafuge 1.0 R)
5. Mikrosantrifüj (Hettich Mikro 24-48 R ve Heraeus Biofuge Pico)
6. Homojenizatör (Janke & Kunkel Ika Labortechnik Ultra-Turrax T25)
7. pH metre (Hanna HI 9321)
8. Spektrofotometre (Pharmacia Ultrospec 3000 ve Shimadzu UV 1800)
9. Sıcak su banyosu (Elektromag)
10. Vorteks (Elektromag M 16)
11. ELISA mikropłaka yıkayıcı (BioTek Instruments ELx50)
12. ELISA mikropłaka çalkalayıcı (IKA-Werke OS 5)
13. ELISA mikropłaka okuyucusu (BioTek Instruments μ Quant ve Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL)
14. Saf su cihazı (Millipore)
15. Doku homojenizatörü (Roche Diagnostics MagNA Lyser)
16. Santrifüj (Thermo Scientific Micro CL 21R)

3.2. Çalışma protokolü

Projemizde kullanılan AA, NAC, TAU ve diğer kimyasal maddeler Sigma-Aldrich (USA) firmasından sağlandı. Kullanılan AA, suya karıştırılarak verildi, sular 2-3 günde bir düzenli olarak yenilendi.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) tarafından sağlanan 240-260 g ağırlığında Sprague Dawley soyu erkek sıçanlar kullanıldı ve aşağıdaki şekilde gruplara ayrıldı.

- a) Kontrol grubu (n=8): Sıçanlar normal sıçan yemi ile beslendi.

b) AA grubu (n=8): Sıçanlarda AA içme suyunda kademeli olarak arttırılarak uygulandı. Bu çerçevede sıçanlar ilk 4 ay 7 ml/L=5.5 g/kg (10,11,31), mütakip 2 ay süresince 10.5 ml/L= 8.25 g/kg ve daha sonraki 2 ay süresince 14 ml/L= 11 g/kg AA içeren içme suyu verildi. Bu sıçanlar normal yem ile beslendi.

c) AA+NAC grubu (n=8): Bir önceki bölümde belirtildiği gibi 8 ay süre ile içme suyunda AA uygulanan sıçanlar NAC (10 g/kg) içeren yem ile beslendi.

d) AA+TAU grubu (n= 8): Bir önceki bölümde belirtildiği gibi 8 ay süre ile içme suyunda AA uygulanan sıçanlar TAU (25 g/kg) içeren yem ile beslendi.

Bu uygulamalara 8 ay süreyle devam edildi. Bu süreçte hayvanların içme suyu ve gıda tüketimleri ile vücut ağırlıkları izlendi. Buna göre sıçanların günlük AA tüketimlerinin sırası ile ilk 4 ay 400 mg/kg, sonraki 2 ayda 600 mg/kg ve son 2 ayda 800 mg/kg olduğu hesaplandı. Aynı süreçte günlük NAC miktarı 800 mg/kg ve TAU miktarı 2 g/kg olarak belirlendi.

Sıçanlar uygulamanın bitiminde bir gece aç bırakılıp sodyum pentobarbital (50 mg/kg vücut ağırlığı) anestezisi altında kalplerinden kan alınarak öldürüldü. Karaciğer, kalp ve beyin dokuları hızla çıkarılıp % 0.9 NaCl çözeltisi ile yıkandı ve sıvı azot içinde dondurularak yöntemler çalışılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Kuru tüplere alınan kanlar 1500 xg'de santrifuj edilerek serumları ayrıldı.

3.3. Serumda/plazmada yapılan incelemeler

Serumda alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktiviteleri İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Merkez laboratuvarında Roche otoanalizöründe ölçüldü.

3.4. Karaciğerde, kalp ve beyinde yapılan incelemeler

İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D.'da yapıldı

3.5.1. Doku homojenatlarının hazırlanması ve postmitokondri fraksiyonunun eldesi

İşlem: Karaciğer dokuları tartıldıktan sonra doku homojenizatörü ile soğuk 0.15 M KCl çözeltisi ile homojenize edildi ve %10'luk homojenatlar (w/v) hazırlandı. Doku homojenatları +4 °C soğuk santrifujde 600 xg'de 10 dk santrifuj edilerek, bütün halde kalan doku parçaları ve nükleer fraksiyon uzaklaştırıldı. Süpernatantlar deneyler sırasında kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

Karaciğer ve beyin süpernatantlarında ROS, MDA, dien konjugat (DK), protein karbonil (PK), antioksidan aktivite (*ferric reducing antioxidant power: FRAP*) ve GSH düzeyleri ölçüldü. GSH-Px ve SOD aktiviteleri bu süpernatantın 10000 xg'de 20 dk santrifüj edilmesi ile elde edilen postmitokondri fraksiyonunda tayin edildi. Kalp dokusunda ise ROS ve FRAP tayini yapıldı.

3.5.2. ROS tayini (91, 166)

2,7-diklorodihydrofloresein diasetat (DCFH-DA)'ın doku esterazları ile 2,7-diklorodihydrofloresein (DCFH)'e dönüşmesi ve oluşan bu ürünün ortamdaki ROS tarafından floresan ışığa veren 2,7-diklorofloresein (DCF)'e oksitlenmesi prensibine dayanır.

Ayırıcılar:

- DCFH-DA: %99'luk DMSO içerisinde 5 mM'lık stok çözeltisi hazırlanarak -20 °C'de saklandı. Çalışma öncesi 1 mM olacak şekilde PBS ile sulandırılmış.
- Tamponlanmış tuzlu su (PBS; pH 7.4)

İşlem: Tüp içerisinde 0.2 mL karaciğer homojenatı ve 0.02 mL 1mM'lık DCFH-DA karıştırıldı ve çalkalayıcı su banyosunda 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Bir başka tüpte deney körü olarak kullanılmak amacıyla aynı miktar homojenat aynı koşullarda PBS içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde deney körü ile deney tüplerinden alınan 0.2 mL örnek, ışıktan korunmak suretiyle renkli mikropilaka kuyucuklarına pipetlendi. Örnekler zaman kaybetmeden florometrik mikropilaka okuyucuda (λ eksitasyon: 485 nm, λ emisyon: 538 nm) okundu. Sonuçlar rölatif floresan ünite (RFU) olarak verildi.

3.5.3. MDA tayini (114)

MDA lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. Deney MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu kompleksin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.

Ayırıcılar:

- Butanol/piridin (15:1)
- %20'lik asetik asit (10 N NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı)
- %8.1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS)
- %0.8'lik TBA

- Stok 1,1,33-tetraepoksiopropan (TEP) standardı: 22 mg TEP tartılarak 10 mL'ye distile su ile tamamlandı. Bu stok standardı çalışılmadan önce 1000 kez sulandırılarak 10 nmol/mL'lik çalışma standardı hazırlandı.

İşlem: %10'luk doku homojenatlarından alınan 0.2 mL üzerine 1.5 mL %20'lik asetik asit, 0.2 mL %8.1'lik sodyum dodesil sülfat, 0.6 mL distile su ve 1.5 mL %0.8'lik tiyobarbitürik asit eklendi. Bu karışım kaynar su banyosunda 1 saat inkübasyonun ardından soğutulup üzerine 1 mL distile su ve 5 mL butanol/piridin (15:1) karışımı eklendi. Karışımdan organik faz santrifüj edilerek ayrıldı. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı spektrofotometrede (532 nm) okundu. Standart olarak TEP kullanıldı. Ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=1.56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanan sonuçlar nmol/mg protein olarak tanımlandı.

3.5.4. Doku lipid ekstralarının hazırlanması ve lipid ekstresinde dien konjugat tayini (21)

0.25 mL hacimde %10'luk doku homojenatları ve 3.75 mL kloroform:metanol (2:1) çözeltisi iyice karıştırıldı. Karışım 1 saat süre ile inkübe edildi, 15 dk da bir vortekslendi. İnkübasyon bitiminde filtre kağıdı kullanılarak süzülme son hacimler 4 mL'ye tamamlandı ve ağızları sıkıca kapatılarak deney vaktine kadar $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Her örnek için birer mL lipid ekstresi alınarak azot gazı altında uçuruldu. Kuru kalıntı 2 mL sikloheksan içerisinde yeniden çözüldü. Absorbanslar sikloheksan körüne karşı spektrofotometrede (233nm) okundu.

Ekstinksiyon katsayısı ($2.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanan sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ doku olarak tanımlandı.

3.5.5. PK tayini (131)

Protein karbonil grupları ile 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) verdiği reaksiyonun ürünü olan protein hidrazonların spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Ayıraçlar :

- 2.5 M HCl
- Absolü etanol/etil asetat karışımı (1:1; v/v)
- 10 mM DNPH: 2.5 M HCl'de hazırlandı.

- 6 M guanidin HCl: 57.3 g guanidin 100 mL 20 mM potasyum fosfat tamponunda çözüldü ve derişik HCl ile pH 2.3'e ayarlandı.
- Protein standardı: Sığır albumini 1 mg/mL olacak şekilde guanidin HCl'de çözüldü. 0.25, 0.5 ve 1 mg/mL albümin içeren standartlar kullanılarak standart eğri hazırlandı.

İşlem: Konik tüplerde 0.5 mL homojenat ve 2 mL 10 mM DNPH (2.5 M HCl'de) ayıracı karıştırıldı. Bir başka tüpte deney körü olarak kullanılmak amacıyla 0.5 mL homojenat ve 2 mL 2.5 M HCl karıştırıldı. Tüpler 1 saat karanlıkta inkübe edildi, bu süreçte 15 dk da bir vorteksledi. İnkübasyon bitiminde tüplere 2.5 mL % 20'lik trikloroasetik asit (TCA) eklendi, karıştırıldı, 10 dk buzda bekletildi ve 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Çöken protein üzerine 2.5 mL % 10'luk TCA eklenip karıştırıldı, santrifüj edildi ve proteinler çökteldi. Bu protein pellet uygun bir baget yardımıyla 2 mL absolü etanol-etilasetat karışımı ile 3 defa yıkandı. Yıkamanın ardından deney ve kör tüplerdeki protein pelletleri üzerine 1 mL 6 M guanidin-HCl çözeltisi eklendi ve uygun bir baget yardımı ile karıştırılarak çözüldü ve 10 dakika 37 °C'de su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilen karışımın üst fazının absorbansları spektrofotometrede (360 nm) okundu. Ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanan sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi. Tüplerdeki protein konsantrasyonları absorbansların ultraviyole spektrofotometrede (280 nm) okunması ile belirlendi. Sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

3.5.6. GSH tayini (15)

Dokulardaki serbest sülfidril (-SH) gruplarının Ellman ayıracı (5,5'- ditiobis-2 nitro benzoik asit; DTNB) tarafından indirgenmesi sonucunda, 1 mol -SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiyobenzoik asit oluşmaktadır. Deney oluşan sarı rengin absorbansın spektrofotometrik (412 nm) olarak okunması esasına dayanır.

Ayıraçlar:

- Ellman Renk Ayıracı: 4 mg DTNB 10 mL %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.
- Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA ve 30 g NaCl 100 mL distile suda çözüldü.
- 0.3 M Na_2HPO_4 : 4.26 g Na_2HPO_4 100 mL distile suda çözüldü.

- GSH standardı: (0.1 mg/mL)

İşlem: Deney tüpüne konulan 0.2 mL homojenat, 0.6 mL 0.15 M KCl ve 1.2 mL proteinsizleştirme çözeltisi, karıştırıldıktan sonra 13000 xg'de +4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Standartları ve ayıraç körünü içeren tüplere de aynı işlemler uygulandı. Santrifüj işlemi ardından elde edilen supernatanlar mikrolaka kuyucuklarına 0.05 mL olacak şekilde pipetlendi ve üzerlerine 0.2 mL 0.3 M Na₂HPO₄ ve 0.05 mL Ellman ayıraç eklendi ve oluşan renklerin absorbansı spektrofotometrik (412 nm) olarak ayıraç körüne karşı okundu. Ekstinksiyon katsayısı 13.6x10³ M⁻¹ cm⁻¹ ve standartlar kullanılarak hesaplanan sonuçlar nmol/mg protein olarak tanımlandı.

3.5.7. FRAP tayini (14)

+3 değerlikli demir (Fe⁺³) iyonlarını +2 değerlikli demir (Fe⁺²) iyonlarına indirgeyen antioksidan gücün ölçülmesi esasına dayanır.

Ayıraçlar:

- 10 mM 2,4,6-tripridil-s-triazin (TPTZ): 312.33 mg TPTZ tartıldı ve 100 mL 40 mM HCl'de eritildi.
- 20 mM FeCl₃.6H₂O: 540 mg FeCl₃.6H₂O tartıldı. Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- 40 mM HCl
- 300 mM Asetat tamponu (pH 3.6): 3.1 g Na-asetat.3H₂O ile 16 mL asetik asit karıştırıldı ve 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. pH 3.6'ya ayarlandı ve 10 kat sulandırıldı.
- FRAP ayıraç: Sırası ile asetat tamponu, TPTZ ve FeCl₃ ayıraçları 10:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.
- Askorbik asit standartları: 500 ve 1000 µM (sudaki çözeltileri)

İşlem: Mikrolaka kuyucuklarına pipetlenen 0.01 mL karaciğer homojenatı ve 0.2 mL FRAP çalışma ayıraç karışımı, 37 °C'de 4 dk inkübe edildikten sonra absorbanslar mikrolaka okuyucuda 593 nm'de okundu. Çalışma standartları 0.01 mL askorbik asit (500 ve 1000 µM) ve 0.2 mL FRAP karıştırılarak hazırlandı. 1 mM askorbik asidin FRAP değeri 2000 kabulü ile sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

3.4.8. SOD tayini (106)

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği spektrofotometrik olarak ölçülür. Riboflavin floresans ışığı etkisiyle süperoksit radikali oluşumunu sağlar ve bu radikaller ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksite dönüşür. Oluşan hidrojen peroksit o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturur. SOD aktivitesi ile renkli ürün oluşumu doğru orantılıdır. Oluşan renklerin absorbansı spektrofotometrik (460 nm) olarak okundu.

Ayıracılar:

- 0.1 mM EDTA içeren 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7.8)
- 0.2 mM riboflavin: 7.3 mg riboflavin 100 mL 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5)' de çözüldü.
- 6 mM o-dianisidin: 19 mg o-dianisidin 10 mL distile suda çözüldü.
- SOD (100 IU/mL) standardı: 100 IU/mL olacak şekilde soğuk distile su ile hazırlandı. Daha sonra bu ana standarttan 0.1 ve 0.05 mL alınarak 10 ve 5 IU'luk SOD standardı hazırlandı.

İşlem: Kör, standart ve deney tüplerine sırası ile 2.6 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.8), 0.1 mL o-dianisidin ilave edildi. Kör tüpüne 0.1 mL distile su; standart tüpüne 0.1 mL standart; deney tüpüne 0.1 mL postmitokondri fraksiyonu eklendi ve her tüpe 30 sn ara ile 0.2 mL riboflavin kondu, karıştırıldı ve 460 nm'deki absorbans değerleri okundu. Tüpler 20W floresans lambanın olduğu 37 °C'ye ayarlanmış özel bir sisteme yerleştirildi ve 8 dk süre ile floresans ışık altında inkübe edildi. İnkübasyonun bitiminde tüplerin absorbansı tekrar 460 nm'de okundu ve iki absorbans arasındaki fark alındı. Deney körü ve standartlara da aynı işlem uygulandı. Sonuçlar $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak verildi.

3.4.9. GSH-Px tayini (117)

GSH-Px aktivitesinin tayini için iki reaksiyon izlenir. İlk reaksiyonda H_2O_2 veya organik hidroperoksitler (ROOH), GSH-Px etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH oksitlenmiş GSH'a (GSSG) dönüşür. İkinci reaksiyonda GSSG, GSH- redüktaz (GSH-R) etkisi ile tekrar GSH'a, NADPH ise NADP^+ 'ye oksitlenmektedir. Bu dönüşüm 340 nm'de absorbansda azalma olarak izlenir.

GSH-Px aktivitesi, 1 mL'lik hacimde son konsantrasyonlar 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM sodyum azid, 1 mM EDTA, 0.2 mM NADPH, 0.5 IU/mL glutatyon redüktaz, 1 mM GSH, 1.2 mM kümen hidroperoksit olacak şekilde ve farklı oranlarda sulandırılmış post mitokondri fraksiyonu eklenerek hazırlanmış ortamda tayin edilmiştir.

Ayrıçlar:

- Tampon çözelti: 20 mL potasyum fosfat tamponu (125 mM, pH 7.0), 2.5 mL sodyum azid (130 mg/dL), 2.5 mL Na₂-EDTA (744 mg/dl), GSH (15.3 mg/5 mL) ve 5 mL NADPH (8.3 mg/5 mL)
- Glutatyon redüktaz (0.5 IU/mL)
- 12 mM kümen hidroperoksit

İşlem: Spektrofotometre küvetlerine konulan 0.7 mL havuz üzerine 0.1 mL GSH-Redüktaz (0.5 IU) ve 0.1 mL 40 kez sulu karaciğer post mitokondri fraksiyonu eklendi. Ardından 0.1 mL 12 mM kümen hidroperoksit ilavesi ile reaksiyon başlatıldı ve absorbans azalması spektrofotometrede 340 nm'de izlendi. NADPH'in ekstinksiyon katsayısı olan $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'den yararlanılarak hesaplanan sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak verildi.

3.4.10. Protein Tayini (149)

Postmitokondri fraksiyonları ve doku homojenatlarında protein miktarı bişikonik asit metodu ile belirlendi.

Ayrıçlar:

- %4 CuSO₄
- Bişikonik asit
- Protein renklendirme ayırıcı: 10 mL bişikonik asit çözeltisi üzerine 0.2 mL %4 Cu SO₄ ekleyerek hazırlandı.

İşlem: 0.2 mL protein renklendirme ayırıcı üzerine belirli oranda sulandırılmış karaciğer postmitokondri fraksiyonlarından ve homojenatlarından 0.01 mL ilave edildi. Karıştırılıp 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Oda ısısına soğutuldu ve oluşan rengin absorbansı 562 nm'de mikrolaka okuyucusunda okundu.

3.5. İstatistik incelemeler

Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verildi. Grup dağılımları Levene's testiyle saptandı ve ANOVA (post-hoc Tukey) veya Kruskal-Wallis (post-hoc Mann-Whitney U) testi kullanıldı.



4. BULGULAR

Çalışmamızda AA'nın tek başına veya NAC ve taurin ile birlikte uygulanmasının serumda karaciğer fonksiyon testleri ile karaciğer, beyin ve kalp dokularında oksidasyon ürünleri ve antioksidan göstergeler üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla ALT, AST, ROS, MDA, PK, GSH ve FRAP düzeyleri, SOD, DK ve GSH-Px aktiviteleri incelendi.

4.1. Vücut ve organ ağırlıkları

AA, NAC ve TAU uygulaması sonucu final vücut ağırlığı, organ ağırlıklarında bir farklılık gözlenmemiştir.

4.2. Serumda elde edilen bulgular

AA uygulanan sıçanlarda serum ALT ve AST aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Bu enzim aktiviteleri NAC ve TAU uygulamalarından sonra da değişmedi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda ALT ve AST üzerine etkisi (Ortalama \pm SEM; herbir grup için n=8)

	Kontrol	AA	AA+NAC	AA+TAU
ALT (U/L)	53.0 \pm 4.12	51.5 \pm 3.51	50.1 \pm 6.38	46.0 \pm 3.41
AST (U/L)	129.8 \pm 6.41	124.2 \pm 4.41	119.0 \pm 8.41	107.3 \pm 4.29

4.3. Karaciğer dokusunda elde edilen bulgular

AA uygulanan sıçanlarda karaciğerde ROS ve MDA düzeylerinde anlamlı artışlar saptanırken, DK ve PK düzeylerinde bir değişiklik bulunmadı. NAC tedavisi AA uygulanan sıçanların karaciğerinde ROS ve PK düzeylerinde anlamlı azalmalara yol açtı. Buna karşılık, MDA ve DK düzeylerinde bir değişiklik oluşturmadı. TAU tedavisi ise AA uygulanan sıçanların karaciğerinde sadece ROS düzeylerinde anlamlı bir azalmaya yol açtı (Tablo 4.2; Şekil 4.1).

AA uygulaması karaciğer FRAP ve GSH düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. NAC ve TAU uygulamalarından sonra karaciğerde FRAP düzeylerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış bulundu, ancak AA, AA+NAC ve AA+TAU gruplarında bir farklılık göstermediği belirlendi. GSH düzeyleri ise AA uygulanan sıçanlarda NAC ve TAU uygulamalarından sonra anlamlı bir artış gösterdi. Karaciğerde SOD ve GSH-PX aktivitelerinde AA, AA+NAC ve AA+TAU gruplarında anlamlı bir değişiklik bulunmadı. Sadece AA uygulanan sıçanlarda NAC uygulamasından sonra KC SOD aktivitelerinde kontrole göre anlamlı bir artış bulundu (Tablo 4.2; Şekil 4.2).

4.4. Beyinde elde edilen bulgular

AA uygulanan sıçanlarda beyinde ROS ve PK düzeylerinde anlamlı artışlar gözlenirken, DK ve MDA düzeylerinde bir değişiklik bulunmadı. NAC tedavisi AA uygulanan sıçanların beyinde ROS, MDA ve PK düzeylerini azalttı. TAU tedavisi ise AA uygulanan sıçanların beyinlerinde sadece ROS düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtı (Tablo 4.3; Şekil 4.1).

AA uygulaması beyin FRAP ve GSH düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. NAC tedavi ile bir değişiklik olmazken, TAU uygulaması beyin GSH düzeylerinde anlamlı bir artış oluşturdu. Beyin SOD aktivitesi AA, AA+NAC ve AA+TAU gruplarında bir değişiklik göstermedi. AA uygulaması beyinde GSH-Px aktivitesini arttırırken, NAC ve TAU tedavisi artmış olan bu aktiviteyi normale çevirdi (Tablo 4.3; Şekil 4.2).

4.5. Kalpte elde edilen bulgular

AA uygulamasından sonra kalpte ROS düzeylerinde % 27.2 oranında bir artış bulundu. Ancak bu artış istatistik olarak anlamlı bulunmadı. FRAP düzeyleri ise değişmedi. NAC tedavisinden sonra ROS ve FRAP düzeylerinde bir değişiklik olmazken, TAU tedavisi kalp ROS düzeylerinde anlamlı bir azalmaya yol açtı (Tablo 4.4).

Tablo 4.2 N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda karaciğerde reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), dien konjugat (DK), protein karbonil (PK), antioksidan aktivite (ferric reducing activity; FRAP) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SEM; herbir grup için n=8)

	Kontrol	AA	AA+NAC	AA+TAU
ROS (RFU)	391.9 \pm 29.8	647.2 \pm 62.1 ^a	280.1 \pm 26.0 ^{a,b}	306.0 \pm 26.0 ^b
MDA (nmol/g doku)	95.0 \pm 5.51	116.1 \pm 6.5 ^a	97.7 \pm 5.06	98.3 \pm 3.96
DK (μ mol/g doku)	1.64 \pm 0.10	1.76 \pm 0.15	1.48 \pm 0.11	1.70 \pm 0.06
PK (nmol/mg protein)	1.60 \pm 0.07	1.69 \pm 0.22	0.97 \pm 0.07 ^{a,b}	1.44 \pm 0.11
FRAP (nmol/mg protein)	16.8 \pm 1.22	22.0 \pm 1.00	24.0 \pm 1.93 ^a	24.4 \pm 1.9 ^a
GSH (μ mol/g doku)	3.83 \pm 0.15	3.53 \pm 0.19	4.55 \pm 0.27 ^b	4.80 \pm 0.13 ^{a,b}
SOD (U/mg protein)	11.5 \pm 0.54	11.5 \pm 0.54	14.5 \pm 0.96 ^a	11.3 \pm 0.71
GSH-Px (nmol/dk/mg protein)	397.0 \pm 32.0	397.0 \pm 32.0	397.5 \pm 19.9	437.0 \pm 18.7

^ap<0.05 kontrol grubu ile; ^bp<0.05 AA grubu ile karşılaştırıldığında

Tablo 4.3 N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda beyinde reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), dien konjugat (DK), protein karbonil (PK), antioksidan aktivite (ferric reducing activity; FRAP) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SEM; herbir grup için n=8)

	Kontrol	AA	AA+NAC	AA+TAU
ROS (RFU)	1514.5 \pm 80.4	2217.0 \pm 111.1 ^a	1451.6 \pm 97.7 ^b	1438.8 \pm 68.9 ^b
MDA (nmol/g doku)	199.7 \pm 6.6	227.0 \pm 14.3	162.2 \pm 11.4 ^{a,b}	181.3 \pm 20.3
DK (μ mol/g doku)	2.90 \pm 0.1	3.41 \pm 0.21	3.48 \pm 0.17	3.49 \pm 0.14
PK (nmol/mg protein)	1.60 \pm 0.10	2.50 \pm 0.15 ^a	1.84 \pm 0.19 ^b	2.03 \pm 0.20
FRAP(nmol/mg protein)	21.3 \pm 1.95	20.1 \pm 0.86	23.3 \pm 2.58	25.0 \pm 1.50
GSH (μ mol/g doku)	1.75 \pm 0.14	1.64 \pm 0.04	2.10 \pm 0.19	2.46 \pm 0.26 ^b
SOD (U/mg protein)	20.1 \pm 0.34	19.3 \pm 0.38	19.3 \pm 0.77	20.9 \pm 1.16
GSH-Px (nmol/dk/mg protein)	141.0 \pm 12.5	265.4 \pm 28.4 ^a	159.75 \pm 16.1 ^b	123.2 \pm 13.3 ^b

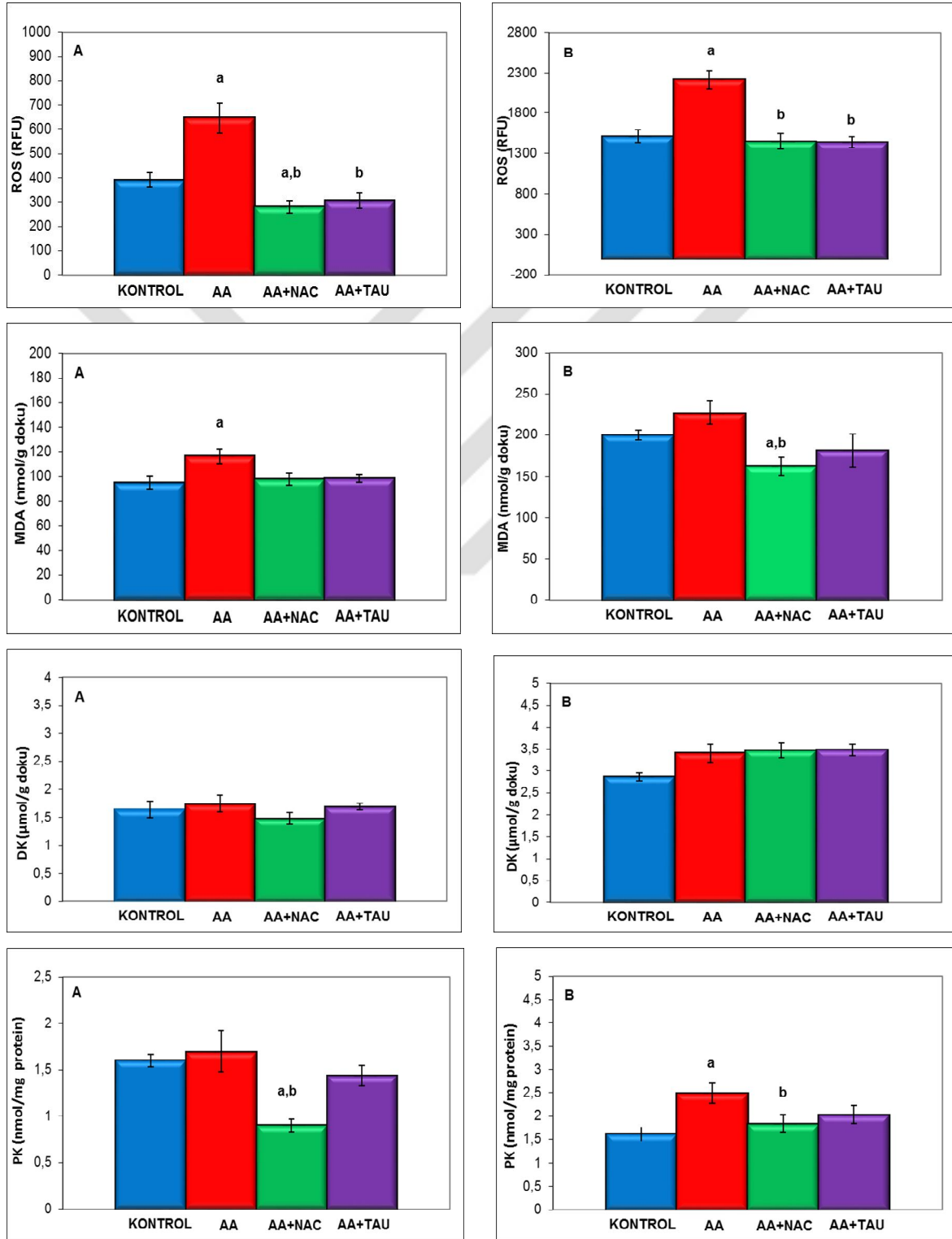
^ap<0.05 kontrol grubu ile; ^bp<0.05 AA grubu ile karşılaştırıldığında

Tablo 4.4 N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda kalpte reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan aktivite (ferric reducing activity; FRAP) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama \pm SEM; herbir grup için n=8)

	Kontrol	AA	AA+NAC	AA+TAU
ROS (RFU)	1086.5 \pm 112.4	1317.1 \pm 98.0	1019.8 \pm 83.0	898.2 \pm 59.7 ^b
FRAP (nmol/mg protein)	12.3 \pm 0.98	13.4 \pm 0.38	14.1 \pm 0.56	12.4 \pm 0.60

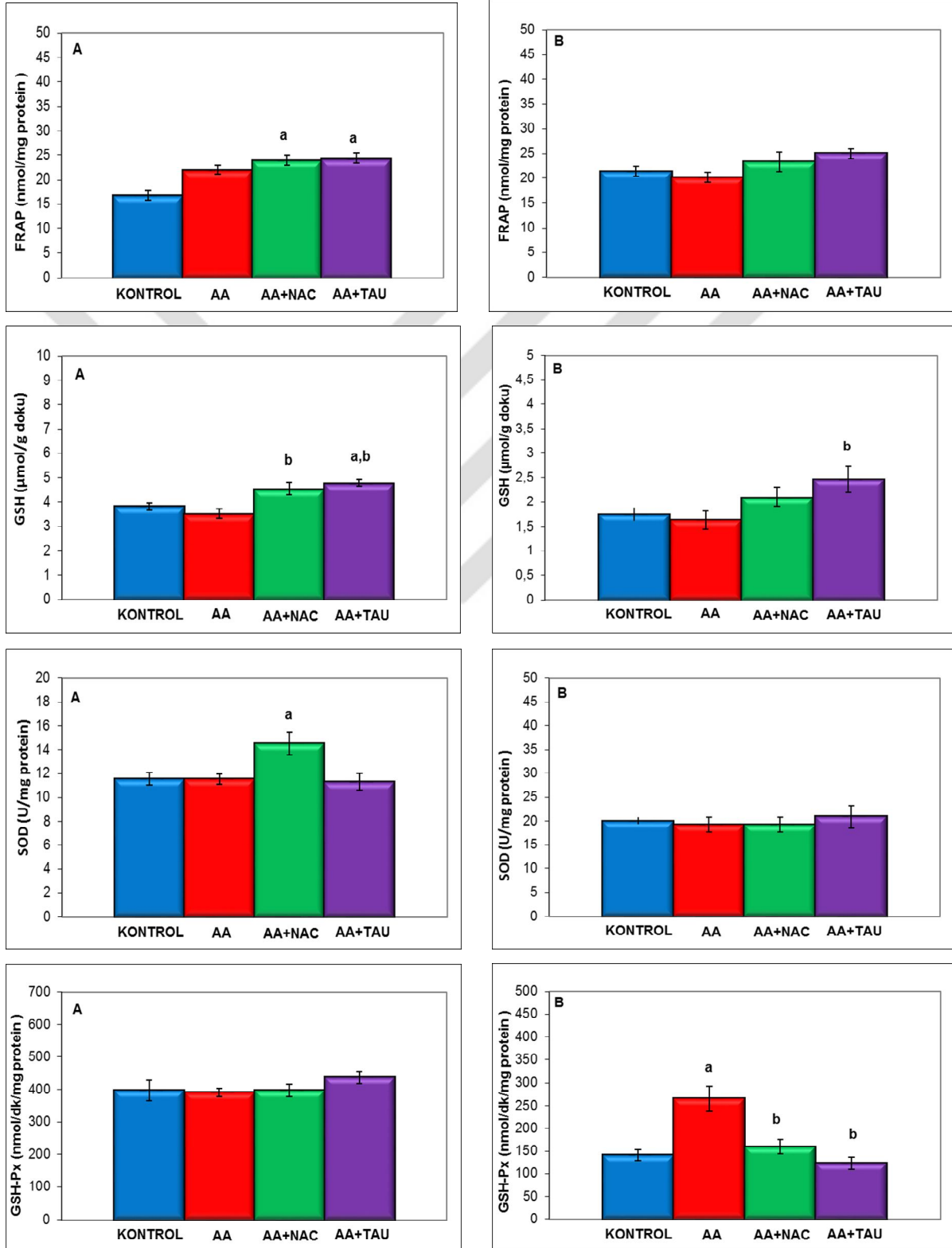
^bp<0.05 AA grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 4.1 N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda karaciğer (A) ve beyin (B) dokularında reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), dien konjugat (DK) ve protein karbonil (PK) düzeyleri üzerine etkisi (ortalama \pm SEM ; herbir grup için n=8)



$P^a < 0.05$ kontrol grubuna göre , $P^b < 0.05$ AA grubuna göre

Şekil 4.2 N-Asetilsistein (NAC) ve taurinin (TAU) asetaldehit (AA) uygulanan sıçanlarda karaciğer (A) ve beyin (B) dokularında antioksidan aktivite (ferric reducing antioxidant power; FRAP), glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz aktivitesi (GSH-Px) üzerine etkisi (Ortalama \pm SEM ; herbir grup için n=8)



$P^a < 0.05$ kontrol grubuna göre , $P^b < 0.05$ AA grubuna göre

5. TARTIŞMA

AA, alkol metabolizması sırasında oluşan ilk üründür. Bazı araştırmacılar AA'nın etanolün farmakolojik ve davranışsal etkilerinin anahtar mediatörü olduğunu ileri sürmektedir. Bu görüşün en radikal taraftarları etanolün bir “prodrug” olduğunu ve etkilerinin ilk metaboliti olan AA'ya bağlı olduğunu ileri sürmektedirler. Bu araştırmacılar alkolizm yerine “asetaldehidizm” teriminin daha uygun olduğunu ifade etmektedirler (125). Öte yandan, diğer bir grup araştırmacı ise alkol tüketiminden sonra kanda ve beyinde AA düzeylerinin herhangi bir farmakolojik ve davranış bozukluğu oluşturabilecek düzeylere ulaşmadığını ileri sürmektedir (35). Bir ara görüş AA'nın alkole benzer farmakolojik ve davranışsal etkiler gösterdiğini ve bu nedenle AA'nın, etanolün bazı etkilerinden sorumlu olabileceğini benimsemektedir (123).

AA'nın oldukça toksik olması nedeniyle insanlarda AA'nın etkisi indirekt yollarla değerlendirilmiştir. Örneğin, ALDH enzim eksikliği olan, AA'yı metabolize edemeyen ALDH2*2 genotipine sahip olan veya ALDH inhibitörü disülfiram kullanan kişilerden alınan bilgiler bu konuda literatüre katkı sağlamıştır (43, 126). Ancak AA ile ilgili çalışmalar genellikle kemiricilerde yapılmıştır. Bu amaçla AA inhalasyon, gavaj veya periton içi yollarla uygulanmıştır (10, 59, 157). Bununla birlikte, AA'nın stabil olmayan yapısı ve hızla metabolize olması nedeniyle, AA ile ilgili çalışmalar bir duraksama göstermiştir. Bunun nedeni AA'nın toksik etkilerini araştırmak için uygun deneysel modeller geliştirilememiş olmasıdır. Bu nedenle daha çok *in vitro* deneyler ile bu konu araştırılmaya çalışılmış ve AA ile çalışmalar 1990'lı yılların sonlarında tekrar hız kazanmıştır (31, 67, 69, 98, 112). Matysiak-Budnik ve ark. (98) içme suyunda AA uygulamasının AA'nın toksik etkilerini incelemek için uygun bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar içme suyu ile AA verildiğinde, gastrointestinal sistemde yoğun bir AA birikiminin olduğunu, bağırsak bakterileri tarafından bir kısmı asetata dönüşse bile, önemli miktarının vena porta yolu ile karaciğere geldiğini ve sistemik dolaşıma katıldığını ve AA'nın karaciğer, beyin ve kalp gibi dokulardaki toksik etkilerini araştırmak için uygun bir yöntem olabileceğini ileri sürmüştür.

Giriş bölümünde belirtildiği gibi, AA'nın karaciğer ve karaciğer dışı dokularda toksik etkisinde çeşitli faktörler rol oynamaktadır (37, 54, 128, 147). Bunlar arasında AA'nın oksidatif stres üzerine etkisi oldukça önemlidir (128, 147). Ancak AA-oksidatif stres ilişkisini araştıran çalışmalar daha çok *in vitro* modellerde veya etanol ile birlikte ALDH inhibitörleri verilen deney hayvanlarında (104, 152, 153) ve transgenik sıçanlarda (2) yapılmıştır. Bu

çalışmalarda AA'nın lipit peroksidasyonunu arttırıcı etkisinin etanolden daha fazla olduğu belirlenmiştir (104, 152, 153). Bununla birlikte, in vivo çalışmalar son derece kısıtlıdır. LD₅₀ dozları karşılaştırıldığında, AA'nın etanolden 10-30 kez daha toksik olduğu bildirilmiştir (19). Etanol ve AA'nın karaciğerde lipit peroksidasyonu üzerine etkisini karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada, etanol (5 g/kg; i.p) veya AA (500 mg/kg; i.p) uygulamasından sonra mitokondri ve mikrozoim fraksiyonlarında lipit peroksit düzeylerinin arttığı, AA'nın etanole benzer bir etki gösterdiği, ancak mitokondri fraksiyonunda daha etkili olduğu gösterilmiştir (162). Gerçekten, Videla ve ark (164) da AA (0.3 g/kg; p.o) uygulanan sıçanlarda karaciğerde lipit peroksit düzeylerinin arttığını bulmuşlardır. Bununla birlikte, etanol (5 g/kg/gün; p.o.) ve AA (0.5 g/kg/gün; p.o) kronik olarak 6 hafta süreyle uygulandığında karaciğer homojenatlarında, mitokondri ve mikrozoim fraksiyonunda lipit peroksit ve karaciğer homojenatlarında GSH düzeylerinin değişmediği bulunmuştur (77). Farbiszewski ve ark (46) ise 4 hafta süre ile AA (0.25 g/kg/gün; p.o.) uygulanan sıçanlarda serumda ALT, AST ve γ -glutamil transpeptidaz aktivitesinin arttığını, plazma, karaciğer ve beyinde protein bağlı ve serbest sülfidril gruplarının azaldığını saptamışlardır.

Çalışmamızda Matysiak-Budnik ve ark. (98) tarafından önerilen yöntemle benzer bir uygulama ile sıçanlara içme suyunda AA uygulandı. Bu uygulamada AA dozu (400-800 mg/kg/gün) kademeli bir biçimde arttırılarak 8 ay gibi uzun bir süre boyunca uygulandı. AA içeren su kapları soğukta saklanarak ve 2-3 günde bir değiştirilerek, AA'nın evaporasyonu engellendi. Gerçekten, benzer bir uygulamada, AA içeren içme suyu kaplarında yapılan ölçümlerde AA kaybının olmadığı bildirilmiştir (69, 98). Amacımız kronik AA uygulamasının karaciğer, beyin ve kalpte prooksidan-antioksidan dengelyi etkileme potansiyelini araştırmaktır.

Organizmada serbest radikallerin artışı oksidatif stres olarak tanımlanır ve bu radikallerin önemli bir bölümü oksijen kaynaklıdır. Bu radikaller içinde en aktif olan hidroksil radikalidir (HO \cdot). Oksijen dışında azot, karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır (161, 163). ROS tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilir ve lipit, protein ve nükleik asitler gibi makromoleküllere zarar verebilir. Bu zarar organizmada antioksidanlar olarak tanımlanan bazı tamir sistemleri tarafından engellenmeye çalışılır. Antioksidan sistem yetersiz kalırsa, oksidatif stresin zararlı etkileri ortaya çıkar. Bunlar arasında lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması önem kazanmaktadır. Prooksidan ve antioksidan dengelyi değerlendirmek üzere çeşitli yöntemler kullanılabilir (161). Çalışmamızda ROS ölçümü için kullandığımız yöntem H₂O₂'e özgü olmakla birlikte,

diğer ROS'ları ($\text{HO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{NO}\cdot$ ve ONOO^-) da kapsamakta ve total ROS ölçümü için uygun bir yöntem olarak benimsenmektedir (52). Lipit peroksidasyonunu değerlendirmek için ise iki farklı yöntem kullanılmıştır. Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA tayini lipit peroksidasyonunu belirlemede özgün olmamakla birlikte sıklıkla kullanılan ve bu amaç için yeterli bir yöntemdir (36). DK ise lipit peroksidasyonunun ilk dönemine ait bir gösterge olup membran lipitlerinin kimyasal durumu hakkında fikir vermektedir (39). Protein oksidasyonunu belirlemek için kullandığımız PK tayini ise karbonillenmiş proteinlerin oldukça erken oluşması ve stabil yapısı nedeniyle diğer yöntemlere bazı üstünlükler göstermektedir (32, 53). Çalışmamızda antioksidan sistemi değerlendirmek için ise total antioksidan kapasitenin bir göstergesi olan FRAP ve GSH düzeyleri ile antioksidan enzimlerden SOD ve GSH-Px aktiviteleri ölçüldü. Bulgularımıza göre, karaciğerde ve beyinde ROS oluşumunun arttığı bulundu. Kalpte ROS oluşumunda bir artış olmakla birlikte bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Dokularda lipit ve protein oksidasyon ürünleri incelendiğinde, karaciğerde lipit peroksit, beyinde ise PK düzeylerinde bir artış bulundu. Antioksidan sistem elemanlarında ise belirgin bir değişiklik saptanmadı. Bu sonuçlar üç dokuda da AA etkisiyle prooksidan bir durum geliştiğini göstermektedir.

Birçok araştırmacı tarafından antioksidanların akut ve kronik etanole bağlı toksik etkileri azaltma/engelleme potansiyeli incelenmiştir (16, 71, 83, 132, 134). Bununla birlikte, kronik AA uygulamasından sonra bu yönde in vivo çalışmalar bulunmamaktadır. Bilindiği gibi, NAC ve TAU antioksidan etkilere sahiptir. NAC (4, 79, 90, 138) ve TAU'nun (18, 33, 41, 50, 139, 174) oksidatif stresin indüklendiği koşullarda etkili olduğu, karaciğer, kalp ve beyin üzerinde koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir. NAC (12, 146, 165) ve TAU'nun (11, 38, 103, 172) alkole bağlı toksik etkileri azalttığına ilişkin bazı in vivo çalışmalar bulunmaktadır. Buna karşılık, NAC ve TAU'nun AA toksisitesi üzerine etkinliği in vivo koşulda araştırılmamıştır. Sadece bazı in vitro modellerde NAC'ın AA toksisitesine karşı koruyucu bir etki gösterdiği bildirilmiştir (100, 145). Menegola ve ark (100) AA'nın embriyo kültürlerinde oluşturduğu toksik etkiyi, ortama eklenen NAC ve GSH'nin engellediğini saptamıştır. Seu ve ark (145) ise AA'nın -etanol benzeri bir etki- ile hücre kültürlerinde ROS oluşumunu arttırdığı, mitokondri yapısını bozduğunu, mitokondriden sitozole sitokrom c geçişini arttırdığını, kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptozise yol açtığını, ortama eklenen NAC'ın bu etkileri önlediğini göstermişlerdir. Öte yandan, TAU uygulanan sıçanlarda akut etanol uygulamasıyla kan ve karaciğerde AA düzeylerinde saptanan artışı engellediği bildirilmiştir (167). Ayrıca glikoz, AA ve MDA gibi aldehit karakterindeki bileşiklerle TAU'nun amino grupları arasındaki

bağlantıların proteinlerin oksidasyonuna karşı koruyucu bir etki sağlayabileceği ve bu nedenle TAU'nun aldehit toksisitesinde yararlı bir etkisi olabileceği ileri sürmüştür (113).

Çalışmamızda, NAC uygulamasının karaciğerde ROS ve PK düzeylerinde, beyinde ise ROS, MDA ve PK düzeylerinde anlamlı bir azalma yaptığı bulundu. Kalpte ise ROS düzeylerinde de bir azalma bulundu, ancak istatistik olarak anlamlı değildi. TAU'nun ise AA uygulanan sıçanların karaciğer ve beyin dokularında ROS düzeylerini azalttığı halde, lipit ve protein oksidasyon ürünlerinde bir değişiklik oluşturmadığı saptandı. NAC uygulaması karaciğer GSH düzeylerinde anlamlı bir artış oluştururken, TAU karaciğer ve beyinde GSH düzeylerini arttırdı ve artmış olan beyin GSH-Px aktivitesini azalttı. Bu sonuçlar her iki antioksidanın AA tarafından indüklenen oksidatif stresi azaltmada etkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, kronik AA uygulamasının karaciğer, beyin ve kalp dokularında prooksidan bir durum yarattığını, NAC veya TAU uygulamalarının AA ile uyarılan oksidatif stresi baskılamada yararlı olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Abbasoğlu L, Kalaz EB, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Beneficial effects of taurine and carnosine in experimental ischemia/reperfusion injury in testis. *Pediatr Surg Int* 2012; 28: 1125-1131.
2. Aberle II NS, Ren J. Experimental assessment of the role of acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy. *Biol Proced Online* 2003; 5: 1-12.
3. Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. *Cerebellum* 2007; 6: 308-314.
4. Arica V, Demir İH, Tutanc M, Basarslan F, Arica S, Karcıoğlu M, Öztürk H, Nacar A. N-Acetylcysteine prevents doxorubicine-induced cardiotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32: 655-661.
5. Asare GA, Bronz M, Naidoo V, Kew MC. Synergistic interaction between excess hepatic iron and alcohol ingestion in hepatic mutagenesis. *Toxicology* 2008; 254: 11-18.
6. Augustyniak A, Skrzydlewska. The influence of Lcarnitine supplementation on the antioxidative abilities of serum and the central nervous system of ethanol-induced rats. *Metabolic Brain Disease* 2010; 25: 381-389.
7. Aydın AF, Küskü-Kiraz Z, Doğru-Abbasoğlu S, Güllüoğlu M, Uysal M, Koçak-Toker N. Effect of carnosine against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rat. *Peptides* 2010; 31: 67-71.
8. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Altieri A, Cogliano V. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol* 2007; 8: 292-293.
9. Balbo S, Hashibe M, Gundy S, Brennan P, Canova C, Simonato L. N2-ethyldeoxyguanosine as a potential biomarker for assessing effects of alcohol consumption on DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3026-3032.
10. Balkan J, Doğru-Abbasoğlu S, Kanbağlı Ö, Çevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Taurine has protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. *Human Exp Toxicol* 2001; 20: 251-254.
11. Balkan J, Kanbağlı O, Hatipoğlu A, Küçük M, Cevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 1755-1758.

12. Banerjee P, Jana S, Chakraborty S, Swarnakar S. Inflammation and MMPs in alcohol-induced liver diseases and protective action of antioxidants. *Indian J Biochem Biophys* 2013; 50: 377-386.
13. Barry RE, Williams AJ. Metabolism of ethanol and its consequences for the liver gastrointestinal tract. *Dig Dis* 1988; 6: 194-202.
14. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
15. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-888.
16. Bingül I, Basaran-Kucukgergin C, Aydin AF, Coban J, Dogan-Ekici I, Dogru Abbasoglu S, Uysal M. Betaine treatment decreased oxidative stress, inflammation, and stellate cell activation in rats with alcoholic liver fibrosis. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016 (baskıda)
17. Bonkovsky HL, Lambrecht RW. Iron-induced liver injury. *Clin Liver Dis* 2000; 4: 409-429.
18. Bouckennooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 728-733.
19. Brien JF, Loomis CW. Pharmacology of acetaldehyde. *Can J Physiol Pharmacol*. 1983; 61: 21-22.
20. Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* 2005; 35: 187-193.
21. Buege JA, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310.
22. Burton A. Acetaldehyde links alcohol consumption to cancer. *Nucleic Acid Res* 2005; 33: 3513-3529.
23. Cai L. Alcoholic cardiomyopathy: acetaldehyde, insulin insensitization and ER stress. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44: 979-982.
24. Cederbaum AI. CYP2E1-biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med* 2006; 73: 657-672.
25. Cederbaum AI, Lu Y, Wang X, Wu D. Synergistic toxic interactions between CYP2E1, LPS/TNF α , and JNK/p38 MAP kinase and their implications in alcohol-induced liver injury. *Adv Exp Med Biol* 2015; 815: 145-172.

26. Clemente-Jimenez J M, Mingorance-Cazorla L, Martinez-Rodriguez S, Las HerasVazquez, FJ, Rodriguez-Vico F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2005; 98, 301–308.
27. Collier JD, Bassendine MF, Burt AD, Major GN. Characterisation of the DNA repair enzyme for O(6)-methylguanine in cirrhosis. *J Hepatol* 1996; 25: 158-165.
28. Correa M, Salamone JD, Segovia KN, Pardo M, Longoni R, Spina L, Peana AT, Vinci S, Acquas E. Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent. *Neurosci Biobehave Rev* 2012; 36: 404-430.
29. Crabb DW, Liangpunsakul S. Acetaldehyde generating enzyme systems: roles of alcohol dehydrogenase, CYP2E1 and catalase, and speculations on the role of other enzymes and processes. *Novartis Found Symp* 2007; 285: 4-16.
30. Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol and Alcoholism* 2009; 44: 115–127.
31. Dahchour A, Lallemand F, Ward RJ, De Witte P. Production of reactive oxygen species following acute ethanol or acetaldehyde and its reduction by acamprosate in chronically alcoholized rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 520: 51-58.
32. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
33. Das J, Roy A Sil PC. Mechanism of the protective action of taurine in toxin and drug induced organ pathophysiology and diabetic complications: a review. *Food Funct* 2012; 3: 1251-1264.
34. Dehl AM. Cytokines and the molecular mechanisms of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 1419-1424.
35. Deitrich RA. Acetaldehyde: Deja vu du jour. *Journal of Studies on Alcohol* 2004; 65: 557-572.
36. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15: 316-328.
37. Deng XS, Deitrich RA. Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Curr. Drug Abuse Rev* 2008; 1: 3-8.
38. Devi SL, Anuradha CV. Oxidative and nitrosative stress in experimental rat liver fibrosis: Protective effect of taurine. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010; 29: 104-110.

39. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 200-227.
40. Drake SL, Lopetcharat K, Drake MA. Comparison of two methods to explore consumer preferences for cottage cheese. *J. Dairy Sci* 2009; 92: 5883-5897.
41. El Idrissi A, Shen CH, L'amoreaux WJ. Neuroprotective role of taurine during aging. *Amino Acids* 2013; 45: 735-750.
42. El Midaoui A, Ismael Ma, Lu H, Fantus Ig, De Champlain J, Couture R. Comparative effects of N-Acetyl-L-Cysteine and ramipril on arterial hypertension, insulin resistance, and oxidative stress in chronically glucose-fed rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 752-760.
43. Eriksson CJP. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 15S-32S.
44. Erman F, Balkan J, Çevikbaş U, Koçak-Toker N, Uysal M. Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication. *Amino Acids* 2004; 27: 199-205.
45. Farbiszewski R, Witek A, Skrzydlewska E. N-acetylcysteine or trolox derivative mitigate the toxic effects of methanol on the antioxidant system of rat brain. *Toxicology* 2000; 156: 47-55.
46. Farbiszewski R, Holownia A, Chwiecko M. The changes in sulfhydryl compounds in plasma, liver and brain after acute and chronic ethanol administration in rats. *Drug Alcohol Depend* 1987; 20: 129-133.
47. Farfán Labonne BE, Gutiérrez M, Gómez-Quiroz LE, Konigsberg Fainstein M, Bucio L, Souza V, Flores O, Ortíz V, Hernández E, Kershenobich D, Gutiérrez-Ruiz MC. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. *Cell Biol Toxicol* 2009; 25: 599-609.
48. Feng XM, Larsen TO, Schnurer J. Production of volatile compounds by *Rhizopus oligosporus* during soybean and barley tempeh fermentation. *Int. J. Food Microbiol* 2007; 113: 133-141.
49. Freeman TL, Tuma DJ, Thiele GM, Klassen LW, Worrall S, Niemela O, Parkkila S, Emery PW, Preedy VR. Recent advances in alcohol-induced adduct formation. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1310-1316.

50. Gentile CL, Nivala AM, Gonzales JC, Pfaffenbach KT, Wang D, Wei Y, Jiang H, Orlicky DJ, Petersen DR, Pagliassotti MJ, Maclean KN. Experimental evidence for therapeutic potential of taurine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 301: 1710-1722.
51. Golubnitschaja O, Moenkemann H, Kim K, Mozaffari MS. DNA damage and expression of checkpoint genes p21WAF1/CIP1 and 14-3-3 in taurine-deficient cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 511-517.
52. Gomes A, Fernandes E, Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* 2005; 65: 45-80.
53. Grune T, Catalgol B, Jung T. Protein oxidation and aging. John Willey & Sons, Inc Publ 2013.
54. Guo R, Ren J. Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *Int. J. Environ Res Public Health* 2010; 7: 1285-1301.
55. Hansen SH. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17: 330-346.
56. Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radical Biology and Medicine* 2008; 45: 1542–1550.
57. Hayashi N, George J, Takeuchi M, Fukurama A, Toshikuni N, Ariwasa T, Tsutsumi M. Acetaldehyde-derived advanced glycation end-products promote alcoholic liver disease. *PLoS One*. 2013; 8:e70034.
58. Heap L, Ward RJ, Abiaka C, Dexter D, Lawlor M, Pratt O, Thomson A, Shaw K, Peters T J. The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochemical Pharmacology* 1995; 50: 263-270.
59. Hemminki K. Urinary sulfur containing metabolites after administration of ethanol, acetaldehyde and formaldehyde to rats. *Chem Res Toxicol* 2013; 16:1124-1129.
60. Hill GE, Miller JA, Baxter BT, Klassen LW, Duryee MJ, Tuma DJ, Thiele GM. Association of malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) adducted proteins with atherosclerotic-induced vascular inflammatory injury. *Atherosclerosis* 1998; 141: 107-116.
61. Hoffmann D, Djordjevic MV, Hoffmann I. The changing cigarette. *Preventive Med* 1997; 26: 427-434.
62. Hofmann D, Brunnemann KD, Gori GB. On the carcinogenicity of marijuana smoke. *Rev Adv Phytochem* 1975; 9: 63-81.

63. Homann N, Stickel F, Konig IR, Jacobs A, Junghanns K, Benesova M, Schuppan D, Himsel S, Zuber-Jerger I, Hellerbrand C, Ludwig D, Caselmann WH, Seitz HK. Alcohol dehydrogenase 1C*1 allele is a genetic marker for alcohol-associated cancer in heavy drinkers. *Int J Cancer* 2006; 118: 1998-2002.
64. Huxtable R J. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992; 72: 101–163.
65. Ikonomidou C, Kaindl AM. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 1535-1550.
66. International Agency for Research on Cancer. Acetaldehyde in monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Some monomers, plastic and synthetic elastomers and acrolein 1979; 19: 341-366.
67. Isse T, Oyama T, Matsuno K, Ogawa M, Narai-Suzuki R, Yamaguchi T, Murakami T, Kinaga T, Uchiyama I, Kawamoto T. Paired acute inhalation test reveals that acetaldehyde toxicity is higher in aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice than in wild-type mice. *J Toxicol Sci* 2005; 30: 329-337.
68. Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1488-1499.
69. Jokelainen K, Parkkila S, Salaspuro M, Neimela O. Covalent adducts of proteins with acetaldehyde in liver as a results of acetaldehyde administration in drinking water. *J Hepatol* 2000; 33: 926-932.
70. Jokelainen K, Roine RP, Vaananen H, Fakkila M, Salaspuro M. In vitro acetaldehyde formation by colonic bacteria. *Gut* 1994; 35: 1271-1274.
71. Karaa A, Thompson KJ, McKillop IH, Clemens MG, Schrum LW. S-adenosyl-L-methionine attenuates oxidative stress and hepatic stellate cell activation in an ethanol-LPS-induced fibrotic rat model. *Scock* 2008; 30: 197-205.
72. Karavalakis G, Stournas S, Bakeas E. Light vehicle regulated and unregulated emissions from different biodiesels. *Sci Total Environ* 2009; 407: 3338-3346.
73. Kelly GS. Clinical applications of N-acetyl cysteine. *Altern Med Rev* 1998, 3: 114-127.
74. Kendler BS. Taurine: An overview of its role in preventive medicine. *Prevent Medicine* 1989, 18: 79-100.
75. Kew M C. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2009; 286: 38-43.

76. Kharbanda KK, Todero SL, Shubert KA, Sorrel MF, Tuma D J. Malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct increase secretion of chemokines by rat hepatic stellate cells. *Alcohol* 2011; 25: 123-128
77. Koçak-Toker N, Kutalp G, Özdemirler G, Uysal M. The effect of acute and chronic acetaldehyde treatment on hepatic lipid peroxide levels in rats. *Turk J Med Biol Res* 1990; 117-12032.
78. Kunitoh S, Imaoka S, Hiroi T, Yabusaki Y, Monna T, Funae Y. Acetaldehyde as well as ethanol is metabolized by human CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 527-532.
79. Lai IK, Dhakal K, Gadupudi GS, Li M, Ludewig G, Robertson LW, Olivier AK. N-acetylcysteine (NAC) diminishes the severity of PCB 126-induced fatty liver in male rodents. *Toxicology* 2012; 302: 25-33.
80. Laonigro I, Correale M, Di Biase M, Altomare E. Alcohol abuse and heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 453-462.
81. Lasram MM, El-Golli N, Lamine AJ, Douib IB, Bouzid K, Annabi A, El Fazaa S, Abdelmoula J, Gharbi N. Changes in glucose metabolism and reversion of genes expression in the liver of insulin-resistant rats exposed to malathion. The protective effects of N-acetylcysteine. *Gen Comp Endocrinol* 2015; 215: 88-97.
82. Lauteburg BH, Bilzer M. Mechanism of acetaldehyde hepatotoxicity. *J Hepatol* 1988; 7: 384-390.
83. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.
84. Lieber CS. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1993; 7: 561-608.
85. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34: 9-19.
86. Lieber CS. Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochem Soc Trans* 1988; 16: 241-247.
87. Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998) - a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 991-1007.
88. Liu JQ, Nagata S, Dairi T, Misono H, Shimizu S, Yamada H. The GLY1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific l-threonine aldolase that catalyzes cleavage of l-allo-threonine and l-threonine to glycine. Expression of the gene in *Escherichia coli* and purification and characterization of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 1997; 245, 289-293.

89. Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N, Nakashima I. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* 2000; 113: 635-641.
90. Lu H, Zhang DM, Chen HL, Lin YX, Hang CH, Yin HX, Shi JX. N-acetylcysteine suppresses oxidative stress in experimental rats with subarachnoid hemorrhage. *J Clin Neurosci* 2009; 16: 684-688.
91. Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Cheng W, Zhang ZF, Li MQ. Troxerutin counteracts domoic acid-induced memory deficits in mice by inhibiting CCAAT/enhancer binding protein β -mediated inflammatory response and oxidative stress. *J Immunol* 2013; 190: 3466-3479.
92. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 723-738.
93. Luo J. Mechanisms of ethanol-induced death of cerebellar granule cells. *Cerebellum* 2012; 11: 145-154.
94. Mahr A, Batteux F, Tubiana S, Goulvestre C, Wolff M, Papo T, Vrtovsnik F, Klein I, Iung B, Duval X; IMAGE Study Group. Brief report: prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in infective endocarditis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 1672-1677.
95. Marietta C, Thompson LH, Lamerdin JE, Brooks PJ. Acetaldehyde stimulates FANCD2 monoubiquitination, H2AX phosphorylation, and BRCA1 phosphorylation in human cells in vitro: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Mutat Res* 2009; 664:77-83.
96. Mas MR, Comert B, Oncu K, Vural SA, Akay C, Tasci I, Ozkomur E, Serdar M, Mas N, Alcigir G, Yener N. The effect of taurine treatment on oxidative stress in experimental liver fibrosis. *Hepatol Res* 2004; 28: 207-215
97. Matsuda T, Yabushita H, Kanaly RA, Shibutani S, Yokoyama A. Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 1374-1378.
98. Matysiak-Budnik T, Jokalainen K, Karkkainen P, Makisalo H, Ohsalo J, Salaspuro M. Hepatotoxicity and absorption of extrahepatic acetaldehyde in rats. *J Pathol* 1996; 178: 469-474.
99. McDonough KH. The role of alcohol in the oxidant antioxidant balance in heart. *Front Biosci* 1994; 4: D601-D606.

100. Menegola E, Broccia ML, Prati M, Ricolfi R, Giavini E. Glutathione and N-acetylcysteine protection against acetaldehyde embryotoxicity in rat embryos developing in vitro. *Toxicol In Vitro* 1995; 9: 633-641.
101. Menzi J, Prentice H, Wu J Y. Neuroprotective mechanisms of taurine against ischemic stroke. *Brain Sci* 2013; 3: 877-907.
102. Miyake T, Shibamoto T. Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem* 1993; 41: 1968-1970.
103. Miyazaki T, Matsuzaki Y. Taurine and liver diseases: a focus on the heterogeneous protective properties of taurine. *Amino Acids* 2012; 46: 101-110.
104. Müller A, Sies H. Inhibition of ethanol- and aldehyde-induced release of ethane from isolated perfused rat liver by pargyline and disulfiram. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 1: 429-432.
105. Muñoz D, Peinado RA, Medina M, Moreno J. Biological aging of sherry wines using pure cultures of two flour yeast strains under controlled microaeration. *J. Agric. Food Chem* 2005; 53: 5258-5264.
106. Mylroie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 82: 512-520.
107. Nagayoshi H, Matsumoto A, Nishi R, Kawamoto T, Ichiba M, Matsuda T. Increased formation of gastric N(2)-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase-2 knockout mice treated with ethanol. *Mutat Res* 2009; 673: 74-77.
108. Nakamura K, Iwakashi K, Furukawa A, Ameno K, Kinoshita H, Ijiri I, Sekine Y, Suzuki K, Iwata Y, Minabe Y, Mori N. Acetaldehyde adducts in the brain of alcoholics. *Arch Toxicol* 2003; 77: 591-593.
109. Niemela O. Acetaldehyde adduct in circulation. *Novartis Found Symp* 2007; 285: 183-192.
110. Niemela O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1533-1538.
111. Niittynen L, Nurminen ML, Korpela R, Vapaatalo H. Role of arginine, taurine and homocysteine in cardiovascular diseases. *Ann Med* 1999; 31: 318-326.
112. Novitskiy G, Traore K, Wang L, Trush MA, Mezey E. Effects of ethanol and acetaldehyde on reactive oxygen species production in rat hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30: 1429-1435.

113. Ogasawara M, Nakamura T, Koyama I, Nemoto M, Yoshida T. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. *Adv Exp Med Biol* 1994; 359: 71-78.
114. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
115. Oriyanhan W, Yamazaki K, Miwa S, Takaba K, Ikeda T, Komeda M. Taurine prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis in prolonged hypothermic rat heart preservation. *Heart Vessels* 2005; 20: 278-285.
116. Oudit GY, Trivieri MG, Husain T, Wilson GJ, Liu P, Sole MJ, Backx PH. Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation* 2004; 109: 1877-1885.
117. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
118. Palomo I, Alarcon M, Moore-Carrasco R, Argiles JM. Hemostasis alterations in metabolic syndrome (review). *Int J Mol Med* 2006; 18: 969-974.
119. Pellizari ED, Hartwell TD, Harris BHS. Pugeable organic compounds in mother's milk. *Bul Environ Contam Toxicol* 1982; 28: 322-328.
120. Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Ferri D, Paradies G. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver. Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767: 1260-1267.
121. Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, Minelli R, Dianzani C, Lepore A, Gentile F, Barrera G. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol.* 2013; 4: 242.
122. Potter J J, Mezey E, Acetaldehyde increases endogenous adiponectin and fibrogenesis in hepatic stellate cells but exogenous adiponectin inhibits fibrogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: 2092-2100.
123. Quertemont E, Didone V. Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Res Health* 2006; 29: 258-265.
124. Ramachandran V, Perez A, Chen J, Senthil D, Schenker S, Henderson GI. In utero ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction, which can result in apoptotic cell death in fetal brain: a potential role for 4-hydroxynonenal. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001; 25: 862-871.
125. Raskin N H. Alcoholism or acetaldehydism? *N Engl J Med* 1975; 292: 422-423.

126. Raza H, Joh A. 4-Hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharm* 2006; 216: 309-318.
127. Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes D. Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition* 1998; 14: 599-604.
128. Ren J, Wold LE. Mechanisms of alcoholic heart disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008; 2: 497-506.
129. Ren J. Acetaldehyde and alcoholic cardiomyopathy: lessons from the ADH and ALDH2 transgenic models. *Novartis Found Symp* 2007; 285: 69-76.
130. Rendón-Ramírez, M, Cortés-Couto, A B, Martínez-Rizo S, Múniz-Hernández, Velázquez-Fernández J B. Oxidative damage in young alcohol drinkers: A preliminary study. *Alcohol* 2013; 47: 501–504.
131. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to protein: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357-363.
132. Rong S, Zhao Y, Bao W, Xiao X, Wang D, Nussler AK, Yan H, Yao P, Liu L. Curvumin prevents chronic alcohol-induced liver disease involving decreasing ROS generation and enhancing antioxidative capacity. *Phytomedicine* 2012; 19: 545-550.
133. Rubin E, Rottenberg H. Ethanol-induced injury and adaptation in biological membranes. *Fed Proc* 1982; 41: 2465-2471.
134. Safer AM, Afzal M, Hanafy N, Mousa S. Green tea extract therapy diminishes hepatic fibrosis mediated by dual exposure to carbon tetrachloride and ethanol: A histopathological study. *Exp Ther Med* 2015; 9: 787-794.
135. Salaspuro MP. Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; 40: 183-208.
136. Salaspuro M, Lindros K. Metabolism and toxicity of a acetaldehyde. In: Seitz HK, Kommersell B, eds. *Alcohol Related Diseases in Gastroenterology*. Berlin: Springer-Verlag, 1985; 106-123.
137. Salaspuro M. Interactions of alcohol and tobacco in gastrointestinal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 135-139.
138. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4117-4129.

139. Schaffer SW, Jong CJ, Ramila KC, Azuma J. Physiological roles of taurine in heart and muscle. *J Biomed Sci* 2010; 17: S2.
140. Schuetzle D, Siegl WO, Jensen TE, Dearth MA, Kaiser EW, Gorse R, Kreucher W, Kulik E. The relationship between gasoline composition and vehicle hydrocarbon emissions: a review of current studies and future research needs. *Environ. Health Perspect* 1994; 102: 3-12.
141. Seitz HK, Becker P. Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Res Health* 2007; 30: 38-41.
142. Seitz HK, Meier P. The role of acetaldehyde in upper digestive tract cancer in alcoholics. *Transl Res* 2007; 149: 293-297.
143. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 599-612.
144. Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol Chem* 2006; 387: 349-60.
145. Seo JB, Gowda GAN, Koh, D. Apoptotic Damage of Pancreatic Ductal Epithelia by Alcohol and Its Rescue by an Antioxidant, *PLoS One*. 2013; 8.
146. Setshedi M, Longato L, Petersen DR, Ronis M, Chen WC, Wands JR, de la Monte SM. Limited therapeutic effect of N-acetylcysteine on hepatic insulin resistance in an experimental model of alcohol-induced steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35: 2139-2151.
147. Setshedi M, Wands JR, de la Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3: 178-185.
148. Shiny KS, Kumar SHS, Farvin KHS, Anandan R, Devadasan K. Protective effect of taurine on myocardial antioxidant status in isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 1-5.
149. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson B J, Klenk D C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
150. Soffritti M, Belpoggi F, Lamberti L, Lauriola M, Padovani M, Maltoni C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of formaldehyde and acetaldehyde in rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 982: 87-105.

151. Soukoulkis C, Panagiotidis P, Koureli R, Tzia C. Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. *J. Dairy Sci* 2007; 90: 2641-2654.
152. Stege TE, Hanby JD, Diluzio NR. Acetaldehyde-induced hepatic lipid peroxidation. In *Currents in Alcoholism* 1977; 1: 139.
153. Stege TE. Acetaldehyde-induced hepatic lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1982; 36: 287-297.
154. Ström A, Fredrikson GN, Schioppa A, Ljungcrantz I, Söderberg I, Jansson B, Carlsson R, Hultgårdh-Nilsson A, Nilsson J. Inhibition of injury-induced arterial remodelling and carotid atherosclerosis by recombinant human antibodies against aldehyde-modified apoB-100. *Atherosclerosis* 2007; 190: 298-305.
155. Thiele GM, Klassen LW, Tuma DJ. Formation and immunological properties of aldehyde-derived protein adducts following alcohol consumption. *Methods Mol Biol* 2008; 447: 235-57.
156. Thiele GM, Worrall S, Tuma DJ, Klassen LW, Wyatt TA, Nagata N. The chemistry and biological effects of malondialdehyde-acetaldehyde adducts. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 218S-224S.
157. Til HP, Woutersen RA, Feron VJ. Evaluation of the oral toxicity of acetaldehyde and formaldehyde in a 4-week drinking-water study in rats. *Food Chem Toxicol* 1988; 26: 447-452.
158. Tuma DJ, Casey CA. Dangerous byproducts of alcohol breakdown – focus on adducts. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 285-290.
159. Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 303-308.
160. Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrell MF. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology* 1996; 23: 872-880.
161. Uysal M, Koçak-Toker N, Doğru-Abbasoğlu S, Chapter 27: Carnosine protection against liver injury. *Imidazole Dipeptides: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Ed.: Preedy VR, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2015; pp: 510-527.
162. Uysal M, Özdemirler G, Kutalp G, Öz H. Mitochondrial and microsomal lipid peroxidasyon in rat liver after acute acetaldehyde and ethanol intoxication. *J Appl Toxicol* 1989; 9: 155-158.

163. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.
164. Videla LA, Fernández V, de Marinis A. Liver lipoperoxidative pressure and glutathione status following acetaldehyde and aliphatic alcohols pretreatments in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 104: 965-970.
165. Wang AL, Wang JP, Wang H, Chen YH, Zhao L, Wang LS, Wei W, Xu D X. A dual effect of N-acetylcysteine on acute ethanol-induced liver damage in mice. *Hepatol Res.* 2006; 34: 199-206.
166. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 612-616.
167. Watanabe A, Hobara N, Nagashima H. Lowering of liver acetaldehyde but not ethanol concentrations by pretreatment with taurine in ethanol-loaded rats. *Experientia* 1985; 41: 1421-1422.
168. Waters E, Wang JH, Redmond HP, Wu Q, Kay E, Hayes DB. Role of taurine in preventing acetaminophen-induced hepatic injury in the rat. *J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 1272-1279.
169. Wilkins D, Schmidt RH, Shireman RB, Smith KL, Jeseski JJ. Evaluating acetaldehyde synthesis from l-[14c(u)] threonine by streptococcus thermophilus and lactobacillus bulgaricus. *J. Dairy Sci* 1986; 69: 1219-1224.
170. World Cancer Research Fund; American Institute for Cancer Research Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. AICR: Washington, DC, USA, 2007; 1-14.
171. Wright CE, Tallan HH, Lin YY, Gaull GE. Taurine: biological update. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 427-453.
172. Wu G, Yang J, Sun C, Luan X, Shi J, Hu J. Effect of taurine on alcoholic liver disease in rats. *Adv Exp Med Biol* 2009; 643: 313-22.
173. Xia Z, Guo Z, Nagareddy PR, Yuen V, Yeung E, McNeill JH. Antioxidant N-acetylcysteine restores myocardial Mn-SOD activity and attenuates myocardial dysfunction in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2006; 544: 118-125.
174. Yalçınkaya S, Ünlüçerçi Y, Giriş M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: Protective effect of taurine. *Nutrition* 2009; 25: 436-444.

175. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 6-20.
176. Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ, Kitajima S. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2001; 276: 35867-35874.
177. Zhang X, Li S Y, Brown R A, Ren J. Ethanol and acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy: from bad to ugly en route to oxidative stress. *Alcohol* 2004; 32: 175-186.
178. Zhong Y, Dong G, Luo H, Cao J, Wang C, Wu J, Feng YQ, Yue J. Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem. *Toxicology* 2012; 302: 275-84.
179. Zimatkin SM, Buben AL. A novel method for evaluation of ethanol oxidation in living brain. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142: 382-385.
180. Zimmerman BT, Crawford GD, Dahl R, Simon FR, Mapoles JE. Mechanisms of acetaldehyde-mediated growth inhibition: delayed cell cycle progression and induction of apoptosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 434-440.

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2013/ 45

28 / 03 / 2013

Sn: Prof. Dr. Pervin VURAL
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi

Karar No :2013/ 45

Başvuru :25.03.2013

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Yüksek Lisans Öğrencisi Zeynep YILDIZ**'a ait "Asetaldehidin Karaciğer, Kalp Ve Beyin Gibi Dokularda Toksik Ekilerinin İncelenmesi. N-Asetilsistein Ve Taurinin Koruyucu Etkisi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	78
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		Malzemeler sağlandıktan sonra başlanacak/ Deneysel aşamalar 8 ay içinde tamamlanacak

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İÜ HADYEK Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pinar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof.Dr.Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr.Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Yard.Doç.Dr..Burak OLGUN
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye