

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARELERDE AKUT BAKIR TOKSİKASYONUNUN BİYOKİMYASAL VE
HİSTOPATOLOJİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

Safiye Nihan ÖZEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Yard. Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

TEMMUZ-2007

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Safiye Nihan Özen'in yüksek lisans tezi olarak hazırladığı **“Farelerde akut bakır toksikasyonunun biyokimyasal ve histopatolojik yönden araştırılması”** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy.....ile kabul edilmiştir.

...../...../2007

Adı Soyadı	İmza
Başkan :
Üye :
Üye :
Üye :

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2007 tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Vahit ALIŞOĞLU
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada intraperitoneal olarak 7 gün süresince bakır sülfat verilen albino farelerde anti oksidan özelliği olduğu bilinen glutatyonun karaciğer dokusu üzerine olan koruyucu etkisi biyokimyasal olarak bu dokudaki glutatyon ve malondialdehit seviyelerinin ölçülmesi ile histopatolojik olarak da doku hasarlarının karşılaştırılması yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

Yüksek Lisans çalışmam süresince her türlü yardım ve desteklerinden ötürü danışman Hocam Yard. Doç. Dr. Yılmaz Çiğremiş'e içten teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışma sırasında beni teşvik eden ve yardımlarını esirgemeyen sevgili eşim Araş. Gör. Dr. Hasan Özen'e sonsuz teşekkürler ederim. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı Öğretim üyelerinden Doç. Dr. Kadir Özcan ve Yard. Doç. Dr. Musa Karaman'a ve ayrıca benimle beraber aynı bölümde yüksek lisans yapan arkadaşım Dinçer Erdağ'a yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	V
RESİMLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII

1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Bakır Metabolizması	4
2.2. Bakır Toksikasyonu	7
2.2.1. Bakır toksikasyonunun klinik bulguları ve patolojisi	10
2.2.2. Bakır ve oksidatif hasar	12
2.3. Oksidatif Stres	15
2.3.1. Serbest Radikaller	16
2.3.2. Glutasyon ve Glutasyon Peroksidazlar	18
2.3.2.1. Glutasyon	18
2.3.2.2. Glutasyon peroksidazlar	19
2.3.3. Lipit Peroksidasyonu	20
2.3.3.1. Aldehitik ürünler ve malondialdehit	20
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	23
3.1.2. Kullanılan Aletler	23
3.1.3. Farelerin Temini ve Bakımı	23
3.1.4. Deney Grupları	24

3.2. Yöntemler	24
3.2.1. Histopatolojik İncelemeler	24
3.2.2. Biyokimyasal Analizler	25
3.2.2.1. GSH Analizi	25
3.2.2.1.1. Kullanılan reaktifler	25
3.2.2.1.2. GSH seviyesinin tayini	25
3.2.2.2. MDA analizi	26
3.2.2.2.1. Kullanılan reaktifler	26
3.2.2.2.2. MDA düzeyinin tayini	26
3.2.3. İstatistiki Analiz	27
4. BULGULAR	28
4.1. Histopatolojik Bulgular	28
4.2. Biyokimyasal Bulgular	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
6. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	47

FARELERDE AKUT BAKIR TOKSİKASYONUNUN BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada glutatyonun (GSH) akut bakır toksikasyonu üzerine olan etkisi histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırıldı. Bu amaçla, her birinde 7 adet erkek albino fare bulunan dört grup; kontrol, GSH, bakır ve bakır + GSH oluşturuldu. Gruplara 7 gün süreyle intraperitoneal olarak sırasıyla % 0.9'luk serum fizyolojik, vücut ağırlığına 250 mg/kg GSH, vücut ağırlığına 33 mg/kg bakır sülfat ve vücut ağırlığına 33 mg/kg bakır sülfat ile artı olarak 250 mg/kg GSH verildi. Deney sonrasında fareler ötenazi edilerek karaciğer dokuları alındı. Dokuların yarısı histopatolojik incelemeler için %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edilerek parafin bloklar hazırlandı ve hematoksilin eozin boyama için kesitler alındı. Dokuların diğer yarısı biyokimyasal olarak dokudaki GSH ve malondialdehitin tespiti için kullanıldı. Bakır verilen farelerin karaciğerlerinin histopatolojik incelemesinde şiddetli derecede hidropik dejenerasyon ve yaygın nekrozlar ile Kupffer hücre proliferasyonu ve lenfositik mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi. Bakır ile beraber GSH verilen farelerin karaciğerlerinde ise dejeneratif bozukluklar daha hafif şiddetteydi. Biyokimyasal analizlerde bakır verilen farelerde kontrol grubundakilere oranla karaciğerlerindeki GSH oranı istatistiki olarak anlamlı şekilde azalmışken ($P<0,05$), MDA oranı ise istatistiki olarak anlamlı biçimde artmıştı ($P<0,05$). Bakır ile beraber GSH verilen farelerde, sadece bakır verilen farelere oranla istatistiksel anlamda olmamakla beraber GSH miktarında artma ($P>0,05$) ve istatistiki olarak anlamlı derecede MDA oranında azalma gözlemlendi ($P<0,05$). Bu bulgular doğrultusunda akut olarak yüksek dozda bakır toksikasyonuna maruz kalan farelerde, GSH verilmesi ile oluşan toksik hasarların kısmen önlenebildiği sonucu elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakır, Toksikasyon, Glutatyon, Malondialdehit

BIOCHEMICAL AND HISTOPATHOLOGICAL INVESTIGATIONS ON ACUTE COPPER TOXICOSIS IN MICE

ABSTRACT

In this study, the effect of glutathione (GSH) on acute copper toxicosis was investigated by histopathological and biochemical means. For this purpose, four groups; control, GSH, copper, and copper + GSH, each composed of 7 male albino mice were made. The groups were given intraperitoneally for 7 days 0.9% serum physiologic, 250 mg/kg body weight GSH, 33 mg/kg body weight copper sulfate, and 33 mg/kg body weight copper sulfate plus 250 mg/kg body weight GSH, respectively. At the end of the treatments, the mice were euthanized and the liver tissues were collected. Half of each liver tissue was fixed in 10% buffered formaldehyde solution and paraffin embedded, and then for hemotoxylin and eosin staining, sections were cut. The other half of the tissues were used for the biochemical analysis of GSH and malondialdehyde (MDA) levels. In histopathological investigation of the liver tissues of the copper group, severe hydropic degeneration and widespread necrosis, proliferation of Kupffer cells and lymphocytic mononuclear cell infiltrations were observed. In the livers of copper + GSH group, degenerative changes were less severe. In biochemical analysis, GSH level was decreased and MDA level was significantly increased in the copper group compared to the control group ($P < 0.05$). In copper + GSH group, though not statistically significant, GSH level was increased ($P > 0.05$) and while MDA level was significantly decreased ($P < 0.05$) compared to the copper alone group. These findings suggest that, GSH supplementation partially protects against copper induced toxicological hazard.

Key Words: Copper, Toxicosis, Glutathione, Malondialdehyde

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

1. Simgeler

mg	:	miligram
ml	:	mililitre
kg	:	kilogram
µg	:	mikrogram
µl	:	mikrolitre
nm	:	nanometre
lt	:	Litre

2. Kısaltmalar

HE	:	Hematoksilen ve eozin
MT	:	Metallotionein
TBARM	:	Tiobarbitürik asit reaktif maddeler
ATP	:	Adenozin Tri Fosfat
DNA	:	Deoksi Ribonükleik Asit
GSH	:	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	:	Oksitlenmiş glutatyon
GPx	:	Glutatyon peroksidaz
GR	:	Glutatyon redüktaz

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

- Resim 1.** Serum fizyolojik verilen kontrol grubundaki bir farenin karaciğeri, resim normal karaciğer histolojisini göstermektedir, HE, x185 29
- Resim 2.** Sadece GSH verilen bir farenin karaciğer dokusu. Histolojik yapıda herhangi bir değişiklik oluşmamış, HE, x185 29
- Resim 3.** Bakır sülfat verilen bir farenin karaciğerinde şiddetli derecede hidropik dejenerasyon ve koagülasyon nekrozu ile Kupffer hücre proliferasyonu ve lenfositik mononükleer hücre infiltrasyonu, HE, x185 30
- Resim 4.** Bakır sülfat ile birlikte GSH verilen bir farenin karaciğerin ışık mikroskopik görüntüsü. Periasinar tarzda olmak üzere hafiften orta şiddetliye değişen oranda hidropik dejenerasyon ve yer yer nekrozis, HE, x185 30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. Akut bakır uygulamasının fare karaciğer GSH ve MDA'sına etkileri 31

1. GİRİŞ

Bakır yeryüzünde yaygın olarak bulunan bir metal olmasının yanında organizmalarda önemli bir çok biyolojik mekanizmaların yürütülmesi için de gerekli olan bir iz elementtir. Bakır özellikle kolayca elektron alış verişi yapabilmesi kapasitesi nedeni ile elektron taşınmasında önemli bir kofaktör olarak hareket eder [1]. Ancak bakırın vücutta fazla oranda birikmesi önemli bozuklukların oluşmasına da neden olabilir. Fizyolojik şartlarda vücuttaki bakır oranı çeşitli sistemlerin uyumlu çalışmaları ile normal bir aralıkta tutulurken [2], çeşitli sebeplerle vücuda su ve gıdalar yoluyla fazla miktarda bakır alınması, diyetteki bileşenlerin değişmesi veya gıdaya bağlı olmayan çeşitli genetik bozukluklar sebebi ile, bakır vücutta birikerek toksikasyona neden olabilir [3]. Toksikasyon olaylarında, bakır metabolize olduğu hedef organ olan karaciğerde de önemli hasarlara neden olur. Oluşan bu doku hasarının, bakırın reaktif oksijen türleri adı verilen ve vücutta çeşitli mikro ve makro moleküller ile tepkimeye girerek onların yapılarını ve fonksiyonlarını bozmaları suretiyle oluşturduğu bildirilmektedir [3-5]. Reaktif oksijen türleri tarafından vücutta oluşturulan doku hasarları oksidatif stres adı verilen bir seri olaylar sonucu şekillenir. Vücut bu tür strese karşı çeşitli yöntemler geliştirmekle beraber şayet oluşan oksijen radikalleri fazla miktarda ise koruyucu fonksiyonlar yeterince çalışmaz. Bu koruyucu sistemlerden birisi glutatyon (GSH) adı verilen ve bir çok biyolojik süreçte görev alan bir moleküldür [6]. GSH'nin antioksidan etkisi glutatyon peroksidaz (GPx) adı verilen enzim için bir kofaktör olmasından kaynaklanır. GPx ise hidrojen peroksit ve diğer hidroperoksitler gibi hasar verici moleküllerin suya indirgenmesini katalizlemek suretiyle bu moleküllerin hücreye zarar vermelerini önleyen önemli bir enzimdir [7].

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, akut olarak intraperitoneal yolla 33 mg/kg bakır sülfat verilen albino farelerde aynı yolla verilen 250 mg/kg GSH'nin karaciğer üzerine olan koruyucu etkisi histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılmıştır. Bu amaçla deney sonunda ötenazi edilen hayvanların karaciğer dokuları toplanarak, rutin hematoksilen eozin (HE) boyama ile histopatolojik ve biyokimyasal olarak da karaciğerde GSH ve lipid

peroksidasyonunun bir göstergesi olarak malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülerek koruyucu etki incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bakır tüm canlıların yapısında yer alan ve önemli fizyolojik olaylarda görev alan bir eser elementtir [8]. Bakırın Cu^0 , Cu^{1+} ve Cu^{2+} olmak üzere üç oksidasyon hali bulunur. Bunlardan oksitlenmiş olan kuprik (Cu^{2+}) hali biyolojik sistemlerde sıklıkla yer alır [9]. Bakırın vücut için gerekliliği ilk defa 1928 yılında sıçanlarda yapılan çalışmalarda deneysel olarak oluşturulan aneminin bakır sülfid içerdiği bilinen hayvan ve bitki külleri kullanılarak önlenmesi ile ortaya konmuş ve eritropoiezis için gerekliliği açıklanmıştır [10]. Bakır redoks tepkimelerinde elektron transferi yapmak suretiyle görev yapar [1]. Bu element vücutta özellikle bazı enzimlerin yapısına girerek oksidatif redüktaz faaliyetlerinde bir kofaktör olarak hareket eder. Kuproenzimler olarak adlandırılan bu moleküller arasında, mitokondrilerde bir elektron transport ve terminal oksidaz olarak faaliyet gösteren sitokrom c oksidaz [11], süperoksitlerin dismutasyonunu sağlayarak reaktif oksijen türlerine karşı savunmada rol alan süperoksit dismutaz [12], melanin sentezinde görev yapan katekol oksidaz [13], kollajen ve elastin fibrillerin bağlanmasında rol alan protein-lisin 6-oksidaz [14], ferrokksidazda görev yapan seruloplazmin [15], primer aminlerin deaminasyonunu sağlayan amin oksidazlar [9], katekolamin sentezinde rol alan dopamin- β -monooksigenaz ve nöropeptidlerin α -amidasyonunu sağlayan peptidilglisin monooksigenaz [16] yer alır. Bakır bu denli önemli faaliyetlerde görev almasına rağmen vücut içerisindeki miktarı belirli ölçüler arasında tutulmalıdır. Vücuttaki bakır miktarı belli değerlerin üzerinde biriktiğinde ise önemli sorunların ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenle vücutta bakır metabolizmasını düzenleyen bir takım sistemler mevcuttur. Ancak yine de bu sistemlerin kontrol edebilme kapasitesini aşacak düzeyde bakırın birikmesi hemoliz, sarılık ve hatta ölümlerle sonuçlanabilecek toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir [3].

2.1. Bakır Metabolizması

Bakır beyin, tırnak, saç, boynuz, böbrek, dalak, kalp, kas, mide, bağırsak, gibi dokularda bulunmasına rağmen en fazla olarak karaciğerde yer alır. Bunun başlıca sebebi karaciğerin diğer pek çok maddenin de metabolize edildiği merkez olmasındandır.

Memeli canlılarda, bakır ağız yoluyla tüketilen su ve besinlerin yapısına katılmış olarak vücuda alındıktan sonra az bir miktarı mideden olmak üzere başlıca olarak proksimal ince bağırsaktan emilir [17]. Ağız yoluyla alınan bakırın yaklaşık %30-50'si ince bağırsaklardan emilir ve emilen bu bakırın büyük bir kısmı Cu^{2+} formundadır [18]. Bakırın bağırsak lümeninden bağırsak mukozasına taşınması ise taşıyıcı aracı moleküller tarafından yürütülür. Bağırsaklardan bakırın alınımı diyetteki çinko, demir, molibden, kalsiyum, fosfor ve askorbik asit miktarı ile negatif yönde etkilenebilir [19]. Bağırsak mukoza hücreleri olan enterositlerde, bakır çoğunluğu sitoplazma içerisinde olacak şekilde metallothionein adı verilen moleküllere bağlı olarak bulunur. Metallothioneinler metallerin hemostazı, depolanması, taşınması ve detoksifikasyonu gibi bir çok görevlerde faaliyet gösteren düşük moleküler ağırlıklı indüklenebilir proteinlerdir [20]. Bağırsaklarda bakır sonrasında mukozal hücrelerden portal dolaşıma geçer. Bu geçiş de tekrar taşıyıcı proteinler vasıtasıyla yürütülür. Özellikle albumin olmak üzere, peptidler ve amino asitler bakırı portal dolaşımında taşıyarak metabolize olacağı organ olan karaciğere getirirler [21].

Karaciğer bakır metabolizmasının merkezi organıdır. Portal kan dolaşımıyla karaciğere gelen bakır karaciğer parankim hücreleri olan hepatositler tarafından alınarak metabolize edilir. Bakırın hepatositlerin sitoplazmasına alınması ise Ctr1 adı verilen bir hücre zarı proteini sayesinde olur [22]. Ctr1 bir permeaz gibi davranarak yada endositozis yolu ile hücre dışındaki bakırı hepatositlere iletir. Ancak bakırın hücre içine alımından önce kuprik şekle dönüşme mekanizması bilinmemektedir. Bakırın hücre içerisine alınma miktarı, bakırla yarışmaları nedeniyle ortamdaki çinko, kadmiyum, manganez ve kobalt gibi divalent katyonların varlığı ile yakından ilgilidir [23]. Hepatositlere alındıktan sonra, bakır Atox1 (anti oksidan protein 1), Cox17 (sitokrom c oksidaz), CCS (copper chaperone for

superoxide oxidase) ve ATP7A adları verilen bakıra eşlik edici moleküller ile hücre içi bölümlere taşınır [5,8]. Bu, bakıra eşlik edici moleküllerden Atox1 hücre içine alınan bakırı iletilen golgi kompleksinde yer alan ATP7B adı verilen başka bir moleküle taşır [24]. Hepatositlerde ATP7B bakırı golgi kompleksinden veziküler cisimciklere taşır ve bu veziküllerden daha sonra lizozomlara taşınan bakır MURR1 ile safraya taşınarak atılır [2,25]. ATP7B ayrıca bakırdan holoseruloplazmin sentezinde rol alması dolayısıyla da oldukça önemlidir. ATP7B'nin karaciğerden seruloplazmin ve diğer taşıyıcı moleküller ile kana karışan bakırın meme dokusunda süte de bu molekül ile taşındığına ait bir delil de vardır [26].

Diğer hücre içi bakır iletilen moleküllerden olan Cox17, hem sitoplazmada hem de mitokondrilerin çift zarları üzerinde yer alan bir proteindir [8]. Bu molekül sitokrom c oksidaz adı verilen ve hücresel enerji üretiminde anahtar rol oynayan bir enzimin normal çalışması için gereklidir. Cox17 sitokrom c oksidazın oluşmasında rol oynayan moleküllere bakırı taşıması nedeniyle önemlidir. Bugüne kadar bu aracı taşıyıcı moleküllerden Sco1, Sco2 ve Cox11 adı verilen proteinler keşfedilmiştir [27,28]. Son olarak, bir diğer hücre içi bakır iletilen molekül CCS (copper chaperone for Cu/Zn superoxide dismutase) adı verilen proteindir. Adından da anlaşılacağı üzere hücre, bu protein hücre içi bakırı süperoksit dismutaza taşımakla sorumludur. Farelerde yapılan bir çalışmada bu proteini kodlayan genin baskılanması durumunda süperoksit dismutaz aktivitesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir [29].

Hepatositlerde bakır ayrıca glutatyon ve metallothionein gibi moleküllere de bağlanır. Bunlardan metallothionein (MT1A) bakır dahil pek çok metalin karaciğerde metabolizması sırasında ve ayrıca çeşitli stres faktörleri altında hücre içi ekspresyonu uyarılabilen küçük bir proteindir [30]. MT1A üzerinde taşıdığı bir çok sistein molekülü sayesinde bakıra bağlanarak onu bünyesinde depolayabilir. MT1A'nın lizozomlarda degradasyonu veya glutatyonla değişim sonucunda bakırı saldırdığı düşünülmektedir [3]. Hepatositlerde bakırı bu moleküle taşıyan iletilen bir protein ise henüz keşfedilmemiştir. Hücre içerisinde anti

oksidatif fonksiyonları olduğu bilinen glutatyon hakkında detaylı bilgi ise ileriki alt başlıkta verilecektir.

Bakır hepatositlerde metabolize olmasını takiben bu hücrelerden bir kısmı safra ile atılırken diğer bir kısmı ise seruloplazmin vasıtasıyla plazmaya karışarak ihtiyaç duyulan dokulara gönderilir. Bakır plazmaya bir kompleks olarak salınır [31,32] ve bu kompleks %90-95 oranında plazma bakırını oluşturur [33]. Aynı zamanda bir akut faz proteini olan seruloplazmin, hem kuprik Cu^{2+} hem de kupros Cu^{1+} halinde 6 adet bakır atomu bağlayabilir [3]. Bakır plazmada albümin, transkuprein ve histidin gibi moleküllere bağlı olarak da taşınabilir [3]. Bakırın plazmada diğer organlara taşınmasında ise ATP7A adı verilen molekül de önemli görevler üstlenir. Özellikle sinir sistemi içerisinde nöronlarda bakırın hücre içi iletiminde de bu molekülün rol aldığı bilinmektedir [8].

Bir çok memeli canlıda bakır kolayca vücuttan atılır ve ana atılım yolu safradır [34]. Normal şartlarda üriner bakır atılım miktarı minimal düzeydedir. Bunun nedeni dolaşımdaki bakırın büyük bir kısmının seruloplazmine bağlı olması veya eritrositler içerisinde bulunması ve çok az miktarda bakırın glomerular kapillarları geçebilmesidir [35,36].

Hepatobiler bakır sekresyon süreci çok az derecede anlaşılabilmiştir. Hepatositlerden safraya bakırın geçişi ile alakalı olarak iki ayrı yolun varlığı tespit edilmiştir [37]. Bunlardan birincisi daha önce de söz edilen veziküler yoldur. Bu yolla lizozomal içeriğin salınması ve dolayısı ile bakırın safra içine verilerek atılımı söz konusudur [34]. İkinci yol ise glutatyon bakır kompleksinin kanaliküler zar taşınması yolu ile iletilmesidir. Bu yol bakırın karaciğer hücrelerinde aşırı derecede biriktiği durumlarda devreye girer [37]. Bakırın safraya taşınması, safraya glutatyon salınması ile ilişkilidir [38].

2.2. Bakır Toksikasyonu

Bakır esansiyel bir mikrobesein olup normalde sürekli olarak etkili bir hemostatik kontrol altında tutulmasına rağmen fazla miktarda alınması toksik etkilerin oluşmasına neden olabilir. Ancak türlerin bakır toksikasyonuna karşı dirençlerinde önemli farklılıklar bulunmaktadır. Bunun başlıca sebebi türlerin bakırı metabolize edebilme kapasitelerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bakır toksikasyonunu etkileyen diğer faktörler arasında ise, özellikle diyetin kompozisyonu ile genetik farklılıkların önemli rol oynadığı düşünülmektedir [33,39].

Normal olarak tüketilen gıda ve sudan ötürü bakır toksikasyonunun oluşması oldukça zordur. İstiridye, karaciğer, fındık ve fıstık türü çerezler, baklagiller, işlenmemiş tahıllar ile çeşitli kurutulmuş meyveler bakır yönünden oldukça zengin olmalarına rağmen bu besinlerin tüketilmesine bağlı olarak oluşmuş bir toksikasyon vakası yoktur [40]. Doğal sudaki ortalama bakır miktarı 4-10 µg/l arasında değişir [41]. Normal şartlarda sadece içilen suya bağlı olarak toksikasyon oluşması da imkansızdır. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Çevre Koruma Ajansı içme sularında olabilecek maksimum bakır miktarını 1,3 mg/l olarak belirlemiştir [42]. Ancak toksikasyon yine de değişik nedenlere bağlı olarak diğer kaynaklardan gelişebilir.

Bakır toksikasyonu akut veya kronik olarak oluşabilir [43]. Akut toksikasyon olayları genellikle nadirdir ve tek seferde aşırı miktarda çeşitli yollarla bakırın alınımı sonucu oluşur. Özellikle uzun süreli olarak bakır borularda kalmış suların tüketilmesi akut bakır toksikasyonuna neden olabilir [3]. Bakır ile kontamine olmuş suların tüketilmesine bağlı olarak akut toksikasyon gelişebilir. Örneğin Nijerya'da dini tören amacıyla tüketilen içerisinde yüksek oranda bakır bulunduğu tespit edilen yeşil sudan ötürü hemoliz ve akut böbrek yetmezliği ile sonuçlanmış bir vaka tespit edilmiştir [44]. Bakırın içme sularına alg üremesini önlemesi amacıyla katılmasına bağlı olarak insanlarda toksikasyon şekillenebilir. İntihar amaçlı olarak gram miktarlarda bakır içeren bileşiklerin içilmesine bağlı olarak akut toksikasyon ve ölüm ile sonuçlanan vakalar da mevcuttur [45]. İnsanlarda genellikle yüksek

miktarda alınan bakır sülfat toksikasyona neden olmaz. Bunun nedeni bakırın alımını takiben hemen uyardığı kusma isteğidir ve bu nedenle mide ve bağırsaktan emilim gerçekleşmeden bakır vücuttan atılmış olur. İnsanlarda akut bakır toksikasyonun genel semptomları olarak ağızda metalik bir tadın oluşması, göğüste ve karında yanma hissi, bulantı, tekrarlayan kusma, ishal, baş ağrısı, terleme, şok, hemoglobinüri, hematüri, anüri, oligoüri ve sarılık sıralanabilir [45,46]. Akut toksikasyonda beyin, karaciğer, böbrek ile mide ve bağırsak mukozasında hasarlar da oluşur [47].

Kronik bakır toksikasyonu ise daha ziyadesiyle oluşan toksikasyon şeklidir. Bu çeşit toksikasyon özellikle bakır ile kontamine besin ve suyun uzun süreli olarak az dozlarda olmak suretiyle alınması sonucu şekillenir [3,39]. Muhtemel toksikasyona neden olabilecek diğer bakır kaynakları arasında bakır pişirme kapları, dışçılıkte kullanılan çeşitli ürünler, fungusit ve pestisidlerin yiyeceklerdeki kalıntıları yer alır. Kronik bakır toksikasyonu ayrıca genetik sebeplere bağlı olarak da oluşabilmektedir [33]. Bu tür genetik hastalıklarda özellikle bakır hemostazında görev alan proteinleri kodlayan genlerdeki hatalar başlıca nedendir.

Bakır toksikasyonuna karşı dirençte türler arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin domuzlar büyüme uyarıcı olarak yeme katılan 250 mg/kg düzeyindeki bakırı tolere edebilirlerken 25 mg/kg bakır koyunlarda toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir [39]. Koyunlarda da cinsler arasında bakır toksikasyonuna karşı dirençte farklılıklar olduğu bilinmektedir. Örneğin Kuzey Ronaldsay koyunlar bakıra karşı oldukça hassastırlar [48]. Bu çeşit cinsle ilgili bakır hassasiyeti, Long Evans Cinnamon sıçanlarda, toksik süt farelerinde ve Bedlington terrierler ile doğu Highland beyaz terrier köpeklerde de mevcuttur [33]. Domuzlarda olduğu gibi kanatlı hayvanlarda ve rodentlerde de bakıra karşı direnç oldukça yüksektir. Örneğin kanatlı hayvan yemlerine bakır özellikle büyüme uyarıcı amaçla ve anti fungusit olarak katılmasına rağmen bu hayvanlarda önemli sorunlara neden olmaz. Ancak çok yüksek oranlardaki bakırın tavuklarda toksikozis oluşturduğu rapor edilmiştir [49]. Atlar ise bakır toksikasyonuna karşı bilinen en dayanıklı hayvanlardır. Bakır toksikasyonuna karşı toleransta geniş getiren hayvanlarla geniş getirmeyen

monogastrik hayvanlar arasındaki en büyük farkın sülfür mekanizmasındaki farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir [43].

Bakır toksikasyonunda yaş önemli bir faktör olarak göze çarpmaktadır [50]. Neonatal ve süt emen hayvanların erginlerine oranla bakır toksikasyonuna karşı daha hassas olduğu bilinmektedir. Bunun muhtemel sebebi genç hayvanlarda bakırın emiliminin daha fazla gerçekleşmesi ve safra yolu ile atılımın tam gelişmemesidir. Bu durum, bakır tarafından oluşturulan ve siroz oluşmasına neden olan Indian Childhood Cirrhosis vakalarının çocuklarla sınırlı olması ile de desteklenmektedir [51].

Bakır toksikasyonunu etkileyen diğer önemli bir faktör, yemin kompozisyonudur. Sülfür ve diğer iz metaller gibi bakır metabolizması antagonistlerinin ve diğer hepatotoksin ve koruyucu faktörlerin diyetle bulunması bakıra karşı toksikasyonu etkiler [43]. Örneğin, diyetle alınan çinko takviyesi koyunlardaki toksikasyonu ve aynı zamanda insanlardaki Wilson hastalığını önlemek amacı ile kullanılabilir. Çinko karaciğerde bakırın birikmesini engeller ve karaciğerde bakırın yayılımını yeniden düzenler [39]. Hepatotoksik pyrolizidin alkaloidlerinin artmış oranda yem ile alınımı koyunların bakıra karşı toleransını azaltır [39]. Alfa-tokoferol gibi antioksidan vitaminlerin alınımının ise sıçanlarda bakır toksikasyonuna karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir [52]. Yemle alınan molibden miktarı bakır toksikasyonunun oluşmasında önemli bir kriter olarak ortaya çıkabilir. Örneğin, molibden miktarının çok düşük olduğu durumlarda yemdeki bakır miktarı normal düzeyde dahi olsa koyunlarda toksikasyon gelişebilir.

2.2.1. Bakır toksikasyonunun klinik bulguları ve patolojisi

Bakır toksikasyonunda gözlenen semptomlar vakadan vakaya değişmekle beraber genelde kendini gastrointestinal semptomlar ile gösterir. Akut toksikasyon vakaları oldukça azdır ve genellikle fazla bir semptomun oluşmasına fırsat vermeden ölümle sonuçlanırlar.

Kronik bakır toksikasyonu durumlarında genellikle bulantı, kusma, halsizlik, iştahsızlık, depresyon, salivasyon, karın ağrısı, paraliz ve hatta ölüm görülebilir [3]. Klinik bulgular arasında polidipsi, poliüri, sarılık ve ensefalopati yer alabilir [53]. Kronik bakır toksikasyonunda karaciğer birinci derecede etkilenen organ olması dolayısıyla karaciğer sirozunun gelişmesine ve hemoliz ile ayrıca renal tübüllerde, beyinde ve diğer organlarda hasarlara neden olabilir. Hiperkupremik durumlar hayvanlarda anemi, kas distrofisi, azalmış büyüme oranı ve üreme kapasitelerinde azalmalara da neden olabilir [33,39].

Kronik bakır toksikasyonunun semptomları sabit olmayıp türler arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Bakırı tolere edebilen hayvanlardan olan domuzlarda aşırı derecede bakır alınması durgunluk, güçsüzlük, solunum bozukluğu, anemi, ve sarılık ile pulmonar ödem ve midenin özefagus bölgesinde ülserasyona neden olur [54]. Sıçanlar bakıra karşı oldukça dirençli olmalarına rağmen 500 mg/kg'dan daha fazla düzeyde bakırın alınması durumunda hepatositlerde yaygın nekrozlar gelişebilir. Ayrıca, böbreklerin proksimal tubul epitellerinde yaygın nekrozlar oluşabilir [55].

Bakır toksikasyonuna karşı hassas olan koyunlarda toksikasyon genellikle iki dönem halinde incelenebilir [39]. Bunlardan birinci dönemde, yem tüketimi ve büyüme oranları genellikle normaldir. Kandaki bakır konsantrasyonu ya değişmemiştir ya da az oranda artmıştır. Plazmadaki karaciğere has enzimlerin miktarları ise yükselmiştir. Bu durumu parankim hücrelerinin ve şişmiş bakır içeren Kupffer hücrelerinin nekrozu takip eder [53]. Toksikasyonun ikinci basamağı aniden oluşur ve genellikle hemolitik kriz olarak adlandırılır. Başlıca klinik bulgular sarılık, zayıflık, aşırı susuzluk ve hemoglobinüridir [53]. Bir kaç gün içerisinde kandaki hemoglobin ve glutatyon düzeylerinin düştüğü ve

methemoglobinin arttığı gözlenir. Hayvanlar genelde bir kaç gün içerisinde ölürlerken bazıları hayatta kalabilir. Bu semptomların başlaması, karaciğerde depolanmış olan bakırın salınmasına ve kandaki konsantrasyonunun artmasına bağlıdır. Yaygın karaciğer dejenerasyonu ve fokal nekrozlar oluşur ve karaciğere has enzimlerin aktivitesi artar. Ayrıca kayda değer oranda böbrek hasarı, nekroz ve proksimal tubullerde mitokondrial enzim aktivitesinin kaybolduğu görülür.

Hemoliz öncesi dönemdeki koyunların karaciğerlerinin elektron mikroskop ile yapılan incelenmesinde parankim hücrelerinde endoplazmik retikulumun hipertrofisi ve otofajik vakuollerin oluştuğu tespit edilmiştir [56]. Bu vakuoller önceleri indirgenmemiş hücresel yapılar içerirlerken, daha sonraları olgunlaştıkça ve lizozomal degradasyon ilerledikçe karakteristik granüler madde ile lipit damlacıkları ve bakır içeren yapılar olarak gelişirler. Ayrıca bakır konsantrasyonu arttıkça artan oranda da hücresel kayıp ve apoptotik cisimcikler gözlenebilir.

Bir Anadolu çoban köpeğinde gözlenen bakır toksikasyonu vakasında serum alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz konsantrasyonlarında artma tespit edilmiştir [57]. Bu vakada dalağın büyüdüğü, karaciğerin ise solgun renkte ve küçük olduğu gözlenmiştir. Histopatolojik bulgular olarak ise karaciğerde retikulin fiberlerin hepatik venalar çevresinde arttığı ve asinilerin fokal tahribatı belirlenmiştir. Subkapsüler, portal ve perivenöz lenf damarlarında genişleme ile portal ve perivenöz ile parankim dokuda pigment içeren makrofajlardan, lenfositlerden, plazma hücrelerinden ve az sayıda granülositlerden oluşan bir yangı tablosu tanımlanmıştır. Ayrıca tüm asinar zonlarda apoptotik hücrelerin bulunduğu öne sürülmüştür.

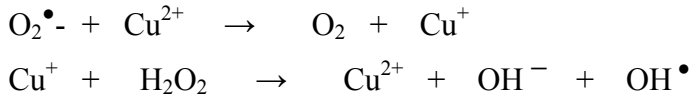
Normal şartlar altında karaciğerdeki bakırın çoğu sitozolda bulunur, ancak bakır hücrede biriktikçe büyük bir kısmı parçacıklar halinde özellikle çekirdek ve lizozomlarda toplanmaya başlar. Bakırın lizozomal toplanması safra yolu ile atımını takip etmesi nedeniyle genellikle detoksifikasyon sürecinin bir parçası olarak kabul edilir. Bakırın lizozomal birikimi yeni doğanlarda [58], Bedlington terrierlerde [59], Wilson hastalığı

olanlarda [60] bildirilmiştir. Benzer şekilde bakır yüklü sıçanlarda karaciğerin X ışını mikroanaliz yöntemi ile bakırın hem lizozomlarda hem de çekirdekte bulunduğu gösterilmiştir [61].

2.2.2. Bakır ve oksidatif hasar

Bakırın toksikasyonu süresince oluşan çoğu patolojik etkiler, hücresel zarlara ve makromoleküllere olan oksidatif hasardan kaynaklanmaktadır [3,4]. İleriki bir bölümde daha ayrıntılı olarak işlenecek olan oksidatif hasar kısaca hücrelerde birçok molekül ile yüksek tepkime kapasitesine sahip oksijen radikalleri tarafından oluşturulan hücre hasarına verilen addır.

Bakır tarafından oluşturulan hücre hasarı mekanizması tam olarak açığa çıkarılmamakla beraber bakırın vücutta oksidasyon ve redüksiyon faaliyetlerinde görev alması nedeniyle oluşturulan hasarın bu tepkimeler sonucu olabileceği düşünülmektedir [3]. Bu kapsamda, bakır iyonları Haber-Weiss tepkimesi adı verilen tepkime zinciri ile hidroksil radikallerinin oluşmasını katalize eder [39]:



Bu tepkimelerin sonucunda süperoksit anyon radikalinin diğer moleküllerle yüksek tepkime kapasitesine sahip olan hidroksil radikaline dönüştürülmesi gerçekleştirilir. Sıçanlarda yapılan *in vivo* bir çalışmada da bakır ile birlikte askorbik asit veya paraquat verildiğinde hidroksil radikali olduğu tespit edilmiştir [4].

Bakır tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkardığı ortak sonuç artan lipit peroksidasyonudur. Lipit peroksidasyonu da hücrede oluşan hasarın asıl nedenlerinden biri sayılabilir. Artan lipit peroksidasyonu, karaciğer homojenatlarının veya hepatositlerin iyonik bakır ile muamele edildiğinde, artan miktarlarda pentan, hepatik malondialdehit ve

tiobarbiturik asit reaktif maddelerin (TBARM) oluşması ile anlaşılabilir [39]. Bu amaçla sıçanlarda *in vivo* yapılan bir çalışmada, diyetsel bakır yüklenmesinin mitokondrial zarlarda lipit peroksidasyonuna neden olduğu ortaya konmuştur [52]. Lipit peroksidasyonu hepatositlerin mitokondrial zarlarının sistik kristalarında genişlemeye neden olur. Oluşan bu etkiler, vitamin E yetersizliği olan bakır yüklü sıçanlarda daha da barizdir ve bakırın hepatositlerde oksidatif hasar yaptığını destekler yöndedir [62].

Bakır tarafından katalizlenen lipit peroksidasyonu bakır yüklü sıçanlarda, hepatosit lizozomlarındaki değişikliklerin de temelini oluşturur [63]. Bu sıçanların izole edilmiş lizozomal zarlarındaki TBARM konsantrasyonu ikiye katlanmıştır. Ayrıca bu zarların kırılabilirliği artmış ve akışkanlıkları azalmıştır. Bunlara ilaveten bazı yağ asitlerinin zarlardaki miktarı değişmiş ve doymamış yağ asitleri miktarı ise artmıştır.

Mitokondriler bakır tarafından oluşturulan karaciğer hasarının ilk hedef organeli olabilir. Bu durum bakır yüklü sıçanlarda mitokondrial fonksiyonların aksaması ile de ortaya konmuştur [52]. Mitokondrilerdeki elektron transport protein komplekslerinin oksidoreduktaz aktivitelerinin analizleri sitokrom c oksidaz aktivitelerinin düştüğünü göstermiştir. Mitokondrial fonksiyonlardaki bu şekil değişiklikler hücresel enerji yükünü düşürerek, kalsiyumun mitokondrilerden sitozol içine akışını artırarak veya normal elektron akışının bozulması sonucu üretilen süperoksit hücreyi maruz bırakarak hepatoselüler fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunabilir.

Bakır toksikasyonlu hayvanlarda apoptotik hücre ölümlerinin olduğu tarif edilmiştir [56]. Programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan bu tür hücre ölümü nekrotik hücre ölümünden pek çok yönden farklılıklar gösterir. Örneğin nekrotik hücreler tipik olarak şişerler ve sonrasında lize olurlar. Bu hücrelerin hücre zarı bütünlükleri kaybolmuştur ve hücre DNA'sı rasgele olarak kırılmıştır. Ancak tipik apoptotik hücreler çekirdek ve sitoplazmanın yoğunlaşması ile karakterize olup, bu hücrelerin hücre zarı bütünlüğü korunur ve DNA'sı 180 ile 200 baz çiftleri olacak şekilde kırılmalar gösterir [64].

Bakır verilmiş hayvanların karaciğerinde apoptotik cisimciklerin oluşması bakır tarafından oluşturulan DNA hasarının bir göstergesidir [56]. *In vivo* şartlarda bakır hidroksil radikallerinin oluşmasını katalize etmesine rağmen bu DNA hasarı yapacakları anlamına her zaman gelmez. Bunun nedeni hidroksil radikallerinin birçok moleküllerle ayırım yapmaksızın tepkimeleri ve DNA'ya ulaşmadan önce diğer hücrel süpürücü moleküller tarafından yok edilmesidir. Ancak bakır DNA'ya kolayca bağlanabilir ve kromatinin yoğunlaşmasına neden olabilir [65]. Bu nedenle DNA ile ilişkili olan bakır, DNA çevresinde lokal olarak hidroksil radikallerinin üretilmesine neden olabilir. Bakır aşırı yüklenmesinde bakırın çekirdekte birikmesi bu şekildeki tepkimelerin olabilmesini sağlayabilmektedir.

Bakır ve askorbik asit mevcudiyetinde DNA'nın hidrojen peroksite maruz kalması DNA zincir kırılması ve baz oksidasyonu şeklinde DNA'da oksidatif hasarın oluşmasına neden olur. Oldukça yüksek konsantrasyonlarda çekirdekte diğer bir indirgeyici molekül olarak glutatyonun bu şekilde oluşan değişimleri uyaracağı düşünülebilir. Ancak aksine glutatyon serbest radikal oluşmasını baskılamaktadır [66]. Glutatyonun bu özelliği bakırı, Cu^+ durumunda stabilize edebilmesinde ve böylece serbest radikal üretilmesindeki fonksiyonunun önünün kesilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle glutatyonun bakır tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı koruyabileceği düşünülebilir. Benzer şekilde bakır tarafından oluşturulan DNA'nın parçacıklara ayrılması, çinko-metallothionein tarafından da önlenebileceği düşünülmektedir. Bunu sebebi olarak da bu molekül kompleksinin bakırı uzaklaştıracağı ve böylece onun redoks tepkimesine katılmasını önleyebileceğinin öngörülmesidir [67].

Oksidatif stres sırasında şekillenen apoptotik DNA hasarının reaktif oksijen türlerinin doğrudan saldırısı sonucu veya endonükleaz aktivitesi sonucu olabileceği düşünülebilir. HepG2 hücrelerinin 1,10-phenanthroline-bakır kompleksi ile inkübasyonun apoptotik hücre ölümünün bir göstergesi olan nukleozomlar arası DNA kırılmasına neden olduğu gösterilmiştir [68]. Ancak kırılmanın düşük sıcaklıklarda oluşmaması ve oluşan durumun askorbik asit ilavesi ile düzeltilebilmesi oluşan DNA kırılmasının, DNA'nın doğrudan

hidroksil radikallerinin saldırısı sonucu oluştuğunu göstermektedir. Hidroksil radikalleri phenanthroline-bakır kompleksinin redoks reaksiyonu sonucu oksijenden üremişlerdir ki reaksiyon normal sıcaklıklarda oluşabilir. Düşük ısılarda askorbik asit yapay bir indirgeyici ortam oluşturmaktadır ve böylece hidroksil radikal oluşmasını engellemektedir.

2.3. Oksidatif Stres

Bakır toksikasyonu süresince oluşturulan hasarda oksidatif stresin öneminden yukarıdaki bölümlerde bahsedilmiştir. Oksidatif stres başlığı altında tanımlanabilecek olaylar oldukça fazla olmasına rağmen, burada genel bir bilgi olarak sunulacaktır.

Vücutta tepkime kapasitesine sahip çeşitli oksijen türleri tarafından yürütülen oksidatif hasara oksidatif stres adı verilir. Aynı zamanda serbest radikal olarak da adlandırılan bu oksijen türleri ortaklanmamış bir elektrona sahip olup fizyolojik olarak birçok elzem biyokimyasal tepkimelerin normal bir sonucu olarak oluşurlar [69,70]. Ancak canlılarda oksidatif stres yangı, karsinogenez, radyasyon hasarı, metal toksikasyonları ve fotobiyolojik etkiler gibi birçok patolojik olguda da oluşmakta ve bu durum prooksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelmektedir. Biyolojik sistemlerde oksidatif stresin oluşumu bir grup radikal oksijen türlerinin ve nitrik oksitin aşırı derecede üretilmesi sonucudur [71]. Bu radikal oksijen türleri vücutta birçok mikro ve makro moleküller ile tepkimeye girebilirler. Bu tepkimeler sonucunda radikal oksijen türleri vücutta özellikle lipitler başta olmak üzere proteinler ve DNA moleküllerinin yapılarını ve takibinde fonksiyonlarını kısıtlayarak veya bozarak önemli hasarların oluşmasına neden olurlar [6,69]. Vücut, bu hasarları önlemek veya etkilerini asgari düzeye indirmek amacıyla radikal oksijen türlerine karşı bir savunma mekanizması oluşturmuştur. Bu savunma mekanizması başlıca iki kategoride incelenebilir; enzimatik savunma mekanizması ve enzimatik olmayan savunma mekanizması.

Günümüzde radikal oksidatif stresin belirlenmesi, vücutta meydana gelebilecek hasarların daha oluşmadan önüne geçilebilmesinde ve bazı patolojik durumlarda oluşan hasarların

yıkımlayıcı etkilerinin azaltılmasında uygulanacak yöntemlerin belirlenebilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu amaçla yukarıda kısaca bahsedilen enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmalarında rol alan moleküller ile radikal oksijen hasarı sırasında ortaya çıkan moleküllerin belirlenmesi gerekmektedir.

2.3.1. Serbest Radikaller

Reaktif oksijen türleri oksijenden türemiş ve kimyasal olarak tepkime oluşturabilen bir grup moleküldür [69,70]. Bunların bazıları oldukça yüksek tepkime kinetiğine sahipken (örneğin; hidroksil radikali), diğerleri (örneğin; süperoksit ve hidrojen peroksit) daha düşük tepkime kapasitesine sahiptir. Hücre içi serbest radikalleri, çoğunlukla bağlanmamış bir elektrona sahip serbest, düşük moleküler ağırlıklı reaktif oksijen türleridir. Bu nedenle serbest radikal ve reaktif oksijen türleri terimleri birbirleri yerine sıklıkla kullanılabilir.

Serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklı olarak üretilebilirler [72]. Endojen serbest radikal kaynaklarını hücre içi olarak üretilen ve etki gösteren, aynı zamanda hücre içinde oluşup çevre bölgeye salınan maddeler oluşturmaktadır. Hücre içi serbest radikaller otooksidasyon sonucu ve bunun sonucu olarak da küçük moleküllerin (indirgenmiş flavinler, tiol, bazı oksidazların faaliyetleri, siklooksigenazlar ve peroksidazlar) inaktivasyonu sonucu oluşurlar. Demir ve bakır gibi geçiş metallerinden oksijen içeren moleküllere elektron transferi serbest radikal tepkimesini tetikleyebilir. Serbest radikaller tüm hücresel alanlarda (mitokondri, lizozom, peroksizom, çekirdek, endoplazmik retikulum, plazma zarları ve sitozol içi) oluşabilirler. Bu yollarla üretilen serbest radikal türleri başlıca şunlardır; hidroksil, peroksi, hipoklorit, süperoksit, alkoksi radikaller ve reaktif moleküller (Hidrojen peroksit ve serbest radikal olmamasına rağmen reaktif olup hasara yol açabilen singlet (bağısız) oksijen. Eksojen serbest radikal kaynakları sigara, çeşitli çevre kirleticileri ve organik çözücüler, anestetik maddeler, hiperoksik ortamlar ve pestisitlerdir. Bu maddelerin bir kısmı ve aynı zamanda çeşitli ilaçlar serbest radikale metabolize olarak hedef organlarda oksidatif hasar yapabilirler [6,69]. Son olarak,

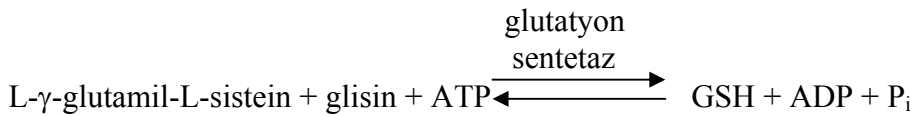
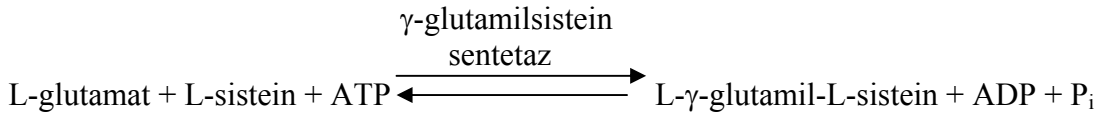
radasyon, maruz kalınan dokuda serbest radikal oluşmasına neden olur [73]. Reaktif oksijen türleri tüm aerobik organizmalar tarafından oluşturulur ve yıkımlanırlar. Böylece bu moleküller ya normal hücresel faaliyet için gerekli olan fizyolojik düzeye gelirler ya da aşırı miktarlara ulaşarak oksidatif stresin oluşmasına neden olurlar. Reaktif oksijen türlerinin fizyolojik olarak hücre içi iletişim ve redoks tepkimelerinin düzenlenmesi gibi çeşitli hayati rollerde görev aldığı bilinmektedir. Örneğin nitrik oksitin bir sinyal molekülü olduğu 1987 yılında ortaya konmuş olup bu molekülün transkripsiyon faktörünün ve gen ekspresyonunun belirleyicilerinin bir düzenleyicisi olduğu günümüzde kesinlik kazanmıştır [74]. Hidrojen peroksit ve süperoksit benzer hücre içi fonksiyonlara sahiptirler. Ayrıca bazı sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve nörotransmitter maddeler hücre içi sinyal iletiminde sekonder iletiler olarak reaktif oksijen türlerini kullanırlar. Reaktif oksijen türlerinin hücre içinde üretilmeleri lipit, protein ve DNA gibi moleküllerin yapılarını tehdit eder. Oksidatif stresin ayrıca mitokondriyal DNA'yı da tahrip etmek ve başka mekanizmalarla olmak üzere yaşlanmada da rol aldığı ileri sürülmektedir [75]. Ancak hücreler serbest radikal oluşmasını önlemek ve onların hasar verici etkilerini kısıtlamak için geniş bir antioksidan savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar peroksitleri etkisizleştiren enzimler, geçiş metallerini uzaklaştıran proteinler ve serbest radikalleri temizleyen bir grup maddelerden oluşur. Hücre içinde oluşan reaktif serbest radikaller hücresel molekülleri oksitleyebilir ve bu da doku hasarı oluşturarak hücre ölümüne neden olabilir.

2.3.2. Glutasyon ve Glutasyon Peroksidazlar

Organizmalar oksidatif strese karşı çeşitli şekillerde önlemler almışlardır. Bu korunma mekanizmaları enzimatik ve enzimatik olmayan moleküller vasıtasıyla yürütülür [6]. Yaptığımız çalışmayla alakalı olarak glutasyon ve bu molekülle yakından ilişkili glutasyon peroksidazdan bu bölümde bahsedilecektir.

2.3.2.1. Glutasyon

Glutasyon (GSH) tüm aerobik canlıların hücre içinde milimolar konsantrasyonlarda bulunan, tripeptid yapısında tiol temelli bir antioksidandır [6]. GSH, γ - glutamilsistein sentetaz ve glutasyon sentetaz'ın etkileşimleri ile hücre içinde sentez edilmektedir. Organizmadaki GSH sentezi, aşağıdaki şekilde gerçekleşir.

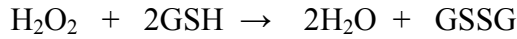


İndirgenmiş glutasyonun vücuttaki başlıca fonksiyonu sülfidril tamponu olmasıdır. GSH oksidatif strese karşı önemli koruyucu rol oynayan glutasyon peroksidaz (GPx) gibi çeşitli enzimler için bir koenzimdir. Böylece GSH birçok bileşiklerin detoksifikasyonunda da görev yapar. Bu görevini ya glutasyon-S-transferaz tarafından katalize edilen konjugasyon tepkimeleri ile ya da GPx katalizlenmiş reaksiyondaki hidrojen peroksit gibi doğrudan yapar. GSH tarafından yürütülen antioksidan tepkimeler bu molekülün oksitlenmiş formunun artması ile sonuçlanır [76]. Oksitlenmiş glutasyon (GSSG) NADPH bağımlı flavoenzim glutasyon reduktaz (GR) tarafından indirgenir. GSSG ayrıca ektili bir

şekilde *E. coli*, *Plasmodium falciparum* ve insanlarda bulunan tioredoksin tarafından indirgenebilir.

2.3.2.2. Glutasyon peroksidazlar

Memeli canlıların hücrelerinde en az 4 tane değişik glutasyon peroksidaz belirlenmiş olup bunların hepsi selenosistein içerir [6,7,77]. GPx1 ve GPx4 (fosfolipid hidroperoksit GPx)'in her ikisi de birçok dokuda fazlasıyla bulunan sitozolik enzimlerdir. GPx4 spermatidlerde enzimatik olarak aktiftir ve ergin spermatozoada yapısal protein olarak görev yapar [78]. N-ucunda bir değişiklik olan bir GPx4 çeşidi sperm çekirdeği için spesifiktir ki burada spermatid kromatin yoğunlaşmasında görev yapar [79]. Böylece GPx4 sperma olgunlaşmasında en azından 3 farklı fonksiyona sahiptir. GPx2 (gastrointestinal GPx) ve GPx3 (plazma GPx) sırasıyla başlıca gastrointestinal kanalda ve böbrekte eksprese edilir. GPx3 tioredoksin sistem tarafından katalitik olarak yeniden üretilebilir ve tioredoksin reduktaz böbrekte GPx3'un ekspresyonuna benzer bir ekspresyon şekli gösterir. Tüm GPx'ler substrat olarak glutasyon kullanarak H₂O₂'in indirgenmesini katalize ederler [6].



GPx tarafından hidroperoksitlerin indirgenmesi için önerilen katalitik mekanizma selenolatın selenenik aside oksitlenmesini gerektirir [7]. Bir molekül GSH'nin eklenmesiyle selenenik asit bir selenenil sülfid bileşenine dönüşür. Bu bileşik ikinci bir molekül GSH eklenmesiyle tekrar aktif selenolat ve glutasyon disülfide dönüşebilir. Böylece tepkime sonucunda iki molekül GSH, GSSG'ye oksitlenir. GSSG daha sonra memelilerdeki başlıca GSSG indirgeyen enzim olan glutasyon reduktaz tarafından indirgenebilir.

GPx'in fizyolojik şartlarda önemli antioksidan etkiye sahip olduğunu belirtirken verilerin yanında bu enzimlerin sadece oksidatif stres durumunda etkili olduğunu belirtenler de mevcuttur [80]. GPx1 geni etkisizleştirilmiş farelerin normal olarak gelişmeleri ve oksidatif strese karşı hiperoksi ile cevap vermeleri kayda değer bir bulgudur [81]. Bu nedenle antioksidan savunmada GPx izoenzimlerinin fonksiyonu halen belirsizdir. Fakat kinetik özellikleri ve bu enzimlerin yaygın dağılımları oksidatif hasara karşı gösterilen toplam savunmada görevleri olabileceğini vurgulamaktadır.

2.3.3. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu serbest radikal türleri tarafından oluşturulan olayların en geniş kapsamlı olarak çalışılanıdır. Hücre zarları fosfolipidlerinin serbest radikaller ve özellikle de reaktif oksijen türlerinin meydana geldiği yerlerde aşırı derecede bulunması bu fosfolipidleri serbest radikaller tarafından hızlıca etkilenebilecek hedefler haline getirir. Özellikle doymamış çoklu yağ asitleri serbest radikallerle tepkimeye oldukça elverişlidir. Yağ asitlerinde lipitlerin peroksidasyonu bir radikal zincir tepkimesine neden olabilir. Bu zincir tepkimelerinden dolayı bir substrat radikali birçok sayıda lipit peroksitlerin oluşmasına neden olabilir. Lipit zarlardaki bu artarak devam eden hasar verici ilerleme genellikle alkanlar ve karbonil bileşikleri de dahil çok çeşitli ürünlerin üretilmesi ile karşılaşmaya çalışılır [69]. Özellikle hidrokarbonlar başta olmak üzere bu ürünlerin bazıları kendileri toksik olmaları nedeniyle radikal hasarı için sekonder haberci görevi görürler.

2.3.3.1. Aldehitik ürünler ve malondialdehit

Çeşitli karbonil bileşikleri lipit peroksidasyonu sonucu meydana gelen hasarın oluşmasında önemli rol oynarlar [6]. Omega-6 ve ω -3 doymamış çoklu yağ asitlerinin peroksidasyonunu takiben, stabil olmayan yağ asidi hidroperoksitleri oksidasyon tepkimeleri ve diğer mekanizmalarla daha stabil olan karbonillere dönüşebilirler. Bu karbonillerin başlıcaları n-

alkenal, 2-alkenal, 2,4-alkadienal, alkatrienal, hidroperoksialkanal, α -hidroksialkenal, 4-hidroksialkenal, 4-hidroksiperoksi-alkenal, malondialdehit, α -dikarbonil, doymuş ve doymamış ketonlar, alkanlar ve alkenlerdir [69].

Omega-6 yağ asitlerinin peroksidasyonu süresince üretilen başlıca karboniller heksenal ve 4-hidroksi-2,3-*trans*-nonenal iken, ω -3 yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu başlıca olarak propanol ve 4-hidroksi-2,3-*trans*-heksenal oluşur [82]. Küçük miktarlarda da olsa tespit edilen diğer bazı aldehitler 4-hidroksi-2,3-oktenal, 4-hidroksidekenal, 4-hidroksiundekenal, 4,5-dihidroksidekenal, 4-hidroksi-2,5-nonenal, 2-hidroksiheptenal, 2-hidroksiheksenal, butanol, pentenal, heksenal, oktenal ve nonenaldır [82,83]. Bu ürünlerin bazılarının sitotoksik veya genotoksik oldukları gösterilmiş olup bunlar protein ve nükleik asit gibi biyomoleküllerle tepkimeye girebilir, ayrıca reseptörleri ve dolayısı ile sinyal iletimini etkileyebilirler [84].

Aldehitler serbest radikallerin tersine oldukça stabildirler ve bu nedenle hücre içi ve dışına yayılarak serbest radikal kaynaklı olayların başlangıç yerinden uzak bölgelerdeki hedefleri etkileyebilirler. Bu nedenle aldehitler ve bunların metabolitleri lipit peroksidasyonunu göstermede iyi birer indeks olabilirler.

Lipit peroksidasyonunu göstermek amacıyla en sıklıkla kullanılan metot tiobarbitürik asit ile tepkiyebilen maddelerin ölçülmesidir [69]. Bu maddelerin başında malondialdehit gelir [6]. Malondialdehit ve diğer aldehitler tiobarbitürik asitle tepkimeye girerek pembe ve floresan bir kromojen verirler ki bu kromojen 532 nm'de kolorimetrik yöntemle veya 512 nm'de florometrik yayılım ile ölçülebilir. Bu yöntemlerle yapılan birçok çalışmada lipit peroksidasyonuna neden olan maddelerin ve toksinlerin verildiği veya vitamin E gibi antioksidanların eksik olduğu diyetlerle beslenen deneklerde, ayrıca reperfüzyon iskemisi gibi çeşitli durumlarda plazma veya idrarda malondialdehit miktarında artmalar gözlenmiştir [6,69].

Oluşan bu aldehidlerden MDA, membran doymamış yağ asitleri oksidasyonunun bir işareti olup, lipit peroksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir [70]. MDA ve 4-

hidroksinonenal gibi aldehitlerin biyolojik aktiviteleri, DNA ve proteinlere çapraz bağlanarak bu moleküllerin fonksiyon ve aktivitesini değiştirebilmeleridir. Örneğin MDA, amino ve tiyol gruplarıyla reaksiyona girebilmektedir. Aldehitler oluşturuldukları yerden daha uzak bölgelere gitmede serbest radikallerden çok daha fazla difüze olarak [85] böylece hücre ödemine, damar geçirgenliğinin bozulmasına, fosfolipaz aktivitesinde değişikliklere neden olabilmekte, araşidonik asitin değişik endoperoksitlerinin ve prostoglandinlerin oluşumunu ve salınımını indükleyebilmektedirler [86].

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Araştırmada, analitik saflıkta olan Sigma marka; glutatyon (GSH), 5,5'-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB), 2-tiyobarbutirik asit (TBA), potasyum klorür (KCl), 1,1,3,3, tetramethoksipropan, n-butanol, triklor asetik asit (TCA), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum hidroksit (NaOH), tri sodyum sitrat kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Numune hazırlanması ve enzim analizlerinde Hierschman marka (10 µl, 100 µl, 1000 µl'lik) otomatik pipetler, cenco whirlmix vortex, Libror-AEG 320 model 0.0001 g'a duyarlı hassas terazi, Hanna marka dijital pH metre, Labortechnic marka homojenizatör, Leica RM2125 mikrotom, Olympus BX51 mikroskop kullanıldı.

3.1.3. Farelerin Temini ve Bakımı

Araştırmada kullanılan, ağırlıkları 20-22 gram arasında değişen, 1 aylık, 28 tane albino tipi erkek fare, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Araştırma Merkezinden temin edildi. Fareler her grupta 7 tane olmak üzere 4 gruba ayrıldıktan sonra, sessiz, sıcaklığın 22°C ve nemin % 60-65 arasında kontrol altında tutulduğu, ayrıca 12 saat ışık, 12 saat karanlık devridaiminin temin edildiği (08:00-20:00 saatleri arası ışık) bir odada bakıma alındılar. Çalışma süresince fareler normal içme suyu ve fare yemi ile beslendi.

3.1.4. Deney Grupları

Çalışmada toplam 4 adet grup bulundu. Bu gruplar sırasıyla kontrol grubu, glutatyon (GSH) grubu, bakır grubu ve bakır + GSH grubu olarak adlandırıldı. Kontrol grubundaki farelere 7 gün süresince her gün intraperitoneal yolla % 0.9'luk serum fizyolojik enjekte edildi. GSH grubundaki farelere yine aynı sürede olmak üzere sadece 250 mg/kg vücut ağırlığında olacak şekilde ve serum fizyolojik içinde sulandırılarak glutatyon verildi. Bakır grubundaki farelere aynı süre zarfında 33 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) serum fizyolojik içinde solüsyon yapılarak intraperitoneal yolla verildi [87]. Son grup olan bakır + GSH grubundaki farelere de intraperitoneal olarak 33 mg/kg Bakır sülfat + 250 mg/kg glutatyon verildi [88].

Yedi günlük deney sonrasında ertesi sabahı fareler eter anestezisi kullanılarak ötenazi edildi ve sistemik nekropsileri yapıldı. Nekropsi sırasında her gruptaki her bir farenin karaciğerleri alındı. Alınan karaciğer dokuları iki eşit parçaya ayrılarak birisi histopatolojik diğeri biyokimyasal araştırmalar için ayrıldı. Histopatoloji için ayrılan doku parçaları %10'luk fosfat tamponlu formolin içinde saklanarak tespit edilirken biyokimyasal analizler için ayrılan parçalar deney yapılıncaya kadar -20°C 'de saklandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Histopatolojik İncelemeler

Bu amaçla %10'luk fosfat tamponlu formolin içinde saklanarak tespit edilen dokulardan rutin yöntemlerle parafin bloklar hazırlandı. Bu bloklardan mikrotom kullanılarak 4-5 μ kalınlığında kesitler elde edildi. Kesitler daha sonrasında rutin incelemeler amacıyla hematoksilin eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskobu altında incelenerek değerlendirildi.

3.2.2. Biyokimyasal Analizler

3.2.2.1. GSH analizi

GSH, Ellman [89] metoduna göre tayin edildi. Metodun temel prensibi, ortamdaki glutasyonun, 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi şeklindedir. Oluşan bu rengin ışık şiddeti, 410 nm'de spektrofotometrede okunarak glutasyon miktarı tayin edilmektedir.

Fare karaciğer numunesi, 1-2 dakika 12000 devir/dakikada, %10'luk homojenat oluşturacak şekilde, distile su ilave edilerek buz üzerinde homojenize edildi. Daha sonra, homojenat 3000 devir/dakikada, +4 derecede, 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta TCA çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve tekrar santrifüj edilerek numune GSH analizine hazır hale getirildi.

3.2.2.1.1 Kullanılan reaktifler

GSH, Na₂HPO₄, 5,5'-Ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi.

3.2.2.1.2. GSH seviyesinin tayini

	Numune	Kör
%10'luk homojenat	500 µl	---
Na ₂ HPO ₄ (0,3 M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 µl	500 µl
Distile su	-----	500 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, vortekslenildi ve 5 dakika sonra oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve sonuçlar glutasyon standart grafiğinden değerlendirildi.

3.2.2.2. MDA analizi

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, Ohkawa ve ark.'nın [90] metoduna göre çalışıldı. Metodun prensibinde ortamda bulunan MDA'nın, tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek renkli bir kromojen oluşturması yatmaktadır. Oluşan kromojenin 532 nm'de absorbanısı okunarak MDA konsantrasyonu tespit edilmektedir.

Fare karaciğer numunesi, %1,15'lik KCl çözeltisi içinde, %10'luk homojenat oluşturacak şekilde, 15000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Bu homojenat direkt olarak MDA analizinde kullanıldı.

3.2.2.2.1. Kullanılan reaktifler

SDS, asetik asit, 2-tiyobarbitürik asit (%0,8), 1,1',3,3' tetrametoksipropan çözeltisi.

3.2.2.2.2. MDA düzeyinin tayini

	Numune	Kör
Homojenat	100 µl	----
%8,1 SDS	200 µl	200 µl
%20'lik asetik asit	1500 µl	1500 µl
%0,8'lik TBA	1500 µl	1500 µl
Distile su	700 µl	800 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, vortekslendi ve tüpler kaynar suda (en az 95 derecede) 1 saat bekletildi. Çeşme suyunda soğutulan tüpler ve 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın absorbanısı 532 nm'de okunarak, numunelerin MDA konsantrasyonları 1,1',3,3' tetrametoksipropan ile hazırlanan standart grafikten değerlendirildi.

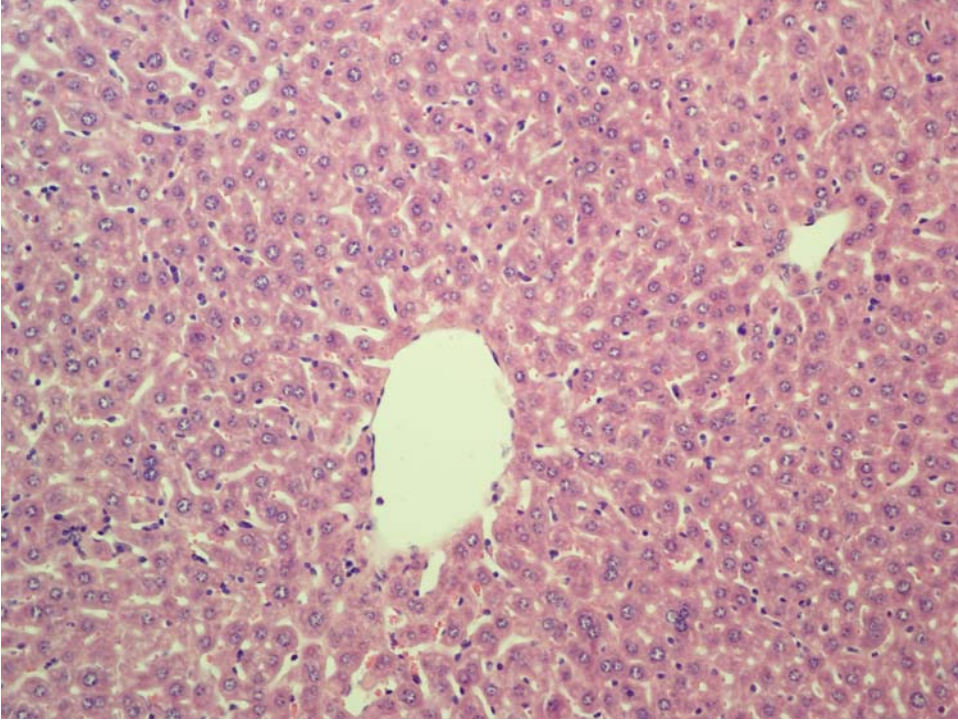
3.2.3. İstatistiki Analiz

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak verildi. Çoklu grupların arasındaki farkların testinde varyans analizi kullanıldı. Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arasındaki farklar değerlendirildi ve P değeri 0,05 den küçük olan sonuçlar istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

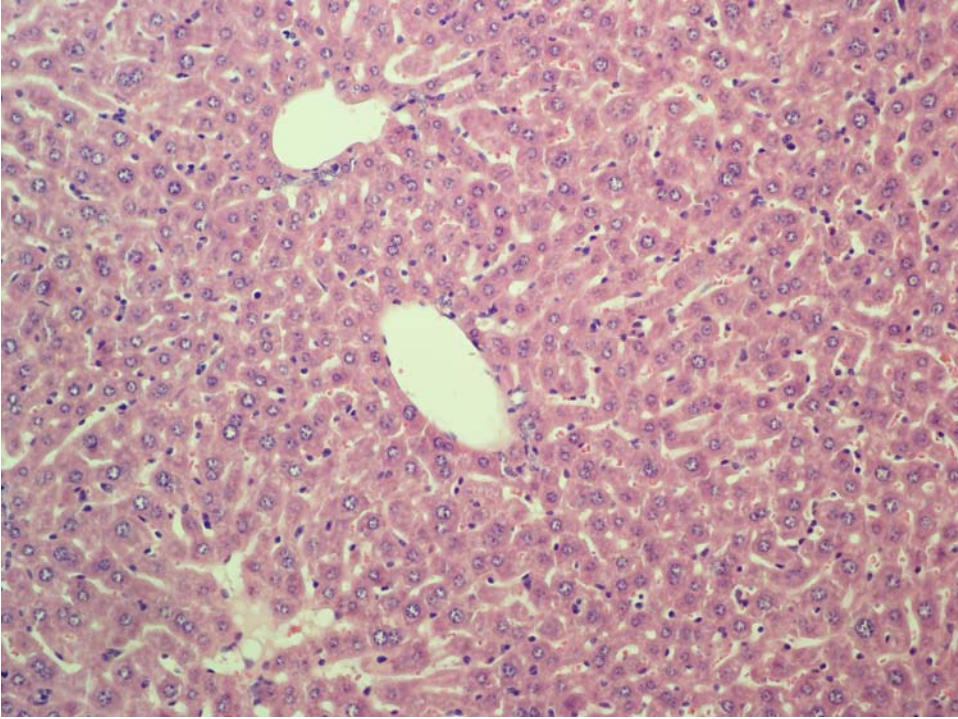
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

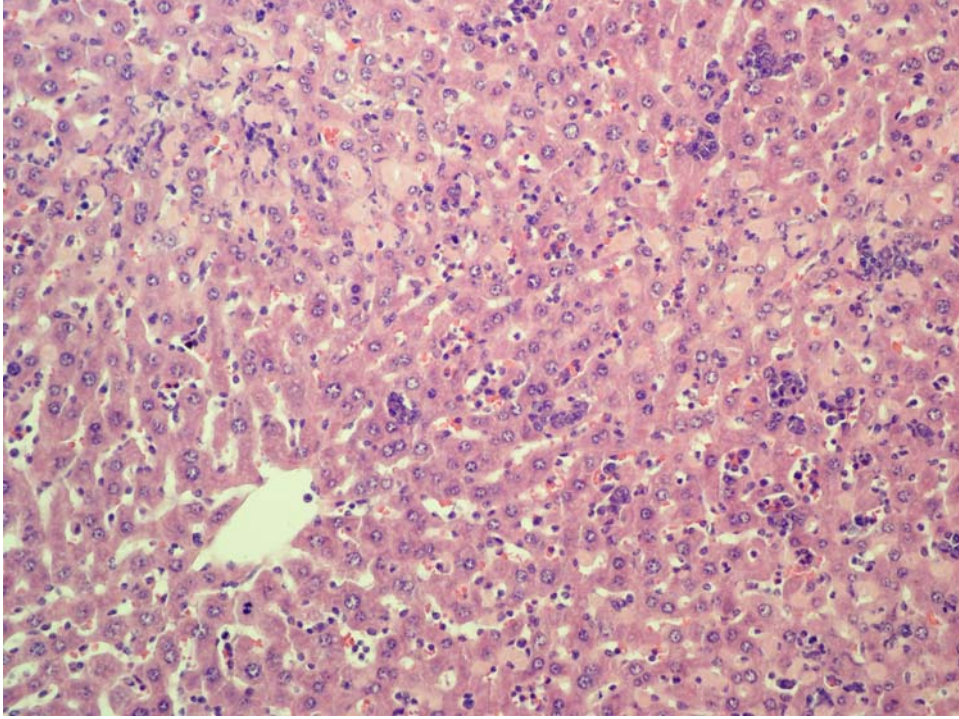
Histopatolojik incelemelerde serum fizyolojik verilen kontrol grubundaki farelerin karaciğerlerinde mikroskopik bir değişikliğe rastlanmadı (Resim 1). Sadece GSH verilen farelerin karaciğerlerinde kontrol grubuna benzer olarak, herhangi bir patolojik değişiklik tespit edilmedi (Resim 2). Bakır verilen farelerin karaciğerlerinde ise şiddetli derece yaygın dejeneratif bozukluklar gözlemlendi. Bakır verilen farelerin hepsinde dejeneratif değişiklikler olmakla beraber az derecede de olsa fareler arasında farklılıklar vardı. Bir farenin karaciğerinde yaygın dejeneratif bozuklukların yanında geniş fokal bir nekrotik sahaya da rastlandı. Genel olarak bakır verilen hayvanların karaciğerindeki dejeneratif bozukluklar hepatositlerin şişmesi ve yer yer sitoplazmalarında vakuollerin oluşması ile karakterize hidropik ve vakuolar dejenerasyon ve sonrasında yerlerini nekrotik hücelere bırakması ile karakterize koagülasyon nekrozu oluşmuştu. Dejeneratif bozuklukların daha az şiddette olduğu vakalarda bu dejeneratif hasarın periasinar tarzda olduğu tespit edildi. Genel olarak bakır verilen farelerin karaciğerinde ayrıca Kupffer hücrelerinin proliferasyonu ile çoğunluğu lenfositik hücrelerden oluşan bir mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 3). Bakır ile birlikte GSH verilen farelerin karaciğerlerinde genellikle hafif derecede olmak üzere dejeneratif bozukluklar tespit edilirken bazı hayvanlarda sadece Kupffer hücrelerinde hafiften orta şiddetliye değişen oranda proliferasyon gözlemlendi. Bazı farelerde bu değişikliklerin şiddeti oldukça hafifti ve/veya belirgin değildi. Hafif derecede dejeneratif bozukluk gözlenen bu gruptaki hayvanların karaciğerinde az miktarda olmak üzere yer yer lenfositik mononükleer infiltrasyonlara da rastlandı (Resim 4).



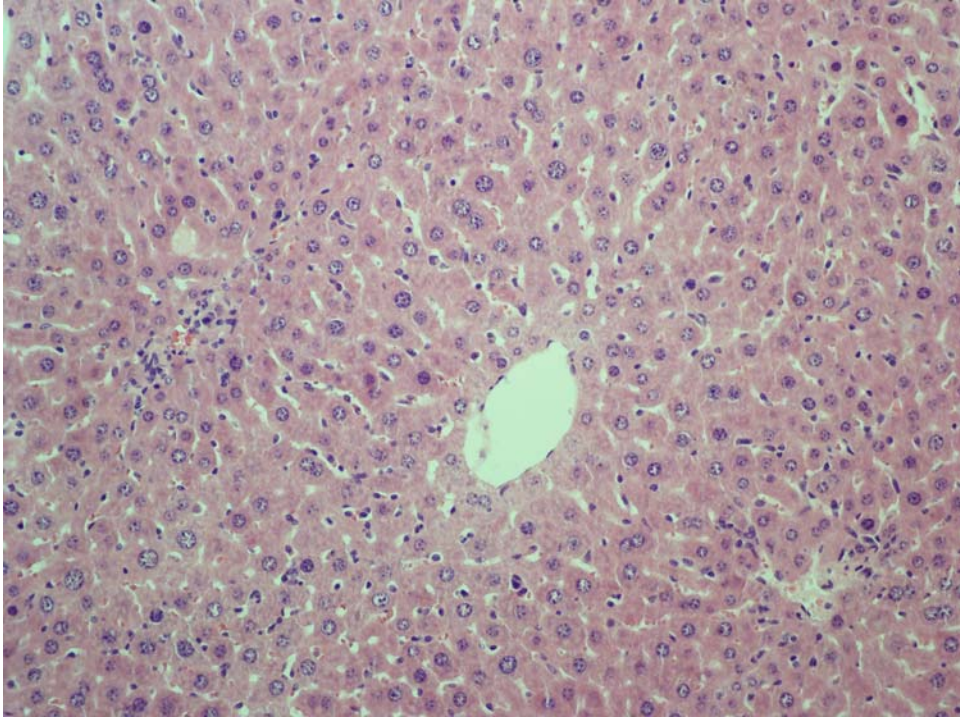
Resim 1. Serum fizyolojik verilen kontrol grubundaki bir farenin karaciğeri, resim normal karaciğer histolojisini göstermektedir, HE, x185.



Resim 2. Sadece GSH verilen bir farenin karaciğer dokusu. Histolojik yapıda herhangi bir değişiklik oluşmamış, HE, x185.



Resim 3. Bakır sülfat verilen bir farenin karaciğerinde şiddetli derecede hidropik dejenerasyon ve koagulasyon nekrozu ile Kupffer hücre proliferasyonu ve lenfositik mononükleer hücre infiltrasyonu, HE, x185.



Resim 4. Bakır sülfat ile birlikte GSH verilen bir farenin karaciğerin ışık mikroskopik görüntüsü. Periasinar tarzda olmak üzere hafiften orta şiddetliye değişen oranda hidropik dejenerasyon ve yer yer nekrozis, HE, x185.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Biyokimyasal analizlerin sonuçları Çizelge 1’de özetlenmiştir. Verilerden de anlaşılacağı üzere sadece bakır verilen farelerde glutasyon değerlerinin kontrol grubundaki farelerin değerlerine oranla istatistiki anlamda önemli ölçüde azaldığı ($P < 0,05$) buna karşın lipit peroksidasyonunun ve dolayısı ile hücre hasarının bir göstergesi olan MDA değerlerinin ise istatistiki anlamda önemli oranda arttığı tespit edildi ($P < 0,05$). Bakır ile birlikte glutasyon verilen farelerden elde edilen karaciğer GSH değerlerinin ise sadece bakır verilen farelerden elde edilen verilere oranla istatistiki anlamda olmamakla beraber arttığı buna karşın MDA değerlerinin ise istatistiki olarak anlamlı oranda azaldığı belirlendi ($P < 0,05$). Yalnızca GSH uygulanan farelerin karaciğer GSH ve MDA değerleri ile kontrol grubu farelerinin değerleri arasında istatistiki bir fark gözlemlenmedi.

Çizelge 1. Akut bakır uygulamasının fare karaciğer GSH ve MDA’sına etkileri sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi. Çoklu grupların arasındaki farkların testinde varyans analizi kullanıldı. Tukey’in çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arasındaki farklar değerlendirildi ve P değeri 0,05 den küçük olan sonuçlar istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

Gruplar	GSH ($\mu\text{mol}/\text{gram yaş doku}$)	MDA ($\text{nmol}/\text{gram yaş doku}$)
Kontrol (n=7)	2,84 ± 0,87	33,7±5,59
GSH (n=7)	3,02 ± 0,84	30,8±2,85
Bakır (n=7)	0,72± 0,34	56,35±8,9
Bakır+GSH (n=7)	1,35 ± 0,36	42,28±8,69
İstatistiki Karşılaştırma (P)		
Kontrol-GSH	0,972	0,911
-Bakır	0,001	0,000
-Bakır+GSH	0,014	0,216
GSH -Bakır	0,000	0,000
-Bakır+GSH	0,004	0,063
Bakır -Bakır+GSH	0,522	0,019

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tezde akut bakır toksikasyonu oluşturulan farelerde GSH'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Araştırmamızda; karaciğer GSH düzeyi kontrolde $2,84 \pm 0,87$ $\mu\text{mol/gr.yaş}$ doku (g.y.d), GSH grubunda $3,02 \pm 0,84$ $\mu\text{mol/g.y.d}$, bakır grubunda $0,72 \pm 0,34$ $\mu\text{mol/g.y.d}$ ve bakır+GSH grubunda ise $1,35 \pm 0,36$ $\mu\text{mol/g.y.d}$ olarak tespit edildi. Kontrole göre bakır ve bakır+GSH gruplarındaki karaciğer GSH seviyesi anlamlı şekilde düşmüştü ($P < 0,05$). Karaciğer MDA düzeyi ise kontrolde $33,7 \pm 5,59$ nmol/g.y.d , GSH grubunda $30,8 \pm 2,85$ nmol/g.y.d , Bakır grubunda $56,35 \pm 8,9$ nmol/g.y.d ve bakır+GSH grubunda ise $42,28 \pm 8,69$ nmol/g.y.d olarak bulundu. Kontrole göre sadece bakır grubunda karaciğer MDA seviyesi anlamlı şekilde artarken ($P < 0,05$), bakır grubuna göre bakır+GSH grubunda MDA değeri anlamlı oranda azalmıştı ($P < 0,05$). Elde edilen histopatolojik ve biyokimyasal bulgular GSH'nin kısmi oranda oluşan toksik etkileri önleyebildiğini göstermektedir. Bakır uygulanan farelerdeki düşmüş karaciğer GSH düzeyi benzer olarak sıçanlarda yapılmış bir çalışmada da ortaya konmuştur [52]. Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada da bakır verilen hayvanlarda artmış MDA düzeyleri tespit edilmesi bu çalışma ile de benzerlik göstermektedir [91]. Bu çalışmalara ilave olarak koruyucu amaçlı verilen GSH'nin sadece bakır verilen farelerdeki seviyelerine oranla GSH düzeylerinin daha yüksek buna karşın MDA düzeylerinin ise daha düşük olması istatistiki anlamda olmamakla beraber etkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgular özellikle histopatolojik incelemelerde daha da etkin bir şekilde ortaya konmuştur. İntramüsküler yolla bakır asetat toksikasyonuna maruz bırakılan farelerin karaciğerlerinde hidropik ve vakuolar dejenerasyonlar ile değişen oranlarda nekrozis olduğu ortaya konmuştur [92]. Diyetle 3g/kg bakır verilen sıçanlarda da şiddetli karaciğer nekrozu tespit edilmiştir [61]. Benzer histopatolojik bulgular bakır toksikasyonlu Doberman pinscherlerde de gözlemlenmiştir [5]. Long Evans Cinnamon sıçanlarda yapılan bir çalışmada da hepatoselüler karyomegali, çok sayıda Councilman cisimcikleri, yaygın nekrozis ve hepatositlerde mitoz tespit edilmiştir [93,94]. Ayrıca bu tür sıçanlarda hepatik bakırın özellikle periasinar bölgede daha fazla miktarda birikme eğilimi olduğu belirtilmiştir [95]. Bu tip bakır birikmesi benzer olarak Doberman pinscherlerde de mevcuttur. Yapılan bu çalışmada da özellikle orta şiddette dejeneratif bozuklukların

gözlendiği bakır verilen fareler ile bazı bakır ile beraber GSH verilen hayvanlarda periasinar bölgedeki hepatositlerde daha fazla şiddette patolojiler gözlemlenmiştir. Ancak verilen dozun yüksekliğinden ötürü sadece bakır verilen farelerin karaciğerlerindeki hasar daha ziyadesi ile diffuz olarak gözlemlenmiştir.

Palacios ve ark. [96] Cyprinidae familyasına ait Brachydanio rerio balığına 14 gün boyunca su ortamında 140 µg/lit konsantrasyonunda bakır uygulaması yaparak hayvanların karaciğer dokusundaki histopatolojik değişimleri incelemiştir. Araştırmacılar histopatolojik incelemeler sonucunda karaciğerde oldukça büyük miktarlarda lize olmuş alanlar ve hepatositik değişimler gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar karaciğer dokusu antioksidan enzimlerinde bir artış olduğunu, bu artışın ise bakıra karşı organizmanın antioksidan savunma mekanizmasındaki artıştan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Yine 6 hafta boyunca sıçanların diyetlerine 800 mg/yem bakır eklenerek yapılan bir çalışmada kontrol grubu hayvanlara göre bakır uygulanan sıçanların karaciğer ve plazma MDA düzeylerinin oldukça arttığı bildirilmiştir [97].

Kawata ve Suzuki'nin [98] yapmış oldukları bir araştırmada, erkek farelere karın içi bakır klorit enjeksiyonu yapmışlar ve karaciğer GSH düzeylerine bakmışlardır. Araştırmacılar bakır uygulanan farelerin karaciğer GSH seviyesinin kontrole göre ilk 12 saatte ve daha sonraki 2. günde oldukça azalmış olduğunu tespit etmişlerdir.

Akut bakır toksikasyonu nadiren oluşmakla beraber ölümcül vakaların meydana gelmesi ile sonuçlanabilir. Özellikle insanlarda intihar amaçlı olarak bakır içeren bileşiklerin alınmasına bağlı toksikasyon vakaları mevcuttur. Ayrıca benzer olarak bakır içeren bileşiklerin içme sularına karışması yolu ile oluşabilecek toksikasyon olayları halk sağlığı açısından akılda bulundurulması gereken önemli bir konudur. Bu tür toksikasyonlarda tedavi amacıyla kullanılacak maddeler kısıtlıdır. Çinko bakırın emilimini engellemesi nedeni ile tedavi amaçlı olarak denenmiştir. Bakır toksikasyonu ile alakalı olarak Wilson hastalığının tedavisinde de çinko takviyesi denenmiştir [99]. Benzer olarak bakırın emilimi

ve metabolizması için yarışan diğer maddeler arasında sülfür ve molibden gibi elementler de yer almaktadır. Ancak bu maddelerin tedavi amaçlı olarak kullanılmasına dair yeterli bir bilgi mevcut değildir. Ayrıca bu elementlerin daha farklı toksikasyonlara neden olabileceği de şüphesizdir. Tedavi amaçlı olarak vitamin E takviyesi de denenmiştir [100]. E vitamininin ise toksikasyona karşı tedavi edici ve koruyucu etkisi sınırlıdır. Vitamin E dışında tüm bu tedavi yöntemleri temelde bakırın emilmesine ve metabolize olması sırasındaki basamakları etkilemeyi hedeflemektedir. Ancak alınan bakır miktarı bu ilave takviyelerde dahi vücudun koruma mekanizmaları tarafından kullanılabilir limitleri aştığında hasar verici sonuçların oluşmasını engellemek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle bakır toksikasyonu sırasında oluşan hasar verici maddelerin oluşmasına yönelik tedavi yöntemleri düşünülebilir.

Bakır toksikasyonun hasar verici etkilerinin dokularda ve özellikle de metabolize olduğu organ olan karaciğerde reaktif oksijen türlerinin üretilmesi yoluyla olduğu gösterilmiştir [4,39]. Bakır çeşitli enzimlerin kofaktörü olmasına rağmen aynı zamanda proteinlerin sistein, histidin ve triptofan gibi yan zincirlerine bağlanma yeteneğinde olan toksik bir maddedir. Toth ve ark. [101] bakır iyonlarının neden olduğu toksisitenin temelinde de bu özelliğinin yattığını belirtmişlerdir. Reaktif oksijen türlerinin hücrelerde özellikle membran yapılarında lipit peroksidasyonuna neden oldukları ve bu şekilde hücre hasarı veya ölümü ile sonuçların oluştuğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [102]. Lipit peroksi radikaller özellikle membran yapıların akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak ya da doğrudan DNA üzerine etkimek suretiyle bu hasarları oluştururlar [103]. Bu nedenle oluşan bu tür reaktif oksijen türlerinin süpürülmesine yönelik uygulamalar meydana gelen doku hasarının önlenmesi için de etkili bir yöntem olabilir. Reaktif oksijen türleri, membran lipidleri, proteinler ve nükleik asitleri içine alan bir çok molekülde oksidatif hasara neden olmaktadır. Bu türlerin zararlı etkileri hücrel antioksidan savunma sistemi ile kontrol edilmektedir. Toksik maddelerin bir çoğunun zararlı etkisi, memeli organizmalarda biyotransformasyonları boyunca oluşan reaktif ürünlerinden kaynaklanmaktadır. Oksijen kaynaklı radikallerin hücreler üzerinde sitotoksik etkiler meydana getirdiği bilinmektedir. *In vivo* olarak organizmada toksik metabolitleri inaktive eden ve yakalayabilen koruyucu

sistemler vardır ve böylece dokularda bu metabolitlerin birikimi ve toksisiteleri önlenmiş olmaktadır. GSH, iç ve dış kaynaklı toksik kimyasallara karşı hücrel savunma sisteminde önemli bir rol oynar. GSH düzeyinin azalması, toksik bileşiklere karşı hücre savunmasını bozmakla kalmaz, hem de oksidatif strese karşı dokuları hasara daha duyarlı hale getirebilir. Glutasyon, metalleri de içine alan çeşitli ilaç ve kimyasalların toksisitesine karşı koruma sağlamaktadır [104]. Oksidatif stres, oksidanların oluşumu ve antioksidan sistemlerin aktivitesi arasındaki dengenin bozulmasıdır.

Bizim sonuçlarımız aynı konuda yapılmış araştırma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Bu verilerin ışığında şu bilimsel yorumlar getirilebilir;

1-Akut bakır toksisitesiyle azalan karaciğer GSH'ı;

Bakır kaynaklı oluşan reaktif oksijen türleri (bakırın etkisiyle aşırı aktive olan karaciğer sitokrom P450 sisteminin ürettiği reaktif oksijen türleri) GSH'nin oksitlenmesinden kaynaklanmış olabilir.

2- Akut bakır toksisitesiyle artan karaciğer lipit peroksidasyonu;

Özellikle hücre içi enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalarından olan GSH'nin önemli derecede azalmış olması, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunu da azaltır. Bunun sonucunda lipitlerin peroksidasyonu hızlanmış olabilir. Yine bakır toksisitesiyle birlikte artan serbest radikal oluşumu direkt oksidatif etkiyle hücrenin membran ve diğer lipitlerinin peroksidasyonu artmış olabilir.

Bakır toksisitesi GSH düşüşündeki azalmayla kendini göstermiştir. GSH'deki azalma membran bütünlüğünde bir değişimle sonuçlanabilir. Azalan GSH dokunun membran lipitlerinin oksitlenmesine yol açacağından dokuda görülen histopatolojik değişimler meydana gelmiş olabilir.

Sonuç olarak bakır sülfat toksikasyonuna maruz bırakılan farelerde GSH'ın oluşan histopatolojik değişiklikleri engellediği ve antioksidan sistemde önemli ölçüde düzelmeler meydana getirdiği tespit edildi. Elde edilen bulgular, akut bakır toksikasyonu tedavisinde GSH takviyesinin diğer tedavi yöntemleri ile beraber kullanılması ile daha etkili ve etkin sonuçların alınabileceğini önerir doğrultudur.

6. KAYNAKLAR

1. Eide, D. J., “Functional genomics and metal metabolism”, *Genome Biol.*, 2 (10): 1028.1-1028.3 (2001).
2. Dijkstra, M., Vonk, R. J. and Kuipers, F., “How does copper get into bile? New insights into the mechanism(s) of hepatobiliary copper transport”, *J. Hepatol.*, 24 (Suppl 1): 109-120 (1996).
3. Gaetke, L. M. and Chow, C. K., “Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients”, *Toxicology*, 189 (1-2): 147-163 (2003).
4. Kadiiska, M. B. and Mason, R. P., “In vivo copper-mediated free radical production: an ESR spin-trapping study. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 58 (6): 1227-1239 (2002).
5. Spee, B., Mandigers, P. J. J., Arends, B., Bode, P., van den Ingh, T. S. G. A. M., Hoffman, G., Rothuizen, J. and Penning, L. C., “Differential expression of copper-associated and oxidative stress related proteins in a new variant of copper toxicosis in Doberman pinschers”, *Comp. Hepatol.*, 4 (1): 3 (2005).
6. Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Davit-Spraul, A., Conti, M. and Legrand A., “Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach”, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 3 (5): 373-384 (2000).
7. Nordberg, J. and Arner, E. S. J., “Reactive oxygen species, antioxidant, and mammalian thioredoxin system”, *Free. Radic. Biol. Med.*, 31 (11): 1287-1312 (2001).
8. Prohaska, J. R. and Gybina, A. A., “Intracellular copper transport in mammals”, *J. Nutr.*, 134 (5): 1003-1006 (2004).
9. Uauy, R., Olivares, M. and Gonzales, M., “Essentiality of copper in humans”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 76 (Suppl 5): 952S-959S (1998).
10. Hart, E. B., Steenbock, H., Waddell, J. and Elvehjem, C. A., “Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. 1928”, *J. Biol. Chem.*, 277 (34): e22 (2002).

11. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S., "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å", *Science*, 272 (5265): 1136-1144 (1996).
12. Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S. and Richardson, D. C., "Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase", *Nature*, 306 (5940): 284-287 (1983).
13. Palumbo, M., d'Ischia, G., Misuraca, G., Carratu, L. and Prota, G., "Activation of mammalian tyrosinase by ferrous ions", *Biochim. Biophys. Acta*, 1033 (3): 256-260 (1990).
14. Gacheru, S. N., Trackman, P. C., Shah, M. A., O'Gara, C. Y., Spacciapoli, P., Greenaway, F. T. and Kagan, H. M., "Structural and catalytic properties of copper in lysyl oxidase", *J. Biol. Chem.*, 265 (31): 19022-19027 (1990).
15. Kaplan, J. and O'Halloran, T. V., "Iron metabolism in eukaryotes: Mars and Venus at it again", *Science*, 271 (5255): 1510-1512 (1996).
16. Klinman, J. P., "The copper-enzyme family of dopamine beta-monooxygenase and peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase: resolving the chemical pathway for substrate hydroxylation", *J. Biol. Chem.*, 281 (6): 3013-3016 (2006).
17. Cousins, R. J., "Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin", *Physiol. Rev.*, 65 (2): 238-309 (1985).
18. Turnlund, J. R., Scott, K. C., Peiffer, G. L., Jang, A. M., Keyes, W. R., Keen, C. L. and Sakanashi, T. M., "Copper status of young men consuming a low-copper diet", *Am. J. Clin. Nutr.*, 65 (1): 72-78 (1997).
19. Jacob, R. A., Skala, J. H., Omaye, S.T., Turnlund, J. R., "Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption and ceruloplasmin levels of young men", *J. Nutr.*, 117 (12): 2109-2115 (1987).
20. Kagi J. H., "Overview of metallothionein", *Methods. Enzymol.*, 205: 613-626 (1991).
21. Harris, E. D., "Copper transport: an overview", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 196 (2): 130-140 (1991).

22. Zhou, B. and Gitschier, J., "hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94 (14): 7481-7486 (1997).
23. Linder, M. C. and Hazegh-Azam, M., "Copper biochemistry and molecular biology", *Am. J. Clin. Nutr.*, 63 (5): 797S-811S (1996).
24. Mercer, J. F. and Llanos, R. M., "Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals", *J. Nutr.*, 133 (5 Suppl 1): 1481S-1484S (2003).
25. Wijmenga, C. and Klomp, L. W., "Molecular regulation of copper excretion in the liver", *Proc. Nutr. Soc.*, 63 (1): 31-39 (2004).
26. Forbes, J.R. and Cox, D. W., "Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins", *Hum. Mol. Genet.*, 9 (13): 1927-1935 (2000).
27. Hamza, I. and Gitlin, J. D., "Copper chaperones for cytochrome c oxidase and human disease", *J. Bioenerg. Biomembr.*, 34 (5): 381-388 (2002).
28. Carr, H. S. and Winge, D. R., "Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion", *Acc. Chem. Res.*, 36 (5): 309-316 (2003).
29. Wong, P. C., Waggoner, D., Subramaniam, J. R., Tessarollo, L., Bartnikas, T. B., Culotta, V. C., Price, D. L., Rothstein, J. and Gitlin, J. D., "Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 (6): 2886-2891 (2000).
30. Yagle, M. K. and Palmiter, R. D., "Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids", *Mol. Cell. Biol.*, 5 (2): 291-294 (1985).
31. Dameron, C. T. and Harris, E. D., "Regulation of aortic CuZn-superoxide dismutase with copper. Caeruloplasmin and albumin re-activate and transfer copper to the enzyme in culture", *Biochem. J.*, 248 (3): 669-675 (1987).
32. Harris, Z. L. and Gitlin, J. D., "Genetic and molecular basis for copper toxicity", *Am. J. Clin. Nutr.*, 63 (5): 836S-841S (1996).
33. Fuentealba, I. C. and Aburto, E. M., "Animal models of copper-associated liver disease", *Comp. Hepatol.*, 2 (1): 5 (2003).

34. Gross, J. B. Jr., Myers, B. M., Kost, L. J., Kuntz, S. M. and LaRusso, N. F., "Biliary copper excretion by hepatocyte lysosomes in the rat. Major excretory pathway in experimental copper overload", *J. Clin. Invest.*, 83 (1): 30-39 (1989).
35. Luza, S. C. and Speisky, H. C., "Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity", *Am. J. Clin. Nutr.*, 63 (5): 812S-820S (1996).
36. DiDonato, M. and Sarkar, B., "Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases", *Biochim. Biophys. Acta*, 1360 (1): 3-16 (1997).
37. Schilsky, M. L., "In vitro modeling of liver membrane copper transport", *Hepatology*, 22(4 Pt 1): 1340-1342 (1995).
38. Freedman, J. H., Ciriolo, M. R. and Peisach, J., "The role of glutathione in copper metabolism and toxicity", *J. Biol. Chem.*, 264 (10): 5598-5605 (1989).
39. Bremner, I., "Manifestations of copper excess", *Am. J. Clin. Nutr.*, 67 (Suppl 1): 1069S-1073S (1998).
40. Sandstead, H. H., "Requirements and toxicity of essential trace elements illustrated by zinc and copper", *Am. J. Clin. Nutr.*, 61(3 Suppl 1): 621S-624S (1995).
41. Barceloux, D. G., "Copper", *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 37 (2): 217-230 (1999).
42. Fitzgerald, D. J., "Safety guidelines for copper in water", *Am. J. Clin. Nutr.*, 67 (5 Suppl 1): 1098S-1102S (1998).
43. McDowell, L. R., "Toxicity", *Minerals in Animal and Human Nutrition*. Cunha, T.J *Academic Press, Inc.*, San Diego, California, 202-204 (1992).
44. Sontz, E. and Schwieger, J., "The "green water" syndrome: copper-induced hemolysis and subsequent acute renal failure as consequence of a religious ritual", *Am. J. Med.*, 98 (3): 311-315 (1995).
45. Oon, S., Yap, C. H. and Ihle, B. U., "Acute copper toxicity following copper glycinate injection", *Intern. Med. J.*, 36 (11): 741-743 (2006).

46. Gunay, N., Yildirim, C., Karcioğlu, O., Gunay, N. E., Yilmaz, M., Usalan, C., Kose, A. and Togun, I., "A series of patients in the emergency department diagnosed with copper poisoning: recognition equals treatment", *Tohoku. J. Exp. Med.*, 209 (3): 243-248 (2006).
47. Clayton, G. D. and Clayton, F. E., "Patty's Industrial Hygiene and Toxicology 3rd ed", *John Wiley and Sons*, New York, NY, 10-24 (1981).
48. Haywood, S., Simpson, D. M., Ross, G. and Beynon, R. J., "The greater susceptibility of North Ronaldsay sheep compared with Cambridge sheep to copper-induced oxidative stress, mitochondrial damage and hepatic stellate cell activation", *J. Comp. Pathol.*, 133 (2-3): 114-27 (2005).
49. Gilbert, R. W., Sander, J. E. and Brown, T. P., "Copper sulfate toxicosis in commercial laying hens", *Avian Dis.*, 40 (1): 236-239 (1996).
50. Zietz, B. P., Dieter, H. H., Lakomek, M., Schneider, H., Kessler-Gaedtke, B. and Dunkelberg, H., "Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply", *Sci. Total Environ.*, 302 (1-3): 127-144 (2003).
51. Tanner, M. S., "Role of copper in Indian childhood cirrhosis", *Am. J. Clin. Nutr.*, 67 (5 Supp 1): 1074S-1081S (1998).
52. Sokol, R. J., Devereaux, M., Mierau, G. W., Hambidge, K. M. and Shikes, R. H., "Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. Modification by vitamin E deficiency", *Gastroenterology*, 99 (4): 1061-1071 (1990).
53. Ishmael, J., Gopinath, C., Howell, J. M., "Experimental chronic copper toxicity in sheep. Histological and histochemical changes during the development of the lesions in the liver", *Res. Vet. Sci.*, 12 (4): 358-366 (1971).
54. Allen, M. M. and Harding, J. D. J., "Experimental copper poisoning in pigs", *Vet. Rec.*, 74: 173-179 (1962).
55. Fuentealba, I., Haywood, S. and Foster, J., "Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper loaded rat. II. Pathogenesis of copper toxicity in the liver", *Exp. Mol. Pathol.*, 50 (1): 26-37 (1989).

56. King, T. P. and Bremner, I., "Autophagy and apoptosis in liver during the prehaemolytic phase of chronic copper poisoning in sheep", *J. Comp. Pathol.*, 89 (4): 515-530 (1979).
57. Bosje, J. T., van den Ingh, T. S., Fennema, A. and Rothuizen, J., "Copper-induced hepatitis in an Anatolian shepherd dog", *Vet. Rec.*, 152 (3): 84-85 (2003).
58. Goldfischer, S. and Bernstein, J., "Lipofuscin (aging) pigment granules of the newborn human liver", *J. Cell. Biol.*, 42 (1): 253-261 (1969).
59. Johnson, G. F., Morell, A. G., Stockert, R. J. and Sternlieb, I., "Hepatic lysosomal copper protein in dogs with an inherited copper toxicosis", *Hepatology*, 1 (3): 243-248 (1981).
60. Goldfischer, S., "Demonstration of copper and acid phosphatase activity in hepatocyte lysosomes in experimental copper toxicity", *Nature*, 215 (5096): 74-75 (1967).
61. Haywood, S., Loughran, M. L. and Batt, R. M., "Copper toxicosis and tolerance in the rat. III. Intracellular localization of copper in the liver and kidney", *Exp. Mol. Pathol.*, 43: 209-219 (1985).
62. Kadiiska, M. B., Hanna, P. M., Jordan, S. J. and Mason, R. P., "Electron spin resonance evidence for free radical generation in copper-treated vitamin E- and selenium-deficient rats: in vivo spin-trapping investigation", *Mol. Pharmacol.*, 44 (1): 222-227 (1993).
63. Myers, B. M., Prendergast, F. G., Holman, R., Kuntz, S. M. and Larusso, N. F., "Alterations in hepatocyte lysosomes in experimental hepatic copper overload in rats", *Gastroenterology*, 105 (6): 1814-1823 (1993).
64. Özen, H., "Neurotrophin and apoptosis mediator expression in primary granule cell degeneration of Jack Russell Terrier", Dokora Tezi, *University of Georgia*, Athens, GA, USA, 10-14 (2003).
65. Sagripanti, J. L., Goering, P. L. and Lamanna, A., "Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 110 (3): 477-485 (1991).
66. Milne, L., Nicotera, P., Orrenius, S. and Burkitt, M. J., "Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione", *Arch. Biochem. Biophys.*, 304: 102-109 (1993).

67. Cai, L., Koropatnick, J. and Cherian, M. G., "Metallothionein protects DNA from copper-induced but not iron-induced cleavage in vitro", *Chem. Biol. Interact.*, 96: 143-155 (1995).
68. Tsang, S. Y., Tam, S. C., Bremner, I. and Burkitt, M. J., "Copper-1,10-phenanthroline induces internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells, resulting from direct oxidation by the hydroxyl radical", *Biochem. J.*, 317: 13-16 (1996).
69. de Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N. and Vermeulen, N. P., "Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans", *Free Radic. Biol. Med.*, 26 (1-2): 202-226 (1999).
70. Slater, T. F., "Free-radical mechanisms in tissue injury", *Biochem. J.*, 222: 1-15 (1984).
71. Machlin, L. J. and Bendich, A., "Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients" *FASEB J.*, 1 (6): 441-445 (1987).
72. Fridovich, I., "Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?" *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 893: 13-18 (1999).
73. Hagen, U., "Current aspects on the radiation induced base damage in DNA" *Radiat. Environ. Biophys.*, 25 (4): 261-271 (1986).
74. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S., "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor", *Nature*, 327 (6122): 524-526 (1987).
75. Finkel, T. and Holbrook, N. J., "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing", *Nature*, 408 (6809): 239-247 (2000).
76. DeLeve, L. D. and Kaplowitz, N., "Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity", *Pharmacol. Ther.*, 52 (3): 287-305 (1991).
77. Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D. and Flohe, L., "Diversity of glutathione peroxidases", *Methods. Enzymol.*, 252: 38-53 (1995).

78. Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J. and Flohe, L., "Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation", *Science*, 285 (5432): 1393-1396 (1999).
79. Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W. and Behne, D., "Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation", *FASEB J.*, 15 (7): 1236-1238 (2001).
80. Jones, D. P., Eklow, L., Thor, H. and Orrenius, S., "Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂", *Arch. Biochem. Biophys.*, 210 (2): 505-516 (1981).
81. Ho, Y. S., Magnenat, J. L., Bronson, R. T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M. and Funk, C. D., "Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia", *J. Biol. Chem.*, 272 (26): 16644-16651 (1997).
82. Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M. U., Poli, G. and Slater, T.F., "Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes", *Biochem. J.*, 208 (1): 129-140 (1982).
83. Wang, Z., Ciabattoni, G., Creminon, C., Lawson, J., Fitzgerald, G. A., Patrono, C. and Maclouf, J., "Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275 (1): 94-100 (1995).
84. Benedetti, A., Casini, A. F., Ferrali, M. and Comporti, M., "Effects of diffusible products of peroxidation of rat liver microsomal lipids", *Biochem. J.*, 180 (2): 303-312 (1979).
85. Griffiths, H. R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A. M., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J., Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H. and Astley, S. B., "Biomarkers", *Mol. Aspects. Med.*, 23 (1-3): 101-208 (2002).
86. Southorn, P. A. and Powis, G., "Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions", *Mayo Clin. Proc.*, 63 (4): 381-389 (1988).

87. Stokinger, H. E., "Copper", patty's industrial hygiene and toxicology, vol. 2a. Clayton, G. D. and Clayton, E. *John Wiley & Sons*, New York, NY, 1620-1630 (1981).
88. Śliva-Jozwik, A., Jozwik, A. and Kolataj, A., "Influence of exogenous glutathione (GSH), as stressfactor, on the activity of lysosome enzymes in some organs of mice", *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 45 (3), 307-314 (2002).
89. Ellman, G. L., "Tissue sulphhydryl groups", *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 (1): 70-77 (1959).
90. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., "Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbutiric acid reaction", *Anal. Biochem.*, 95 (2): 351-358 (1979).
91. Ohhira, M., Ono, M., Ohhira, M., Sekiya, C., Namiki, M., Fujimoto, Y., Nagao, M. and Mori, M., "Changes in free radical-metabolizing enzymes and lipid peroxides in the liver of Long-Evans with cinnamon-like coat color rats", *J. Gastroenterol.*, 30 (5): 619-23 (1995).
92. Bulut, M., "Erişkin fare karaciğeri üzerine bakır asetatın histopatolojik etkisinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Kafkas Üniversitesi*, Kars, 30-34 (2006).
93. Kasai, N., Osanai, T., Miyoshi, I., Kamimura, E., Yoshida, M. C. and Dempo, K., "Clinico-pathological studies of LEC rats with hereditary hepatitis and hepatoma in the acute phase of hepatitis", *Lab. Anim. Sci.*, 40 (5): 502-505 (1990).
94. Masuda, R., Yoshida, M. C., Sasaki, M., Dempo, K. and Mori, M., "Hereditary hepatitis of LEC rats is controlled by a single autosomal recessive gene", *Lab. Anim.*, 22 (2):166-169 (1988).
95. Mori, M., Hattori, A., Sawaki, M., Tsuzuki, N., Sawada, N., Oyamada, M., Sugawara, N. and Enomoto, K., "The LEC rat: a model for human hepatitis, liver cancer, and much more", *Am. J. Pathol.*, 144 (1): 200-204 (1994).
96. Palacios, S. P., Risbourg, S. B. and Vernet, G., "Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate", *Aquatic Toxicol.*, 50: 109-124 (2000).
97. Tatum, L., Shankar, P., Boylan, L. M. and Spallholz, J. E., "Effect of dietary copper on selenium toxicity in Fischer 344 rats", *Biol. Trace. Elem. Res.*, 77 (3): 241-249 (2000).
98. Kawata, M. and Suzuki, K. T., "Relation between metal and glutathione concentrations in mouse liver after cadmium, zinc or copper loading", *Toxicol. Lett.*, 15 (2-3): 131-137 (1983).

99. Brewer, G. J., Dick, R. D., Johnson, V. D., Fink, J. K., Kluin, K. J. and Daniels, S., "Treatment of Wilson's disease with zinc XVI: treatment during the pediatric years", *J. Lab. Clin. Med.*, 137 (3): 191-198 (2001).
100. Sokol, R. J., Devereaux, M. W., Traber, M. G. and Shikes, R. H., "Copper toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: effect of vitamin E", *Pediatr. Res.*, 25 (1): 55-62 (1989).
101. Toth, L., Juhasz, M., Varga, T., Csikkel-szolnokı, A. and Nemcsok, J., "Some effect of CuSO₄ on carp", *J Environ. Sci. Health Part B*, 31 (3): 627-635 (1996).
102. Britton, R. S., "Metal-induced hepatotoxicity", *Semin. Liver Dis.*, 16: 3-12 (1996).
103. Mattie, M. D. and Freedman, J. H., "Protective effects of aspirin and vitamin E (alpha-tocopherol) against copper- and cadmium-induced toxicity", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285 (4): 921-925 (2001).
104. Perin, D. D. and Watt, A. E., "Complex formation of zinc and cadmium with glutathione", *Biochim. Biophys. Acta*, 230 (1): 96-104 (1971).

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Samsun'da doğdu. İlk öğretimini İstanbul ve Samsun'da, orta ve lise öğretimini Samsun'da tamamladı. 1993 yılında Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yüksek öğretime devam ederek 1997 yılında mezun oldu. Sırasıyla Çorum Kınık Köyü İlköğretim Okulu, Samsun Asarcık İlköğretim Okulu ve Samsun Çatalarmut İlköğretim Okulu'nda sınıf öğretmeni olarak görev yaptı. Görevine 2000-2003 yıllarında ara vererek yurt dışında bulundu. Yurt dışı dönüşünde Kars Halefoğlu İlköğretim Okulu'nda görevine yeniden başladı. 2005 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisansa başladı. Halen Kars Şehit Albay İbrahim Karaoğlanoğlu Yatılı İl Bölge Okulu'nda görevine devam etmektedir.