

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALÜMİNYUMA MARUZ KALAN BAZI RAT DOKULARININ
ANTIOKSİDAN VE YAĞ ASİT METABOLİZMASI ÜZERİNE 3-BENZOİL-
7- HİDROKSİ KUMARİN BİLEŞİĞİNİN ETKİLERİ**

KENAN TÜRKAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ADYAMAN, 2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ALÜMİNYUMA MARUZ KALAN BAZI RAT DOKULARININ ANTIOKSİDAN VE YAĞ ASİT METABOLİZMASI ÜZERİNE 3- BENZOİL-7-HİDROKSİ KUMARİN BİLEŞİĞİNİN ETKİLERİ

Kenan TÜRKAN

Adıyaman Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA
Yıl : 2021, Sayfa sayısı: IX+49

Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA
Prof. Dr. Erol ASİLTÜRK
Prof. Dr. Adnan KURT

Bu tez çalışmasında, sıçanlarda $AlCl_3$ ile oluşturulan oksidatif strese karşı 3-benzoil-7-hidroksi kumarinin koruyucu etkileri araştırıldı. Çalışmada dört grup oluşturuldu. Bu gruplar; Kontrol grubu (K), Kumarin grubu (C), Alüminyum grubu (A) ve Kumarin+Alüminyum (C+A) grubudur. Kumarin 10 mg/kg ve $AlCl_3$ 8,3 mg/kg günasırı olarak uygulandı. Sıçanların karaciğer ve beyin dokularında MDA, redükte GSH, AChE, GST, Ces, bazı mineraller ve yağ asitleri belirlendi. Karaciğer dokusu biyokimyasal parametreleri incelendiğinde, A grubu Al, Fe, Cu ve MDA düzeyleri artarken GSH, Ces, GST ve Mn düzeyleri azaldı. C+A grubu MDA, Fe, Al ve Cu düzeyleri A grubuna göre azaldı. Ayrıca, C+A grubu GSH ve GST düzeyleri A grubuna göre arttı. Beyin dokusu biyokimyasal parametreleri incelendiğinde, A grubu Al, MDA düzeyleri K grubuna göre arttı. C+A grubu MDA ve Al düzeyi A grubuna göre azaldı. A grubu GSH, Ces, AChE ve GST düzeyi K grubuna göre azaldı. C+A grubu Ces ve AChE enzim aktivite düzeyleri A grubuna göre arttı. Beyin dokusu yağ asit düzeyleri incelendiğinde, A grubu 16:1, 20:4n6 ve 22:6n3 yağ asit düzeylerinin diğer gruplara göre azaldığı gözlemlendi. Ayrıca A grubu PUFA düzeyinin önemli miktarda azaldığı tespit edildi. C+A grubunda ise kumarin maddesinin etkisiyle bu yağ asitlerinin arttığı gözlemlendi. Karaciğer dokusu yağ asit düzeyleri incelendiğinde, A grubu $\sum SFAD$ düzeyinin K grubuna göre nispi oranda artarken, $\sum USFA$ düzeyinin nispi oranda azaldığı gözlemlendi. C+A grubunda ise kumarinin etkisiyle $\sum USFA$ ve PUFA düzeyleri A grubuna göre arttığı gözlemlendi. Sonuç olarak $AlCl_3$ ile oluşturulan oksidatif strese karşı 3-benzoil-7-hidroksi kumarin bileşiğinin antioksidan olarak olumlu etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kumarin; MDA; Mineral; Enzim Aktivitesi, Yağ Asitleri

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECTS OF 3-BENZOYL-7-HYDROXY COUMARIN COMPOUND ON THE ANTIOXIDANT AND FATTY ACID METABOLISM OF SOME RAT TISSUES EXPOSED TO ALUMINUM

Kenan TÜRKAN

Adiyaman University
Graduate Education Institute
Department of Chemistry

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA

Year : 2021, Number of pages: IX+49

Jury : Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA
Prof. Dr. Erol ASILTÜRK
Prof. Dr. Adnan KURT

In this thesis study, the protective effects of 3-benzoyl-7-hydroxy coumarin against oxidative stress induced by $AlCl_3$ in rats were investigated. Four groups were formed in present study. These groups are Control group (K), Coumarin group (C), Aluminum group (A) and Coumarin + Aluminum (C+A) group. Coumarin as 10 mg/kg and $AlCl_3$ as 8.3 mg/kg were applied every other day. MDA, reduced GSH, AChE, GST, Ces, some minerals and fatty acids were determined in the liver and brain tissues of rats. When the biochemical parameters of the liver tissue were examined, the levels of Al, Fe, Cu and MDA in group A increased whereas GSH, Ces, GST and Mn levels decreased. The levels of MDA, Fe, Al and Cu in the C+A group decreased compared to the A group. On the other hand, GSH and GST levels in C+A group increased compared to A group. When the biochemical parameters of the brain tissue were examined, Al and MDA levels of group A increased compared to group K. MDA and Al levels in C+A group decreased compared to A group. GSH, Ces, AChE and GST levels in A group decreased compared to the K group. Ces and AChE enzyme activity levels in C+A group increased compared to A group. When the fatty acid levels of brain tissue were examined, it was observed that 16:1, 20:4n6 and 22:6n3 fatty acid levels in group A decreased compared to the other groups. In addition, PUFA level of group A was found to be significantly decreased. In the C+A group, it was observed that these fatty acids increased with the effect of coumarin. When the fatty acid levels of liver tissue were examined, it was observed that the \sum SFA level of group A increased relative to the group K, while the level of \sum USFA decreased relatively. In the C+A group, it was observed that USFA and PUFA levels increased with the effect of coumarin compared to the A group. As a result, we think that 3-benzoyl-7-hydroxy coumarin compound has positive effects as antioxidant against oxidative stress caused by $AlCl_3$.

Keywords: Coumarin; MDA; Mineral; Enzyme Activity, Fatty Acids

DESTEKLER

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FEFYL/2020-0001 numaralı proje ile desteklenmiştir.



BEYAN

“Alüminyuma Maruz Kalan Bazı Rat Dokularının Antioksidan ve Yağ Asit Metabolizması Üzerine 3-Benzoil-7-Hidroksi Kumarin Bileşiminin Etkileri” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Kenan TÜRKAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin ve bu çalışmanın her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, akademik kişiliğı ve çalışma prensipleri ile bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım Değerli Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA' ya, deneylerdeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Murat KOCA' ya, Prof. Dr. Adnan KURT' a, Dr. Öğr. Üyesi Miraç UÇKUN' a ve Doç.Dr Ertan YOLOĞLU' na teşekkür ederim.

Laboratuvardaki deneylerin yapılmasında yardımcı olan değerli iş arkadaşım Mehmet KARAKUŐ' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım, eğitimin ve daha da önemlisi hayatım boyunca beni anlayış ve hoşgörü ile karşılayan, maddi ve manevi yardımları ile destek olan annem Ümmühan TÜRKAN'a, babam Zülfi TÜRKAN'a, abim Mehmet TÜRKAN'a, kızkardeşim Müzeyyen PEÇİL'e, yengem Halime TÜRKAN'a ve sevgili eşim Aynı Zeliha TÜRKAN'a minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Kenan TÜRKAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT.....	II
DESTEKLER.....	III
BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alüminyumun Alınma Yolları ve Zararları	2
2.2. Kumarinler.....	4
2.3. Redükte Glutasyon.....	6
2.4. Glutasyon-S-Transferaz	7
2.5. Karboksilesteraz Enzimi	7
2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi	8
2.7. Malondialdehit.....	8
2.8. Yağ asitleri.....	9
2.9. Mineraller	9
2.10. Çalışmanın Amacı	11
3. MATERYAL VE METOD	12
3.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler	12
3.2. İnceleme Materyali	12
3.3. Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar	12
3.4. Deney Hayvanları	12
3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	13
3.6. Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri	13
3.7. GSH	14
3.8. GST Aktivitesi.....	14
3.9. MDA.....	14
3.10. Ces Aktivitesi	15
3.11. AChE Aktivitesi	15
3.12. Total Protein Analizi.....	15
3.13. Lipitlerin Ekstraksiyonu	15
3.14. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması	16
3.15. Element Analizi	17
3.16. 3-benzoil-7-hidroksi kumarin molekülünün sentezi	18
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	19
5. BULGULAR.....	20
6. TARTIŞMA	28
KAYNAKLAR	33
KİŞİSEL BİLGİLER	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kumarin çeşitleri ve Farmakolojik aktiviteleri	5
Çizelge 3.1 GC-FID kolon sıcaklık programı	16
Çizelge 3.2 Mikrodalga cihazı çalışma şartları	17
Çizelge 3.3 Standart minerallerin ICP-MS cihazında kalibrasyon değerleri	17
Çizelge 5.1 Karaciğer dokusu mineral düzeyleri (ppm)	20
Çizelge 5.2 Karaciğer dokusu MDA, GSH ve enzim aktivite düzeyleri	21
Çizelge 5.3 Karaciğer dokusu yağ asit düzeyi (%)	22
Çizelge 5.4 Beyin dokusu mineral düzeyleri (ppm).....	24
Çizelge 5.5 Beyin dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri.....	25
Çizelge 5.6 Beyin dokusu yağ asit düzeyi (%)	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 3-benzoil-7-hidroksi kumarin bileşiğinin sentezi 18



SİMGELER VE KISALTMALAR

AChE	: Asetilkolinesteraz
Al	: Alüminyum
AlCl ₃	: Alüminyum Klorür
Al(OH) ₃	: Alüminyum Hidroksit
Ca	: Kalsiyum
Ces	: Karboksilesteraz
Cu	: Bakır
F	: Florür
Fe	: Demir
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-P _x	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
HCl	: Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik Asit
KHCO ₃	: Potasyum Bikarbonat
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Magnezyum
Mn	: Mangan
NaCl	: Sodyum Klorür
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Trikloroasetik Asit
TCA	: Thiobarbiturik Asit
Zn	: Çinko
6:0	: Kaproik Asit
11:0	: Undekanoik Asit
14:0	: Myristik Asit
15:0	: Pentadekanoik Asit
15:1	: Cis-10 Pentadekanoik Asit
16:0	: Palmitik Asit
16:1	: Palmitoleik Asit
18:0	: Stearik Asit
18:1n9c	: Oleik Asit
18:2n6c	: Linoleik Asit
18:3n3	: Alpha Linolenik Asit
18:3n6	: Gamma Linolenik Asit
20:3n6	: Cis-8, 11, 14-Eicosatrienoik Asit
20:4n6	: Araşidonik Asit
22:6n3	: Dokosahekzanoik Asit
22:0	: Behenik Asit
24:1	: Nervonik Asit

1. GİRİŞ

İnsanlar ve hayvanlar hayatları boyunca alüminyuma (Al) sürekli olarak maruz kalmaktadırlar. Al yerkabuğunda, içme sularında, gıdalarda bulunmasının yanı sıra birçok sanayi ürünüde de bulunmaktadır [1,2]. Metabolizmada biriken Al birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Hücrede oksidatif stresi artırarak antioksidan/protein dengesini bozmaktadır. Al birçok dokuda birikmektedir [3,4]. Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıkların Al ile ilişkili olduğu bilinmektedir [5]. Kumarinler birçok bitkinin yapısında bulunmaktadır. Doğal kumarinlerin yanı sıra laboratuvar şartlarında birçok kumarin türevi sentezlenmiştir. Kumarinlerin, yapılan çalışmalarda antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar gibi birçok farmakolojik etkileri tespit edilmiştir [6,7].

Bu tez çalışmasında alüminyum klorüre ($AlCl_3$) maruz bırakılan rat karaciğer ve beyin dokuları üzerine 3-benzoil-7-hidroksi kumarin türevli maddenin biyokimyasal parametreler üzerine etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER**2.1. Alüminyumun Alınma Yolları ve Zararları**

Al yer kabuğunda en bol bulunan üçüncü elementtir [1]. İlk olarak 1825 yılında bu metal, Danimarkalı fizikçi Hans Oersted tarafından elementel metalik formunda izole edildi [8]. Al içeren ürünler birçok modern uygulamada kullanılmaktadır. Suyu alüminyum sülfat ($Al_2(SO_4)_3$) ve kireç eklenmesi, kirleticilerin pıhtılaşmasına yol açan alüminyum hidroksit ($Al(OH)_3$) oluşumuna neden olur. Bu prosedür, rezervuarlarda suyun arıtılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Al içeren materyaller gıdalarda da yaygın olarak bulunur. Bunlar arasında işlenmiş peynirdeki emülsifiye edici ajanlar, turşudaki sıkılaştırıcı ajanlar, kabartma tozu ve çeşitli gıda renklendiricileri bulunur. Al bazlı renklendiricilerin kozmetik uygulamaları da vardır. Bebek mamaları da önemli bir Al içeriğine sahiptirler [2,9]. İçme suları ise değişken Al içeriğine sahiptir. Bazı şehirler, sularında 0.4-1 mg/L yüksek Al konsantrasyonları bildirmiştir. Birçok ilaç Al tuzları içerir, özellikle alüminyum oksit (Al_2O_3), bağışıklık aktivasyonunu teşvik etmek için aşılarda etkili bir adjuvan olarak kullanılır. Terlemeyi önleyiciler, tamponlu aspirin ve antasitler genellikle Al (300-600 mg/tablet) içerir [5]. İnsanların Al'ye maruz kalmasının en yaygın şekli gastrointestinal sistemdir. Buradaki emilim oranı yaklaşık % 0.2'dir [1]. Al tuzları kanda transferine bağlanır [10]. Al^{+3} transferin aracılığıyla kan-beyin bariyerinden geçerek sinir sistemine giriş yapabilir. Al-protein komplekslerinin yaklaşık % 0.005'i beyine bu yolla girer [11]. Fosil yakıtların yanması sonucu oluşan asit yağmurları Al tuzlarının çözünmesine neden olmaktadır. Bu durumda çözünmüş olan Al daha tehlikeli olmaktadır [12]. Doğal suların çoğu çok düşük miktarlarda metaller içermektedir [13]. Bununla birlikte su arıtma sistemlerinde Al tuzlarının kullanılması sulardaki Al miktarını arttırmaktadır. İçme suyu kaynağına florür (F) ilave edilirken Al'nin varlığı göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü F eklenmesi sonucu su asidik bir hale dönüşmektedir. Bu

durum Al'nin çözünmesini önemli ölçüde etkilemektedir [14]. Ayrıca içme suyunda F bulunduğundan, yiyeceklerde Al'nin bağırsaktan emilimi önemli ölçüde artmaktadır [15,16]. Bağırsak lümenindeki yüksek fosfat konsantrasyonu Al emilimini azaltırken, sitrat onu artırır [17]. Gıdalardaki Al konsantrasyonu son derece değişkendir. Çay ve kahve gibi bitkilerde Al düzeyi yüksektir [18,19]. Çaya süt ilave edilmesi, çözünmeyen fosfat oluşumunu desteklerken, limon suyu eklenmesi sitratların oluşumu ile Al çözünürlüğünü artırır [20]. Gıdalardan alınan Al miktarı dikkate alınırken ürünün ne tür bir kap içerisinde alındığı da önemlidir [21]. Tüketicilerin yüksek düzeyde Al alımında gıdaların işleme, pişirme ve depolama etkileri önemli faktörlerdendir [22]. Özellikle Al tencere ve tavalarda asitli yiyecekler pişirildiğinde yüksek düzeyde (50µg/L) Al yemeğe geçmektedir [23]. Uluslararası Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı (EFSA) haftalık olarak kabul edilebilir Al alımını 1 mg Al/kg vücut ağırlığı olarak belirtmiştir [24]. Farklı ülkelerden insanlarda yapılan diyet araştırmaları, katkı maddeleri de dahil olmak üzere haftalık Al alımının 14 ila 280 mg/hafta arasında değiştiğini belirtmiştir [25]. Bu seviyeler, Avrupa Topluluğu tarafından önerilen tolere edilebilir haftalık alım miktarını önemli ölçüde aşmakta ve birçok ülkede, başta çocuklar olmak üzere çok sayıda insanın Al zehirlenmesi riski altında olduğunu göstermektedir [26]. Diyetteki Al fazlası, diğer eser elementlerin, özellikle Fe [27] ve Ca'nın [28] biyoyararlanımı üzerinde olumsuz etkileri vardır. Al terlemeyi önleyici kozmetik ürünlerinde bulunduğu koltuk altı derisi tarafından emilebilir veya kirli ortamda tozla solunabilir [11]. Özellikle terlemeyi önleyici maddeler içinde bulunan alüminyum kloro hidrat, özellikle kol altı aşınmış cilde püskürtüldüğünde transdermal emilim yoluyla vücudumuza girebilir [29]. Al alımında göz ardı edilen bir başka yol aşılardır. Aşıda bulunan en yaygın Al kaynakları her ikisi de çözünmeyen alüminyum hidroksifosfat ve alüminyum oksihidroksittir. Her biri 0.5 mg Al içeren 20 aşı vücuda 10 mg Al alınması anlamına gelir ki bu toksisiteye neden olur [30]. İnsanların Al'ye yüksek düzeyde maruz kalmasının sebeplerinden biri de tütün, esrar ve eroin kullanımınıdır [31,32]. Al ağır metallere göre daha az toksik olduğundan dolayı genellikle etkisi göz ardı edilmektedir [33]. Yapılan çalışmalarda, yetişkin bir bireyin günde 3-12 mg arasında Al alımı yaptığı tespit edilmiştir [34]. Al insanlarda böbrek, karaciğer, kalp, kemik ve beyin

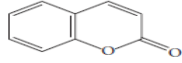
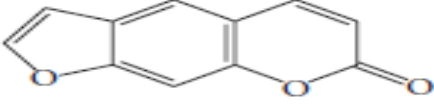
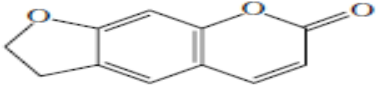
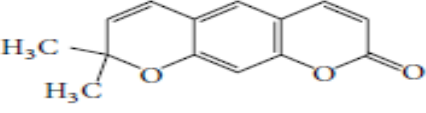
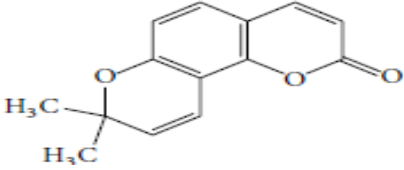
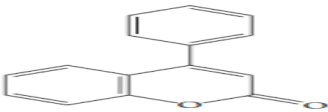
olmak üzere tüm dokularda birikmektedir [3,4]. Al maruziyeti sonucunda insan ve hayvanlarda öğrenme-hafıza fonksiyonu bozulmaktadır [35]. Ayrıca histopatolojik olarak beyin dokusunda nörotoksositeye neden olmaktadır [36,37]. Al oksidatif strese neden olmaktadır [38]. Al maruziyeti sonucunda oksidatif stres parametrelerinden malondialdehit (MDA) artmaktadır [39]. Ayrıca enzim aktivitelere olumsuz etkileri bulunmaktadır [40]. Al beyinde Fe birikmesine neden olmaktadır [41,42]. Dokularda serbest radikaller üreterek lipid peroksidasyonuna sebebiyet vermektedir. Hücrede protein, DNA ve glutatyon moleküllerine zarar vermektedir [43].

2.2 Kumarinler

Kumarinler (2H-1-benzopiran-2-on) genel molekül yapısındadır. Bitkilerde bulunan fenolik madde sınıfına girer. 1300'den fazla kumarin çeşidi bitkiler, bakteriler ve mantarlarda bulunmaktadır. Kumarinlerin birçoğu bilimsel olarak çalışılmıştır. Kumarinler ilk olarak Tonka fasulyesinden elde edilmiştir. Bitkilerin bütün kısımlarına dağılmış olsa da meyvelerde, tohumlarda ve yapraklarda bol miktarda vardır [44-52]. Ayrıca tarçın kabuğu yağı, lavanta yağı ve cassia yağı gibi bazı uçucu yağlar içerisinde de yüksek seviyede kumarin bulunmaktadır [49,53, 54].

Çevresel koşullar ve mevsimsel değişikliklerde bitkinin kumarin içeriği değişebilir [55]. Farmakolojik ve biyokimyasal çalışmaların çoğu 7-hidroksi kumarin üzerine yapılmıştır [56]. Doğal kumarinler esas olarak bileşiklerin kimyasal yapısına bağlı olarak altı tipte sınıflandırılır. Çizelge-2.1'de doğal kumarinlerin farmakolojik özellikleri ve farklı kumarin türleri verilmiştir. Kumarinlerin birçok farmakolojik özellikleri vardır. Bunlar; antienflamatuar aktivitesi [57-59], K vitamini antagonisti [60], antibakteriyal aktivitesi [61-63], antifungal aktivitesi [54,64], antiviral aktivitesi [65,66], antikanser aktivitesi [67-70], antihipertansif aktivitesi [71]'dir. Ayrıca antitüberküloz [72], antikonvülsan aktivitesi [73,74], multiple skleroz aktivitesi [75], antiadipojenik aktivitesi [76], antihiperglisemik aktivitesi [77,78] ve antioksidan aktivitesi [6,7] tespit edilmiştir.

Çizelge 2.1 Kumarin Çeşitleri ve Farmakolojik Aktiviteleri

Kumarin çeşitleri	Kumarinler	Farmakolojik aktiviteleri
Basit kumarinler 	Esculetin	Antiadipogenik, Antioksidan, Nöroprotektif
	Ammoresinol	Antibakteriyel
	Ostruthin	Antibakteriyel, Antifungal
	Osthole	Antibakteriyel, Antifungal, Antikanser, Antikonvülzan
	Novobiocin	Antibakteriyel
	Coumermycin	Antibakteriyel
	Chartreusin	Antibakteriyel, Antitümör
	Fraxin	Antikanser, Antiadipogenik, Antioksidan
	Umbelliferon	Antitüberküler
	Fraxidin	Antihiperglisemik, Antiadipogenik
	Phellodol A	Antitüberküler
	Esculin, fraxetin	Antiadipogenik
	Murrayatin	
	Auraptene	
Furano kumarinler 	Imperatorin	Antienflamatuvar, Antibakteriyel, Antifungal, Antiviral, Antikanser
	Psoralen	Antifungal, Anti-TB
	Bergapten	Anti-TB
	Methoxsalen	Sitokrom P450 Önleyici
	Marmalde, marmelosin	
Dihydrofurano Kumarinler 	Anthogenol	Antibakteriyel
	Felamidin	Antibakteriyel, Anti-TB
	Marmesin	Anti-TB
	Rutaretin	Anti-TB
Pyrano kumarinleri iki tiptir		
Doğrusal tip 	Grandivittin	Antibakteriyel
	Agasyllin	Antibakteriyel
	Aegelinol benzoate	Antibakteriyel
	Xanthyletin	Anti-TB
Açısal tip 	Inophyllum A, B, C, E, P, G1 ve G2	Antiviral
	Calanolide A, B ve F	Antiviral
	(+)-Dihydrocalanolide A ve B	Antiviral
	Pseudocordatolide C	Antiviral
Fenil kumarinler 	Isodispar B, dispardiol B, mammae A/AB cyclo E, mammae A/AB dioxalanocyclo F, disparinol D, disparpropylinol B	

2.3. Redükte Glutasyon

Redükte Glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisinden oluşur. Molekül ağırlığı düşük olan fakat önemli görevleri olan bir tripeptittir [80]. De Rey- Pailhede tarafından 1888'de keşfedildikten sonra 1921'de ilk kez Hopkins tarafından yapısı açıklanmıştır [81]. SH sistein sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alış-veriş yapan kısmıdır [82]. Plazma, kan hücreleri, beyin, akciğer, böbrekler gibi birçok doku ve organda bulunur fakat en fazla bulunduğu yer karaciğerdir. Karaciğerdeki GSH'ın hızlı bir yarılanma ömrü vardır. Genel olarak karaciğerdeki yarılanma ömrü 2-4 saattir. GSH mitokondride ise daha uzun süre kararlı halde kalır. Mitokondride bulunan GSH'ın yaklaşık 30 saatlik bir yarı ömrü vardır [83]. Vücuttaki GSH'ın büyük bir kısmı sitozolde (%85-90) bulunurken geri kalanı ise (%10-15) mitokondri ve diğer organellerde bulunur. Bazı durumlarda mitokondride sitozoldeki oranlara ulaşıldığı görülmüştür. Mitokondride GSH sentezleyen enzimlerde eksiklik olduğunda sitozolden alınarak devamlılığı sağlanır [84]. Hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olan GSH'ın antioksidan savunma sisteminde görev almaktan başka ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesi, aminoasitlerin taşınması, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde tutulması, bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim görevi görmesi gibi birçok görevi vardır [85]. Ayrıca Zn, Cd, Hg, Cu ve Pb gibi ağır metal iyonlarıyla kompleks oluşturarak vücuttan atılmalarını kolaylaştırır [86]. Glutasyon, antioksidan savunma sisteminin önemli bileşenlerinden biri olan, glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin substratı olarak mekanizmada ve enzimin hidrojen peroksiti (H_2O_2) ve diğer organik peroksitleri detoksifiye etmesinde görev alır [87]. GSH serbest radikaller ve peroksitleri etkisiz hale getirerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur [88]. GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, detoksifikasyonda ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev alır [89].

2.4. Glutatyon-S-Transferaz

Glutatyon-S-Transferaz (GST) molekül ağırlıkları 20.000-25.000 dalton olan ve her bir alt birimi 200-240 aminoasitten oluşmaktadır. İlk kez sıçan karaciğerinde Boyland ve arkadaşları tarafından ifade edilmiştir [90]. GST'ler kataliz reaksiyonlarında, elektrofilik substratlar üzerine GSH tripeptidin nükleofilik atağını kataliz ederler. Bunun yanında oksidasyonla oluşan ürünlerin ya da dışarıdan alınan yabancı toksik maddelerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre komponentlerine zarar vermeden atılmasını sağlarlar. Bu yüzden GST'ler, çok önemli koruyuculuk görevi gören enzim gruplarından biridir [91]. GST'nin indirgeme özelliği, membran bileşenlerini lipit peroksidasyonundan korur. Doğal koruyucu sistemlerden biri olarak da kabul edilen GST'ler herbisit, pestisit, antikanser ilaçlar, kimyasal kanserojenler ve çevresel kirlilikler gibi elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da önemli bir role sahiptirler. GST, bakterilerden memelilere kadar birçok canlıda bulunmaktadır. İnsan, sıçan, fare, sığır, gibi hayvanların karaciğer, eritrosit, akciğer, plasenta ve bağırsak mukozasından izole edilerek çalışılmıştır [92]. Toksik metabolitlerle glutatyonun konjugasyonunu katalizleyen GST enzimi de toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna yol açan başka bir antioksidan enzimdir. Yapılan çalışmalarda diyabette kesin olarak antioksidan sistemlerde bozukluk olduğu, antioksidan enzimlerin arttığı veya azaldığı şeklinde raporlar vardır [93].

2.5. Karboksilesteraz Enzimi

Serin hidrazlar sınıfında bulunan karboksil esteraz (Ces), ester substratlarının bir türünden alkol bağının hidrolizini katalizleyen önemli bir enzimdir. Omurgalı ve omurgasız canlı türlerinin dokularının birçoğunda Ces enzimi bulunmaktadır [94]. Ces'in birçok enzimi izole edilmiş ve hatta saflaştırılmış halde bile geniş substrat özgüllüğü gösterirler. Ces'lerin fizyolojik fonksiyonları belirsizdir. Spesifik lipidlerin taşınmasında ve depolanmasında, ksenobiyotik ve biyolojik esterlerin

asimilasyonunda ve düzenleyici fonksiyon olarak özgül hormonların biyoinaktivasyonunda işlev görmektedir [95].

2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi

Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) dokularda serbest ya da fosfolipidlerle bileşik halinde bulunan asetilkolini hidrolizleyen bir enzimdir. Özellikle karaciğerde oluşur. AChE enzimi eritrositlerde, karaciğerde, dalakta, sinir uçlarında, beyinde bulunur. Asetilkolin çok önemi bir esterdir. Sinir hücrelerinin arasında nörotransmitter olarak görev yapmasının yanında kas hücrelerinin kasılmasının başlamasında ve kas lifleri boyunca elektriksel akımın oluşmasında da görevlidir. Görevini tamamlayan asetilkolin, AChE tarafından kolin ve asetata parçalanır [96]. Kolinesterazlar aynı zamanda hücre yenilenmesi, farklılaşması, çeşitli etkenler sonucunda oluşan strese yanıt oluşumunda da rol oynarlar [97].

2.7. Malondialdehit

Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu son ürün olarak MDA oluşur. Memelilerde bu yağ asitleri en çok araşidonik asit (20:4n6) ve dokosaheksanoik (20:6n3) asittir. Oleik asit (18:1n9c) ve linoleik asitin (18:2n6c) oksidasyonundan çok az miktarda malondialdehit oluşur. Bazı dokularda MDA enzimatik reaksiyonlar sonucu da oluşabilir [98]. Oksidatif hasarın belirteci MDA'dır. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonu değerlendirilmesi yapılır [99]. MDA'nın hücre membranlarının geçirgenliğini arttırdığı, membranların iyon alışverişine etki ederek hücre içi iyon dengesini bozduğu, enzim aktivitelerinin bozulmasına, DNA'nın yapısında kırılmalara ve baz değişimlerine neden olduğu gösterilmiştir [100]. Bu nedenle biyolojik materyallerde MDA'nın ölçülmesi lipit peroksid seviyelerinin belirteci olarak kullanılır [99].

2.8. Yağ asitleri

Katı ve sıvı yağların içeriğinde yağ asitleri mevcuttur. Zincirin bir ucunda COOH (karboksil) grubu, diğer ucunda CH₃ (metil) grubu, ortada ise değişik uzunlukta hidrokarbonlar bulunmaktadır. Zincir yapısında farklı bağlar bulunmaktadır. Çift bağ içermeyen yağ asitleri, doymuş yağ asitleri olarak tanımlanır. Bitki ve hayvanlarda en önemli yağ asit bileşeni palmitik (16:0) asittir. Yağ asitlerinin yapısında bir çift bağı olanlar tekli doymamış yağ asitleri olarak tanımlanır. En önemlileri palmitoleik (16:1) ve 18:1n9c yağ asitleridir. Birden fazla çift bağ içeren yağ asitleri, çoklu doymamış yağ asitleri olarak adlandırılır. Bunların molekül dizilişlerinde karbon atomu sayısı 18-20 arasında ve 2-4 adet çift bağa sahip olduklarından bu yağ asitlerinin toplamı çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) olarak tanımlanmıştır [101].

2.9. Mineraller

Organik bileşiklerin tamamen okside olduktan sonra geriye kalan kül kısmına mineral denir. Hayvan organizmalarındaki külün büyük bir kısmını iskelet mineralleri, diğer az bir kısmını da elzem moleküller içindeki yapılar oluşturur. Bu mineraller genellikle iyonik yapıdadırlar. Erişkin bir bireyde %4-5 oranında mineral bulunur. Metabolik rolleri; mineral türüne göre değişmekle beraber bazı maddelerle bileşik yaparak organik yapılar oluştururlar ve genel olarak aktivatör, düzenleyici, transmitter olarak işlev görürler. Vücutta asit-baz dengesini, osmotik basıncı, membran geçişini sağlarlar. Sinir ve kas sisteminin işlevleri için gereklidirler. Organizma tarafından gereksinim miktarı çok olanlar; Ca, P, S, Na, K, Mg ve Cl ‘asal mineraller’ olarak tanımlanırlar. Bunlardan S ve P organik maddelerin bir parçası olarak bulunurlar. Vücuttaki Ca, Mg ve P’nin büyük kısmı kemiklerde bulunur. Bu mineraller kemiklerin yapısını ve dansitesini sağlarlar. Kemikler aynı zamanda bu mineraller için depo yeridirler. Asal minerallerin birçoğunun sinir sisteminde, hormonlarda ve kan dokusunda işlevleri vardır. Asal minerallerin dışında organizmada periyodik tabloda yer alan ve gereksinimleri asal minerallere göre daha

az olan ‘‘eser mineraller’’ bulunur. Bunların başında Fe ve Cu gelir. Diğerleri ise; Zn, Mn, I, F, Se ve Co’dur. Eser minerallerin düzeyleri asallara göre çok düşük olmasına karşın hepsi yaşam için gereklidir. [102].

Ca vücudumuzda en fazla bulunan minerallerden biridir. Başlıca iskelet ve dişlerin yapısından sorumlu olup, %99’u buralarda bulunur. Ca bazı enzimlerin aktivasyonu için gereklidir. En önemlisi adenosin trifosfataz (ATPaz) olup, kasların kasılarak enerji salınımını sağlar. Benzer şekilde yağların parçalanmasını sağlayan lipaz, kolesterol esterlerini hidrolize eden kolin esteraz ve proteinlerin sindiriminde yer alan proteolitik enzimlerde etkindir. Mineral hücre metabolizmasının düzenlenmesinde önemli işlevi olan kalmodulin sistemine yardımcı olur. Ca hücreye girince kalmodun proteine bağlanır, bu kalmodulin-protein bileşiği glikojen sentezi dahil birçok enzim aktivitesini düzenler [102].

Mg’nin ATP ile yaptığı bileşik genellikle enzim tepkimelerinde kullanılır. Hücrede karbonhidrat ve protein metabolizmaları için Mg olmalıdır. Bütün proteinlerin, nükleik asitlerin, nükleotitlerin ve karbonhidratların sentezi için iyonize magnezyum (Mg^{+2}) gerekir. Karbonhidrat metabolizmasında Mg^{+2} birçok enzim için aktivatör görevi görmektedir. Protein metabolizmasında, Mg^{+2} hücre ribozomlarında protein sentezi için ko-faktördür [102].

Fe, metabolizmada kan ve dokular için en önemli minerallerden biridir. Diğer Fe içeren enzimler hidrojen peroksidaz reaktif molekül olarak oksijen metabolizmasında görülür. Bunlar H_2O_2 ’nin birikmesini önler. H_2O_2 biyolojik aktif moleküllere zarar vermektedir. Katalaz ve peroksidaz enzimleri H_2O_2 ’yi su ve oksijene dönüştürürler [102].

Cu önemli enzimlerin aktivasyonu için gerekli bir mineraldir. Süperoksit dismutaz (SOD) yapısında Cu bulunan güçlü bir antioksidandır. Bütün hücrelere dağılmış olarak bulunur. Hücre dışındaki süperoksit dismutazlar (SODS) ekstraselluar seruloplazmin ve intraselluar bakır tionein olarak adlandırılır. Bunlar çinko ve bakır elementlerini her biri için aktif olan tarafta taşırlar ve bakır süperoksit dismutaz (Cu/SOD) ile çinko süperoksit dismutaz (Zn/SOD) olarak gösterilirler. Bütün SOD’ler süperoksit anyonların peroksitlere dönüşümünü katalize ederler. Daha sonra bunlar Se’ye bağlı GSH-Px yardımıyla suya dönüştürülür [102].

Zn hücre-enzim sisteminde görev almaktadır. Canlı sistemlerde çinkonun yer aldığı 70-90 arasında enzim bulunmaktadır. Bu enzimler karbonhidrat ve enerji metabolizmasında, proteinlerin yıkımı ve sentezinde, nükleik asit sentezinde, karbondioksit taşınmasında ve diğer birçok reaksiyonda yer alırlar. En önemlileri; karbonhidrat, laktat dehidrojenaz, glutamat dehidrojenaz, alkalın fosfataz ve timidin kinaz enzimleridir [102].

Mn, hücrede özellikle mitokondride bulunan önemli bir mineraldir. Metal-enzim bileşiği olarak birçok besinin metabolizmasını katalize eder. Birçok amino asidin birbirine dönüşmesini katalize eden enzimleri Mn aktive eder. Bunlar; arginaz, sistein desülfideraz, prolinaz, dipeptidaz ve lösin amino peptinaz enzimleridir [102].

2.10. Çalışmanın Amacı

Al yer kabuğunda en bol bulunan minerallerden biridir. İnsanlar alüminyumunu içme sularından, içeceklerden, yiyeceklerden ve birçok yolla metabolizmasına almaktadırlar. Al'nin insanların birçok dokusunda birikmesi sonucu değişik hastalıklara neden olmaktadır. Al'nin hücrede oksidatif strese ve toksisiteye neden olduğu bilinmektedir. Kumarinler doğal olarak birçok bitkide bulunmaktadır. Ayrıca sentez olarak laboratuvarlarda elde edilen birçok kumarin de mevcuttur. Yapılan literatür araştırmalarında Al'nin oluşturduğu oksidatif strese karşı 3-benzoil-7-hidroksi kumarin bileşiğinin etkilerinin araştırılmadığı tespit edildi. Bu çalışmada alüminyumun oluşturduğu oksidatif strese ve toksisiteye karşı 3-benzoil-7-hidroksi kumarin maddesinin sıçan karaciğer ve beyin dokuları üzerine etkileri araştırılması yapıldı.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler

İzopropil alkol, metanol, Tris-EDTA tamponu, n-hekzan, EDTA-Na₂, etil alkol, H₂SO₄, HCl, tiobarbiturik asit (TBA), H₂O₂, trikloroasetik asit (TCA), fosfat tamponu, redükte GSH, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit, mineral standartları, fizyolojik su ve yağ asitleri standardı kullanıldı.

3.2. İnceleme Materyali

Deneyel uygulamada ağırlıkları birbirine yakın erkek *Wistar albino* (260±10 g) sıçanların karaciğer ve beyin dokuları incelendi.

3.3. Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar

Santrifüj, çelik başlı homojenizatör, teflon başlı homojenizatör, Gaz Kromatografisi (GC-FID) cihazı, Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazı, Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS), vorteks, otomatik pipetler, su banyosu, derin dondurucu (-80 °C), mikrodalga yakma cihazı, santrifüj tüpleri.

3.4. Deney Hayvanları

Deneyel çalışmada, *Wistar Albino* cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi (ADYÜ DEHAM)'nden temin edildi ve deneyel uygulama burada gerçekleştirildi. Deneyel çalışmanın etik kurulu da yine bu kurumdan alındı (Etik Kurul No: 2019/57). Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen bir kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda, su ise paslanmaz çelikten yapılmış özel biberonlarda verildi. Deney hayvanlarının bulunduğu ortamın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu. Hayvanlar 12 saat ışıklı ve 12 saat karanlık ortamda takip edildi. Her grupta 7 sıçanın bulunduğu 4 grup

oluşturuldu. Deneysel 28 adet sıçan kullanıldı. Deneysel çalışma dört gruptan oluşmaktadır.

- Kontrol grubu (K)
- Alüminyum grubu (A)
- Kumarin grubu (C)
- Kumarin + Alüminyum grubu (C+A)

Kontrol grubuna 1 ml distile su intraperitoneal olarak gınaşırı uygulandı. $AlCl_3$ distile suda çözünerek gınaşırı 8,3 mg/kg intraperitoneal olarak uygulaması yapıldı [103].

3-benzoil-7-hidroksi kumarin 1 ml distile suda 10 mg/kg olarak oragastrik gavaj yöntemiyle uygulaması yapıldı [104].

3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmada incelenen enzimlerin aktiviteleri Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında gerçekleştirildi. Her örnek cihazda üç defa okundu. Çalışmada incelenen enzimlerin aktiviteleri spesifik aktivite (nmol/dk/mg protein) olarak ifade edildi.

3.6. Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri

Karaciğer dokusu için çelik uçlu, beyin dokusu ise teflon başlıklı homojenizatör kullanıldı. Dokular homojenizatörlerde 2000 rpm'de 30 saniye boyunca parçalandı. Homojenizasyon işleminde tartılan doku ağırlığının 4 katı hacmine tekabül edecek (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (0.1M pH: 7.4 olan potasyum fosfat tamponu içinde; 0.15 M KCl, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT) içinde yapıldı. Homojenize edilmiş dokular ependorf tüplerine alındı ve 4 °C ve 16000 xg devirde 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısımlarında enzim aktiviteleri ölçüldü.

3.7. GSH

Beyin ve karaciğer dokularında GSH analizi Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında Sedlak ve Lindsay metodu kullanılarak 412 nm de yapıldı. Dokular %50 TCA (Trikloroasetik asit) ile çöktürüldü ve 5 dk 1000xg de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan ependorf tüpleri içerisindeki süpernatant kısmından 0.5 ml alındı ve üzerine 2 ml Tris-EDTA tamponu (0.2 M, pH: 8.9) ve 0.1 ml 0.01 M 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit ilave edildi. Bu karışım oda sıcaklığında 5 dk bekletildi ve cihazda 412 nm de absorbans değerleri ölçüldü [105]. GSH düzeyi nmol/mg protein olarak verildi.

3.8. GST Aktivitesi

GST enzim aktivitesi Habig ve arkadaşları (1974) tarafından bulunmuş olan yöntemle yapıldı [106]. Analizde %96'lık etil alkol içinde hazırlanmış olan 20mM 1-kloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB) substrat olarak kullanıldı. Redükte GSH ise kofaktör olarak kullanıldı. 0.1 M pH:6,5 olan fosfat tamponundan 100 µl, 0.002M GSH çözeltisinden 100 µl ve CDNB çözeltisinden 10 µl 96'lık mikrolapla kuyucuklarına çok kanallı otomatik pipetler ile pipetlendi. Kuyucuklardaki karışım 15 sn karıştırıldı ve 344 nm'de cihaza okutuldu ve datalar kaydedildi. Bu çalışma Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında yapıldı. Sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak verildi.

3.9. MDA

Dokulardaki MDA analizi Placer (1966) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. 0.25 N hidroklorik asit (HCl) içerisinde %0.375 thiobarbitürik asit (TBA) ve %15 trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi kullanıldı. Doku örneklerindeki MDA miktarları cihazda 532 nm'de okunan absorbans değerleri yardımıyla bulundu. Sonuçlar nmol/g yaş doku ağırlığı olarak kaydedildi [107]. Bu çalışma Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında yapıldı.

3.10. Ces Aktivitesi

Bu enzimin aktivitesinin ölçümünde substrat olarak %96'lık etil alkol içinde hazırlanan 26 mM p-nitrofenol (PNPA) kullanıldı. Reaksiyon çözeltisi, 5 µl örnek ve 0.05 M trizma pH: 7,4 olan çözelten 250 µl içermektedir. Bu karışım 25 °C'de ön inkübasyona bırakıldı. İşlemin son basamağında çözeltinin son konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde 5 µl PNPA ilave edildi ve spektrofotometrede 405 nm'de absorbans değişimleri okundu [108,109]. Bu değerler yardımıyla karboksilesteraz aktivitesi tespit edildi. Bu çalışma Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında yapıldı. Sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak verildi.

3.11. AChE Aktivitesi

AChE aktivitesi Ellman vd. (1961) tarafından yapılan [110] ve Özmen vd. (1988) tarafından modifiye edilen yöntemle göre yapıldı [111]. Bu analizde Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazı kullanıldı. Substrat olarak asetilkolin iodid (ACTI) kullanıldı. Mikroplaka kuyucuklarının içerisine 10 µl süpernatant konuldu. Üzerine 0.701 mM ACTI ve pH:8 olan 0.1 M trizma çözeltisi içinde hazırlanmış 0.136 mM DTNB çözeltisinden 200 µl ilave edildi. Karışım 412 nm dalga boyunda cihazda okundu ve absorbans değişimleri tespit edildi. Sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak verildi.

3.12. Total Protein Analizi

Süpernatant örneklerinde total protein analizi Bradford'a göre yapıldı [112]. Sonuçlar mg protein olarak verildi. Tüm analizler üç tekrar ile yapıldı.

3.13. Lipitlerin Ekstraksiyonu

Beyin ve karaciğer dokularında lipit ekstraksiyonu yapmak için Hara ve Radin metodu kullanıldı [113]. Karaciğer dokusunu parçalamak için çelik uçlu, beyin dokusunu parçalamak için ise teflon başlı homojenizatör kullanıldı. Doku

örneklerinden 0,5-1 g alınarak homojenizasyon tüpü içerisine alındı. Üzerine 3:2 (v/v) hekzan- izopropanol karışımından 6 ml eklendi. Doku örnekleri 30 sn süreyle homojenize edildi. Homojenizatörün çevresi 5 ml hekzan-izopropil alkol çözeltisi ile yıkandı. Numuneler santrifüj tüplerine alındı ve 4500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı metilleştirme işlemi için tüplere alındı.

3.14. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Lipitler içinde bulunan yağ asitlerinin gaz kromatografisinde analizinin yapılabilmesi için polar olmayan uçucu ve kararlı yapıya sahip metil esterlerine dönüştürülmesi gerekir [114]. Bu işlem için hekzan/izopropil alkol fazındaki lipit ekstratı santrifüj tüplerine alındı. Üzerine %2'lik metanolik sülfirik asitten 5 ml ilave edildi, vorteks ile iyice karışmaları sağlandı. Bu karışım 50 °C lik su banyosunda çeker ocak içerisinde 15 saat süre ile metilleşmeye bırakıldı. Tüpler su banyosundan çıkarılarak oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Üzerine 5 ml %5 lik sodyum klorür (NaCl) ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Bu karışım üzerine 5 ml hekzan ilave edilerek ekstraksiyon işlemi yapıldı. İyice karıştırıldıktan sonra faz ayrımının olması için bir süre bekletildi. Ayrılan hegzan fazı pipetle alındı ve üzerine 5 ml %2 lik potasyum bikarbonat (KHCO₃) ile muamele edildi. Fazların ayrılması için 4 saat bekletildi. Ayrılan hegzan fazı cam deney tüpüne alındı. Hegzan fazı uzaklaştırıldıktan sonra yağ asit metillerinin üzerine 2 ml hekzan ilave edildi. Bu karışım 0.22 µm PTFE şırınga ucu filtreden süzüldü. Viale alınan yağ asitlerini içeren hegzan fazındaki numune Shimadzu QP 2010 Ultra Gaz Kromatografisi cihazında ve Restek Rtx 2330 kolonunda yapıldı. Kolon sıcaklık programı Çizelge 3.1'de verilmiştir. Örneklerin analizine başlamadan önce 37'lik yağ asit standardı GC-FID'de okunarak kalibrasyon yapıldı.

Çizelge 3.1 GC-FID kolon sıcaklık programı

Artış Sıcaklığı °C/dk	Sıcaklık °C	Bekleme Süresi (dk)
	130	4
3	230	10

3.15. Element Analizi

Beyin ve karaciğer dokularının element analizleri için örnekler mikrodalga yakma cihazında yakıldı. Bunun için Berghof marka mikrodalga yakma cihazı kullanıldı. 250 mg doku tartıldı ve cihazın hem aside hem basınca dayanıklı özel teflon kaplarının içine konuldu. Üzerine %65 nitrik asitten 5 ml eklendi ve çeker ocak içerisinde karıştırıldı. 20 dk bu şekilde bekletildi ve ardından uygun seyreltmelerle cihaza verildi. Mikrodalga çalışma şartları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Mikrodalga cihazı çalışma şartları

Step	1	2
T (°C)	160	190
P (bar)	40	40
Power (%)	80	90
Ta (min)	5	1
Time (min)	5	15

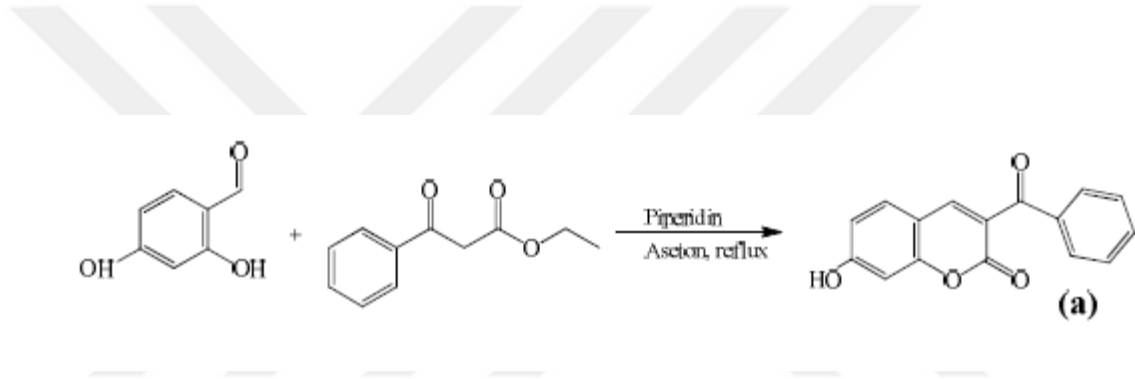
Sıvı hale gelmiş olan doku örnekleri Perkin Elmer marka ICP-MS cihazında okundu. Cihazın şartlanması sürecinde hazırlanmış olan 5-10-25-50-100-250 ppb’lik standartlar cihaza verildiğinde cihazın okumuş olduğu değerler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Standart minerallerin ICP-MS cihazında kalibrasyon değerleri

(ppb)	Fe	Zn	Mg	Ca	Al	Mn	Cu
5	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
10	9,956	10,025	9,808	10,255	9,712	9,965	9,979
25	24,723	24,888	24,727	24,938	24,605	24,800	24,857
50	50,104	50,337	50,046	52,139	49,347	50,214	50,180
100	100,819	100,894	100,822	98,823	100,437	101,078	100,935
250	248,066	247,479	247,757	245,447	247,075	248,013	248,018

3.16. 3-benzoil-7-hidroksi kumarin molekülünün sentezi

3-benzoil-7-hidroksi kumarin bileşiğinin sentezinde, üç boyunlu bir reaksiyon balonunun içinde 2,4-dihidroksibenzaldehit (2.762 g), etil benzoil asetat (3.844 g), üç damla piperidin ve 50 mL aseton eklenerek bileşenler çözüldükten sonra karışım bir magnetik karıştırıcı üzerinde 2 saat süreyle reflaks edildi. Süre sonunda reaksiyon karışımı aşırı metanol içine aktarılarak 3-benzoil-7-hidroksi kumarin bileşiğinin (Şekil 1) çökmesi sağlandı. Elde edilen kumarin bileşiği etanolde kristallendirilerek saflaştırıldı [115].



Şekil 3.1 3-benzoil-7-hidroksi kumarin bileşiğinin sentezi

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

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



5. BULGULAR

Çizelge 5.1 Karaciğer dokusu mineral düzeyleri (ppm)

Mineraller	K	C	A	C+A
Fe	103.20±3.49	100.55±3.00 ^x	116.84±2.38 ^a	102.25±2.20 ^x
Zn	25.79±1.66	25.95±0.66	24.43±1.26	29.16±1.22
Mg	238.06±6.09	230.34±5.11	232.74±9.28	240.56±1.93
Al	29.98±3.64	28.75±3.08 ^z	94.14±5.44 ^c	69.07±6.33 ^{cx}
Mn	2.90±0.07	2.94±0.06 ^x	2.55±0.04 ^a	2.65±0.09 ^a
Cu	5.37±0.76	4.69±0.23 ^x	7.32±0.53 ^a	5.29±0.40 ^x

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

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

Karaciğer dokusu mineral düzeyleri Çizelge 5.1’de gösterilmiştir. A grubu Fe ve Cu mineral düzeylerinin diğer gruplara göre arttığı tespit edildi (p<0.05). Tüm grupların Zn mineral düzeyleri arasında istatistiksel fark olmadığı gözlemlendi (p>0.05). A grubu Al mineral düzeyinin diğer gruplara göre arttığı tespit edildi (p<0.05, p<0.001). C+A grubu Al mineral düzeyi A grubuna göre azaldığı gözlemlendi (p<0.05). K grubu Mn mineral düzeyine göre A ve C+A gruplarında azalma tespit edilirken (p<0.05), C grubu Mn mineral düzeyine göre de A grubunda azalma gözlemlendi (p<0.05).

Çizelge 5.2 Karaciğer dokusu MDA, GSH ve enzim aktivite düzeyleri

Parametreler	K	C	A	C+A
MDA	45.02±2.54	48.04±3.41 ^z	78.75±5.84 ^c	58.56±3.65 ^{ax}
GSH	88.45±3.02	96.41±4.23 ^z	73.75±4.0 ^a	86.32±5.45 ^x
Ces	1.78±0.04	1.80±0.05 ^x	1.47±0.02 ^a	1.47±0.09 ^a
GST	31.40±0.75	33.80±1.67 ^x	24.33±1.04 ^a	32.20±1.89 ^x

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

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

Karaciğer dokusu MDA, GSH ve enzim aktivite düzeyleri Çizelge 5.2’de gösterilmiştir. A grubu MDA düzeyinin diğer gruplara göre arttığı tespit edildi (p<0.05, p<0.001). A grubu GSH düzeyi diğer gruplara göre azaldığı gözlemlendi (p<0.05, p<0.001). A ve C+A grupları Ces enzim aktivite düzeyleri K ve C gruplarına göre azaldığı tespit edildi (p<0.05). A grubu GST enzim aktivite düzeyi diğer gruplara göre azaldığı gözlemlendi (p<0.05).

Çizelge 5.3 Karaciğer dokusu yağ asit düzeyi (%)

Yağ asitleri	K	C	A	C+A
6:0	0,081±0,004	0,057±0,003 ^c	0,057±0,003 ^b	0,039±0,004 ^{cx}
11:0	0,019±0,001	0,010±0,001 ^c	0,013±0,001 ^c	0,007±0,001 ^{cz}
14:0	0,134±0,004	0,122±0,006 ^y	0,164±0,008 ^a	0,097±0,009 ^{bz}
15:0	0,217±0,002	0,180±0,005 ^{az}	0,257±0,014 ^a	0,164±0,006 ^{cz}
16:0	18,142±0,133	17,622±0,248	17,937±0,295	17,212±0,269
17:0	0,614±0,016	0,533±0,018	0,709±0,045	0,574±0,023
18:0	23,145±0,332	22,797±0,360	24,985±0,439	23,458±0,364
20:0	0,144±0,003	0,132±0,005	0,129±0,002	0,107±0,004 ^{cy}
22:0	0,098±0,002	0,087±0,002 ^a	0,095±0,002	0,082±0,003 ^{bx}
23:0	0,066±0,002	0,067±0,002	0,068±0,003	0,074±0,004
24:0	0,225±0,005	0,224±0,004	0,233±0,002	0,245±0,012
ΣSFA	42,885±1,410	41,831±1,012	44,647±1,612	42,059±1,812
15:1	0,215±0,006	0,213±0,009	0,211±0,006	0,206±0,006
16:1	1,123±0,016	1,061±0,020	1,185±0,066	1,087±0,039
18:1n9t	0,047±0,002	0,038±0,001	0,035±0,003 ^a	0,029±0,002 ^c
18:1n9c	4,522±0,200	4,200±0,209	4,156±0,231	4,133±0,318
20:1n9	0,179±0,002	0,194±0,011	0,191±0,008	0,144±0,008 ^{ax}
24:1	0,104±0,012	0,090±0,005	0,113±0,003	0,104±0,007
ΣMUFA	6,190±0,312	5,796±0,247	5,891±0,311	5,703±0,510
18:2n6t	0,137±0,004	0,131±0,003	0,145±0,008	0,120±0,003
18:2n6c	14,311±0,335	15,896±0,240 ^{bz}	13,317±0,337	14,988±0,214 ^y
18:3n6	0,135±0,006	0,141±0,005	0,114±0,005	0,194±0,016 ^{cz}
18:3n3	0,139±0,005	0,149±0,007 ^x	0,119±0,009	0,153±0,005 ^x
20:2n6	0,648±0,029	0,876±0,063 ^{bx}	0,679±0,032	0,573±0,048
20:3n6	0,488±0,012	0,523±0,019	0,600±0,046 ^a	0,522±0,024
20:4n6	29,302±0,229	29,822±0,454	28,998±0,466	29,910±0,584
20:5n3	0,143±0,089	0,094±0,005	0,077±0,005	0,095±0,009
22:6n3	5,622±0,213	4,741±0,269 ^a	5,413±0,214	5,683±0,206
W ₃	5,904±0,295	4,984±0,301	5,609±0,241	5,931±0,256
W ₆	45,021±1,412	47,389±1,201	43,853±1,256	46,307±1,147
PUFA	50,925±1,851	52,373±1,754	49,462±1,785	52,238±1,856
ΣUSFA	57,115±2,010	58,169±1,987	55,353±1,745	57,941±1,852

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

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

Karaciğer dokusu yağ asit (%) düzeyleri Çizelge 5.3'te verilmiştir. K grubu Σ SFA düzeyine göre; C grubunda nispi azalma gözlenirken A grubunda nispi oranda artış tespit edildi ($p>0.05$). Tüm grupların Σ MUFA düzeyleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). C ve C+A grupları Σ PUFA düzeylerinin K ve A gruplarına göre nispi oranda arttığı gözlemlendi ($p>0.05$). A grubu Σ USFA düzeyinin K, C ve C+A gruplarına göre nispi oranda azaldığı tespit edildi ($p>0.05$). K grubu 6:0, 11:0, 15:0 ve 22:0 yağ asit düzeylerine göre C grubunda istatistiksel olarak azaldığı belirlendi ($p<0.05$; $p<0.001$). K grubu 14:0 ve 15:0 yağ asit düzeylerine göre A grubunda artış tespit edildi ($p<0.05$). C+A grubu 6:0, 11:0, 14:0, C15:0, 20:0 ve 22:0 yağ asit düzeylerinin K grubuna göre azaldığı gözlemlendi ($p<0.01$; $p<0.001$). A grubu 6:0, 11:0, 14:0, 15:0, 20:0 ve 22:0 yağ asit düzeylerinin C+A grubunda azaldığı tespit edildi ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$). Majör yağ asitlerinden 18:0 düzeyinin C ve C+A gruplarında A ve K gruplarına göre nispi oranda azaldığı gözlemlendi ($p>0.05$). K grubu 18:2n6c yağ asit düzeyi C grubunda artarken ($p<0.01$), C+A grubunda da nispi oranda arttığı belirlendi ($p>0.05$). A grubu 18:2n6c yağ asit düzeyi K grubuna göre nispi oranda azalırken ($p>0.05$), C ve C+A grupları 18:2n6c düzeylerinin A grubuna göre arttığı tespit edildi ($p<0.01$; $p<0.001$). C+A grubu 18:3n6 yağ asit düzeyinin K ve A gruplarına göre arttığı belirlendi ($p<0.001$). A grubu 18:3n3 yağ asit düzeyinin C ve C+A gruplarına göre azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$).

Çizelge 5.4 Beyin dokusu mineral düzeyleri (ppm)

Mineraller	K	C	A	C+A
Fe	18.72±0.62	18.23±0.80	20.07±1.59	16.78±0.28
Zn	12.93±0.77	11.07±0.18	11.14±0.04	10.91±0.32
Mg	163.36±4.02	153.39±2.73	152.86±3.26	151.85±3.89
Ca	50.85±1.66	33.44±0.84 ^{cz}	55.38±2.23	52.12±1.09
Al	38.60±1.42	36.06±1.61 ^z	60.04±1.12 ^c	49.35±1.75 ^{cz}
Mn	0.42±0.01	0.40±0.01	0.36±0.01 ^a	0.37±0.01 ^a
Cu	2.27±0.03	2.19±0.06	2.19±0.07	2.13±0.10

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

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

Beyin dokusu mineral düzeyleri Çizelge 5.4'te gösterilmiştir. Tüm grupların Fe düzeyleri arasında istatistiksel fark olmadığı gözlenirken ($p>0.05$), A grubu Fe düzeyi diğer gruplara göre nispi oranda arttığı tespit edildi ($p>0.05$). K grubu Mg düzeyine göre diğer gruplarda nispi oranda azalma gözlemlendi ($p>0.05$). K, A ve C+A grupları Ca düzeyleri arasında istatistiksel fark gözlenmezken ($p>0.05$); C grubu Ca düzeyi K ve A gruplarına göre azaldığı tespit edildi ($p<0.001$). Çalışmanın en önemli sonucu Al düzeyinde tespit edildi. K grubu Al düzeyine göre A grubunda önemli düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.001$). A grubu Al düzeyine göre C ve C+A gruplarında azalma tespit edildi ($p<0.001$). K grubu Mn düzeyine göre A ve C+A gruplarında azalma gözlenirken ($p<0.05$), K ve C grupları arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Tüm grupların Cu düzeyleri arasında istatistiksel fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

Çizelge 5.5 Beyin dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri

Parametreler	K	C	A	C+A
MDA	182.45±7.85	191.21±8.25	256.89±11.23 ^c	202.23±10.74 ^x
GSH	98.75±2.43	94.25±3.34 ^z	75.38±2.34 ^c	84.26±2.49 ^b
Ces	0.16±0.02	0.15±0.01	0.13±0.01 ^b	0.15±0.01 ^x
AChE	144.71±2.24	153.50±2.53 ^z	183.65±3.41 ^c	146.49±2.21 ^z
GST	22.67±0.85	21.73±0.51	18.76±0.72 ^a	19.89±0.63

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

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

Beyin dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri Çizelge 5.5'te gösterilmiştir. A grubu MDA düzeyi K grubuna göre önemli düzeyde arttığı gözlemlendi (p<0.001). C+A grubu MDA düzeyi A grubuna göre azaldığı tespit edildi (p<0.05). K grubu GSH düzeyine göre A ve C+A gruplarında azalma gözlemlendi (p<0.001; p<0.01). A grubu GSH düzeyine göre C+A grubunda nispi oranda arttı (p>0.05). K grubu Ces enzim aktivitesine göre A grubunda azalırken (p<0.01), A grubu Ces enzim aktivitesine göre C+A grubunda arttığı gözlemlendi (p<0.05). K grubu AChE enzim aktivite düzeyine göre A grubunda artış tespit edildi (p<0.001). A grubu AChE enzim aktivite düzeyine göre C+A ve C gruplarında azalma gözlemlendi (p<0.001). K, C, C+A grupları GST enzim aktivite düzeyleri arasında istatistiksel fark gözlenmezken (p>0.05), K grubu GST enzim aktivite düzeyine göre C ve C+A gruplarında nispi oranda azalma tespit edildi. Ancak, K grubu GST enzim aktivite düzeyine göre A grubunda azalma gözlemlendi (p<0.05).

Çizelge 5.6 Beyin dokusu yağ asit düzeyi (%)

Yağ asitleri	K	C	A	C+A
11:0	0,084±0,005	0,102±0,005 ^a	0,116±0,003 ^c	0,108±0,001 ^b
14:0	0,247±0,004	0,209±0,010 ^b	0,203±0,005 ^b	0,188±0,006 ^c
15:0	0,111±0,008	0,092±0,002	0,088±0,007	0,076±0,004 ^a
16:0	29,957±0,656	29,852±0,990	31,059±0,731	28,687±0,926
17:0	0,332±0,008	0,345±0,006	0,329±0,006	0,348±0,022
18:0	36,084±0,645	36,003±0,556	35,911±0,498	33,613±0,318 ^{ax}
20:0	0,409±0,045	0,419±0,063	0,441±0,055	0,496±0,030
22:0	0,232±0,029	0,268±0,020	0,298±0,028	0,308±0,011
23:0	0,066±0,003	0,078±0,020	0,068±0,006	0,104±0,003
24:0	0,260±0,025	0,308±0,013	0,352±0,016 ^a	0,393±0,010 ^c
ΣSFA	67,782±2,786	67,676±2,851	68,865±2,563	64,321±2,412
15:1	0,817±0,026	0,787±0,039 ^y	0,965±0,031 ^a	0,809±0,021 ^x
16:1	2,057±0,116	2,021±0,091 ^x	1,619±0,062 ^a	1,840±0,069
18:1n9t	0,150±0,019	0,090±0,012 ^{ax}	0,151±0,010	0,089±0,010 ^{ax}
18:1n9c	20,105±0,632	20,428±1,091	21,429±1,104	23,215±0,229
20:1n9	1,251±0,185	1,331±0,288	1,608±0,354	1,881±0,185
22:1n9	0,157±0,015	0,171±0,052	0,202±0,033	0,206±0,013
24:1	0,289±0,012	0,365±0,011	0,391±0,023 ^a	0,516±0,023 ^{cy}
ΣMUFA	24,826±0,845	25,193±0,746	26,365±0,821	28,556±0,756 ^a
18:2n6t	0,262±0,012	0,284±0,013	0,221±0,007	0,299±0,005
18:2n6c	0,495±0,036	0,492±0,030	0,488±0,025	0,534±0,080
20:2n6	0,119±0,012	0,132±0,018	0,130±0,009	0,166±0,033
20:3n6	0,126±0,008	0,137±0,004	0,129±0,004	0,166±0,009 ^{bx}
20:4n6	4,045±0,125	3,671±0,158 ^x	2,516±0,103 ^b	3,606±0,127 ^x
22:6n3	2,345±0,155	2,415±0,079 ^z	1,286±0,135 ^c	2,352±0,149 ^z
W ₃	2,345±0,155	2,415±0,079	1,286±0,135	2,352±0,149
W ₆	5,047±0,201	4,716±0,189	3,484±0,145	4,771±0,175
PUFA	7,392±0,412	7,131±0,381 ^z	4,770±0,302 ^c	7,123±0,241 ^z
ΣUSFA	32,218±0,641	32,324±0,712	31,135±0,623	35,679±0,754 ^{by}

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

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

Beyin dokusu yağ asit (%) düzeyleri Çizelge 5.6'da verilmiştir. Tüm grupların ΣSFA düzeyleri arasında istatistiksel fark olmadığı gözlenmesine rağmen,

C+A grubu Σ SFA düzeyinin diğer gruplara göre nispi oranda azaldığı tespit edildi ($p>0.05$). C+A grubu Σ MUFA düzeyinin K grubuna göre arttığı saptandı ($p<0.05$).

A grubu Σ PUFA düzeyinin diğer gruplara göre önemli düzeyde azaldığı tespit gözlemlendi ($p<0.01$). K grubu 11:0 yağ asit düzeyine göre C, A ve C+A gruplarında artarken ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$), K grubu 14:0 yağ asit düzeyinin diğer gruplarda yüksek çıktığı saptandı ($p<0.01$; $p<0.001$). C+A grubu 15:0 yağ asit düzeyinin K grubuna göre azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Beyin dokusu makro yağ asitlerinden 18:0 düzeyi incelendiğinde, C+A grubunun 18:0 yağ asit düzeyi önemli oranda diğer gruplara göre azaldığı saptandı ($p<0.05$). A grubu 15:1 yağ asit düzeyinin diğer gruplara göre yüksek çıktığı tespit edildi ($p<0.05$; $p<0.01$). A grubu 16:1 yağ asit düzeyi K ve C gruplarına göre azalırken ($p<0.05$), A grubu 16:1 yağ asit düzeyine göre C+A grubunda nispi artış tespit edildi ($p>0.05$). K grubu 24:1 yağ asit düzeyine göre A ve C+A gruplarında artış tespit edildi ($p<0.05$; $p<0.001$). C+A grubu C20:3n6 düzeyinin K ve A grubuna göre arttığı saptandı ($p<0.05$; $p<0.001$). Önemli yağ asitlerinden 20:4n6 ve 22:6n3 yağ asit düzeyleri K grubuna göre azalırken ($p<0.01$; $p<0.001$), A grubu bu yağ asit düzeylerine göre C+A grubunda arttığı saptandı ($p<0.05$; $p<0.001$).

6.TARTIŞMA

Al yiyecekler, hava, toprak ve suda yaygın olarak bulunur. Bu mineral endüstride, tarımda ve insanların günlük yaşamında yaygın olarak kullanılmaktadır. Al insan metabolizması organlarında birikerek ciddi hasarlar vermektedir. Bu tez çalışmasında $AlCl_3$ içeren rat karaciğer ve beyin dokuları üzerine 3-benzoil-7-hidroksi kumarin bileşiğinin etkileri incelendi. Dokularda mineraller, yağ asitleri, lipit peroksidasyon ürünü ve antioksidan enzim aktivite değerleri ölçüldü.

Çalışmamızda; Al yüklemesi yapılan rat karaciğer ve beyin dokusunda Al düzeylerinin arttığı gözlemlendi. Ayrıca, karaciğer dokusu Fe ve Cu düzeylerinin de A grubunda arttığı tespit edildi. Al ile ilgili yapılan sıçan doku çalışmalarında Al'nin arttığı rapor edilmiştir [116,117]. Al yüklemesi yapılan metabolizma organlarında diğer mineral düzeylerinin de etkilendiği bildirilmiştir [118,119]. Yang ve ark. yaptığı çalışmada, Al yüklemesi yapılan sıçan karaciğer dokularında Al, Fe ve Cu konsantrasyonlarının arttığı rapor edilmiştir [120]. Ayrıca, Al'ye maruz kalan sıçan karaciğer dokularında Fe düzeylerinin arttığı da bildirilmiştir [121]. Al, Fe^{+3} taşıyıcı transfer proteine bağlanarak, Fe^{+2} 'nin bağlanmasını azalttığı bilinmektedir. Hücrede Fe^{+2} 'nin artışı lipit peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir [122]. Kronik Cu ve Fe yüklemesi sıçan karaciğer ve böbrek dokularında Fe^{+2} artışına neden olmaktadır [123,124]. Al yüklemesi sonucunda Fe kaynaklı oksidatif stresi arttırdığı rapor edilmiştir [125].

Çalışmanın her iki dokusunda, A ve C+A gruplarının Mn düzeylerinin K grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Bazı çalışmalarda Al yüklemesi yapılan sıçan karaciğer dokularında Mn düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir [126,127]. Beyin ve karaciğer dokularında, K grubuna göre Zn ve Mg düzeylerinin A grubunda nispi oranda azaldığını gözlemledik. Eser elementlerin en önemli fonksiyonlarından biri antioksidan enzim sistemlerde göstermektedir. Özellikle Cu, Zn, Fe, Mn ve Mg antioksidan enzim sistemlerde kofaktör olarak kullanılmaktadır [128]. Çalışmamızda, $AlCl_3$ 'e maruz bırakılan sıçan karaciğer dokularında MDA düzeyi artarken, GSH düzeyi ve GST, Ces enzim aktivite düzeyleri azaldı. Bu sonuçlardan, $AlCl_3$ 'ün

peroksidasyon düzeyini arttırarak antioksidan sistem üzerinde olumsuz etkileri olduğunu düşünmekteyiz. Birçok çalışmada, $AlCl_3$ 'e maruz bırakılan rat karaciğer dokularında MDA düzeyinin arttığı, GSH, GSH-Px, SOD ve katalaz (CAT) enzim aktivite düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir [129-131]. Başka bir çalışmada ise GST, SOD, GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerinde azalma gösterdiği bildirilmiştir [132].

Beyin dokusu MDA düzeyleri incelendiğinde A grubu MDA düzeyi artarken, GSH düzeyi ile Ces ve GST enzim aktivite düzeylerinin azaldığı tespit edildi. Bu sonuçlardan, $AlCl_3$ 'ün beyin dokusu mineral ve antioksidan düzeylerine olumsuz etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, Al toksisitesine karşı kullandığımız kumarin maddesinin karaciğer dokusunda Al, Fe ve Cu metabolizmasına olumlu etkilerini gözlemledik. Al uygulanan bireysel grupta artan bu mineralleri azaltan kumarin maddesi ayrıca antioksidan sistem üzerine de pozitif etki göstermiştir. C grubu, A grubunun arttırdığı lipit peroksidasyonu (MDA) azalttığı, azalan GSH ve GST enzim aktivite düzeyini arttırdığı tespit edildi. Kumarin türevli moleküllerin antioksidan kapasitelerinin yüksek olduğu ve bu özelliğinin moleküler yapılarından kaynaklandığı bildirilmiştir. Kumarin moleküllerinin yapılarında bulunan hidroksi, asetoksi ve metoksi gruplarının yapıya antioksidan özellik kazandırdığı rapor edilmiştir. Kumarin moleküllerinin detoksifikasyon özellikleri mevcuttur [133]. Yapılan bir çalışmada, dört farklı kumarin molekülünün karbontetraklorüre (CCl_4) karşı sıçan karaciğerinde etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan esculetin ve scoparone kumarin maddelerinin karaciğerde koruma etkilerinin pozitif olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, CCl_4 'e karşı koruma sağlayan bu kumarinlerin oksidatif stresi engellemesindeki etkinin yapısal özelliklerinden kaynaklandığı da bildirilmiştir [134]. Başka bir çalışmada, ferril nitrilotriasetat (Fe-NTA) ile oksidatif strese maruz bırakılan sıçan dokuları üzerine 1,2-benzopyron kumarin maddesinin etkinliği araştırılmıştır. Araştırmalarında bu kumarin molekülünün, Fe-NTA'nın oluşturduğu yüksek MDA'yı azalttığı, azalan GSH ve GST enzim aktivitesini ise arttırdığı bildirilmiştir. Araştırmalarında kullanılan 1,2-benzopyron kumarin molekülünün düzeltici (amelioratif) etkisinin olduğu açıklanmıştır [133]. Çalışmamızda, Al'nin oluşturduğu

toksik etki ile Ces ve GST enzimleri ilişkilidir. Al; GST ve Ces enzim aktivitesini karaciğer dokusunda azaltmıştır. Ayrıca, beyin dokusundaki GST ve Ces enzim aktivitesinin de azaldığını görmekteyiz. Yapılan literatür araştırmasında, Al'nin sıçan dokularında GST enzim aktivitesini azalttığı rapor edilirken, Ces enzim aktivitesi ile ilgili çalışmaların olmadığını gözlemledik. Yapılan toksikolojik çalışmalarda, kurşun asetat verilen rat dokularında Ces enzim aktivite değerlerinin azaldığı rapor edilmiştir [135]. Bu çalışmanın, Ces enzim aktivitesi üzerine kumarin türevli maddelerin etkileri için önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın en önemli sonuçlarından biri, beyin dokusu AChE enzim aktivite düzeyinde olduğunu tespit ettik. Al grubu beyin dokusunda AChE enzim aktivitesini artırırken, C+A grubunda bu enzim aktivitesinin Al grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Haider ve arkadaşlarının çalışmalarında, akut $AlCl_3$ verilen sıçan beyin hipokampus ve kortekslerde AChE enzim aktivitesi düzeylerinin artarken asetilkolin molekül düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir [136]. Beyin dokusundaki Al ile Alzheimer Hastalığı oluşumu arasında yakın bir ilişki vardır [137]. Ayrıca, yapılan hayvan çalışmalarında Al ve Alzheimer Hastalığının başlangıcı ile bilişsel işlevlerdeki ilgili bozukluklar arasında önemli bağlantı olduğu bildirilmiştir. Al'nin öğrenme ve hafıza kayıplarına neden olması beyin dokusunda kolinerjik fonksiyonların negatif etkilenmesine yol açar [138]. Bilişsel yetenekler, kolinerjik sistemin işlevleriyle güçlü bir şekilde bağlantılıdır [139]. Al maruziyeti sonucunda kolinerjik nöronların özelliğini kaybettiği bildirilmiştir [140]. Daha önce de belirtildiği gibi Al, AChE'nin güçlü bir aktivatörüdür [141,142]. Al, AChE'nin aktivitesini artırarak, sinaptaki ACh'nin erişilebilirliğini azaltır, böylece beyindeki kolinerjik iletimi bozarak bilişsel eksiklikler üretir [143]. Beyinde artan Al konsantrasyonu ile AChE enzim aktivitesi arasındaki ilişki şu şekilde açıklanmıştır. Al, enzimin periferik bölgeleri ile etkileşime girerek ve ikincil yapısını ve nihayetinde aktif bölgesini değiştirerek AChE aktivitesi üzerinde doğrudan etki üretme yeteneğine sahiptir [144]. Beyindeki artmış AChE aktivitesinde rol oynadığı bildirilen bir başka faktör ise, Al intoksikasyonunu takiben apoptotik nöronal kayıptır ve bilişsel işlev bozukluğuna neden olmasıdır [145]. Ayrıca, beyinde artan AChE

aktivitesi, artmış bozunma ve sinapsta asetilkolinin düşük kullanılabilirliği nedeniyle bilişsel işlev bozukluğuna neden olabilir [136].

Çalışmada, karaciğer dokusu yağ asit düzeyleri incelendiğinde önemli bulguların olduğunu tespit ettik. A grubu Σ SFA düzeyinin diğer gruplara göre nispi oranda arttığını görmekteyiz. A grubu majör yağ asitlerinden 18:0 düzeyinin diğer gruplara göre nispi oranda arttığı gözlemlendi. Doymamış yağ asitleri düzeyleri incelendiğinde, A grubu Σ MUFA, W_6 , W_3 , PUFA ve Σ USFA düzeylerinin kontrol grubuna göre nispi oranda azaldığı belirlendi. Doymamış bireysel majör yağ asitlerinden 18:1n9c, 18:2n6c, 20:4n6 ve 22:6n3 yağ asit düzeyleri A grubunda nispi oranda azalmalar tespit edilmiştir. Kumarin maddesi verilen C ve C+A grupları Σ SFA düzeyleri A grubuna göre nispi oranda azaldığı gözlemlendi. Kumarin verilen grupların majör bireysel yağ asitlerinden 18:0 düzeyinde de benzer sonuç tespit edilmiştir. Doymamış yağ asit düzeyleri incelendiğinde kumarin verilen grupların PUFA ve Σ USFA düzeyleri A grubuna göre nispi oranda arttığı belirlendi. A grubu 18:2n6c düzeyine göre kumarin gruplarında artış tespit edildi. Ayrıca A grubu W_6 düzeyinin kumarin gruplarına göre azaldığı tespit edildi. Genel olarak yağ asit düzeylerini değerlendirdiğimizde, Al verilen sıçan karaciğer dokusunda doymuş yağ asit düzeylerini arttırdığı, doymamış yağ asit düzeylerini ise azaltmaya yönelik etkilerini görmekteyiz.

Beyin dokusu yağ asit düzeyleri incelendiğinde, A grubunun 16:0 ve Σ SFA düzeylerinin diğer gruplara göre nispi artış olduğu gözlemlendi. Önemli majör yağ asitlerinden olan 18:0 yağ asit düzeyi C+A grubunda K ve A gruplarına göre anlamlı azaldığı tespit edildi. A grubu 16:1 düzeyi K grubuna göre önemli düzeyde azaldığı belirlendi. Önemli yağ asitlerinden 18:1n9c düzeyinin C+A grubunda diğer gruplara göre nispi oranda arttığı tespit edildi. Ayrıca C+A grubu Σ MUFA düzeyinin K grubuna göre arttığı gözlemlendi. Çalışmanın en önemli sonuçlarından biri de beyin dokusu 20:4n6 ve 22:6n3 yağ asit düzeylerinin A grubunda azalması, kumarin maddesinin etkisiyle C+A grubunda bu yağ asit düzeylerinin artmasıdır. Ayrıca, A grubu W_3 ve W_6 düzeyleri diğer gruplara göre nispi oranda azalırken bu grubun Σ PUFA düzeyi anlamlı olarak azalmıştır. Kumarin maddesinin etkisiyle Σ USFA, Σ PUFA düzeylerinin A grubuna göre arttığı saptandı. Genel olarak beyin dokusu yağ

asit düzeylerinde Al'nin doymuş yağ asit düzeylerini arttırma eğiliminde olduğu gözlenirken, kumarin maddesinin etkisiyle C+A grubunda tekli ve çoklu doymamış yağ asitlerini arttırıcı yönde etkileri gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada AlCl₃ verilen sıçan karaciğer dokusunda Σ SFA düzeyinin arttığı, Σ USFA ve PUFA düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca; bireysel yağ asitlerinden 18:2n6c ve 20:4n6 yağ asit düzeylerini alüminyum verilen grupta azaldığı bildirilmiştir. Beyin dokusunda ise önemli değişikliklerin olmadığı tespit edilmiştir [146].

Sonuç olarak; Al'nin oluşturduğu toksik etkiye karşı kullanılan kumarin türevli molekülün lipit peroksidasyon düzeylerine, antioksidan enzim sistemine ve yağ asit düzeylerine pozitif etki gösterdiğini düşünmekteyiz. İleriki yapılacak deneysel çalışmalar için bu tez çalışmasının ışık tutabileceğini öngörmekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1] N.D. Priest, R.J. Talbot, D. Newton, J.P. Day, S.J. King, L.K. Fifield, ‘‘Uptake by man of aluminum in a public water supply’’, *Human Experimental Toxicology*, vol.17, 296–301, 1988.
- [2] S.A. Burrell, C. Exley, ‘‘There is (still) too much aluminium in infant formulas’’, *BMC Pediatrics*, vol. 10 no. 63, 2010.
- [3] S.C. Bondy, ‘‘Prolonged exposure to low levels of aluminum leads to changes associated with brain aging and neurodegeneration’’, *Toxicology*, vol. 315, pp. 1–7, 2014.
- [4] S.M. Farhat, A. Mahboob, T. Ahmed, ‘‘ Oral exposure to aluminum leads to reduced nicotinic acetylcholine receptor gene expression, severe neurodegeneration and impaired hippocampus dependent learning in mice’’, *Drug and Chemical Toxicology*, pp.1-9, 2019.
- [5] S.C. Bondy, ‘‘Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age related neurodegeneration’’, *Neurotoxicology*, vol. 52, pp. 222–229, 2016.
- [6] S.H. Kim, K.A. Kang, R. Zhang, M.J. Piao, D.O. Ko, Z.H. Wang, S.W. Chae, S.S. Kang, K.H. Lee, H.K. Kang, H.W. Kang, J.W. Hyun ‘‘Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species,’’ *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 29, no. 11, pp. 1319–1326, 2008.
- [7] A. Basile, S. Sorbo, V. Spadaro, M. Bruno, A. Maggio, N. Faraone, S. Rosselli, ‘‘Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (apiaceae),’’ *Molecules*, vol. 14, no.3, pp. 939–952, 2009.
- [8] H. Sigel, A. Sigel, *Metal Ions in biological systems*. New York: Marcel Dekker, 1988.
- [9] R. Dabeka, A. Fouquet, S. Belisle, S. Turcotte, ‘‘Lead, cadmium and aluminum in Canadian infant formulae, oral electrolytes and glucose solutions’’, *Food Additives Contaminants Part A: Chemistry Analysis Control Exposure Risk Assessment*, vol. 28, pp. 744–753. 2011.

- [10] W.R. Harris, Z. Wang, Y.Z. Hamada, ‘‘Competition between transferrin and the serum ligands citrate and phosphate for the binding of aluminum’’, *Inorganic Chemistry*, vol. 42, pp. 3262–3273, 2003.
- [11] R.A. Yokel, S.S. Rhineheimer, P. Sharma, D. Elmore, P.J. McNamara, ‘‘Entry, half-life and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single Al exposure’’, *Toxicological Sciences*, vol. 64, no. 26, pp. 77–82, 2001.
- [12] R.W. Smith, ‘‘Kinetic aspects of aqueous aluminum chemistry: environmental implications’’, *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 149, pp. 81–93, 1996.
- [13] D. Hydes, ‘‘Dissolved aluminium concentration in sea water’’, *Nature*, vol.268, pp. 136–137, 1977.
- [14] G. Crisponi, V. Nurchi, G. Faa, M. Remelli, ‘‘Human diseases related to aluminum overload’’, *Monatshefte Fur Chemie*, vol.142. no. 4, pp.331-340, 2011.
- [15] J.A. Varner, K.F. Jensen, W. Horvath, R.L. Isaacson, ‘‘Chronic administration of aluminum fluoride or sodium fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity’’, *Brain Research*, vol. 784, no. 1–2, pp. 284–298, 1998.
- [16] H.W. Ahn, B. Fulton, D. Moxon, E.H. Jeffery, ‘‘Interactive effects of fluoride and aluminum uptake and accumulation in bones of rabbits administered both agents in their drinking water’’, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 44, no. 3, pp. 337-350, 1995.
- [17] T.B. Drüeke, ‘‘Intestinal absorption of aluminium in renal failure’’, *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 17, no. 2, pp. 13-6, 2002.
- [18] H. Matsumoto, E. Hirasawa, S. Morimura and E. Takahashi, ‘‘Localization of Aluminum in Tea Leaves,’’ *Plant and Cell Physiology*, vol. 17, no. 3, pp. 627-631, 1976.
- [19] K.R. Koch, M.A. Pougnet, S. de Villiers, F. Monteagudo, ‘‘Increased urinary excretion of Al after drinking tea’’, *Nature*, vol. 333, no. 6169, pp. 122-122, 1988.
- [20] R.B. Martin, ‘‘The chemistry of aluminum as related to biology and medicine’’, *Clinical Chemistry*, vol. 32, no. 10, pp. 1797-1806, 1986.

- [21] B. Aspenström-Fagerlund, B. Sundström, J. Tallkvist, N.G. Ilbäck, A.W. Glynn, "Fatty acids increase paracellular absorption of aluminium across Caco-2 cell monolayers", *Chemico- Biological Interactions*, vol.181, no. 2, pp. 272-278, 2009.
- [22] L. Jorhem, G. Haeggglund, "Aluminium in foodstuffs and diets in Sweden", *Z Lebensm Unters Forsch*, vol. 194, no. 1, pp. 38-42, 1992.
- [23] H. Liukkonen-Lilja, S. Piepponen, "Leaching of aluminium from aluminium dishes and packages", *Food Additives Contaminants*, vol.9, no. 3, pp. 213-223, 1992.
- [24] G. Berthon, S. Sjöberg, "Safety of aluminium from dietary intake", in *European Food Safety Authority (EFSA)*, Italy, 2008, pp. 1-34.
- [25] R. Kroes, I.C. Munro, R. Walker, *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. Geneva: World Health Organization, 2007.
- [26] D. Krewski, R.A. Yokel, E. Nieboer, D. Borchelt, J. Cohen, J. Harry, S. Kacew, J. Lindsay, A.M. Mahfouz, V. Rondeau, "Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide", *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B Critical Reviews*, vol. 10, no. 1, pp. 1-269, 2007.
- [27] P.N. Alexandrov, Y. Zhao, A.I. Pogue, M.A. Tarr, T.P. Kruck, M.E. Percy, J.G. Cui, W.J. Lukiw, "Synergistic effects of iron and aluminum on stress-related gene expression in primary human neural cells", *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 8, no. 2, pp. 117-127, 2005.
- [28] R.A. Goyer, "Toxic and essential metal interactions", *Annual Review of Nutrition*, vol. 17, pp. 37-50.
- [29] R.S. Flarends, T. Bin, D. Elmore, S.L. Hem, "A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium", *Food and Chemical Toxicology*, vol.39, no. 2, pp.163-168, 2001.
- [30] L.S. Keith, D.E. Jones, C.H. Chou, "Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations", *Vaccine*, vol. 20, no. 3, pp. 13-17, 2002.
- [31] C.Exley, A. Begum, M.P. Woolley, R.N. Bloor, "Aluminum in tobacco and cannabis and smoking-related disease." *The American journal of medicine*, vol. 119 no. 3, pp. 276-279. 2006.

- [32] T. Bora, M. Merdivan, C. Hamamci, "Levels of trace and major elements in illicit heroin", *Journal of Forensic Science*, vol. 47, no. 5, pp. 1-5, 2002.
- [33] R.A. Yokel, "The toxicology of aluminum in the brain: A review", *Neurotoxicology*, vol. 21, no. 5, pp.813–828, 2000.
- [34] S.M. Saiyed, R.A. Yokel, "Aluminium content of some foods and food products in the USA with aluminium food additives", *Food Additives and Contaminants*, vol. 22, no. 3, pp. 234–244, 2005.
- [35] J. Nie, S. Lv, X. Fu, Q. Niu, "Effects of Al exposure on mitochondrial dynamics in rat hippocampus", *Neurotoxicity Research*, vol. 36, no. 2, pp. 334–346, 2019.
- [36] H.Q. Li, S.P. Ip, G.Q. Zheng, Y.F. Xian, Z.X. Lin, "Isorhynchophylline alleviates learning and memory impairments induced by aluminum chloride in mice", *Chinese Medical Journal*, vol. 13, no. 29, 2018.
- [37] Z. Cao, P.Y. Wang, X. Gao, B. Shao, S.C. Zhao, Y.F. Li, "Lycopene attenuates aluminum-induced hippocampal lesions by inhibiting oxidative stress-mediated inflammation and apoptosis in the rat", *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol.193, pp.143–151, 2019.
- [38] D.R. Sharma, A. Sunkaria, W.Y. Wani, R.K. Sharma, R.J. Kandimalla, A. Bal, K.D. Gill, "Aluminium induced oxidative stress results in decreased mitochondrial biogenesis via modulation of PGC- 1 alpha expression", *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 273, no. 2, pp. 365–380, 2013.
- [39] X. Yang, X. Zhang, J. Zhang, Q. Ji, W. Huang, X. Zhang, Y. Li, "Spermatogenesis disorder caused by T-2 toxin is associated with germ cell apoptosis mediated by oxidative stress", *Environmental Pollution*, vol. 251, pp. 372–379, 2019.
- [40] C.X. Xie, M.P. Mattson, M.A. Lovell, R.A. Yokel, "Intraneuronal aluminum potentiates iron-induced oxidative stress in cultured rat hippocampal neurons", *Brain Research*, vol. 743, no.1–2, pp. 271- 277, 1996.
- [41] R.J. Ward, Y. Zhang, R.R. Crichton, "Aluminium toxicity and iron homeostasis", *Journal Inorganic Biochemistry*, vol. 87, no. 1–2, pp. 9–14, 2001.

- [42] Z. Wu, Y. Du, H. Xue, Y. Wu, B. Zhou, ‘‘Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production’’, *Neurobiology of Aging*, vol. 33, no. 1, pp.191–199, 2012.
- [43] M. González, C. Bernal, S. Mahieu, M. Carrillo, ‘‘The interactions between the chronic exposure to aluminum and liver regeneration on bile flow and organic anion transport in rats’’, *Biological Trace Element Research*, vol. 127, no. 2, pp. 164–176, 2009.
- [44] Y. Aoyama, T. Katayama, M. Yamamoto, H. Tanaka, K. Kon, ‘‘A new antitumor antibiotic product, demethylchartreusin, isolation and biological activities,’’ *The Journal of Antibiotics*, vol. 45, no. 6, pp. 875–878, 1992.
- [45] M. Iranshahi, M. Askari, A. Sahebkar, D. Hadjipavlou- Litina, ‘‘Evaluation of antioxidant, antiinflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin,’’ *DARU Journal of Faculty of Pharmacy*, vol. 17, no. 2, pp. 99–103, 2009.
- [46] W.C. Evans, *Trease and Evans Pharmacognosy*. Edinburg: Saunders, 2009.
- [47] J.A.Mead, J.N. Smith, R.T.Williams, ‘‘Studies in detoxication. 72. The metabolism of coumarin and of o-coumaric acid,’’ *The Biochemical Journal*, vol. 68, no. 1, pp. 67–74, 1958.
- [48] C. Spino, M. Dodier, S. Sotheeswaran, ‘‘Anti-HIV coumarins from calophyllum seed oil,’’ *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 8, no. 24, pp. 3475–3478, 1998.
- [49] S. Rosselli, A.M. Maggio, N. Faraone, V. Spadaro, M. Bruno, K.H. Lee, K.F. Bastow, S.M. Natschke, ‘‘The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol,’’ *Natural Product Communications*, vol. 4, no. 12, pp. 1701–1706, 2009.
- [50] A. Rahman, M. Shabbir, S.Z. Sultani, A. Jabbar, M.I. Choudhary, ‘‘Cinnamates and coumarins from the leaves of *Murraya paniculata*,’’ *Phytochemistry*, vol. 44, no.4, pp. 683–685, 1997.
- [51] A.J. Cohen, ‘‘Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and

their significance to man,” *Food and Cosmetics Toxicology*, vol. 17, no. 3, pp. 277–289, 1979.

[52] R.W. Puller, H.R. Bokesch, K.R. Gustafson, T.C. McKee, J.H. Cardellina II, J.B. McMahon, G.M. Cragg, D.D Soejarto, M.R. Boyd, “HIV inhibitory coumarins from latex of the tropical rainforest tree *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*,” *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 4, no. 16, pp. 1961–1964, 1994.

[53] J. Choi, K.T. Lee, H.Ka, W.T. Jung, H.J. Jung, H.J. Park, “Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties,” *Archives of Pharmacal Research*, vol. 24, no. 5, pp. 418–423, 2001.

[54] F. Bourgaud, A. Hehn, R. Larbat, S. Doerper, E. Gontier, S. Kellner, U. Matern, “Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes,” *Phytochemistry Reviews*, vol. 5, no. 2-3, pp. 293–308, 2006.

[55] D. Bogdal, “Coumarins: fast synthesis by Knoevenagel condensation under microwave irradiation,” *Journal of Chemical Research, Synopses*, vol.8, pp.468–469, 1998.

[56] B.G. Lake, “Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment,” *Food and Chemical Toxicology*, vol.37, no. 4, pp. 423–453, 1999.

[57] N.B. Piller, “A comparison of the effectiveness of some anti inflammatory drugs on thermal oedema,” *British Journal of Experimental Pathology*, vol. 56, no. 6, pp. 554–560, 1975.

[58] A. Witaicenis, L. N. Seito, and L. C. Di Stasi, “Intestinal antiinflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis,” *Chemico- Biological Interactions*, vol. 186, no. 2, pp. 211–218, 2010.

[59] O.S. Kwon, J.S. Choi, N. Islam, Y.S. Kim, H.P. Kim, “Inhibition of 5-lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of *Artemisia capillaris* and its constituents,” *Archives of Pharmacal Research*, vol. 34, no. 9, pp. 1561–1569, 2011.

[60] J. Hirsh, J.E. Dalen, D.R. Anderson, L. Poller, H. Bussey, J. Ansell, D. Deykin, “Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness and optimal

therapeutic range,” *American College of Chest Physicians*, vol. 119, no. 1, pp. 8–21, 2001.

[61] K. Hod’ak, V. Jakesov’a, V. Dad’ak, “On the antibiotic effects of natural coumarins. VI. The relation of structure to the antibacterial effects of some natural coumarins and the neutralization of such effects,” *Cesko-Slovenska Farmacie*, vol. 16, no. 2, pp. 86–91, 1967.

[62] M. Gellert, M.H. O’Dea, T. Itoh, J.I. Tomizawa, “Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 12, pp. 4474–4478, 1976.

[63] S.K. Poole, C.F. Poole, “Thin-layer chromatographic method for the determination of the principal polar aromatic flavour compounds of the cinnamons of commerce,” *The Analyst*, vol. 119, no. 1, pp. 113–120, 1994.

[64] C.M. Wang, W. Zhou, C.X. Li, H. Chen, Z.Q. Shi, Y.J. Fan, “Efficacy of osthol, a potent coumarin compound, in controlling powdery mildew caused by *Sphaerotheca fuliginea*,” *Journal of Asian Natural Products Research*, vol. 11, no. 9, pp. 783–791, 2009.

[65] A.D. Patil, A.J. Freyer, D.S. Eggleston, R.C. Haltiwanger, M.F. Bean, P.B. Taylor, M.J. Caranfa, A.L. Breen, H.R. Bartus, R.K. Johnson, “The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 36, no. 26, pp. 4131–4138, 1993.

[66] Y. Kashman, K.R. Gustafson, R.W. Fuller, J.H. Cardellina, J.B. McMahon, M.J. Currens, S.H. Hughes, G.M. Cragg, M.R. Boyd, R.W. Buckheit Jr, “The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 35, no. 15, pp. 2735–2743, 1992.

[67] J. Portugal, “Chartreusin, elsamicin A and related anticancer antibiotics,” *Current Medicinal Chemistry Anti-Cancer Agents*, vol. 3, no. 6, pp. 411–420, 2003.

[68] K.W. Luo, J.G. Sun, J.Y. Chan, L. Yang, S.H. Wu, K.P. Fung, F.Y. Liu, “Anticancer effects of imperatorin isolated from *Angelica dahurica*: Induction of

apoptosis in HepG2 cells through both death-receptor and mitochondria-mediated pathways,” *Chemotherapy*, vol. 57, no. 6, pp. 449–459, 2011.

[69] D. Yang, T. Gu, T. Wang, Q. Tang, C. Ma, “Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells,” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 74, no. 7, pp. 1430–1434, 2010.

[70] E.S. Yun, S.S. Park, H.C. Shin, Y.H. Choi, W.J. Kim, S.K. Moon “p38 MAPK activation is required for esculetin-induced inhibition of vascular smooth muscle cells proliferation,” *Toxicology in Vitro*, vol. 25, no. 7, pp. 1335–1342, 2011.

[71] P.E. Nguenefack-Mbuyo, T.B. Nguenefack, A.B. Dongmo, S. Afkir, A.G.B. Azebaze, T. Dimo, A. Legssyer, A. Kamanyi, A. Ziyat, “Anti-hypertensive effects of the methanol/methylene chloride stem bark extract of *Mammea africana* in 1-NAME-induced hypertensive rats,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 117, no. 3, pp. 446–450, 2008.

[72] C.C. Chiang, M.J. Cheng, C.F. Peng, H.Y. Huang, I.S. Chen, “Anovel dimeric coumarin analog and antimycobacterial constituents from *Fatoua pilosa*,” *Chemistry and Biodiversity*, vol. 7, no. 7, pp. 1728–1736, 2010.

[73] G.L. Nelsestuen, “Role of γ carboxyglutamic acid. An unusual protein transition required for the calcium dependent binding of prothrombin to phospholipid,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 251, no. 18, pp. 5648–5656, 1976.

[74] J.J. Luszczki, E. Wojda, M.A. Mach, W. Cisowski, M. Glensk, K. Glowniak, S.J. Czuczwar, “Anticonvulsant and acute neurotoxic effects of imperatorin, osthole and valproate in the maximal electroshock seizure and chimney tests in mice: a comparative study,” *Epilepsy Research*, vol. 85, no. 2-3, pp. 293–299, 2009.

[75] X. Chen, R. Pi, Y. Zou, M. Liu, X. Ma, Y. Jiang, X. Mao, X. Hu, “Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice by osthole, a natural coumarin,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 629, no. 1–3, pp. 40–46, 2010.

[76] E. Shin, K.M. Choi, H.S. Yoo, C.K. Lee, B.Y. Hwang, M.K. Lee, “Inhibitory effects of coumarins from the stem barks of *Fraxinus rhynchophylla* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells,” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 33,

no. 9, pp.1610–1614, 2010.

[77] N.Y. Kim, H.O. Pae, Y.S. Ko, B.M. Choi, C.D. Jun, H.T. Chung, M. Inagaki, R. Higuchi, Y.C. Kim, “In vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituents from *Fraxinus rhynchophylla*,” *Planta Medica*, vol. 65, no. 7, pp. 656–658, 1999.

[78] D.M. Fort, K. Rao, S.D. Jolad, J. Luo, T. Carlson, S.R. King, “Antihyperglycemic activity of *Teramnus labialis* (Fabaceae),” *Phytomedicine*, vol. 6, no. 6, pp. 465–467, 2000.

[79] K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, “Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity”, *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, vol. 2013, 2013.

[80] P.M. Kidd, “Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage”, *Alternative Medicine Reviews*, vol. 2, pp. 155-176, 1997.

[81] T. Brittain, B. Tottle, “Glutathione in the red blood cells of embryonic mice”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 83, pp. 843-46, 1986.

[82] J.C. Franson, D.J. Hoffman, J.A. Schmutz, “Blood Selenium Concentrations and enzyme activities related to glutathione metabolism”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 21, no. 10, pp. 2179-84, 2002.

[83] D.J. Reed, “*Introduction to Biochemical Toxicology*”. United States of America: Wiley and Sons Interscience, 2000.

[84] J. Martensson, J.C. Lai, A. Meister, “High affinity transport of glutathione is part of a multi-component system essential for mitochondrial function”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 18 pp. 7185–7189, 1990.

[85] A.Z. Reznick, L. Packersen, C.K. Sen, J.O. Holloszy, M.J. Jackson, *Free Radical and Oxidative Damage in Biology and Medicine*. London: Birkhauser Publisher, 1998.

[86] H.J. Stein, M.M. Oosthuizen, R.A. Hinder, H. Lamprechts, “Oxygen free radicals and glutathione in hepatic ischemia reperfusion injury”, *Journal of Surgical Research*, vol. 50, no. 4, pp. 398-402, 1991.

- [87] M.E. İnal, E. Sunal, G. Kanbak, "Age related changes in the glutathione redox system", *Cell Biochemistry and Function*, vol. 20, no. 1, pp. 61-66, 2002.
- [88] E.L. Çaylak, "Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ve antioksidanlar", *Tıp Araştırma Dergisi*, vol. 9, no. 1, pp. 73-83, 2011.
- [89] S. Chavan, L. Sava, V. Saxena, S. Pillai, A. Sontakke, D. İngöle, "Reduced glutathione: Importance of specimen collection", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 150-152, 2005.
- [90] J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey, "Glutathione transferases", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 45, no. 1, pp. 51-88, 2005.
- [91] R.N. Armstrong, "Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases", *Chemical Research in Toxicology*, vol.10, no. 1, pp. 2-18, 1997.
- [92] M.A. Gyamfi, I.I. Ohtani, E. Shinno, Y. Aniya, "Inhibition of glutathione s-transferases by Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea, in vitro", *Food Chemical Toxicology*, vol. 42, no. 9, pp. 1401-1408, 2004.
- [93] R. Memisoğulları, "Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi", *Duzce Tıp Fakültesi Dergisi*, vol.7, no. 3, pp. 30-39, 2005.
- [94] F.J. Leinweber, "Possible physiological roles of carboxylic ester hydrolases", *Drug Metabolism Reviews*, vol. 18, no. 4, pp. 379-439, 1987.
- [95] M.G. Barron, K.A. Charron, W.T. Stott, S.E. Duvall, "Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout", *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, no. 11, pp. 2506-2511, 1999.
- [96] A.Güven, "İmportance of acetylcholinesterase and its inhibitors", *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, vol.6, no. 1-2, pp. 145-151, 2000.
- [97] U. Kuşcuoğlu, "Deneysel omurilik yaralanmasında agmatinin doza bağımlı nöroprotektif etkilerinin incelenmesi", Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi, 2004.
- [98] E.L. Smith, R.R. Hill, I.R. Lehmann, "Principles of Biochemistry General Aspects", New York: McGraw-Hill, 1983.

- [99] V. Düzgüner, "Deneysel olarak diyabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun lipit peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisi", Yüksek lisans tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi, 2005.
- [100] D.D. Rio, A.J. Stewart, N.A. Pellegrini, "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress", *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 15, no. 4, pp. 316-328, 2005.
- [101] D.Voet, J.G. Voet, *Biochemistry*. New York: John Wiley and Sons Interscience, 1990.
- [102] M. Aksoy, *Beslenme Biyokimyası*. Ankara:Hatiboglu Yayınları, 2008.
- [103] A. Ozkaya, S. Celik, A. Yuce, Z. Sahin, O. Yilmaz," The effects of ellagic acid on some biochemical parameters in the liver of rats against oxidative stress induced by aluminum", *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, vol.16, no. 2, pp. 263-268, 2010.
- [104] N. Khan, S. Sharma, S. Sultana," Attenuation of potassium bromate-induced nephrotoxicity by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats: Chemoprevention against free radical-mediated renal oxidative stress and tumor promotion response", *Redox Report*, vol.9, no. 1, pp. 19-28, 2004.
- [105] J. Sedlak, R.H. Lindsay, "Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent", *Analytical Biochemistry*, vol.25, no. 1, pp. 192-205, 1968.
- [106] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, "Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation", *Journal of biological Chemistry*, vol. 249, no. 22, pp. 7130-7139, 1974.
- [107] Z.A. Placer, L.L Cushman, B.C. Johnson, "Estimation of product of lipid peroxidation (malony dialdehyde) in biochemical systems", *Analytical Biochemistry*, vol.16, no. 2, pp. 359-364, 1996.
- [108] U. Nousiainen, R. Törrönen, "Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by in vivo and in vitro inhibition", *General Pharmacology; The Vascular System*, vol.15, no. 3, pp. 223-227, 1984.

- [109] P. Santhoshkumar, T. Shivanandappa, “In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver”, *Chemico-biological interactions*, vol.119, pp. 227-282, 1999.
- [110] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”, *Biochemical Pharmacology*, vol.7, no. 2, pp. 88-95, 1961.
- [111] M. Özmen, S.E. Dominguez, A.Fairbrother, “Effects of dietary azinphos methyl on selected plasma and tissue biomarkers of the gray-tailed vole”, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, vol.60, no. 2, pp. 194-201, 1998.
- [112] M.M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding”, *Analytical Biochemistry*, vol.72, no. 1-2, pp. 248-254, 1976.
- [113] A. Hara, N.S. Radin, “Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent”, *Analytical Biochemistry*, vol. 90, no. 1, pp. 420-426, 1978.
- [114] W.W. Christie, “*Gas Chromatography and Lipids*”, Glasgow: The Oil Press, 1992.
- [115] A. Kurt, A.F. Ayhan, M. Koca, “Kumarin Türevli Kopolimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu”, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol. 22, no. 3, pp. 880-887, 2018.
- [116] N. Kaneko, H. Yasui, J. Takada, K. Suzuki, H. Sakurai, “Orally administered aluminum-maltolate complex enhances oxidative stress in the organs of mice”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 98, no. 12, pp. 2022-2031, 2004.
- [117] M.G. Abubakar, A. Taylor, G.A. Ferns, “Aluminium administration is associated with enhanced hepatic oxidant stress that may be offset by dietary vitamin E in the rat”, *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 84, no. 1, pp. 49-54, 2003.
- [118] A. Mohammadiras, M. Abdollahi, “A systematic review on oxidant antioxidant imbalance in aluminium toxicity”, *International Journal of Pharmacology*, vol. 7, no. 1, pp. 12–21, 2011.

- [119] M.L. Turski, D.J. Thiele, ‘‘New roles for copper metabolism in cell proliferation, signalling and disease’’, *Journal of Biological Chemistry*, vol.284, no. 2, pp.717– 721, 2009.
- [120] Y. Yang, H. Wang, Y. Guo, W. Lei, J. Wang, X. Hu, J. Yang, Q. He, ‘‘Metal ion imbalance-related oxidative stress is involved in the mechanisms of liver injury in a rat model of chronic aluminum exposure’’, *Biological Trace Element Research*, vol.173, no. 1, pp.126–131, 2016.
- [121] R.J. Ward, Y. Zhang, R.R. Crichton, ‘‘Aluminium toxicity and iron homeostasis’’, *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol.87, no. 1-2, pp.9-14, 2001.
- [122] B. Nehru, P. Anand, ‘‘Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains’’, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol.19, no. 2-3, pp.203-208, 2005.
- [123] H. Malhi, B. Joseph, M.L. Schilsky, S. Gupta, ‘‘Development of cell therapy strategies to overcome copper toxicity in the LEC rat model of Wilson disease’’, *Regenerative Medicine*, vol.3, no. 2, pp.165–173, 2008.
- [124] K. Bishu, R. Agarwal, ‘‘Acute injury with intravenous iron and concerns regarding long-term safety’’, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol.1, no. 1, pp.19-23, 2006.
- [125] A. Becaria, A. Campbell, S.C. Bondy, ‘‘Aluminum as a toxicant’’, *Toxicology and Industrial Health*, vol.18, no. 7, pp.309-320, 2002.
- [126] J.L. Esparza, M. Gomez, J.L. Domingo, ‘‘Role of melatonin in aluminum-related neurodegenerative disorders: A review’’, *Biological Trace Element Research*, vol.188, no.1, pp.60-67, 2019.
- [127] A. Ozkaya, H. Ciftci, A. Dayangac, B.S. Cevrimli, A. Olcucu, S. Celik, ‘‘Effects of ellagic acid and hesperetin on levels of some elements in livers of aluminum-induced rats’’, *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*, vol.38, no.3, pp.345-349, 2013.
- [128] C. Meplan, ‘‘Trace elements and ageing, a genomic perspective using selenium as an example’’, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 25, no.1, pp.11-16, 2011.

- [129] S. Shrivastava, "Combined effect of HEDTA and selenium against aluminium induced oxidative stress in rat brain", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 26, no. 2-3, pp. 210-214, 2012.
- [130] M.E. Mahmoud, S.S. Elsoadaa, "Protective effect of ascorbic acid, biopropolis and royal jelly against aluminum toxicity in rats", *Journal of Natural Sciences Research*, vol.3, no.1, pp.102-112, 2013.
- [131] I. Bouasla, A. Bouasla, A. Boumendjel, M. Messarah, C. Abdennour, M.S. Boulakoud, A.E. Feki, "Nigella sativa Oil Reduces Aluminium Chloride-Induced Oxidative Injury in Liver and Erythrocytes of Rats", *Biological Trace Element Research*, vol.162, no. 1-3, pp. 252-261, 2014.
- [132] N.H. Nour-Eldein, E.A. Hassanin, W.M. El-Sayed, "Mitigation of Acute Aluminum Toxicity by Sodium Selenite and N-Acetylcysteine in Adult Male Rats", *Biological Trace Element Research*, vol. 183, no. 1, pp. 128-137, 2018.
- [133] N. Khan, S. Sharma, S. Sultana, "Amelioration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced renal oxidative stress and tumor promotion response by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats", *Cancer Letters*, vol.210, no. 1, pp.17-26, 2004.
- [134] M. Atmaca, H.M. Bilgin, B.D. Obay, H. Diken, M. Kelle, E. Kale, "The hepatoprotective effect of coumarin and coumarin derivatives on carbon tetrachloride-induced hepatic injury by antioxidative activities in rats", *Journal of Physiology and Biochemistry*, vol. 67, no. 4, pp. 569-576, 2011.
- [135] A. Ozkaya, Z. Sahin, M. Kuzu, Y.S. Saglam, M. Ozkaraca, M. Uckun, E. Yologlu, V. Comakli, R. Demirdag, S. Yologlu, "Role of geraniol against lead acetate-mediated hepatic damage and their interaction with liver carboxylesterase activity in rats", *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol.124, no. 1, pp. 80-87, 2018.
- [136] L. Liaquat, S. Sadir, Z. Batool, S. Tabassuma, S. Shahzad, A. Afzal, S. Haider, "Acute aluminum chloride toxicity revisited: Study on DNA damage and histopathological, biochemical and neurochemical alterations in rat brain", *Life Sciences*, vol. 217, pp. 202-211, 2019.

- [137] M. Kawahara, M. Kato-Negishi, "Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypothesis", *International of Journal Alzheimer's Disease*, vol. 2011, 2011.
- [138] K.R. Dave, A.R. Syal, S.S. Katyare, "Effect of long-term aluminum feeding on kinetics attributes of tissue cholinesterases", *Brain Research Bulletin*, vol.58, no.2, pp.225–233, 2002.
- [139] G. Qi-Hai, W. Qin, H. Xie-Nan, S. An-Sheng, N. Jing, S. Jing-Shan, "Protective effect of Ginkgo biloba leaf extract on learning and memory deficit induced by aluminium in model rats", *Chinese Journal of Integrative Medicine*, vol.12, no.1, pp. 37–41, 2006.
- [140] P.P. Goncalves, V.S. Silva, "Does neurotransmission impairment accompany aluminium neurotoxicity?", *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol.101, no. 9, pp.1291–1338, 2007.
- [141] P. Zatta, M. Ibn-Lkhayat-Idrissi, P. Zambenedetti, M. Kilyen, T. Kiss, "In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase", *Brain Research Bulletin*, vol.59, no. 1, pp. 41–45, 2002.
- [142] S.V. Thirunavukkarasu, S. Venkataraman, S. Raja, L. Upadhyay, "Neuroprotective effect of Manasamitra vatakam against aluminium induced cognitive impairment and oxidative damage in the cortex and hippocampus of rat brain", *Drug and Chemical Toxicology*, vol.35, no. 1, pp. 104–115, 2012.
- [143] K. Blennow, M.J. de Leon, H. Zetterberg, "Alzheimer's disease", *Lancet*, vol.368, no. 9533, pp. 387–403, 2006.
- [144] V. Kakkar, I.P. Kaur, "Evaluating potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles in aluminium induced behavioral, biochemical and histopathological alterations in mice brain", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 11, pp. 2906–2913, 2011.
- [145] S.M. Ravi, B.M. Prabhu, T.R. Raju, P.N. Bindu, "Long-term effects of postnatal aluminium exposure on acetylcholinesterase activity and biogenic amine neurotransmitters in rat brain", *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 44, no. 4, pp. 473–478, 2000.

[146] A. Özkaya, S. Çelik, ‘‘Oksidatif strese maruz kalan ratların bazı biyokimyasal parametrelerine hesperetin ve ellagik asidin etkisi’’, Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, 2007.

