

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME
HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



**BAKIR SÜLFAT TOKSİSİTESİ OLUŞTURULAN
RATLARDA KRİSİN VE FLUNİKSİN MEGLUMİNİN
YEM TÜKETİMİ, CANLI AĞIRLIK, ANTİOKSİDAN
DURUM, BAZI KAN VE YANGI PARAMETRELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAKAN GÜLLÜOĞLU

2018

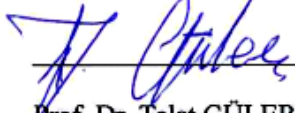
ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Talat GÜLER

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

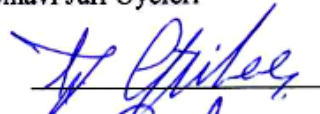
Prof. Dr. Pınar TATLI SEVEN



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

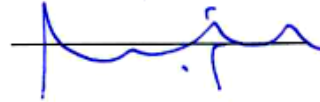
Prof. Dr. Talat GÜLER



Prof. Dr. Pınar TATLI SEVEN



Prof. Dr. Nuriye Tuğba BİNGÖL





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

HAKAN GüLLüOğLU

Tarih

İmza

21.06.2018

Prof.Dr. Pınar TATLI SEVEN

Danışman

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı

ELAZIğ



Eşime ve Kızıma...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, sonuçların değerlendirilmesi ve yazım aşamasında bana büyük katkılar sağlayan kıymetli tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Pınar TATLI SEVEN hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasında benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Kazım ŞAHİN, Sayın Prof.Dr. Talat GÜLER, Sayın Prof.Dr. Nurhan ŞAHİN, Sayın Prof.Dr. Mehmet ÇİFTÇİ, Sayın Doç.Dr. Cemal ORHAN, Sayın Arş.Gör.Dr. Seda İFLAZOĞLU MUTLU hocalarıma saygı ve şükranlarımı sunarım. Bu tez çalışmanın uygulama ve analizlerin de destek aldığım Sayın Doç.Dr. İsmail SEVEN, Sayın Dr.Öğr.Üyesi Burcu GÜL BAYKALIR, Sayın Dr.Öğr.Üyesi Tuba PARLAK AK ve Sayın Arş.Gör.Dr. Neşe BAŞAK TÜRKMEN'e teşekkür ederim.

Hakan GÜLLÜOĞLU

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
1.1. Bakır (Cu)	3
1.2. Bakır ve Oksidatif Stres Oluşumu	5
1.3. Krisin	8
1.4. Fluniksin Meglumin	9
1.5. Serbest Radikaller	11
1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	11
1.6.1. Malondialdehid (MDA)	12
1.6.2. Katalaz (CAT)	13
1.6.3. Super Oksit Dismutaz (SOD)	13
1.6.4. Redükte Glutasyon (GSH)	14
2. GEREÇ ve YÖNTEM	15
2.1. GEREÇ	15
2.1.1. Hayvan Materyali	15

2.1.2. Yem	15
2.2. YÖNTEM	16
2.2.1. Deneme Düzeni	16
2.2.2. Işıklandırma	17
2.2.3. Grupların Yem Tüketiminin (YT) Belirlenmesi	17
2.2.4. Canlı Ağırlık ve Canlı Ağırlık Değişimlerinin Belirlenmesi	17
2.2.5. Ölüm Oranının Belirlenmesi	17
2.2.6. Analitik İşlemler	17
2.2.6.2. Kan ve Doku Analizleri	17
2.2.6.2.1. Kan Analizleri	18
2.2.6.2.2. Doku Analizleri	18
2.2.6.2.2.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	18
2.2.6.2.2.3. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	19
2.2.6.2.2.4. Doku SOD Tayini	19
2.2.6.2.2.5. TNF- α Analizi	19
2.2.6.2.2.6. Histopatolojik Değerlendirmeler	19
2.2.6.3. İstatistik Analizler:	21
3. BULGULAR	22
3.1. Grupların Yem Tüketimi Değerleri	22
3.2. Gruplarının Canlı Ağırlık Ortalamaları	22
3.3. Gruplarının Canlı Ağırlık Değişimleri	22
3.4. Grupların Bazı Biyokimyasal Parametre Değerleri	24
3.5. Grupların Böbrek ve Karaciğer Dokularındaki MDA Düzeyleri ile GSH, SOD ve CAT Aktiviteleri	26

3.6. Grupların Plazma TNF- α Düzeyleri	27
3.7. Grupların Işık Mikroskopik Bulguları	27
3.7.1. Kontrol Grubu	27
3.7.2. Bakır Grubu	28
3.7.3. Fluniksin Meglümün Grubu	35
3.7.4. Krisin Grubu	36
3.7.5. Bakır-Fluniksin Meglümün Grubu	37
3.7.6. Bakır-Krisin Grubu	41
4. TARTIŞMA	46
4.1. Performans	46
4.2. Grupların Bazı Biyokimyasal Parametre Değerleri	48
4.3. Araştırma Gruplarının Böbrek ve Karaciğer Dokularındaki MDA Düzeyleri ile GSH, SOD ve CAT Aktiviteleri	50
5. SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Kullanılan yemin besin madde bileşimi	15
Tablo 2: Deneme gruplarının performans parametreleri üzerine etkileri.....	21
Tablo 3: Deneme gruplarının kan parametreleri üzerine flunixin ve krisin'in etkileri	25
Tablo 4: Deneme gruplarının karaciğer dokusundaki MDA ($\mu\text{g/ml}$ homojenat) düzeyleri ile GSH (nmol/mg protein) SOD (U/ml) ve CAT (k/g protein) aktiviteleri	26
Tablo 5: Deneme gruplarının böbrek dokusundaki MDA ($\mu\text{g/ml}$ homojenat) düzeyleri ile GSH (nmol/mg protein). SOD (U/ml) ve CAT (k/g protein) aktiviteleri	26
Tablo 6: Deneme gruplarının plazma TNF- α (pg/ml) düzeyleri.....	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kontrol grubu normal karaciğer görünümü, H&E.....	28
Şekil 2: Kontrol grubu normal böbrek görünümü, H&E.	28
Şekil 3: Kontrol grubu normal karaciğer görünümü, Kaspaz.	28
Şekil 5: Bakır grubu karaciğerde sentrilobuler hepatosellüler dejenerasyon ve nekrotik hücreler (oklar), H&E.....	30
Şekil 6: Bakır grubu karaciğerde hepatositte karyomegali (kalın ok) ve karyolitik çekirdekli fokal nekroz alanları (ince oklar), H&E.	30
Şekil 7: Bakır grubu karaciğerde çift çekirdekli hepatositler (oklar), H&E.	30
Şekil 8: Bakır grubu karaciğerde Kupffer hücrelerinde proliferasyon (oklar), H&E.	30
Şekil 9: Bakır grubu karaciğerde sinuzoidlerde vazokonjesyon ve dilatasyon (oklar), H&E.	31
Şekil 10: Bakır grubu karaciğerde sinuzoidlerde vazokonjesyon ve dilatasyon (oklar), H&E.....	31
Şekil 11: Bakır grubu karaciğerde periportal bölgelerde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonları (oklar), H&E.	31
Şekil 12: Bakır grubu karaciğerde Vena Sentralis çevresinde vakuolizasyonla birlikte yağ dejenerasyonu ve nekroz (oklar), H&E.....	31
Şekil 13: Bakır grubu karaciğerde Vena Sentralis'te hiperemi ile beraber dilatasyon (oklar), H&E.	32
Şekil 14: Bakır grubu karaciğerde Vena Sentralis'te hiyalin kalıntısı (ok), H&E.	32

Şekil 15: Bakır grubu karaciğerde hepatik kord alanlarında disorganizasyon (ince oklar) ve portal bölgede safra kanalında proliferasyon (kalın oklar), H&E.....	32
Şekil 16: Bakır grubu böbrek korteksinde tubulusların dejenerasyonu ve nekrotik hücreler (oklar), H&E.....	32
Şekil 17: Bakır grubu böbrek korteksinde proksimal tubulusların epitel hücrelerinde şişme, karyomegali (uzun oklar) ve karyolizis (kısa ok), H&E.....	33
Şekil 18: Bakır grubu böbrek korteksinde proksimal tubuluslarda konjesyon (kısa ok) ve epitelyal hücre deskuamasyonu (uzun oklar), H&E.....	33
Şekil 19: Bakır grubu böbrek korteksinde proksimal tubulusta hiyalin silindirleri (ok), H&E.....	33
Şekil 20: Bakır grubu böbrek korteksindeki glomerulusta büzüşme ile birlikte konjesyon (yıldız), bazal membranda kalınlaşma (oklar), Bowman kapsülünde dilatasyon ve dejenerasyon (kare), H&E.....	33
Şekil 21: Bakır grubu böbrek korteksinin intersitisyel dokusundaki kan damarlarında konjesyon (oklar), H&E.....	34
Şekil 22: Bakır grubu böbrek korteksinde fokal mononükleer hücre infiltrasyonları (oklar), H&E.....	34
Şekil 23: Bakır grubu karaciğerde hepatositlerde aktif kaspaz-3 pozitif reaksiyon, Kaspaz.....	34
Şekil 24: Bakır grubu karaciğerde hepatositlerde aktif kaspaz-3 reaksiyonu (oklar), Kaspaz.....	34

Şekil 25: Bakır grubu böbrek korteksinde tubulus epitellerinde aktif kaspaz-3 reaksiyon, Kaspaz.....	35
Şekil 26: Bakır grubu böbrek korteksinde tubulus epitellerinde aktif kaspaz-3 reaksiyonu (oklar), Kaspaz.....	35
Şekil 27: FM grubu normal karaciğer görünümü, H&E.....	36
Şekil 28: FM grubu normal böbrek görünümü, H&E.....	36
Şekil 29: FM grubu karaciğerde çok az sayıda hepatositte pozitif olmayan aktif kaspaz-3 reaksiyonu (oklar), Kaspaz.....	36
Şekil 30: FM grubu böbrek korteksindeki çok az sayıda tubulusta pozitif olmayan aktif kaspaz-3 reaksiyonu (oklar), Kaspaz.....	36
Şekil 31: Krisin grubu normal karaciğer görünümü, H&E.....	37
Şekil 32: Krisin grubu normal böbrek görünümü, H&E.....	37
Şekil 33: Krisin grubu normal karaciğer görünümü, Kaspaz.....	37
Şekil 34: Krisin grubu normal böbrek görünümü, Kaspaz.....	37
Şekil 35: Bakır-FM grubu karaciğerde hafif derecede dejeneratif, nekrotik ve infiltratif değişiklikler, H&E.....	39
Şekil 36: Bakır-FM grubu karaciğerde hepatositlerde karyomegali (uzun oklar) ve karyolitik çekirdekli fokal nekroz alanları (kısa ok), H&E.....	39
Şekil 37: Bakır-FM grubu karaciğerde çok sayıda çift çekirdekli hepatosit (oklar), H&E.....	39
Şekil 38: Bakır-FM grubu karaciğerde sinuzoidlerde hafif vazokonjesyon (kalın oklar) ve dilatasyon (uzun ok), Vena Senralis'te hafif hiperemi (yıldız) ve dilatasyon (kısa ok), H&E.....	39

Şekil 39: Bakır-FM grubu karaciğerde hepatik kord alanlarında hafiflemiş disorganizasyon, H&E.....	40
Şekil 40: Bakır-FM grubu böbrek korteksindeki proksimal tubulus epitel hücrelerinde karyomegali (kısa ok) ile proksimal tubulusların lümeninde epitelyal hücre deskuamasyonu (uzun ok) ve hiyalin oluşumları (kalın ok) H&E.	40
Şekil 41: Bakır-FM grubu böbrek korteksindeki glomeruluslarda hafif derecede büzüşme ve konjesyon (kısa ok), Bowman kapsülünde hafif dilatasyon (yıldız) ve bazal membranda normal görünüm (uzun ok), H&E.....	40
Şekil 42: Bakır-FM grubu böbrek korteksinin intersitisyel dokusundaki kan damarlarında hafif konjesyon (uzun ok) ve mononükleer hücre infiltrasyonu, H&E.	40
Şekil 43: Bakır-FM grubu karaciğerde bazı hepatositlerde aktif kaspaz-3 pozitif reaksiyon, Kaspaz.....	41
Şekil 44: Bakır-FM grubu karaciğerde birkaç hepatositte aktif kaspaz-3 pozitif reaksiyonu (oklar), Kaspaz.	41
Şekil 45: Bakır-FM grubu böbrek korteksinde bazı tubulus epitelinde aktif kaspaz-3 reaksiyon, Kaspaz.....	41
Şekil 46: Bakır-FM grubu böbrek korteksinde birkaç tubulus epitelinde aktif kaspaz-3 reaksiyonu (yıldız) ve pozitif aktif kaspaz- 3 reaksiyonu vermeyen birçok tubulus (kare), Kaspaz.	41
Şekil 47: Bakır-Krisin grubu karaciğerde çok sayıda çift çekirdekli hepatosit ile mitotik figürlü hepatosit (uzun oklar) ve karyolitik çekirdekli birkaç nekrotik hepatosit (kısa oklar), H&E.....	43

Şekil 48: Bakır-Krisin grubu karaciğerde birçok hepatositte karyomegali (oklar)	
sinuzoidlerde hafif derecede vazokonjesyon ve dilatasyon, H&E.	43
Şekil 49: Bakır-Krisin grubu karaciğerde hepatik kord alanlarında hafiflemiş	
disorganizasyon ve Vena Sentralis'te hafif hiperemi ile dilatasyon	
(yıldız), H&E.	44
Şekil 50: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde proksimal ve distal tubuluslarda	
birkaç nekrotik hücre (oklar), H&E.	44
Şekil 51: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde proksimal tubulusta hafif	
konjesyon (uzun oklar), proksimal tubulus epitel hücrelerinde	
karyomegali (yıldız) ve intraluminal epitelyal hücre deskuamasyonu	
(kısa ok) ve hiyalin silindirleri (kalın ok), H&E.	44
Şekil 52: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde büzüşme ve konjesyonun	
olmadığı glomerulus (yıldız) ve normal görünümlü bazal membran (ok)	
, H&E.	44
Şekil 53: Bakır-Krisin grubu karaciğerde bazı hepatositlerde aktif kaspaz-3 pozitif	
reaksiyon, Kaspaz.	45
Şekil 54: Bakır-Krisin grubu karaciğerde birkaç hepatositte aktif kaspaz-3 pozitif	
reaksiyonu (oklar), Kaspaz.	45
Şekil 55: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde bazı tubulus epitellerinde aktif	
kaspaz-3 reaksiyon, Kaspaz.	45
Şekil 56: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde birkaç tubulus epiteline aktif	
kaspaz-3 reaksiyonu (yıldızlar) ve pozitif aktif kaspaz- 3 reaksiyonu	
vermeyen birçok tubulus (oklar), Kaspaz.	45

ÖZET

Bu araştırma, aşırı bakıra maruz bırakılmış ratlarda krisin ve fluniksin meglümin'in, yem tüketimi, canlı ağırlık değişimi, antioksidan durum, bazı kan ve yangı parametreleri ve histolojik değişimler üzerine koruyucu etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı. Araştırmada bireysel olarak barındırılan 36 adet erkek Sprague-Dawley rat kullanıldı ve Kontrol, Bakır Sülfat (Cu, 500 ppm canlı ağırlık (CA)/gün, gavaj), Fluniksin Meglumin (FM; 2,2 ppm CA/gün, ip), Krisin (Krisin, 50 ppm CA/gün, gavaj), Bakır Sülfat+Fluniksin Meglumin (Cu+FM; 500 ppm BW/gün bakır sülfat, gavaj ve 2,2 mg/kg CA/gün fluniksin meglumin, ip) ve Bakır Sülfat+Krisin (500 ppm CA/gün bakır sülfat, gavaj ve 50 ppm CA/gün krisin, gavaj) olarak altı gruba ayrıldı. Yem tüketimi (YT) Cu grubuyla karşılaştırıldığında, Cu+Krisin grubunda önemli oranda arttı ($P<0.01$). Cu toksisitesi, oksidatif stresin göstergesi olan malondialdehiti (MDA) önemli oranda artırdı. Krisin ve FM uygulaması karaciğer ve böbrek dokularında önemli oranda MDA düzeyini azalttı, ve superoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerini artırdı ($P<0.001$). Serum TNF- α düzeyi bakır grubuyla karşılaştırıldığında Cu+FM ve Cu+Krisin gruplarında önemli oranda daha düşüktü ($P<0.001$). Cu uygulanan ratların karaciğer ve böbrek dokularında FM ve krisin uygulamaları dejenerasyonu, nekrozu ve apoptozisi iyileştirdiği görüldü. Krisinin serbest radikalleri temizleyerek ve antioksidanların aktivitesini artırarak YT ile karaciğer ve böbrek üzerine olan olumsuz etkileri iyileştirdiği ortaya çıktı.

Anahtar Kelimeler: Bakır toksisitesi, krisin, fluniksin meglumin, yem tüketimi, canlı ağırlık değişimi, antioksidan durum, kan, yangı, histolojik parametreler, rat.

ABSTRACT

The Effects of Flunixin Meglumine and Chrysin on Some Blood and Inflammation Parameters, Antioxidant Status, Body Weight, Feed Intake on Toxicity Induced Copper Sulphate in Rats

This experiment was conducted to determine the protective effects of chrysin and flunixin meglumine on feed intake, body weight change, antioxidant status, some blood and inflammation parameters, and histological changes in rats exposed to excess copper. Thirty-six Sprague Dawley male rats were housed in individual cages and randomly divided into six groups; Control, Copper Sulphate (Cu; 500 ppm body weight (BW/day, gavage) Flunixin Meglumine (FM; 2.2 ppm BW/day, ip), Chrysin (Chrysin; 50 ppm BW/day, gavage), Copper Sulphate + FM (Cu+FM; 500 ppm BW/day of copper sulphate, gavage and 2.2 ppm BW/day of FM, ip) and copper sulphate + Chrysin (Cu+Chrysin; 500 ppm BW/day of copper sulphate, gavage and 50 ppm BW/day of chrysin, gavage). Feed intake (FI) in the Cu+Chrysin group significantly increased in comparison with that of Cu group ($P<0.01$). Cu toxicity significantly increased MDA indicating oxidative stress. Chrysin and FM administration significantly decreased MDA levels, and increased the superoxide dismutase and catalase activities in the liver and kidney tissues ($P<0.001$). Serum TNF- α levels were significantly lower in the Cu+FM and Cu+Chrysin groups in comparison to the Cu group ($P<0.001$). It was seen that FM and chrysin treatments alleviated degeneration, necrosis and apoptosis in the liver and kidney tissues of the Cu-treated rats. Chrysin appeared to ameliorate the adverse effects on FI and liver and kidney tissues by scavenging where the free radicals are located, and increasing activity of antioxidants.

Key words: Copper toxicity, chrysin, flunixin meglumine, feed intake, body weight change, antioxidant status, blood, inflammation, histological parameters, rat

1. GİRİŞ

Artan çevre kirliliği ve gıda güvenliğinde yaşanan sorunlardan dolayı insan yaşamı ve sağlığı gün geçtikçe daha fazla tehdiye maruz kalmaktadır. Bilim insanları, bu gibi faktörlerden kaynaklanabilecek olumsuzlukların giderilmesinde yeni teknikler araştırma ve geliştirme çabalarını sürdürmektedir. Özellikle ağır metaller çevre kirliliğinde önemli rol oynamaktadırlar. Kurşun, çinko bakır, kobalt, kadmiyum, krom, nikel, arsenik, civa ve gümüş gibi metallerin iyonları normalde canlı sistemlerinde gerekli olmalarına karşın belirli bir dozun üstüne çıktıklarında son derece toksik olabilmektedirler (1). Metaller, ya işlevsel ve yapısal molekülleri etkileyerek doğrudan, ya da serbest radikal oluşumunu artırarak dolaylı yoldan etki ederler.

1.1. Bakır (Cu)

Bakır, periyodik cetvelde simgesi Cu olarak gösterilen, 1B geçiş grubu elementi olan, kırmızı ya da kahverengi görünümlü önemli bir metaldir. Dünya'nın hemen hemen tüm bölgelerinde bulunması nedeniyle geniş ölçüde üretimi yapılabilmektedir. Elektriği diğer bütün metaller içinde gümüşten sonra en iyi ileten metaldir (2).

Bakır; hücrede birçok enzimin fonksiyonunda rol oynayan önemli bir iz elementtir. Özellikle hücrede enerjinin üretildiği mitokondride etkili olduğu, demirin homeostazisi, serbest radikallerin temizlenmesi, kollojen ve elastinin bağ oluşturma gibi mekanizmalarda görev alan enzimlerin katalizlenmesinde rol oynamaktadır (3-5). Hücre fizyolojisi yanında sanayide de çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Özellikle elektrik ve boya sanayinde, tesisat borularının üretiminde kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca veteriner hekimlik alanında

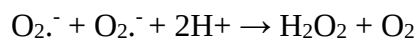
antelmantik olarak, tarımda ise fungusit olarak bakır sülfat sıklıkla kullanılmaktadır (5,6). Tarımsal alanda özellikle bağ yetiştiriciliğinin yaygın olduğu bölgelerde fungusit olarak kullanılan bakır (35- 40 kg Cu/ha/yıl) toprakta bakır birikimine yol açabilmektedir. Özellikle Akdeniz Bölgesinde seracılık yapılmakta ve seralarda bakır kaynaklı gübreler ve fungusitler oldukça fazla kullanılmaktadır (7). Nitekim, Akdeniz Bölgesinde gerçekleştirilen bir araştırmada (8), Antalya yöresinde ki sera topraklarının % 8'inin bakır içeriğinin kritik toksisite sınırının üzerinde olduğu ve yaprak örneklerinin bakır içeriğinin (yapraktan uygulanan bakır içeren kimyasallardan dolayı) çok yüksek olduğu belirtilmiştir. Yaprak da fazla olmasının sebebi olarak da bakır uygulamalarının yaprağa yapılmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Tüm bu alanlarda yaygın olarak kullanılan bakırın hava, su, gıda veya bakır içeren bileşiklerin deri yoluyla teması sonucunda vücuda alınması mümkün olmaktadır. Bakırın yüksek oranda organizmaya alınması ciddi zehirlenmelere yol açmaktadır. Özellikle oral yolla alındığında ciddi toksikasyonlara yol açtığı bildirilmektedir (6). Bakır toksisitesinde kanda bakır yükselir ve hemolize neden olur. İlk biriktiği yerin karaciğer olmasından dolayı karaciğer ile ilgili biyomarkırlar öncelikli olarak etkilenmektedir. Aspartat transaminaz (AST) ve alanin amin transferaz (ALT) aktiviteleri karaciğer fonksiyon testlerinde önemli biyomarkırlardır. Yapılan bir çalışmada (9), bakır verilen tüm ratların plazma ALT ve AST aktivitelerinin önemli oranda arttığı belirlenmiştir (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.001$). Bakır alımının ALT ve AST aktivitelerindeki artışa neden olması karaciğer fonksiyonu üzerine olumsuz etkili olduğunu göstermektedir (10).

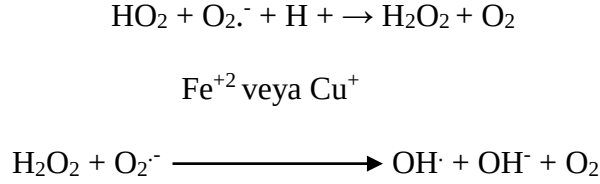
Dokularda birikebilmesinden dolayı belirli konsantrasyonlarda özellikle karaciğer ve böbrek olmak üzere birçok dokuda hasar oluşturmaktadır (3,5). Bakırın metabolize olduğu organ karaciğer olduğu için birincil hasar oluşturduğu organ karaciğerdir. Hepatositlerin çekirdek ve lizozomlarında birikerek hasar yapmaktadır. Bu yapılardaki hasarı sonucu kana geçer ve kandaki filtrasyon yolu ile böbrek tubulus epitelleri tarafından emilir ve sitoplazmada birikerek böbrekte de hasar oluşturur (5).

1.2. Bakır ve Oksidatif Stres Oluşumu

Bakır fazlalığı serbest oksijen radikallerinin üretimini tetikleyerek mitokondride lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. Normalde hidrojen peroksit (H_2O_2) kendi başına çok zayıf oksidan özelliği gösterir. Hidrojen peroksit; glutatyon peroksidaz, katalaz (CAT) ve belirli peroksidazlar tarafından ortadan kaldırılabılır. Fakat antioksidan savunma sistemi yeterli olmadığında hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen sistemi (ROS) içine girer ve serbest radikaller içerisinde önemli bir rol oynar. Çünkü demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Süperoksit radikallerinin asıl zararları ise hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarındandır. İki süperoksit radikalının bir araya gelmesi sonucu hidrojen peroksit meydana gelir (11-13).



Süperoksit radikali ve peroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu da hidrojen peroksit ve oksijen oluşur.



Diğerk taraftan geçiş metalllerinin otooksidasyonu sonucunda da süperoksit radikali oluşabilmektedir.



Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olup serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir (13).

Mitokondrinin membranını etkileyerek geçirgenliğini bozar ve eriyebilir bileşiklerin membrandan içeri girmesine sebep olmaktadır. Bunun sonucu olarak mitokondri büyür, osmotik basınç artar ve sitokrom C'nin sitosole salınımının artmasına yol açmaktadır. Bu durum kaspaz-9 enziminin aktive olmasına sebep olmaktadır (5,14-16). Kaspaz enzimleri (Cystein Aspartate Specific Proteases-KASPAZ) sistein proteaz grubu enzimlerdir. İnaktif proteinlerdir, ancak çeşitli yollarla aktive edilirler. Hücre ölümleri sırasında oluşan birçok değışimin sorumlusu olarak bilinmektedir (17). Bakır toksisitesinin ratların karaciğesinde serbest radikallerin artmasına yol açarak tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α)'yı indükleyerek kaspaz enzimlerini aktive ettiğı bildirilmiştir (18). TNF birçok hücre tipi tarafından salgılanır ve 185 aminoasitlik glikoprotein hormonlardır. TNF'lerden biri olan TNF- α (kaşektin, kaşeksin) daha çok makrofajlar tarafından üretilmektedir. Makrofajlarda artması oksidanların, inflamasyon lipidlerinin ve

prostaglandin E2'nin üretimini uyarmaktadır (19). Ratlarda deneysel olarak bakır zehirlenmesi oluşturulup karaciğer ve böbrek hücrelerinde ki apoptozisin araştırıldığı bir çalışmada (5) bakır sülfat solüsyonu I.deneme grubundaki sıçanlara günlük 75 mg/kg dozda ve 14 gün süreyle, II.deneme grubundakilere ise aynı dozda 28 gün süreyle gastrik sonda ile uygulanmıştır. Histopatolojik incelemelerde karaciğer hücrelerinde dejenerasyon, portal mononükleer hücre infiltrasyonları ve nekroz olduğu belirlenmiştir. Karaciğerde hücresel dejenerasyonun birinci grupta daha şiddetli olduğu, ikinci grupta ise nekrotik hücrelerin sayısının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Her iki grupta da böbreklerde dejenerasyon ve lenfosit infiltrasyonu olduğu belirlenmiştir. Deneme gruplarında apoptozin tespit edilmesi amacıyla kaspaz 3,8 ve 9 aktivitelerine bakılmış, her iki deneme grubunda ve her iki organda hücrelerin hem apoptozis hem de nekroz ile ölebildiği ancak her iki organda birinci grupta apoptotik hücrelerin, ikinci grupta ise nekrotik hücrelerin sayısının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bakırın diğer ağır metallerde olduğu gibi oksidatif strese yol açtığı bildirilmektedir. Oksidatif stres ile apoptozis arasında ilişki mevcuttur (20,21). Normal durumlarda mitokondride hücresel solunum sırasında az miktarda serbest oksijen radikalleri üretilirken, hücre organellerinde bakır biriktiğinde özellikle lizozomda serbest oksijen radikallerinin üretiminin arttığı belirlenmiştir (5). Bakır toksisitesi ile ilgili ratlarda yapılan bir çalışmada (9) yüksek oranda bakırın, beyin dokusunda reaktif oksijen türlerini artırdığı, malondialdehit (MDA) düzeyini yükselttiği, süper oksit dismutaz (SOD) düzeyini azalttığı ve redükte glutasyonu (GSH) tükettiği bildirilmiştir.

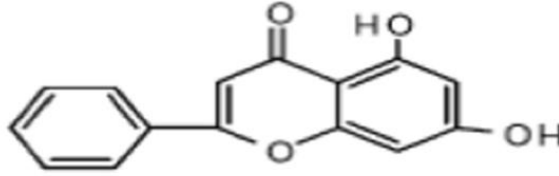
1.3. Krisin

Normal biyolojik sistem içerisinde reaktif oksijen türleri oluşabilmektedir. Lipidler, proteinler, DNA gibi moleküller çeşitli etkenlerle hasara uğrayabilmektedir. Metabolizmada bu hasarları önleyici endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak antioksidanlar yetersiz olursa oksidatif hasar meydana gelmektedir. Antioksidanların birçoğu yaygın olarak kullandığımız gıdalarda bulunmaktadır. Bunlar; bazı vitaminler, flavonoidler, polifenoller ve diğer bileşikler kapsamaktadır (22). Flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında bazı hastalıkları koruma etkilerinin olduğu belirlenmiş ve son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar artmıştır. Sayıları 4000'in üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (22,23).

Flavonoidler vitaminlere benzer özellik gösterirler. Vitamin E bilindiği üzere antioksidan bir yapıya sahiptir. Ancak flavonoidler daha fazla hidrofilik yapıda oldukları için membranın polar yüzüne yakın şekilde lokalize olmaktadır ve sulu peroksil radikallerini kolayca yakalayarak lipid peroksil radikallerine vitamin E den daha hızlı şekilde etki etmektedirler. Böylece metabolizmaya flavonoid alımı vitamin E gibi antioksidanların harcanmasını da engellemiş olacaktır (24). Flavonoidlerin antioksidan özelliklerden başka bazı enzimleri inhibe edebilme özellikleri de bulunmaktadır. Yine flavonoidlerin antitümör, antiviral, antiinflamatuvar, antitrombotik, vazodilatasyon ve antialerjik etki mekanizmaları bulunmaktadır (22,25).

Krisin, güçlü bir antioksidan özelliğe sahip flavonoiddir. Son zamanlarda fito kimyasalların serbest radikalleri temizleme ve oksidatif stresi inhibe etme güçleri bilim adamlarının ilgisini çekmiştir. Çin ve Doğu Asya Ülkelerinde

bitkisel tedavide yaygın olarak kullanılan krisin; bal, çiçek ve propolisde bulunan bir flavanoiddir (26). Krisin flavonoidlerin alt gruplarından olan bir flavon yapısındadır.



Krisin (27).

Flavanoidler, iz elementlerle veya radikallerle şelat yaparak antioksidan özellik göstermektedirler (28-30). Ayrıca doymamış yağ asitlerini hücre membranında oksidantlara karşı askorbat gibi korudukları bildirilmiştir (31). Krisinin antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar etkileriyle pek çok biyolojik aktivite ve farmakolojik etki gösterdiği bildirilmektedir (26,32). Krisinin reproduktif sistem üzerine de etkili olduğu bildirilmiştir. Testesteronu östrojene dönüştüren aromataz enzimini inhibe ederek testesteron oranını artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca krisinin oksidatif stres ve apoptotik doku hasarının etkisini düşürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (33).

1.4. Fluniksin Meglumin

Fluniksin meglumin (FM; 3 pridin karboksilik asit) non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAi) grubunda yer alan analjezik antiinflamatuvar, antipiretik ve antiprostoglandin etkilere sahip ilaçtır. NSAi ilaçlar içerisinde en güçlü etkiye sahiptir. FM araşidonik asitten prostoglandinlerin sentezlenmesinde rol oynayan siklooksijenaz enzimini irreversibl olarak inhibe ederek etkisini

gostermektedir. Prostaglandinler çeşitli fizyolojik ve patolojik olayların (ağrı, yangı, romatoid artrit, çeşitli muskokeletal bozukluklar gibi) oluşumunda rol oynayan, tüm vücut hücrelerinde sentezlenebilen bir otokoiddir (34). FM veteriner hekimlikte endotokseminin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (35-37). FM gibi bazı anti-inflamatuvar ilaçların antitoksemi mekanizması siklooksijenaz (COX) inhibisyonundan bağımsız etkileri de mevcuttur (38). Son yıllardaki bazı araştırmalar NSAID'ların serbest radikallerle savaşma kapasitesinin olduğunu ve vücutta güçlü antioksidanlar olarak etki ettiğini ileri sürmektedir (39). NSAID'ler lokal ve merkezi olarak ağrı kesici özellikleriyle opioidlerle sinerjik etkileşime sahiptirler. Ağrı kesici, ateş düşürücü ve yangı giderici olarak veteriner hekimlikte; atlarda; osteoartrit, laminit kolit, endotoksemi, pnömoni, sıgırda mastit tedavisinde ve laboratuvar hayvanlarında (kobay, rat, fare, hamster, gerbil) operasyon sonrasında kullanılmaktadır. Aspirin gibi NSAi ilaçların sinovyal sıvının viskozitesini azalttığı ve eklem dejenerasyonunda rol oynayan serbest radikallerin (oksijen, hidroksil OH⁻ ve hidrojen peroksit H₂O₂) oluşumunu da azalttığı belirtilmektedir (34).

FM'nin meydana getirdiği en önemli yan etkiler arasında; nefrotoksitite, platelet agregasyonunu önlenmesi ile gastrointestinal kanamalar olduğu bildirilmiştir. FM kullanımıyla maymun ve ratlarda aneminin şekillendiği ve yine ratlarda uygulanan FM'nin gastrointestinal sistemde belirgin patolojik değişimlere neden olduğuna ait çalışma bulguları da kaydedilmiştir. FM kullanımında, her ne kadar ilacın fare, rat ve tavşanlarda sorunsuz bir şekilde kullanılabileceği vurgulanmış olsa da, çalışmada alyuvar sayılarında azalma ile akyuvar sayılarındaki artış dikkat çekici nitelik taşımaktadır. Bu kapsamda FM'nin

kullanımının sonrasında kan parametrelerindeki değişimlerin kontrol altında tutulması gerektiği sonucuna varılmıştır (40).

1.5. Serbest Radikaller

Besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen atom, molekül veya bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronlara serbest radikaller denir. Hücrelerin hayati fonksiyonları için oksijen molekülleri vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen ve son derece reaktif, stabil olmayan, reaktif oksijen türlerine (metabolitleri) dönüşür. Reaktif oksijen metabolitleri, karbonhidrat, lipit, protein moleküllerine ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir (41-43).

Serbest radikal zincir reaksiyonları genellikle, moleküllerden hidrojenin uzaklaştırılmasıyla başlamaktadır. Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Üç farklı mekanizma ile hücreye zarar verebilirler. Birinci mekanizma membran stabilizasyonunu ortadan kaldırıp hücre ve doku bozulmalarına yol açarak, ikinci mekanizma disülfid bağı oluşturarak ve son olarak hidroksil radikali, peroksinitrit ve nitrojen oksit gibi reaktif nitrojen türleri ile DNA hasarına yol açarak hücreye zarar verebilmektedirler (44). Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekliyse de, fazla üretilmesi doku hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır (45).

1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROS'ların oluşumunu ve meydana getirdiğı hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler.

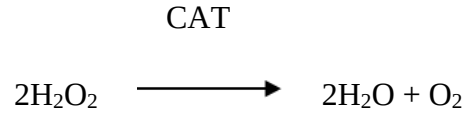
Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya ROS'ları toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, endojen kaynaklı (doğal) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde veya enzim ve enzim olmayanlar (vitamin C, vitamin E ve redükte glutatyon (GSH)) şeklinde de sınıflandırılırlar. Antioksidanlar hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunabilirler (46,47).

1.6.1. Malondialdehid (MDA)

Membranda bulunan (fosfolipit, glikolipit, gliserit ve sterol yapısında yer alan) çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri ile peroksit, alkol, aldehit, hidroksi yağ asidi, etan ve pentan gibi farklı ürünlere yıkılması reaksiyonuna lipid peroksidasyon denir. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik aktivitesi olan aldehitler hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffuze olup hücrenin diğer kısımlarına hasarı yayarlar (48,49). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü MDA'dır. MDA üç ya da daha fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile meydana gelir. Hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Bu nedenle MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve hücre kültürleri için genotoksik ve karsinogenik etki sergiler (50-53).

1.6.2. Katalaz (CAT)

Katalaz; H₂O₂'i oksijen ve suya parçalayan 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak bu enzim bir molekül H₂O₂'i elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir (54).



Dokulardaki CAT aktivitesi çok büyük değişiklikler göstermektedir. Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye, beyin, kalp, akciğer ve bağ dokusunda ise daha düşük aktiviteye sahiptir (55). Dokularda başlıca mitokondri ve peroksizomlarda olmak üzere partiküllere bağlı şekilde bulunurken, eritrositlerde çözünebilir durumda bulunmaktadır. Asetaldehit, etanol gibi hidrojen veren substratların oksidasyonunda da rol almaktadır (peroksidatif etki). CAT'ın indirgeyici aktivitesi büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerine etki etmezken, H₂O₂ ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı etkilidir. Birçok hastalıkta, örneğin kanser, Down sendromu ve anemide serum CAT aktivitesinin değiştiği bildirilmiştir (56,57).

1.6.3. Super Oksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalinin (O₂^{·-}) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir (58). Tüm aerobik hücreler SOD içerir. Hem sitozol, hem de mitokondrilerde bulunan bu enzim süperoksit radikallerini etkisizleştirerek, hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korur. Dokularda oksijen basıncının (pO₂)

yükselmesi ile SOD aktivitesi artar. Enzim fagosit edilmiş bakterilerin intraselüler olarak öldürülmesinde rol oynar ve granülosit fonksiyonu için önemlidir. İçeriğindeki metal iyonuna göre sitozolik dimerik Cu, Zn-SOD ve mitokondriyal tetramerik Mn-SOD olarak adlandırılır (59).

1.6.4. Redükte Glutasyon (GSH)

İndirgenmiş glutasyon (GSH) içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Glutasyon peroksidaz (GPx) enziminin kofaktörlüğünü yaparak, H_2O_2 'i metabolize eder (60).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Hayvan Materyali

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM)’nden temin edilen 6-8 haftalık 200-250 gram ağırlığında 36 adet erkek Sprague-Dawley ırkı ratlar kullanıldı. Deneysel uygulamalar boyunca laboratuvar hayvanları bakım ve kullanım şartlarına ($24\pm3^{\circ}\text{C}$) uygun olarak özel kafeslerde bakılmıştır. Beslenmelerinde standart rat pelet yemi kullanıldı ve su *ad libitum* sağlandı. Ratlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde 6 gruba ayrıldı ve uygulama 21 gün sürdü. Ratlar yem tüketimi tespiti için ayrı ayrı kafeslerde barındırıldı. Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığı’ndan etik kurul onayı alınmıştır (08.01.2014 / 15).

2.1.2. Yem

Denemede kullanılan standart rat pelet yemi FÜDAM’dan temin edilmiştir. Yem ve su hayvanlara *ad libitum* olarak verilmiştir. Kullanılan yemin besin madde bileşimi Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1: Kullanılan yemin besin madde bileşimi

Besin madde içeriği	% oranı	Besin madde içeriği	% oranı
Kuru madde ¹	92.5	Ham yağ ¹	3
Ham kül ¹	7.4	Ca ²	1
Ham protein ¹	23.5	P ²	0.9
Ham selüloz ¹	6	Metabolik enerji (kcal, kg) ²	2650

¹: Analiz yoluyla belirlenmiştir.

²: Hesap yoluyla belirlenmiştir.

Bakır Sülfat: Ticari bir firmadan temin edilmiştir (SIGMA)

Krisin: Ticari bir firmadan temin edilmiştir (ALDRICH, P. Code: 101425030)

Flunixin Meglumin: Ticari bir firmadan temin edilmiştir (50 mg/mL)

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Deneme Düzeni

Araştırma, her birinde 6'şar adet rat bulunan kontrol ve 5 deneme grubundan oluşturuldu. Ratların ferdi olarak canlı ağırlıkları belirlendi ve homojen ağırlık dağılımı sağlanarak bireysel olarak standart rat kafeslerinde barındırıldı. Her biri 6 tekerrürden oluşan 6 gruba ayrıldı. Her grupta 6, her tekrar grubunda ise 1 rat yer aldı.

Araştırma grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu:

- 1.Grup: Kontrol grubu (Kontrol); Bakır Sülfat, Krisin ve Fluniksin uygulaması yapılmayan grup.
- 2.Grup: Bakır grubu (Cu); 500 mg/kg CA dozunda Bakır sülfat gavajla uygulanan,
- 3.Grup: Fluniksin grubu (FM); 2.2 mg/kg CA dozunda fluniksin meglumin ip olarak verilen,
- 4.Grup: Krisin grubu (Kr); 50 mg/kg CA dozunda Krisin gavajla uygulanan,
- 5.Grup: Bakır + Fluniksin grubu (Cu+FM); 500 mg/kg CA dozunda Bakır sülfat (gavajla) + 2.2 mg/kg CA fluniksin meglumin ip olarak verilen,
- 6.Grup: Bakır + Krisin grubu (Cu+Kr); 500 mg/kg CA dozunda Bakır sülfat (gavajla) + 50 mg/kg CA dozunda Krisin gavajla verilen grup.

Araştırmada kullanılan bakır sülfat (61,62), fluniksin meglumin (63) ve krisin (33) dozları önceki çalışmalar baz alınarak yapılmıştır. Araştırma süresince her gün guruplara ait uygulamalar yapılmış ve son uygulamadan 24 saat sonra hayvanlar dekapite edilmiştir.

2.2.2. Işıklandırma

Denemede tüm gruplara araştırma süresince her gün laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım şartlarına uygun olarak 12 saat aydınlık, daha sonrasında 12 saat karanlık olacak şekilde ışıklandırma programı uygulandı.

2.2.3. Grupların Yem Tüketiminin (YT) Belirlenmesi

Grupların yem tüketimleri tartılarak verilmiş ve her grubun ortalama YT 7., 14. ve 21. günlerde verilen yemlerden artan yemler çıkarılarak hesaplandı.

2.2.4. Canlı Ağırlık ve Canlı Ağırlık Değişimlerinin Belirlenmesi

Denemenin başlangıcında ratların, ferdi olarak canlı ağırlıkları belirlendi ve ortalama canlı ağırlıkları eşit olacak şekilde gruplara ayrıldı. Denemenin 7., 14. ve 21. günlerinde ratların yine ferdi olarak canlı ağırlık tartımları yapılarak canlı ağırlıkları belirlenip, yine aynı günlerdeki canlı ağırlık değişimleri tespit edildi.

2.2.5. Ölüm Oranının Belirlenmesi

Tüm gruplar her gün uygulamalar esnasında kontrol edilmiş ve gruplarda herhangi bir ölüme rastlanmamıştır.

2.2.6. Analitik İşlemler

2.2.6.1. Yem Örneklerinin Analizleri

Yem örneklerinin kuru madde, ham kül, ham protein (Kjeldahl metodu), ham yağ (eter ekstraksiyon) analizleri AOAC (64)'a göre, ham selüloz düzeyi ise Crampton and Maynard (65)'a göre belirlendi.

2.2.6.2. Kan ve Doku Analizleri

Deneme sonunda ratlar dekapite edilerek kan örnekleri alındı ve biyokimyasal analizler yapılması için uygun şekilde saklandı. Ayrıca laparotomi yapılarak karaciğer ve böbrek dokuları (antioksidan sistem üzerine etkileri

belirlemek ve histopatolojik değerlendirmeler için) ayrıldı. Serumda yangı parametrelerinden TNF- α düzeyi, karaciğer dokusunda Kaspas 3 aktivitesi ve histopatolojik parametreler incelendi.

2.2.6.2.1. Kan Analizleri

Tüplere alınan kan örneklerinin serumları çıkarıldı. Serumda kortizol, glikoz, albümin, kreatinin, globulin, total protein, üre, ALT, AST, total kolesterol, trigliserit, HDL, VLDL ve LDL analizleri hizmet alımı şeklinde, Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı'nda yaptırıldı.

2.2.6.2.2. Doku Analizleri

Laparotomi yapılarak alınan karaciğer ve böbrek dokuları analizler yapılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2.2.6.2.2.1. Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyinin Tayini

Doku MDA düzeyleri spektrofotometrik olarak Ohkawa et al. (66) tarafından önerilen metoda göre yapıldı. Aerobik şartlar altında ve pH 3.5'te doku homojenatinin kaynar su banyosunda inkübasyonu sonucu lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu pembe renkli kompleks 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

2.2.6.2.2.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

CAT aktivitesi spektrofotometrik yöntemle göre belirlenmiştir (55). H₂O₂'in CAT tarafından yıkım hızı 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 240 nm'de köre karşı ayarlandıktan sonra 30 saniye içindeki absorbans farkı ölçülmek suretiyle CAT aktivitesi hesaplanmıştır.

2.2.6.2.2.3. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

GSH aktivitesi Ellman (67) metodu ile tayin edilmiştir. 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), sülfidril bileşikler tarafından redükte edilmiş bir disülfid bileşiğidir. Örnek ile DTNB'nin oluşturduğu sarı renkli kompleksin renk şiddeti ortamdaki GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır, 412 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.

2.2.6.2.2.4. Doku SOD Tayini

SOD enzim değerleri Sun et al. (68)'nın modifiye ettiği metotla belirlendi. Bu metodun prensibi nitroblue tetrazolium (NBT)'un süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanarak 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

2.2.6.2.2.5. TNF- α Analizi

Plazma TNF- α düzeyleri ticari bir firmadan sağlanan ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kitleri kullanılarak ölçülmüştür (Catalog No: E-EL-R0019). Ölçümler İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarında yapılmıştır.

2.2.6.2.2.6. Histopatolojik Değerlendirmeler

Histopatolojik değerlendirmeler için, her hayvana ait karaciğer ve böbrek dokuları alınarak tamponlu formaldehit doku tespit solüsyonuna bırakıldı. Bu solüsyonda dokular 24-30 saat süreyle tespit edildikten sonra 12-24 saat kadar akarsuda yıkamaya bırakıldı. Daha sonra % 70, 80, 96-I, 96-II, 100-I ve 100-II'lik alkol serilerinden geçirilen dokular ksilol-I, ksilol-II ve ksilol-III serilerinden de geçirilerek 45°C'lik etüvde ksilol-parafin karışımında 1 gece bırakıldı. Bunu takiben üç ayrı parafin serisinde birer saat süreyle bekletilerek parafin bloklar

hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan kızaklı mikrotomda 5 µm kalınlığında poli-L-lizin kaplı ve 1/4'ü tıraşlanmış lamlara seri kesitler alındı. Bu kesitlere 24 saat ya da daha uzun süreyle oda ısısında kurutma yapıldı. Kesitler, rutin histolojik incelemeler için hematoksilin-eozin (H&E) boyama yöntemine göre boyanarak ışık mikroskobunda incelendi.

Karaciğer ve böbrek dokularında apoptozise uğrayan hücreleri belirlemek için immunohistokimyasal analiz yöntemi olan kaspaz metodu kullanıldı. Boyama işlemine başlamadan önce, kesitler 37°C'lik etüvde 1 gece, 60°C'lik etüvde ise 15-20 dakika bekletildi. Daha sonra 2 kez, 15'er dakika ksilol solüsyonlarında deparafinizasyon uygulandı. % 100, 96, 80 ve 70'lik alkol serilerinde 5'er dakika rehidratasyon işlemi yapıldı. Kesitler önce distile suda çalkalandı ve arkasından antijen retrieval prosedürünü uygulamak üzere sitrat buffer solüsyonuna (pH 7.6) alındı. Mikrodalgada 20 dakika kaynatıldıktan sonra çıkarılan kesitler oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakika soğutuldu. Sonrasında 3 kez, 5'er dakika phosphate-buffered saline (PBS) solüsyonunda yıkandı. Kesitler kurularak dokuların etrafı immun kalemle çizildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3'lük H₂O₂'de (200 ml methanole 6 ml H₂PO₂ eklenerek) 5 dakika bekletilerek akabinde 3 kez, 5'er dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Ardından kesitler Ultra V blok ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra direkt primer antikor uygulamasına geçildi. Kesitler, primer antikor olarak rabbit poliklonal antibody aktif kaspaz-3 (Thermo Scientific, CPP32, Ab-4, UK) ile 37°C'lik etüvde 1 saat süreyle nemli ve karanlık ortamda (humidified chamber) inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonundan sonra PBS solüsyonunda 3 kez, 5'er dakika yıkanan kesitlere akabinde biotinylated goat anti-polivalent ile 30

dakika oda sıcaklığında sekonder antikor inkübasyonu yapıldı. Ardından PBS solüsyonunda 3 kez, 5'er dakika yıkanan kesitler streptavidin peroksidaz ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS solüsyonunda 3 kez, 5'er dakika yıkanan kesitler kurularak 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) kromojen ve substrat (Thermo Scientific, UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/DAB, UK) ile 5-15 dakika muamele edildi. Sonrasında kesitler 5 dakika distile suda yıkandı ve zemin boyaması için zıt boya olarak Mayer's hematoksilende 30 saniye boyama yapıldı. Son olarak akarsuda 5 dakika yıkanan kesitler alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek aqueous mounting medium ile kapatıldı.

İmmunohistokimyasal olarak karaciğer ve böbrek dokularındaki aktif kaspaz-3 aktiviteleri binoküler başlıklı fotomikroskop özelliğine sahip ışık mikroskopunda (Olympus BX- 51, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, JAPAN) incelendi ve fotoğrafları çekildi. Doku kesitlerindeki kaspaz-3 pozitif hücreler kahverengi boyanma gösterdi ve boyanma yoğunluğuna bakılarak (-; boyanma yok, +; zayıf, ++; orta derecede, +++; şiddetli) değerlendirildi.

2.2.6.3. İstatistik Analizler:

İstatistiksel analiz için SPSS 21 paket programından yararlanıldı (69). Değerlendirmede verilere One-way Anova testi uygulandı, gruplar arasındaki önemliliğin belirlenmesinde ise Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirmesinde önemlilik, $p < 0.05$ esasına göre ele alındı.

3. BULGULAR

3.1. Grupların Yem Tüketimi Değerleri

Araştırma gruplarının canlı ağırlık, canlı ağırlık değişimi ve yem tüketimi sonuçları Tablo 2’de sunulmuştur. Elde edilen veriler incelendiğinde canlı ağırlık değerleri bakımından yapılan ölçümlerin tamamında gruplar arasında önemli bir fark oluşmadığı, çalışma boyunca Cu grubundaki ratların canlı ağırlık değişimi miktarı diğer gruplardan rakamsal olarak düşük olduğu ve bu durumun 15-21. ve 1-21. gününlerde istatistiksel olarak önem kazandığı tespit edildi ($p<0.01$).

Araştırmanın YT değerleri incelendiğinde, denemenin her döneminde Cu grubunun YT’nin diğer grupların YT’nden istatistiksel olarak düştüğü görüldü. En yüksek YT’nin 15-21. günlerde Kontrol grubunda (22.92 g) ve en düşük YT’nin ise 15-21. günlerde Cu grubunda (16.83 g) olduğu belirlendi ($p<0.01$).

3.2. Gruplarının Canlı Ağırlık Ortalamaları

Araştırma gruplarının canlı ağırlık ortalamaları Tablo 2’de sunulmuştur. Cu verilen grupların canlı ağırlıklarında diğer gruplardan daha düşük bir artış gözlenirken, Kontrol, Flunixin ve Krisin gruplarının Cu’lu gruplara göre canlı ağırlığı rakamsal olarak iyileştirdiği belirlendi.

3.3. Gruplarının Canlı Ağırlık Değişimleri

Çalışmanın toplamında ve 15-21. günlerinde Cu verilen grubun canlı ağırlık değişimi diğer gruplardan önemli derecede düşük olduğu tespit edildi ($p<0.01$). Araştırmanın genelinde (1-21. gün) Kontrol ile Krisin gruplarının canlı ağırlık değişimleri benzerlik gösterdiği belirlendi ($p<0.01$). Araştırma gruplarının dönemlere göre canlı ağırlık değişimleri Tablo 2’de sunulmuştur.

Tablo 2: Deneme gruplarının performans parametreleri üzerine etkileri

		Kontrol	Cu	FM	Krisin	Cu+FM	Cu+Krisin	P
Canlı Ağırlık (g/hyv)	Başlangıç	251±13.4	249.5±16.8	249±14.3	249.5±17	248.8±14.9	250.5±8.3	ÖD
	7. gün	275.4±14	265.3±15.7	271.3±17.6	272.7±15.5	266.7±14.3	269.4±8.3	ÖD
	14. gün	291.5±12.7	274.9±17.6	286.6±16.4	288.5±14.5	277.5±13.7	280.8±4.3	ÖD
	21. gün	312.8±13.9	285.4±17.9	306.7±16.4	309±13.8	302.7±15.2	300.4±4.5	ÖD
Canlı Ağırlık Değişimi (g/hyv/gün)	1-7	4.07±0.35	2.64±0.5	3.72±0.59	3.86±0.36	2.98±0.69	3.15±0.42	ÖD
	8-14	2.29±0.37	1.37±0.32	2.18±0.24	2.26±0.42	1.54±0.55	1.62±0.58	ÖD
	15-21	3.04±0.32 ^a	1.5±0.12 ^b	2.89±0.17 ^a	2.93±0.25 ^a	2.73±0.14 ^a	2.80±0.09 ^a	**
	1-21	3.09±0.07 ^a	1.79±0.21 ^b	2.89±0.16 ^{ab}	2.97±0.26 ^a	2.26±0.33 ^{ab}	2.49±0.19 ^{ab}	**
Yem Tüketimi (g/hyv/gün)	1-7	22.74±1.46	19.93±1.08	22.56±0.85	22.68±0.67	20.40±1.83	21.78±1.06	ÖD
	8-14	23.33±0.29 ^a	17.41±1.15 ^c	22.56±0.53 ^a	22.92±0.67 ^a	19.2±0.63 ^{bc}	19.80±0.79 ^b	**
	15-21	22.92±0.84 ^a	16.83±1.37 ^c	22.38±1.06 ^{ab}	22.44±1.05 ^{ab}	18.66±0.55 ^{bc}	18.54±2.17 ^{bc}	**
	1-21	22.99±0.64 ^a	18.06±0.90 ^c	22.50±0.48 ^a	22.68±0.69 ^a	19.42±0.71 ^{bc}	20.04±1.04 ^{ab}	**

ÖD: İstatistiki olarak önemli değil. **: $p<0.01$; ^{abc}: Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler birbirinden farklı bulunmuştur.

3.4. Grupların Bazı Biyokimyasal Parametre Değerleri

Araştırma gruplarının bazı biyokimyasal parametreleri Tablo 3’de verilmiştir. HDL, LDL, VLDL, total kolesterol, trigliserit, total protein, albümin, kreatinin, globulin ve BUN değerlerinin istatistiksel olarak etkilenmediği belirlendi ($p<0.05$). Glikoz ve kortizol değerleri diğer gruplardan önemli derecede yüksek olarak Cu grubunda ölçüldü ($p<0.05$). Yine Cu grubunda AST düzeyi bütün gruplardan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$).



Tablo 3: Deneme gruplarının kan parametreleri üzerine fluniksin ve krisin'in etkileri

	Kontrol	Cu	FM	Krisin	Cu+FM	Cu+Krisin	P
Glikoz (mg/dL)	90.75±3.96 ^b	103.66±4.03 ^a	94.20±1.32 ^b	93.80±1.68 ^b	90.60±1.60 ^b	92.80±1.65 ^b	*
Kortizol (ug/dL)	0.47±0.03 ^c	0.75±0.04 ^a	0.48±0.06 ^c	0.47±0.02 ^c	0.64±0.01 ^b	0.62±0.02 ^b	**
HDL (mg/dL)	16.37±0.49	15.98±0.029	16.71±0.60	16.46±0.41	15.78±0.69	16.02±0.64	ÖD
LDL (mg/dL)	10.00±0.40	11.02±0.21	10.20±0.58	10.51±0.20	10.24±0.30	10.84±0.49	ÖD
VLDL (mg/dL)	8.65±0.38	9.96±0.98	8.68±0.13	8.40±0.38	9.08±0.63	9.32±0.24	ÖD
Total Kolesterol (mg/dL)	35.02±0.56	36.96±1.16	35.59±0.66	35.37±0.44	35.10±0.96	36.18±0.45	ÖD
Trigliserit (mg/dL)	9.32±1.93	49.83±4.93	43.40±0.68	42.00±1.89	45.40±3.18	46.60±1.20	ÖD
AST (U/L)	209.75±25.26 ^b	266.33±13.02 ^a	216.00±12.08 ^b	211.40±4.77 ^b	238.60±11.26 ^{ab}	225.60±8.56 ^b	*
ALT (U/L)	71.50±1.84 ^c	88.16±2.65 ^a	72.60±2.15 ^{bc}	73.00±2.72 ^{bc}	80.00±3.57 ^b	78.60±1.07 ^{bc}	**
Total Protein (g/dL)	5.18±0.12	5.29±0.09	5.19±0.08	5.22±0.09	5.28±0.11	5.25±0.14	ÖD
Albümin (g/dL)	3.30±0.10	3.58±0.05	3.36±0.20	3.34±0.07	3.48±0.13	3.53±0.13	ÖD
Kreatinin (mg/dL)	0.28±0.01	0.27±0.02	0.28±0.01	0.31±0.01	0.24±0.06	0.27±0.02	ÖD
Globulin (g/dL)	1.88±0.13	1.71±0.08	1.82±0.20	1.88±0.08	1.80±0.21	1.71±0.18	ÖD
BUN (mg/dL)	55.25±0.94	59.50±1.23	55.80±1.93	55.90±1.14	57.00±1.14	56.10±1.70	ÖD

ÖD: İstatistiki olarak önemli değil. *: p<0.05. **: p<0.01; ^{ab}: Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler birbirinden farklı bulunmuştur.

3.5. Grupların Böbrek ve Karaciğer Dokularındaki MDA Düzeyleri ile GSH, SOD ve CAT Aktiviteleri

Araştırma gruplarının karaciğer (Tablo 4) ve böbrek (Tablo 5) dokularındaki MDA düzeyi ile GSH, SOD ve CAT aktiviteleri aşağıda verimiştir. Veriler incelendiğinde (Tablo 4 ve Tablo 5), her iki dokunun Cu grubundaki MDA düzeylerinin diğer gruplardan önemli derecede yüksek olduğu ve Cu+Krisin ile Cu+Flunixin grublarında krisin ve Flunixin'in benzer şekilde önemli derecede iyileştirici etki gösterdiği belirlendi ($p<0.001$).

Tablo 4: Deneme gruplarının karaciğer dokusundaki MDA ($\mu\text{g/ml}$ homojenat) düzeyleri ile GSH (nmol/mg protein) SOD (U/ml) ve CAT (k/g protein) aktiviteleri

		Kontrol	Cu	FM	Krisin	Cu+FM	Cu+Krisin	P
Karaciğer	MDA	2.42 $\pm$ 0.13 ^c	3.84 $\pm$ 0.16 ^a	2.23 $\pm$ 0.16 ^c	2.15 $\pm$ 0.21 ^c	2.94 $\pm$ 0.14 ^b	3.05 $\pm$ 0.19 ^b	***
	GSH	19.07 $\pm$ 0.57 ^a	9.80 $\pm$ 0.75 ^c	18.45 $\pm$ 1.85 ^a	17.82 $\pm$ 1.32 ^a	14.48 $\pm$ 1.13 ^b	13.90 $\pm$ 0.97 ^b	***
	SOD	0.24 $\pm$ 0.01 ^a	0.16 $\pm$ 0.01 ^c	0.27 $\pm$ 0.02 ^a	0.26 $\pm$ 0.02 ^a	0.19 $\pm$ 0.01 ^{bc}	0.20 $\pm$ 0.01 ^{ab}	***
	CAT	0.77 $\pm$ 0.02 ^a	0.18 $\pm$ 0.01 ^d	0.73 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.70 $\pm$ 0.03 ^b	0.30 $\pm$ 0.01 ^c	0.27 $\pm$ 0.01 ^c	***

^{abcd}: Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler birbirinden farklı bulunmuştur. ***: $P<0.001$

Tablo 5: Deneme gruplarının böbrek dokusundaki MDA ($\mu\text{g/ml}$ homojenat) düzeyleri ile GSH (nmol/mg protein). SOD (U/ml) ve CAT (k/g protein) aktiviteleri

		Kontrol	Cu	FM	Krisin	Cu+FM	Cu+Krisin	P
Böbrek	MDA	6.06 $\pm$ 0.31 ^c	11.23 $\pm$ 0.27 ^a	6.71 $\pm$ 0.44 ^c	6.69 $\pm$ 0.44 ^c	8.51 $\pm$ 0.20 ^b	8.64 $\pm$ 0.26 ^b	***
	GSH	25.48 $\pm$ 2.39 ^a	14.84 $\pm$ 0.86 ^c	22.13 $\pm$ 1.59 ^{ab}	22.36 $\pm$ 1.79 ^{ab}	17.62 $\pm$ 1.48 ^{bc}	15.39 $\pm$ 1.91 ^c	**
	SOD	0.27 $\pm$ 0.03 ^a	0.10 $\pm$ 0.01 ^c	0.25 $\pm$ 0.01 ^a	0.23 $\pm$ 0.01 ^a	0.17 $\pm$ 0.02 ^b	0.16 $\pm$ 0.02 ^b	***
	CAT	0.68 $\pm$ 0.01 ^a	0.14 $\pm$ 0.01 ^c	0.62 $\pm$ 0.01 ^a	0.65 $\pm$ 0.03 ^a	0.30 $\pm$ 0.01 ^b	0.25 $\pm$ 0.01 ^b	***

^{abc}: Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler birbirinden farklı bulunmuştur. **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$

Karaciğer GSH ve böbrek SOD ve CAT aktiviteleri kontrol, Fluniksin ve krisin gruplarında birbirine benzer olarak en yüksek, Cu+Flu ve Cu+Krisin gruplarında ise yine birbirine benzer olarak Cu grubundan önemli derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$). Karaciğer SOD aktivitesi Cu+Krisin grubunda Cu+Flu grubundan ($p<0.001$), böbrek GSH aktivitesinde ise Cu+Flu grubunda Cu+Krisin grubundan ($p<0.01$) önemli derecede daha iyi iyileştirici etki gösterdiği tespit edildi. Karaciğer CAT Aktivitesinde yine Cu+Flu ve Cu+Krisin gruplarında benzer şekilde iyileştirici etki görüldü ($p<0.001$).

3.6. Grupların Plazma TNF- α Düzeyleri

Grupların plazma TNF- α düzeyleri incelendiğinde (Tablo 6), TNF- α düzeyinin Kontrol, Fluniksin ve Krisin gruplarında benzer şekilde en düşük, Cu grubundaki ise diğer gruplardan önemli derecede yüksek olduğu ve Cu+Krisin ile Cu+Fluniksin grubuplarında krisin ve fluniksin'in benzer şekilde önemli derecede iyileştirici etki gösterdiği belirlendi ($p<0.001$).

Tablo 6: Deneme gruplarının plazma TNF- α (pg/ml) düzeyleri

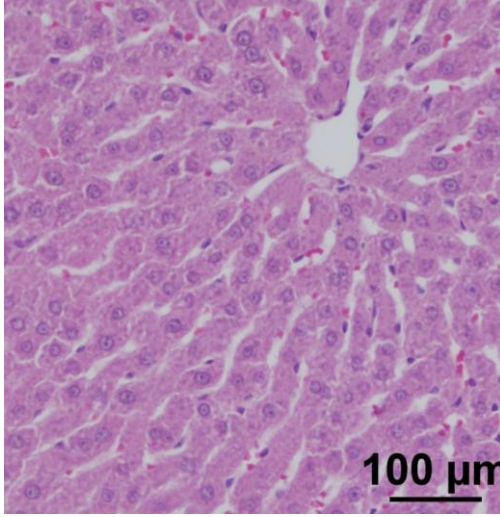
	Kontrol	Cu	FM	Krisin	Cu+FM	Cu+Krisin	P
TNF- α	106.22 $\pm$ 2.65 ^c	164.32 $\pm$ 5.26 ^a	114.43 $\pm$ 3.32 ^c	114.44 $\pm$ 3.08 ^c	129.62 $\pm$ 3.38 ^b	131.25 $\pm$ 2.49 ^b	***

^{abc}: Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler birbirinden farklı bulunmuştur. ***: $P<0.001$

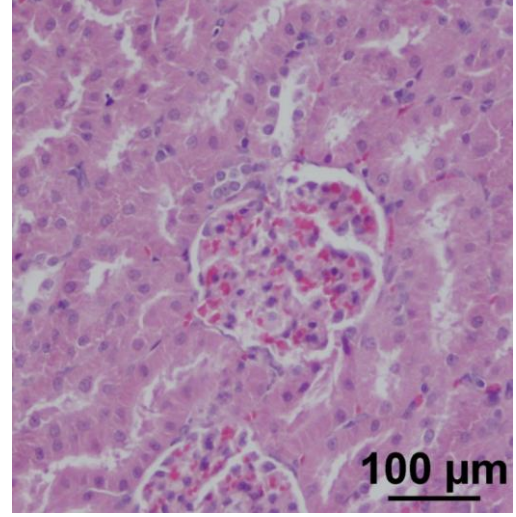
3.7. Grupların Işık Mikroskopik Bulguları

3.7.1. Kontrol Grubu

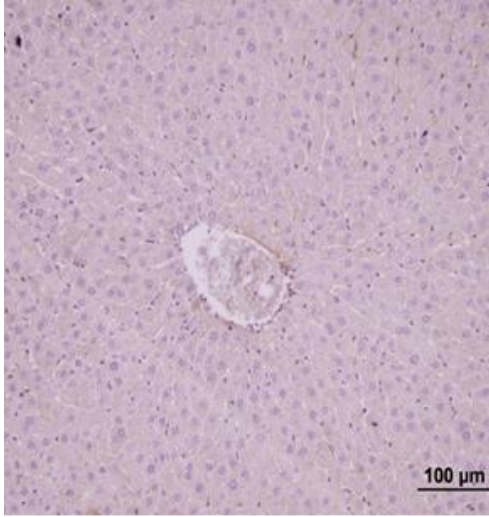
Karaciğer ve böbrek dokularının yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde normal bir morfolojiye sahip oldukları görüldü (Şekil 1, 2). Kaspaz metodu ile boyanan karaciğer ve böbrek kesitleri incelendiğinde ise herhangi bir pozitif boyanmaya rastlanmadı (Şekil 3, 4).



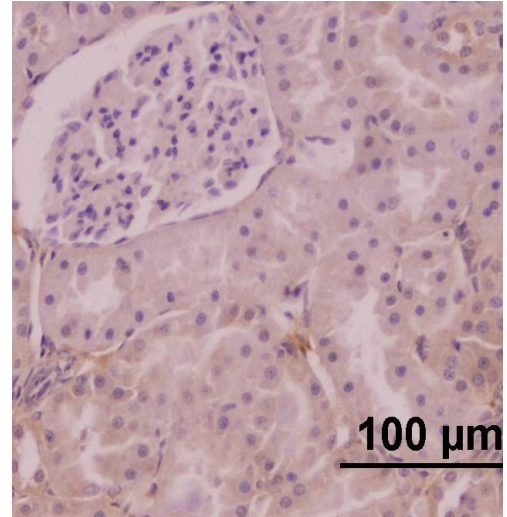
Şekil 1: Kontrol grubu normal karaciğer görünümü, H&E.



Şekil 2: Kontrol grubu normal böbrek görünümü, H&E.



Şekil 3: Kontrol grubu normal karaciğer görünümü, Kaspaz.



Şekil 4: Kontrol grubu normal böbrek görünümü, Kaspaz.

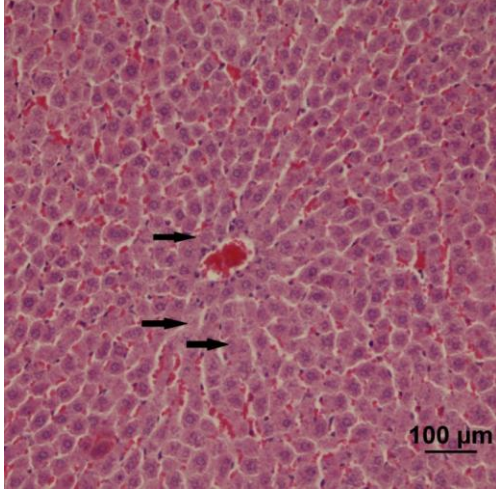
3.7.2. Bakır Grubu

Karaciğerde mikroskopik olarak ilk dikkat çekici bulgu şiddetli sentrilobüler hepatosellüler dejenerasyon ve nekroz idi (Şekil 5). Karyolitik çekirdekli fokal nekroz alanlarının yanı sıra bazı hepatositlerde karyomegali göze çarptı (Şekil 6). Çift çekirdekli hepatosit formasyonları ile mitotik aktivitenin varlığı belirlenirken Kupffer hücrelerinde de proliferasyon dikkati çekti (Şekil 7, 8).

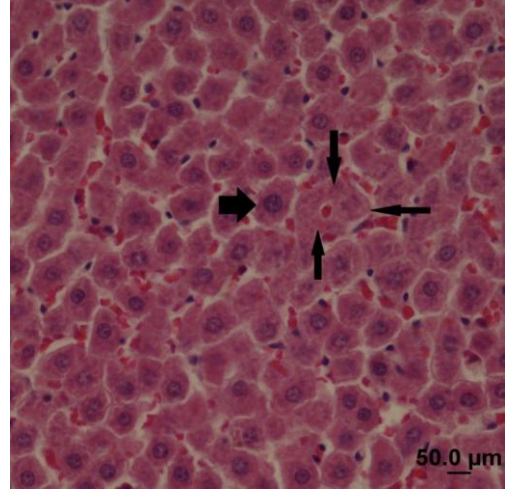
Sinuzoidlerde vazokonjesyon ve dilatasyon görülürken (Şekil 9, 10) periportal bölgelerde de mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonları gözlemlendi (Şekil 11). Bazı sentral venlerin çevresinde vakuolizasyonla birlikte yağ dejenerasyonu ve nekroz tespit edildi (Şekil 12). Ayrıca bazı sentral venlerde hiperemi ile beraber dilatasyon belirlenirken (Şekil 13) bazılarında da hiyalin kalıntısı mevcut idi (Şekil 14). Bazı hepatik kord alanlarında disorganizasyon görülürken bazı bölgelerde de hegzagonal karaciğer lobüllerinin kısmi yokluğu gözlemlendi. Ayrıca bazı portal alanlarda safra kanalı proliferasyonu tespit edildi (Şekil 15).

Böbreklerin ışık mikroskopik incelemesinde korteks bölgesinde bulunan tubuluslardan çoğunlukla proksimal ve daha az olarak distal tubulusların şiddetli dejenerasyonu ve nekroz dikkati çekti (Şekil 16). Proksimal tubulusların epitel hücrelerinde şişme, karyomegali ve karyolizis görüldü (Şekil 17). Bazı proksimal tubuluslarda konjesyonun yanı sıra bazılarının lümeninde epitelyal hücre deskuamasyonu ve hiyalin silindirlerine rastlandı (Şekil 18, 19). Kortekste bulunan bazı glomeruluslarda ise büzüşme ile birlikte konjesyonun varolduğu görülürken bazal membranın da kalınlaştığı göze çarptı. Bowman kapsülünde ise dilatasyon ve dejenerasyon tespit edildi (Şekil 20). Korteksin intersitisyel dokusundaki kan damarlarında ise konjesyon ve fokal mononükleer hücre infiltrasyonları gözlemlendi (Şekil 21, 22).

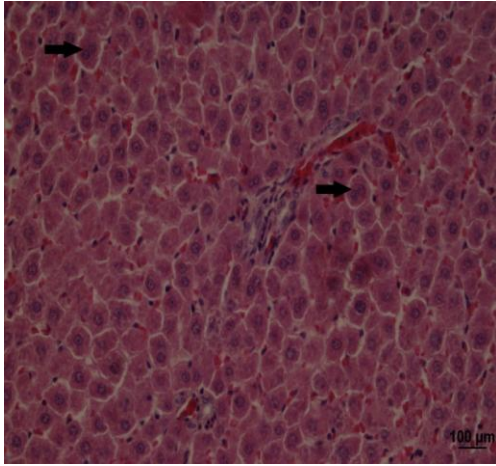
Kaspaz metodu ile boyanan karaciğer dokularında hepatositlerde, böbrek dokularında ise çoğunlukla proksimal ve daha az olarak da distal tubuluslarda kontrol grubuna göre şiddetli derecede pozitif reaksiyon gösteren apoptotik hücrelere rastlandı (Şekil 23, 24, 25, 26). Pozitif boyanmanın hem çekirdek hem de sitoplazmada olduğu görüldü.



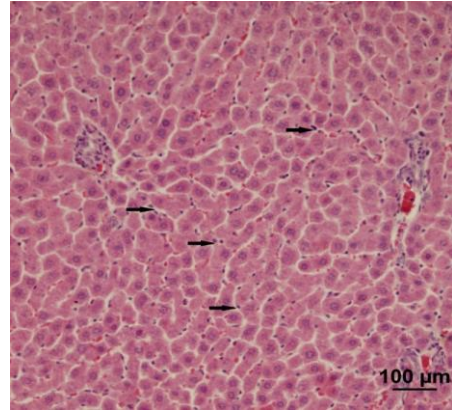
Şekil 4: Bakır grubu karaciğerde sentrilobüler hepatosellüler dejenerasyon ve nekrotik hücreler (oklar), H&E.



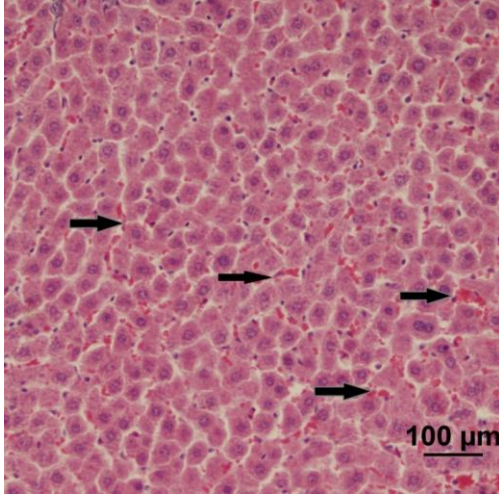
Şekil 5: Bakır grubu karaciğerde hepatositte karyomegali (kalın ok) ve karyolitik çekirdekli fokal nekroz alanları (ince oklar), H&E.



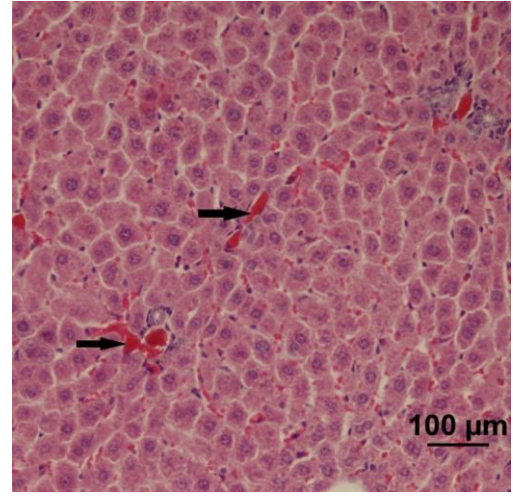
Şekil 6: Bakır grubu karaciğerde çift çekirdekli hepatositler (oklar), H&E.



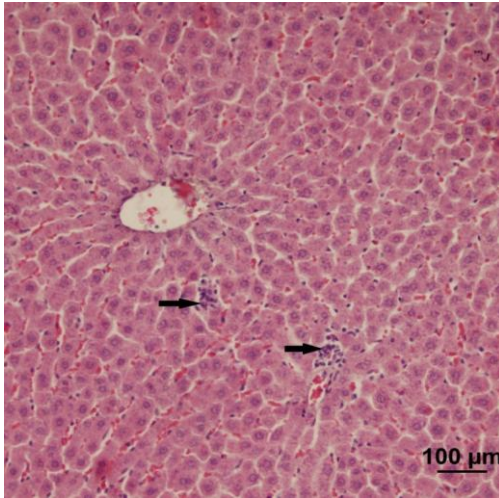
Şekil 7: Bakır grubu karaciğerde Kupffer hücrelerinde proliferasyon (oklar), H&E.



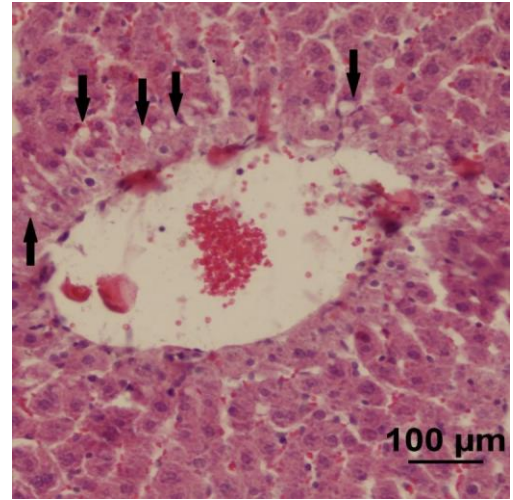
Şekil 8: Bakır grubu karaciğerde sinuzoidlerde vazokonjesyon ve dilatasyon (oklar), H&E.



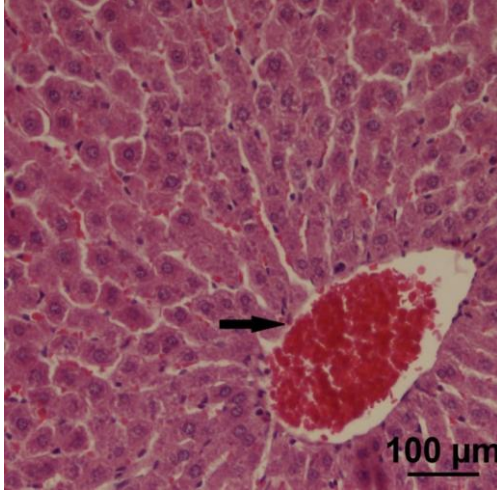
Şekil 9: Bakır grubu karaciğerde sinuzoidlerde vazokonjesyon ve dilatasyon (oklar), H&E.



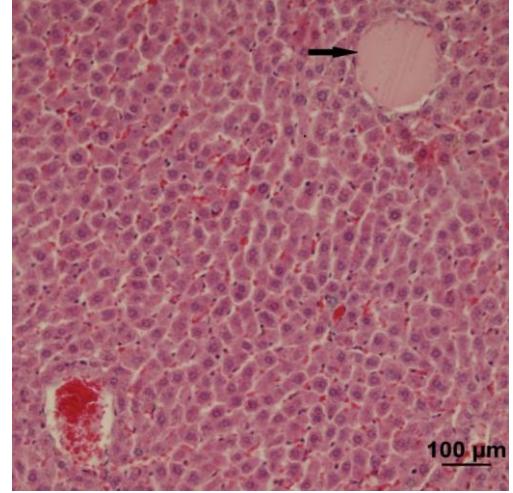
Şekil 10: Bakır grubu karaciğerde periportal bölgelerde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonları (oklar), H&E.



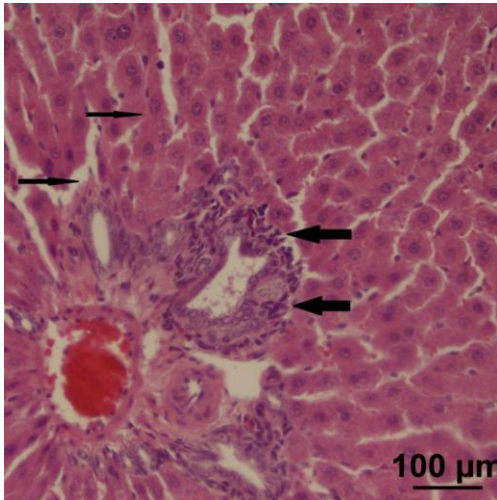
Şekil 11: Bakır grubu karaciğerde Vena Sentralis çevresinde vakuolizasyonla birlikte yağ dejenerasyonu ve nekroz (oklar), H&E.



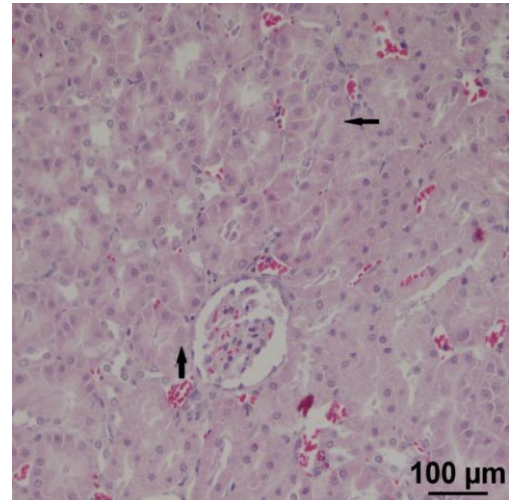
Şekil 12: Bakır grubu karaciğerde Vena Sentralis'te hiperemi ile beraber dilatasyon (oklar), H&E.



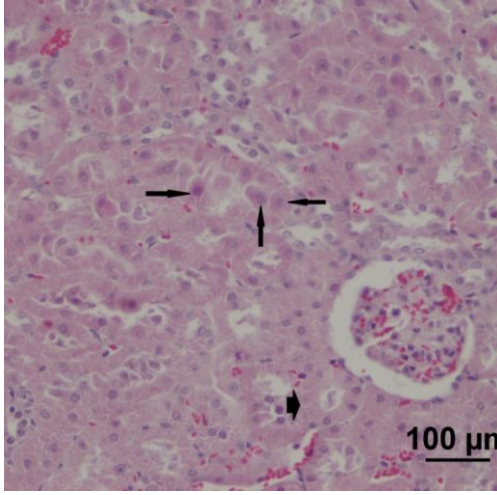
Şekil 13: Bakır grubu karaciğerde Vena Sentralis'te hiyalin kalıntısı (ok), H&E.



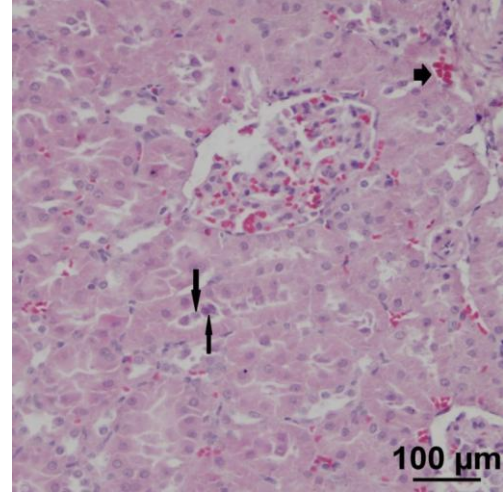
Şekil 14: Bakır grubu karaciğerde hepatik kord alanlarında disorganizasyon (ince oklar) ve portal bölgede safra kanalında proliferasyon (kalın oklar), H&E.



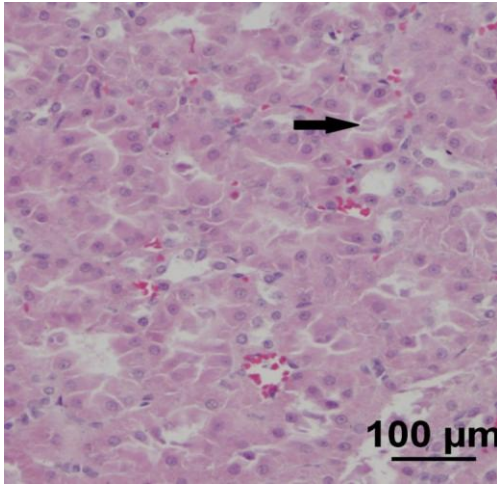
Şekil 15: Bakır grubu böbrek korteksinde tubulusların dejenerasyonu ve nekrotik hücreler (oklar), H&E.



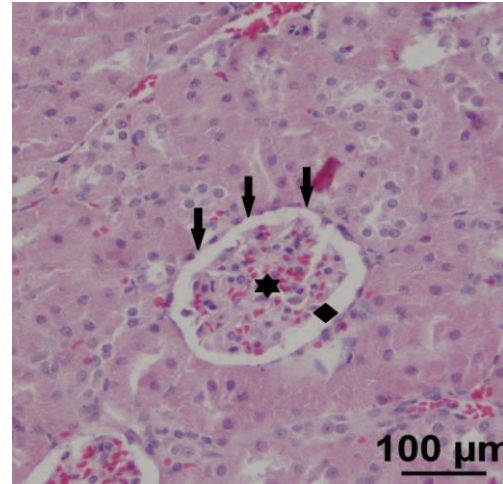
Şekil 16: Bakır grubu böbrek korteksinde proksimal tubulusların epitel hücrelerinde şişme, karyomegali (uzun oklar) ve karyolizis (kısa ok), H&E.



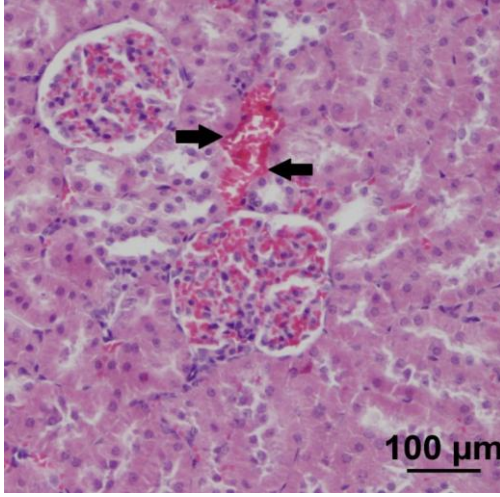
Şekil 17: Bakır grubu böbrek korteksinde proksimal tubuluslarda konjesyon (kısa ok) ve epitelyal hücre deskuamasyonu (uzun oklar), H&E.



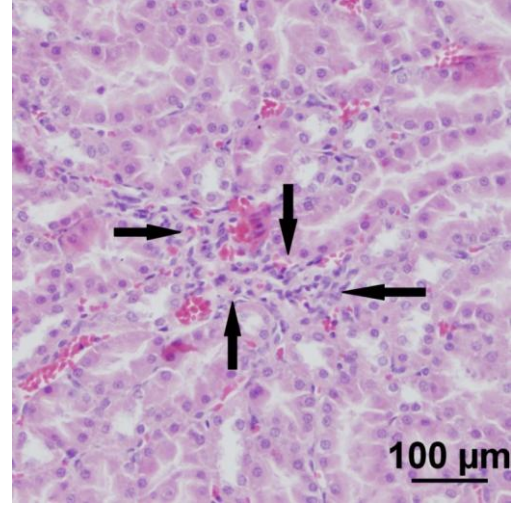
Şekil 18: Bakır grubu böbrek korteksinde proksimal tubulusta hiyalin silindirleri (ok), H&E.



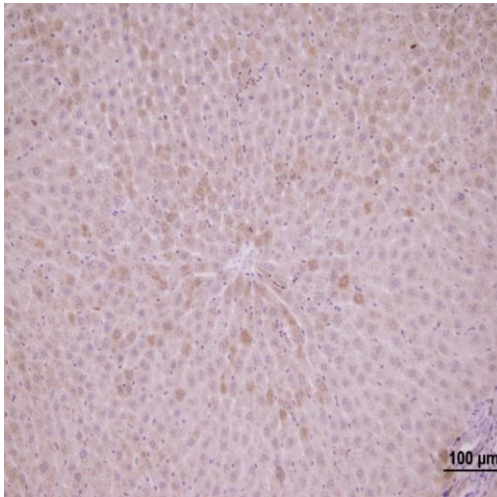
Şekil 19: Bakır grubu böbrek korteksindeki glomerulusta büzüşme ile birlikte konjesyon (yıldız), bazal membranda kalınlaşma (oklar), Bowman kapsülünde dilatasyon ve dejenerasyon (kare), H&E.



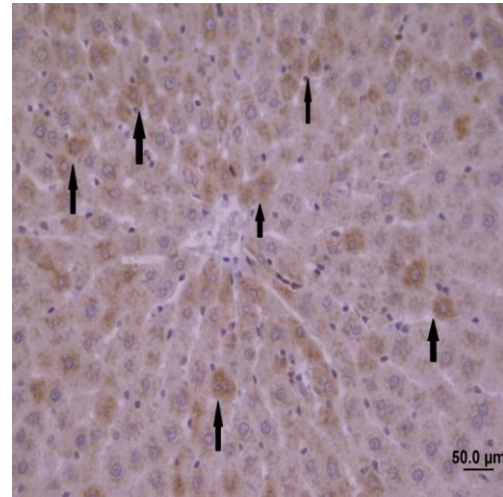
Şekil 20: Bakır grubu böbrek korteksinin intersitisyel dokusundaki kan damarlarında konjesyon (oklar), H&E.



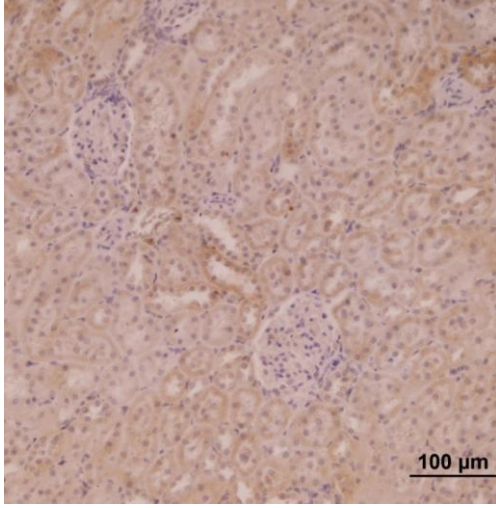
Şekil 21: Bakır grubu böbrek korteksinde fokal mononükleer hücre infiltrasyonları (oklar), H&E.



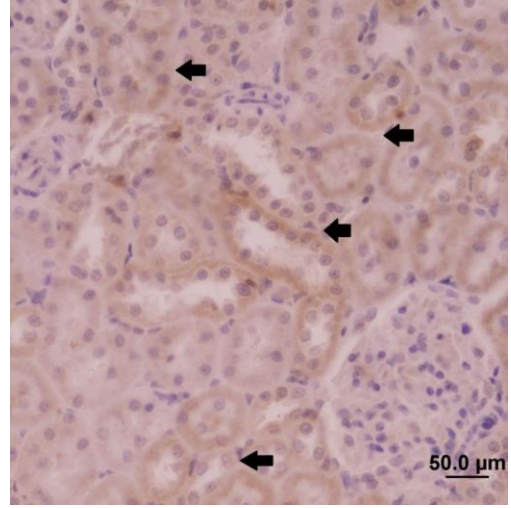
Şekil 22: Bakır grubu karaciğerde hepatositlerde aktif kaspaz-3 pozitif reaksiyon, Kaspaz.



Şekil 23: Bakır grubu karaciğerde hepatositlerde aktif kaspaz-3 reaksiyonu (oklar), Kaspaz.



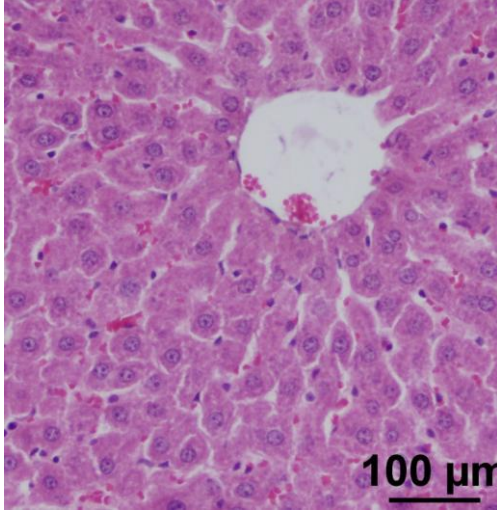
Şekil 24: Bakır grubu böbrek korteksinde tubulus epitellerinde aktif kaspaz-3 reaksiyon, Kaspaz.



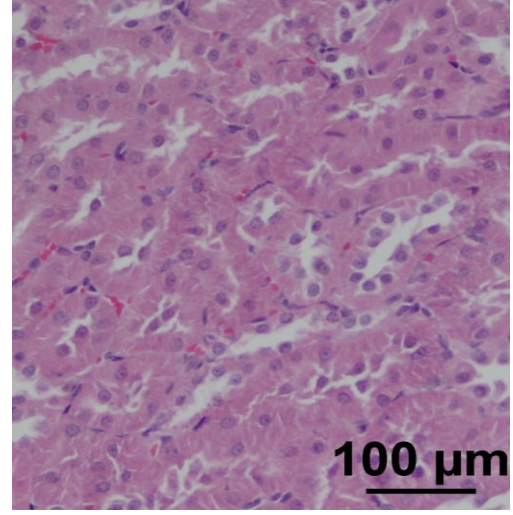
Şekil 25: Bakır grubu böbrek korteksinde tubulus epitellerinde aktif kaspaz-3 reaksiyonu (oklar), Kaspaz.

3.7.3. Fluniksin Meglumin Grubu

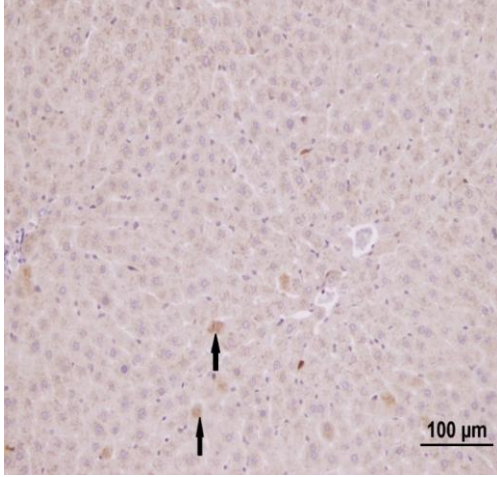
Karaciğer ve böbreklerin mikroskopik değerlendirmeleri sonucunda kontrol grubuna benzer şekilde, normal histolojik görünümünü korudukları tespit edildi (Şekil 27, 28). Her iki dokuya ait kesitler incelendiğinde kaspaz pozitif olmayan zayıf boyanmaya rastlandı (Şekil 29, 30).



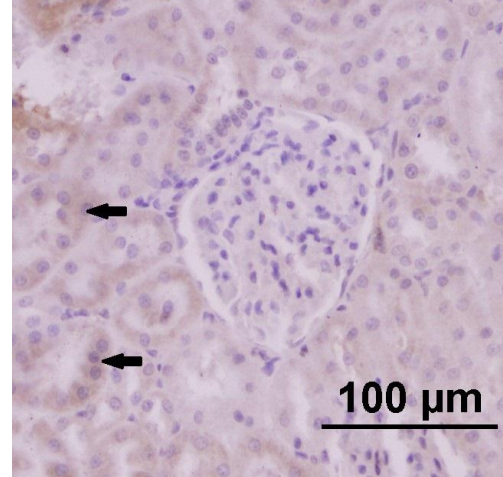
Şekil 26: FM grubu normal karaciğer görünümü, H&E.



Şekil 27: FM grubu normal böbrek görünümü, H&E.



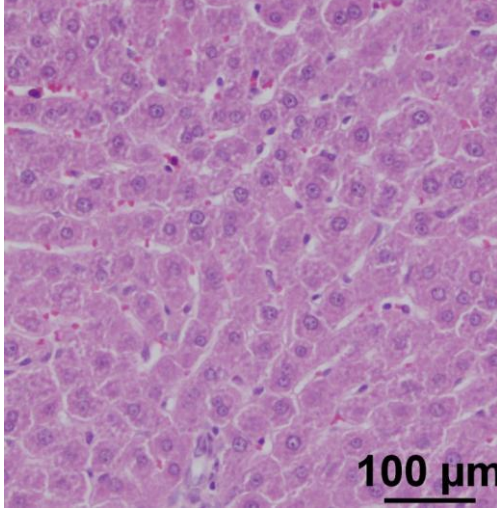
Şekil 28: FM grubu karaciğerde çok az sayıda hepatositte pozitif olmayan aktif kaspaz-3 reaksiyonu (oklar), Kaspaz.



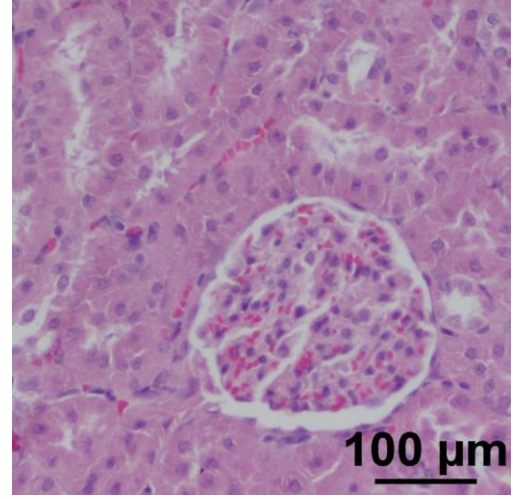
Şekil 29: FM grubu böbrek korteksindeki çok az sayıda tubulusta pozitif olmayan aktif kaspaz-3 reaksiyonu (oklar), Kaspaz.

3.7.4. Krisin Grubu

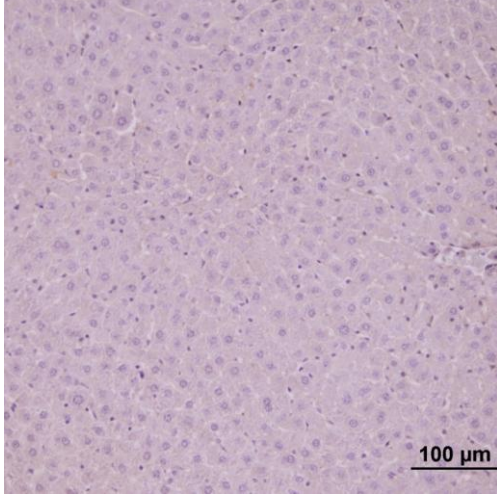
Krisin verilen bu gruba ait karaciğer ve böbrek dokularının mikroskopik olarak kontrol grubu ile aynı morfolojik görünümü sergiledikleri gözlemlendi (Şekil 31, 32). Kaspaz metodu ile boyanan doku kesitleri incelendiğinde ise herhangi bir pozitif boyanmaya rastlanmadı (Şekil 33, 34).



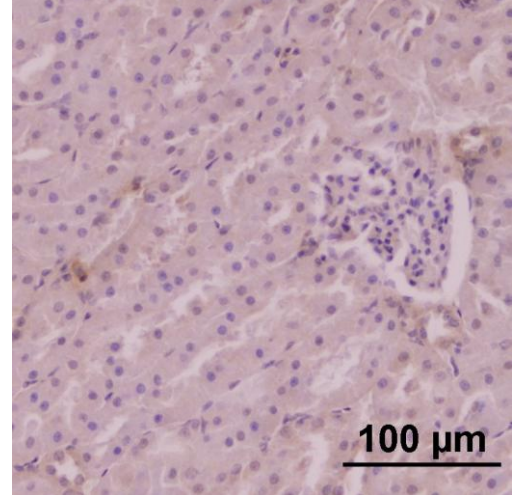
Şekil 30: Krisin grubu normal karaciğer görünümü, H&E.



Şekil 31: Krisin grubu normal böbrek görünümü, H&E.



Şekil 32: Krisin grubu normal karaciğer görünümü, Kaspaz.



Şekil 33: Krisin grubu normal böbrek görünümü, Kaspaz.

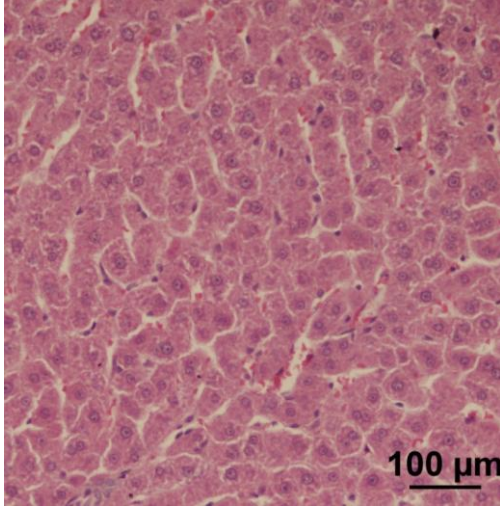
3.7.5. Bakır-Fluniksin Meglümin Grubu

Bakır ile oluşturulan hasara karşı Fluniksin Meglümin uygulanan bu grup karaciğerlerin ışık mikroskopik incelemesinde; bakır grubuna ait karaciğerlerdeki yoğun dejeneratif, nekrotik ve infiltratif değişimlerin yerini hafif şiddette değişikliklerin aldığı saptandı (Şekil 35). Karyolitik çekirdekli fokal nekroz alanları yer yer görülürken birçok hepatositte karyomegalide artış dikkati çekti

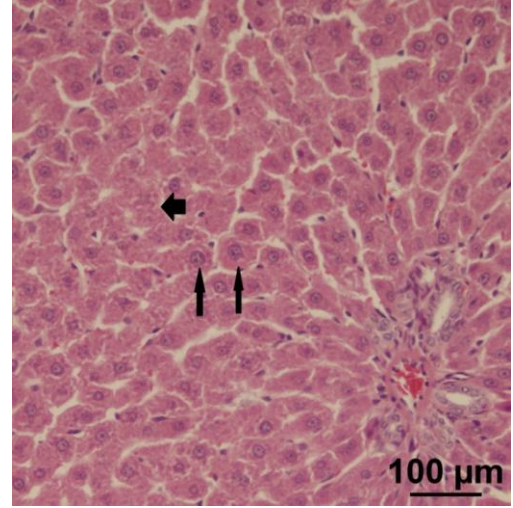
(Şekil 36). Bu grupta, bakır grubuna kıyasla artmış olan çift çekirdekli hepatosit formasyonları ile mitotik aktiviteye bağlı rejeneratif değişimler gözlendi (Şekil 37). Bakır grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta; sinuzoidlerdeki vazokonjesyon ile dilatasyonun, sentral venlerdeki hiperemi ile dilatasyonun (Şekil 38) ve bazı hepatik kord alanlarındaki disorganizasyonun da hafiflediği göze çarptı (Şekil 39).

Böbreklerin ışık mikroskopik değerlendirmesinde, korteks bölgesinde bulunan tubulusların hafif şiddette dejenerasyon ve nekrozu dikkati çekti. Bakır grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta; proksimal tubuluslarda gözlenen karyomegali, karyolizis, konjesyon, intraluminal hücre deskuamasyonu ve hiyalin oluşumlarının azaldığı tespit edildi (Şekil 40). Bakır grubundaki glomeruluslarda görülen büzüşme ve konjesyonun bu grupta hafiflediği görülürken bazal membranların da normal görünümde oldukları saptandı (Şekil 41). Korteksin intersitisyel dokusundaki kan damarlarında bulunan konjesyon ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının ise azaldığı gözlendi (Şekil 42).

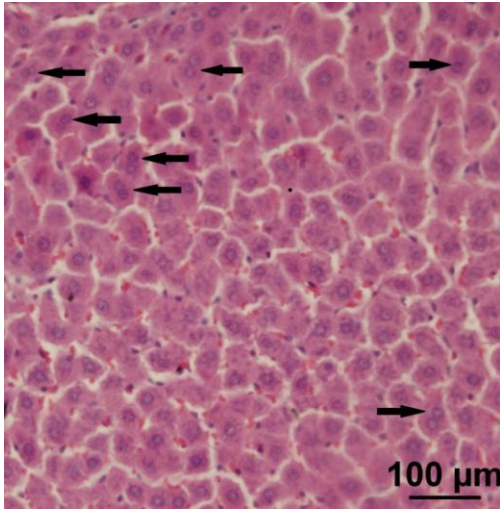
Karaciğer ve böbrek kesitleri immunohistokimyasal açıdan değerlendirildiğinde, kaspaz metodu ile pozitif boyanma gösteren apoptotik hücre yoğunluğunun orta derecede olduğu ve bakır grubuna kıyasla azaldığı görüldü. İmmunoreaktivite gösteren bu hücreler karaciğerde sentrilobuler bölgedeki hepatositler ile böbrekte korteks bölgesindeki proksimal ve distal tubuluslar idi (Şekil 43, 44, 45, 46).



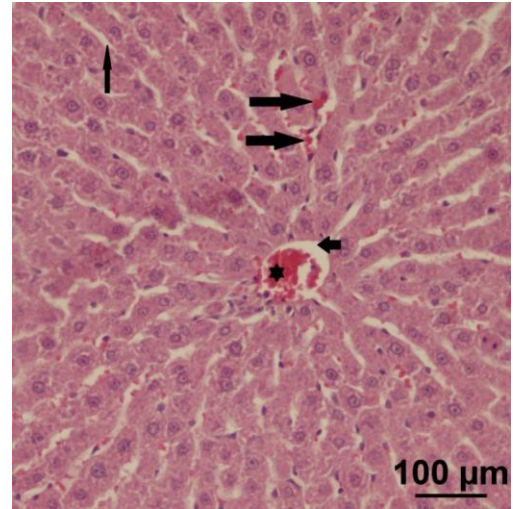
Şekil 34: Bakır-FM grubu karaciğerde hafif derecede dejeneratif, nekrotik ve infiltratif değişiklikler, H&E.



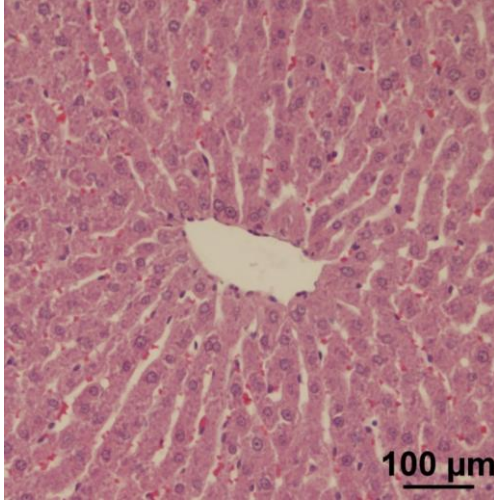
Şekil 35: Bakır-FM grubu karaciğerde hepatositlerde karyomegali (uzun oklar) ve karyolitik çekirdekli fokal nekroz alanları (kısa ok), H&E.



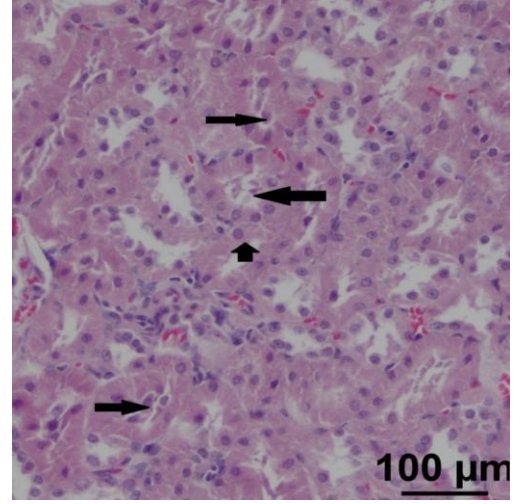
Şekil 36: Bakır-FM grubu karaciğerde çok sayıda çift çekirdekli hepatosit (oklar), H&E.



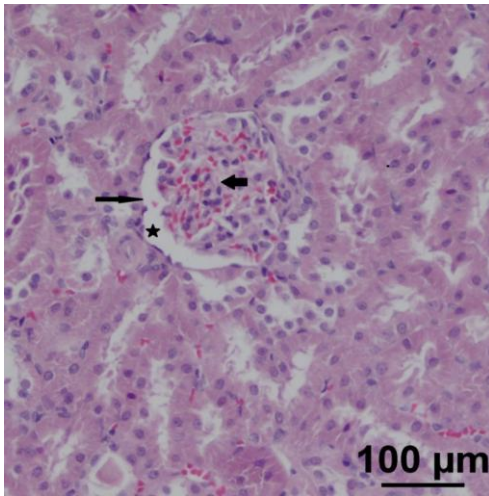
Şekil 37: Bakır-FM grubu karaciğerde sinuzoidlerde hafif vazokonjesyon (kalın oklar) ve dilatasyon (uzun ok), Vena Senralis'te hafif hiperemi (yıldız) ve dilatasyon (kısa ok), H&E.



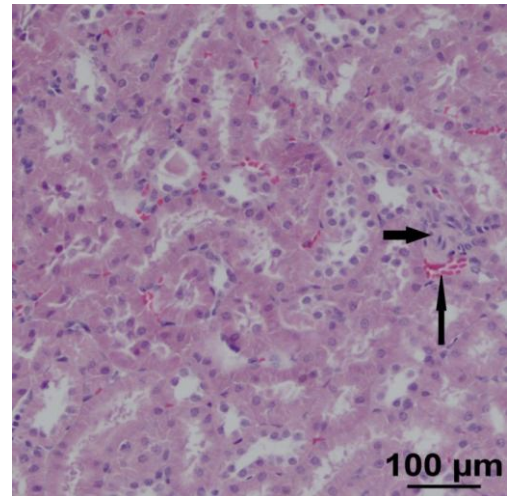
Şekil 38: Bakır-FM grubu karaciğerde hepatik kord alanlarında hafiflemiş disorganizasyon, H&E.



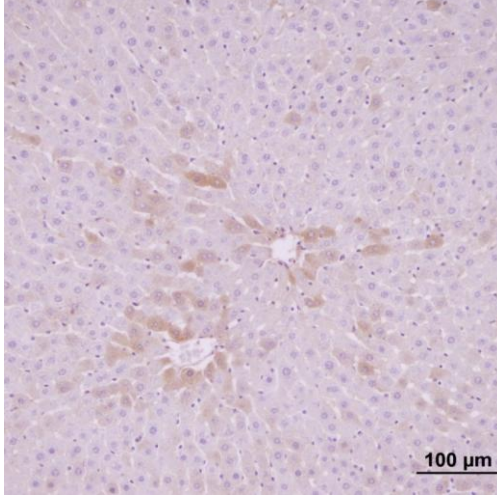
Şekil 39: Bakır-FM grubu böbrek korteksindeki proksimal tubulus epitel hücresinde karyomegali (kısa ok) ile proksimal tubulusların lümeninde epitelyal hücre deskuamasyonu (uzun ok) ve hiyalin oluşumları (kalın ok) H&E.



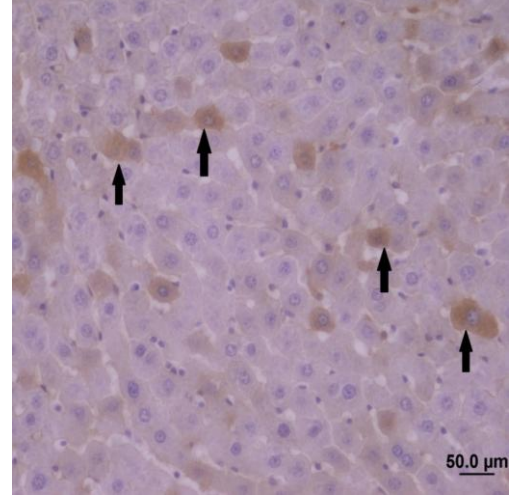
Şekil 40: Bakır-FM grubu böbrek korteksindeki glomeruluslarda hafif derecede büzüşme ve konjesyon (kısa ok), Bowman kapsülünde hafif dilatasyon (yıldız) ve bazal membranda normal görünüm (uzun ok), H&E.



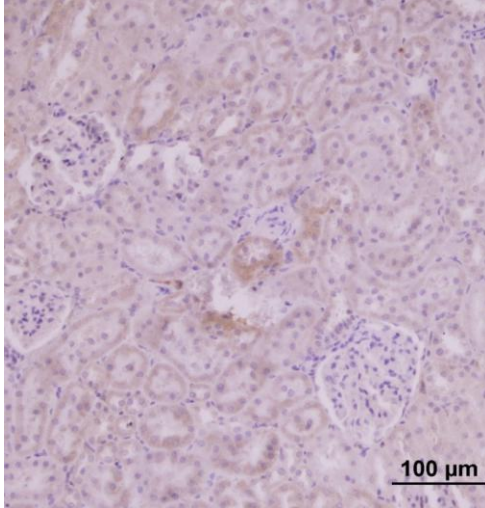
Şekil 41: Bakır-FM grubu böbrek korteksinin intersitisyel dokusundaki kan damarlarında hafif konjesyon (uzun ok) ve mononükleer hücre infiltrasyonu, H&E.



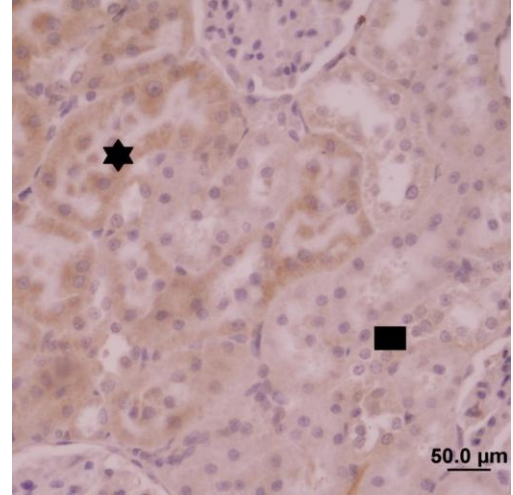
Şekil 42: Bakır-FM grubu karaciğerde bazı hepatositlerde aktif kaspaz-3 pozitif reaksiyon, Kaspaz.



Şekil 43: Bakır-FM grubu karaciğerde birkaç hepatositte aktif kaspaz-3 pozitif reaksiyonu (oklar), Kaspaz.



Şekil 44: Bakır-FM grubu böbrek korteksinde bazı tubulus epitellerinde aktif kaspaz-3 reaksiyon, Kaspaz.



Şekil 45: Bakır-FM grubu böbrek korteksinde birkaç tubulus epiteline aktif kaspaz-3 reaksiyonu (yıldız) ve pozitif aktif kaspaz- 3 reaksiyonu vermeyen birçok tubulus (kare), Kaspaz.

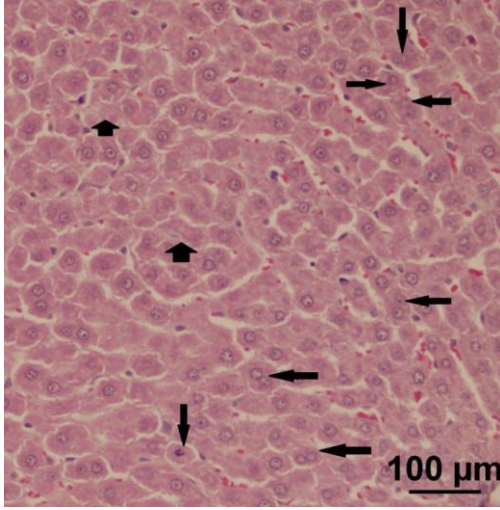
3.7.6. Bakır-Krisin Grubu

Bakır ile oluşturulan hasara karşı Krisin uygulanan bu grup karaciğerlerin mikroskopik değerlendirmesinde; bakır grubuna ait karaciğerlerdeki şiddetli

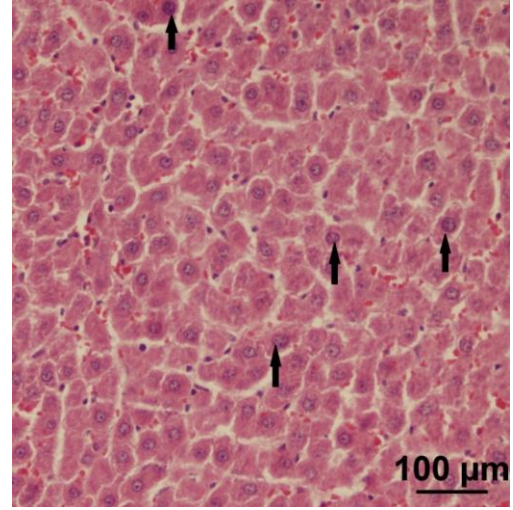
patolojik değişimlerin yerine rejeneratif değişikliklerin ön planda olduğu tespit edildi. Bazı bölgelerde hafif derecede dejeneratif ve nekrotik değişiklikler gözlenirken bazı bölgelerde ise yoğun mitotik aktivitelere rastlandı (Şekil 47). Bakır grubuna kıyasla hepatositlerdeki karyomegalinin arttığı dikkati çekerken, sinuzoidlerdeki vazokonjesyon ile dilatasyonun ise azaldığı saptandı (Şekil 48). Yine bakır grubu karaciğerlerin hepatik kord alanlarında gözlenen disorganizasyon ve sentral venlerdeki hiperemi ile dilatasyonun da bu grupta kısmen düzeldiğı göze çarptı (Şekil 49).

Bakır grubuna oranla bu grup böbreklerde; dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin hafiflediğı, infiltratif değişimlerin ise görülmediğı tespit edildi. Korteks bölgesinde bulunan proksimal ve distal tubuluslarda birkaç nekrotik hücreye rastlandı (Şekil 50). Proksimal tubuluslarda gözlenen karyomegali, konjesyon, intraluminal hücre deskuamasyonu ve hiyalin silindirlerinin hafiflediğı tespit edildi (Şekil 51). Bakır grubundaki glomeruluslarda görülen büzüşme ve konjesyonun bu grupta görülmediğı bazal membranların da normal görünümde oldukları saptandı (Şekil 52).

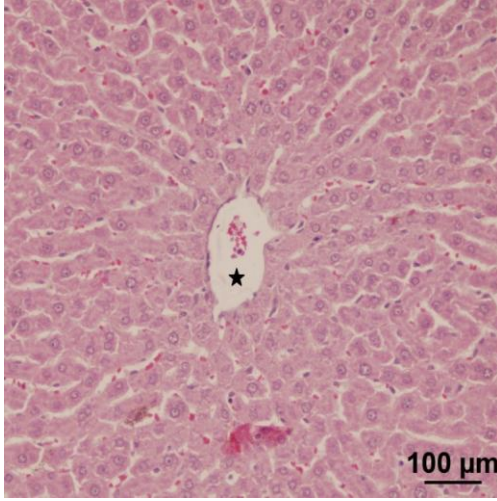
Karaciğer ve böbrek kesitlerindeki pozitif kaspaz immunoreaktivite yoğunluğunun orta derecede olduğı ve bakır grubuna kıyasla azaldığı tespit edildi. Spesifik boyanma gösteren bu hücrelerin karaciğerdeki hepatositler ile böbrek korteksindeki tubuluslar olduğı görüldü (Şekil 53, 54, 55, 56).



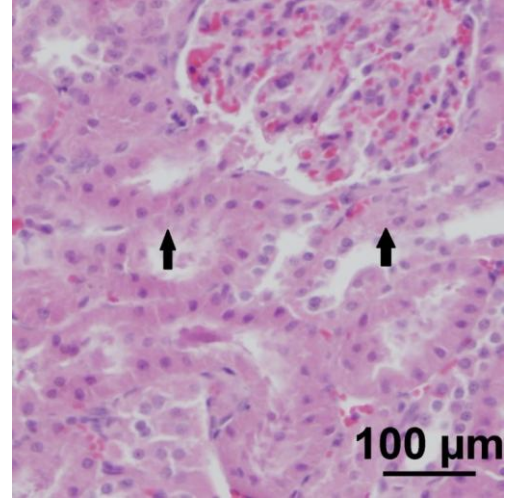
Şekil 46: Bakır-Krisin grubu karaciğerde çok sayıda çift çekirdekli hepatosit ile mitotik figürlü hepatosit (uzun oklar) ve karyolitik çekirdekli birkaç nekrotik hepatosit (kısa oklar), H&E.



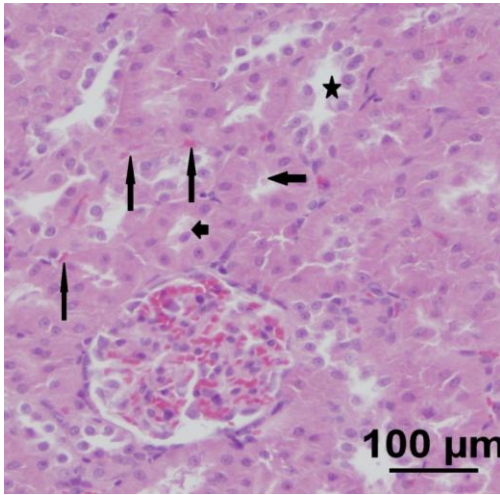
Şekil 47: Bakır-Krisin grubu karaciğerde birçok hepatositte karyomegali (oklar) sinuzoidlerde hafif derecede vazokonjesyon ve dilatasyon, H&E.



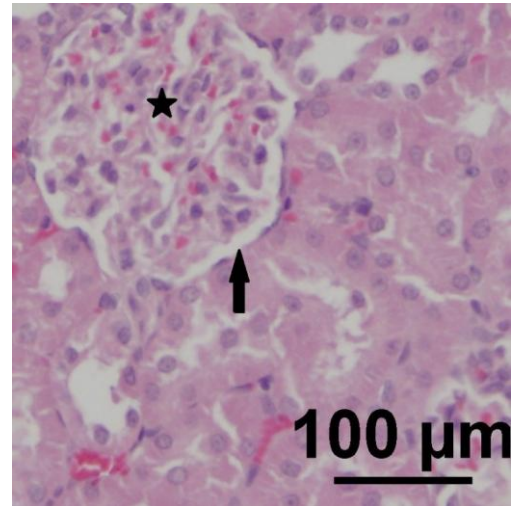
Şekil 48: Bakır-Krisin grubu karaciğerde hepatik kord alanlarında hafiflemiş disorganizasyon ve Vena Sentralis'te hafif hiperemi ile dilatasyon (yıldız), H&E.



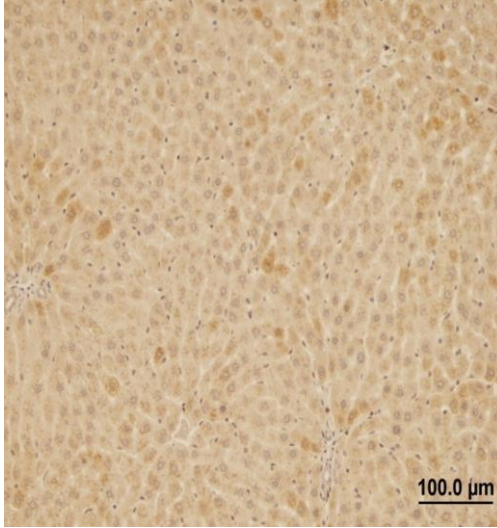
Şekil 49: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde proksimal ve distal tubulusta birkaç nekrotik hücre (oklar), H&E.



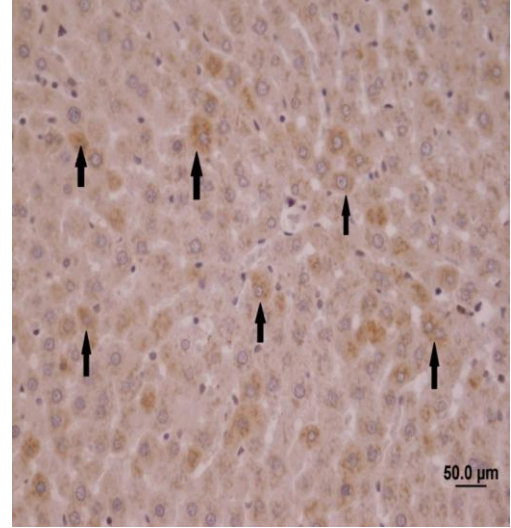
Şekil 50: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde proksimal tubulusta hafif konjesyon (uzun oklar), proksimal tubulus epitel hücrelerinde karyomegali (yıldız) ve intraluminal epitelyal hücre deskuamasyonu (kısa ok) ve hiyalin silindirleri (kalın ok), H&E.



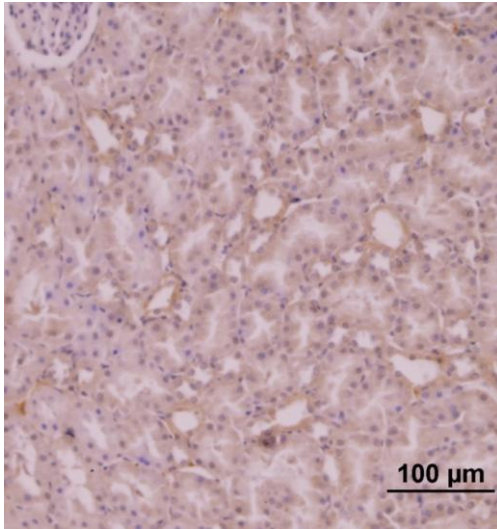
Şekil 51: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde büzüşme ve konjesyonun olmadığı glomerulus (yıldız) ve normal görünümlü bazal membran (ok) , H&E.



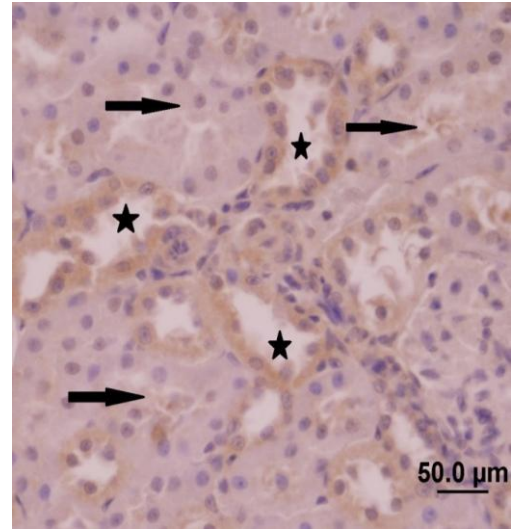
Şekil 52: Bakır-Krisin grubu karaciğerde bazı hepatositlerde aktif kaspaz-3 pozitif reaksiyon, Kaspaz.



Şekil 53: Bakır-Krisin grubu karaciğerde birkaç hepatositte aktif kaspaz-3 pozitif reaksiyonu (oklar), Kaspaz.



Şekil 54: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde bazı tubulus epitellerinde aktif kaspaz-3 reaksiyon, Kaspaz.



Şekil 55: Bakır-Krisin grubu böbrek korteksinde birkaç tubulus epitelinde aktif kaspaz-3 reaksiyonu (yıldızlar) ve pozitif aktif kaspaz- 3 reaksiyonu vermeyen birçok tubulus (oklar), Kaspaz.

4. TARTIŞMA

Bakır toksik bir metal olup su, yiyecek ve bakırın bulunduğu çevrelerde temasla vücuda alınabilmektedir. Özellikle ağız yoluyla alınan bakırın ciddi toksik etkiler oluşturduğu bildirilmektedir. Dokularda birikebilme özelliğinden dolayı kritik sınırlara ulaştığında zehirlenmelere yol açmaktadır. Başta karaciğer ve böbrek dokuları etkilenmektedir (5). Bakır sülfat toksisitesi oluşturulan ratlarda, anti-inflamatuar etkili olan flunixin ile antioksidan ve anti-inflamatuar etkisi olduğu bilinen krisinin, yem tüketimi, canlı ağırlık değişimi, lipid peroksidasyon, antioksidan sistem ve yangı parametreleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

4.1. Performans

Bu çalışmada, 1-21 günlük periyotta bakır grubunun YT, canlı ağırlık ve canlı ağırlık değişimleri Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Tablo 2) söz konusu parametrelerin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür ($p<0.01$). Bu durum ratların yüksek oranda oral olarak bakıra maruz kalmasından dolayı toksik etkinin başlamasına ve bu nedenle yem tüketimi ve canlı ağırlığı olumsuz etkilemesine bağlanmıştır. Nitekim aynı durum 2 farklı dozda (200-400 ppm) bakır kullanılarak hazırlanan diyetlerin domuz yavruları üzerinde etkisini belirlemek üzerine yapılan bir çalışmada (70) 200 ppm bakır verilen grubun büyümeyi geliştirdiği ancak 400 ppm verilen grubun büyümeyi ve yem tüketimini deprese ettiği bildirilmiştir ($P<0.01$). Yine 38 haftalık yumurtacı tavuklarda yapılan bir çalışmada 3 farklı dozda (400, 500 ve 600 ppm) bakır katkısı yapılmış ve 4 hafta sonunda artan bakır katkısının yem tüketimini deprese ettiği bildirilmiştir. Bakır gruplarında artan bakır katkısı ile sırasıyla yem tüketimi 109, 107 ve 97.8 g/tavuk/gün olarak tespit edilmiş istatistiksel olarak önemli düşüş bildirilmiştir ($P<0.004$). Ancak canlı

ağırlıkta önemli bir değişim bulunmamıştır (71). Bakır toksisitesinde antioksidan mekanizmanın etkilendiği ve lipid peroksidasyonun arttığı bildirilmektedir. Özellikle karaciğer homojenatları veya haptositleri iyonik bakır ile reaksiyona girdiği ve lipid peroksidasyonun en önemli göstergelerinden MDA'nın ve TBARS'ın yükselmesine neden olduğu belirlenmiştir (5). Bu durumdan dolayı oksidatif stres meydana gelir ve ratlarda oksidatif stres sonucu antioksidan yetersizliğinin canlı ağırlık kaybına neden olduğu belirlenmiştir (72). Flavanoidler, iz elementlerle veya radikallerle şelat yaparak antioksidan özellik göstermektedirler (28-30). Ayrıca doymamış yağ asitlerini hücre membranında oksidantlara karşı askorbat gibi korudukları bildirilmiştir (31). Krisinin antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar etkileriyle pek çok biyolojik aktivite ve farmakolojik etki gösterdiği bildirilmektedir (26,32). Krisinin akciğer kanserini etkileyen bir ajana karşı koruyucu etkisini belirlemek için 6-8 haftalık fareler üzerinde yapılan bir çalışmada (73), kontrol grubuna oranla (31.2 g) kanseri tetikleyen ilacın vücut ağırlığını önemli ölçüde düşürdüğü (20.4 g), oral krisin (250 mg/kg canlı ağırlık) katkısının ise (27.1 g) vücut ağırlığını istatistiksel olarak önemli oranda yükselttiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). Krisinin bu olumlu etkisini içeriğindeki flavonlara bağlamışlardır. Bizim çalışmamızdaki bulguları incelediğimizde canlı ağırlık değişiminin kontrol, bakır, flunixin+bakır ve krisin+bakır gruplarının 1-21 gün total sonuçlarında sırasıyla 3.09, 1.79, 2.26 ve 2.49 g/hyv olarak tespit edildiği ($P<0.01$) ve bakır verilen ratlara flunixin (5.grup) ve krisin (6.grup) uygulamalarının ratların canlı ağırlığını yükselttiği ve kontrol gruba yaklaştırdığı ancak hem bakır hem de kontrol gruplarıyla istatistiki olarak benzer oldukları belirlenmiştir. Yem tüketiminde ise aynı gruplar için 21 gün total sonuçları sırasıyla 22.99, 18.06, 19.42 ve 20.04 g/hyv olarak belirlendiği

krisin grubunun önemli oranda bakır grubuna göre yem tüketimini artırdığı bulunmuştur ($P<0.01$). Diğer pozitif kontrol grupları olan krisin (3.grup) ve fluniksin (4. grup) gruplarında ise beklenildiği gibi performans parametrelerinde kontrol grubuyla istatistiki olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. Non steroidal anti-inflamatuar olan fluniksin megluminin toksik durumlarda veteriner hekimlikte sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (35-37). Bu çalışmada performans parametreleri üzerine iyileştirici etkisinin olması toksemiye önleyici etkisine bağlanmıştır. Krisinin bakır toksisitesi üzerine performans parametrelerini iyileştirici etkisi ise yapısındaki flavonlara bağlanmıştır (73).

4.2. Grupların Bazı Biyokimyasal Parametre Değerleri

Kortizol hormonu böbrek üstü bezlerinden salgılanan ve organizma da artmasıyla stresin arttığının göstergesi olan önemli bir hormondur. Vücudun savunma mekanizmalarını alarma geçirerek önemli görevler üstlenmiştir. Kortizolün en önemli etkilerinden biri de glikoz metabolizması üzerine olan etkisidir. Kortizol yüksekliğinde kandaki glikoz yoğunluğunu artırır ve bu etkisini karaciğerde glikoz yapımını hızlandırarak yapmaktadır (74). Bizim çalışma sonuçlarımız incelendiğinde kortizol ($P<0.01$) ve glikoz ($P<0.05$) düzeylerinin bakır grubunda kontrol grubuna göre önemli oranda yükseldiği tespit edilmiştir (Tablo 3). Bu durum bakırın organizmada stresi artırdığının en önemli göstergelerinden biridir. Fluniksin ve krisin uygulamaları ise kortizol ($P<0.01$) ve glikoz ($P<0.05$) düzeyini önemli düzeyde düşürmüştür. Bizim çalışma bulgularımızla benzer olarak, ovariohisterektomi geçiren ve oksidatif stress durumunda olan 24 köpek üzerinde yapılan bir çalışmada (75) fluniksin megluminin kortizol düzeyini kontrol grubuna göre önemli oranda düşürdüğü ($P<0.01$) tespit edilmiştir. Krisinin flavonoid yapısından dolayı antioksidan

özellikte olması ve bundan dolayı oksidatif stress üzerine pozitif etkisi olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (28-30). Bizim çalışmamızla uyumlu olarak, krisinin oksidatif strese artan kortizolün düşmesini sağladığı bildirilmektedir (76).

Nefrotoksisite ve hepatotoksisite serum biyokimyasal parametrelerde meydana gelen değişiklikler ile belirlenebilir. Bu çalışmada, hepatotoksisiteye neden olan yüksek düzeyde bakır, beklenene uygun olarak karaciğer toksisitesinden sorumlu olan AST ve ALT gibi serum biyokimyasal parametrelerin artmasına neden olmuştur (Tablo 3) (9). AST ve ALT gibi transaminaz enzimler karaciğer hasarının tanısında önemli bir role sahip olan en önemli belirteçlerdir. Bizim çalışmamızla benzer bulgular gösteren ve ratlarda bakır toksisitesini belirlemek için yapılan bir çalışma da (9), toplam 16 rat üzerinde bakır verilmeyen (kontrol) ve verilen (deneme) olarak iki grup incelenmiştir. Deneme grubuna bakır 1g/lt su ile verilmiştir. Çalışma 4 hafta sürmüştür. Deneme sonunda plazma ALT ve AST aktiviteleri incelendiğinde kontrol ve bakır grupları arasında çok önemli farklar tespit edilmiştir ($P<0.001$). Kontrol ve deneme grubunun ALT aktiviteleri sırasıyla 85.6, 282.0; AST aktiviteleri ise sırasıyla 138.2, 392 olarak belirlenmiştir ($P<0.001$). Transaminazların seviyelerindeki değişiklikler, karaciğer fonksiyonlarının bozulmuş olduğunun göstergeleridir (77,78). Kim ve ark. (79), hepatosellüler hasara neden olan siklosporin A'nın (CsA) AST, ALT ve ALP gibi karaciğer ile ilgili enzimlerin faaliyetlerinde önemli bir artışa neden olduğunu ve bu maddeye karşı flavonoid yapı içeren propolisin uygulanması ile CsA'ya karşı hepatosellüler membranın yapısal bütünlüğünü muhafaza etmek için artış gösteren (80) AST ve ALT aktivitelerini önemli ölçüde azalttığını bildirmiş ($P<0.01$) ve böylece

flavonoidlerin karaciğer üzerine koruyucu etkilerini göstermişlerdir. Bizim çalışmada da AST ve ALT değerleri incelendiğinde kontrol grubunun sırasıyla 209.75, 71.50; bakır grubunun sırasıyla 266.33, 88.16 U/L; krisin katkısının ise sırasıyla 225.60, 78.60 U/L olarak bulunduğu belirlenmiş (Tablo 3) ve krisin katkısının bakır kaynaklı hasar sonucu oluşan AST ve ALT değerlerindeki yükselmeyi önemli oranda düşürdüğü görülmüştür. Bu durumun Priydarsini ve ark. (80)'in flavonoid yapıdaki bileşiklerle yaptıkları bir çalışmada ki gibi krisinin yapısındaki flavonoidlerin oksidatif stresi azaltmasının bir sonucu olarak yorumlanmıştır. Fluniksin megluminin (5. Grup) ise krisin (6. Grup) gibi ALT düzeyini önemli oranda düşürdüğü belirlenmiştir ($P<0.01$) (Tablo 3). Fluniksin megluminin ALT düzeyi üzerine pozitif etkisi nonsteroidal anti-inflamatuar (NSAID) yapısından dolayı olabilir. Nitekim NSAID'ların serbest radikallerle savaşıma kapasitesinin olduğunu ve vücutta güçlü antioksidanlar olarak etki ettiği bildirilmektedir (39).

4.3. Araştırma Gruplarının Böbrek ve Karaciğer Dokularındaki MDA Düzeyleri ile GSH, SOD ve CAT Aktiviteleri

Bakır toksisitesinde kanda bakır yükseldikten sonra bakırın ilk biriktiği yer öncelikle karaciğerdir. Bakırın karaciğer ve böbrek gibi önemli dokularda yaptığı hasarı belirlemek ve özellikle de oksidatif stresin bu dokular üzerine etkisini ortaya çıkarmak için GSH ve en önemli antioksidan enzim aktiviteleri (SOD ve CAT) ölçülmüştür (Tablo 4, 5). Bakır uygulamasının karaciğer ve böbrek MDA düzeylerini arttırdığı ($P<0.01$); karaciğer ($P<0.001$) ve böbrek GSH ($P<0.01$), SOD ve CAT ($P<0.001$) aktivitelerini önemli derecede düşürdüğü belirlenmiştir. Özcelik ve Uzun (9) çalışmamızla benzer olarak ratlar üzerinde yaptıkları çalışma da toksik düzeyde bakır uygulamasının beyin dokusundaki MDA, SOD ve GSH

aktiviteleri üzerine etkisini belirlemişlerdir. Çalışma sonuçları incelendiğinde kontrol ve bakır gruplarının sırasıyla MDA düzeyi 1.11; 1.88 nmol/mg protein ($P<0.001$), SOD aktiviteleri 5.76; 4.69 U/mg protein ($P<0.01$); GSH aktiviteleri 44.04; 27.18 μ mol/mg protein ($P<0.001$) olarak tespit edilmiştir. Genel olarak bakır toksisitesinde reaktif oksijen türlerinin üretimi sonucu lipid peroksidasyonunun arttığı ve iyonik bakır ile karaciğer homojenatları ve hepositler reaksiyona girdiği zaman hepatic MDA ve TBARS'ın artması sonucu lipid peroksidasyon meydana gelir (81,82). Zhang ve ark. (61) ise karaciğerde bakır birikiminin SOD aktivitesini düşürdüğü ve serumda MDA düzeyi ile karaciğer homojenatlarında yükselmeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Glutasyon non enzimatik bir antioksidandır. Önemli fizyolojik ve metabolik fonksiyonları olan, serbest radikalleri, metalleri ve diğer elektrofilik bileşikleri detoksifiye edebilen bir antioksidandır. Non enzimatik reaksiyonlar yoluyla bakır, selenyum, krom ve çinko gibi metalleri bağlayabilme özelliğine sahiptir (9,83). Oksidatif stress durumunda diğer antioksidan enzimler gibi GSH tüketiminin fazla olmasından dolayı GSH aktivitesinde düşme meydana gelir (9,84,85).

MDA düzeyinin plazmada ya da dokularda düşmesi lipid peroksidasyonun azaldığını ifade etmektedir. Bu yaklaşımla; bu çalışmada bakır kaynaklı oksidatif strese kaynaklanan lipid peroksidasyon oluşumunun azaltılmasında antioksidan özelliğe sahip krisinin ve antiinflamatuvar ve antioksidan etkili fluniksin kullanımının etkili olduğu belirgin şekilde tespit edilmiştir (Tablo 4, 5). Nitekim ratlarda nefrotoksik etkili bir maddeye (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) karşı krisinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (86) tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), GSH, CAT ve SOD aktiviteleri incelenmiştir. Krisinin TBARS'ı düşürdüğü, GSH, CAT ve SOD aktivitelerini ise önemli oranda

yükselttiği bildirilmiştir ($P \leq 0.01$). Bizim çalışma bulguları incelendiğinde karaciğer dokusunda krisinin (6. Grup) bakır grubuna kıyasla MDA düzeyini düşürdüğü, GSH, SOD ve CAT aktivitelerini önemli oranda yükselttiği; böbrek dokusunda ise GSH hariç, karaciğerdeki sonuçlarla benzer bulgular elde edildiği tespit edilmiştir ($P < 0.001$) (Tablo 4). Pushpavalli ve ark. (32) krisinin D galaktozamin verilen ratların TBARS düzeyini önemli oranda düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Yine çalışmamızla benzer olarak yapılan çalışmalarda krisinin dokularda GSH ve antioksidan enzimleri artırdığı bildirilmiştir (32,33). Bu durum krisinin yüksek antioksidan kapasitesi ile ilişkilidir (33). Krisinin propolisin içerik maddelerinden olduğu bilinmektedir. Propolisteki güçlü antioksidan yapı krisin gibi flavonoid içeren maddelerden dolayı olmaktadır. Propolisteki çeşitli flavonoidler ve fenolik maddelerin (dolayısıyla krisinin içeriğindeki) C vitamini gibi davranarak, lipitler ve diğer bileşiklerin okside olmasını engellediği veya oksidatif hasar sürecini sekteye uğratarak serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir (87,88). Bunun yanısıra, flavonoidler lipid peroksidasyonu, trombosit agregasyonu, kılcal geçirgenliği ve kırılgenlik ile siklooksijenaz ve lipoksijenaz dahil olmak üzere enzim sistemlerinin aktivitesini inhibe ederler (31). Fluniksin megluminin antioksidan sistem üzerine olumlu etkisi ise serbest radikallerle savaşma kapasitesinin olmasına ve vücutta güçlü antioksidanlar olarak etki etmesine bağlanabilir (Tablo 4, 5) (39).

Tümör nekrozu faktörü (TNF), farklı hücre tipleri tarafından salgılanan ve hasarlı hücrelerin yıkımını sağlayan bir sitokindir ve aynı zamanda 185 amino asitli bir glikoprotein hormonudur (19). TNF- α 'nın özellikle T hücre aracılı doku hasarı ile meydana gelen inflamasyonun oluşmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (89). TNF- α , başlıca makrofajlar, lenfositleri içeren pek çok hücre

tipi, endotelial hücreler ve mast hücrelerinin aktiviteleriyle üretilmektedir. Özellikle iltihaplı hastalıklarda TNF- α düzeyi değişmektedir. Tüm hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyon faktörü olan Nuclear Factor Kappa B'nin aktivasyonu sonucu TNF- α artar (90). Flavonoidler ise Nuclear Factor Kappa B'nin aktivasyonunu inhibe ederek TNF- α 'nın indüklenmesine engel olmaktadır (91). Nitekim D-galaktozamin kullanılarak karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda flavonoid olarak *Phyllanthus rheedii* Wight. (Euphorbiaceae) etanol ekstraktının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (92), D-galaktozaminin TNF- α 'yı artırdığı ancak flavonoidlerden zengin *Phyllanthus rheedii* Wight. (Euphorbiaceae) ekstraktının kullanımının TNF- α 'yı normale döndürdüğü bildirilmiştir. Ekstraktın bu olumlu etkisinin yapısındaki yüksek oranda bulunan flavonoid, tanin ve flavonların etkisine bağlamışlardır. Fareler üzerinde krisinin antiinflamatuvar etkisinin belirlendiği bir çalışmada (93) TNF- α üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan antiinflamatuvar etkili flunixin meglumin ve antioksidan etkili krisinin bakır grubuna kıyasla TNF- α düzeyini önemli oranda düşürdüğü belirlenmiştir ($P<0.001$) (Tablo 6). Benzer çalışma bulgularıyla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (91-93).

Histolojik parametreler incelendiğinde kontrol, flunixin ve krisin gruplarıyla karşılaştırıldığında bakır grubunun karaciğerde ve böbrekte ciddi hücre hasarları meydana getirdiği ve her iki dokuda da kaspaz-3 reaksiyonu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 23-26). Bu durum dokulardaki lipid peroksidasyon ve antioksidan aktiviteler (Tablo 4 ve 5) ve TNF- α (Tablo 6) ile ilgili bulgularla uyum içerisinde olduğu da görülmektedir. Flunixin bakır ve krisin bakır grubunun ise bakır grubuna kıyasla belirgin bir şekilde hasarı azalttığı kaspaz-3 reaksiyonunun bakır grubuna kıyasla daha düşük olduğu histolojik

incelemelerde tespit edilmiştir. Bu durum çalışmamızda ki diğer bulgularla da örtüşmektedir. Benzer olarak ratlarda nefrotoksik etkili bir maddeye (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) karşı krisinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (86) böbrek hasarı oluşturan TCDD'nin hasarı oluşumunu azalttığı histolojik olarak belirlemişlerdir. Bu yayında TCDD'nin glomerulosklerozis oluşturduğu ancak krisin kullanımının glomerulosklerozisi azalttığı belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada bizim bulgularımıza benzer olarak antioksidan bulgularla histolojik parametreler paralel bulgularla seyretmiştir. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışma da (94) beyin damarlarında ki tıkanlığın oluşturabileceği hasarlara karşı krisinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla bilateral karatoid arterleri ameliyatla bağlanarak beyin hasarı oluşturulmuştur. Daha sonra 3 gruba ayrılan ratlar üzerinde bir kontrol bir de krisinin 2 (30;100 mg/kg; i.g./ gün) ve farklı dozu 26 gün verilmiştir. Histolojik incelemelerde 30 mg/kg krisin dozunun patolojik değişiklikleri azalttığı ve ratların korteks ve hipokampal CA1 alanlarında hücre kaybını indükleyen kronik serebral hipoperfüzyonu hafiflettiği belirlenmiştir. Ancak 100 mg/kg dozdaki krisinin etkisi tespit edilmemiştir. 30 mg/kg krisin uygulaması korteks ($P<0.05$) ve hipokampal ($P<0.05$) alanlarda TUNEL-pozitif sayısını önemli oranda düşürmüştür. Bu çalışmada krisinin apoptozisden nöronları koruduğu bildirilmiştir. Krisinin böbrek hasarı üzerine etkisini belirlemek için ratlar üzerinde yapılan farklı bir çalışma da (26) cisplatin kullanılarak böbrek hasarı oluşturulmuş ve krisinin iki farklı dozu (25 ve 50 mg/kg oral) kullanılmıştır. Cisplatin grubunun böbrek tubullerinde geniş ve şiddetli hasar oluşturduğu; krisinin 25 mg/kg dozunda böbrek histolojik yapısını etkili olarak koruduğu ve nekrozisi ayrıca diğer patolojik bulguları azalttığı belirlenmiştir. 50 mg/kg dozunda verilen krisin grubunda ise renal tubullerin normal yapısında

olduğu ve herhangi bir nefrotoksisiteye rastlanmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarıyla (26,86) benzer olarak bizim çalışmamızda da krisinin dokularda toksisite üzerine olumlu etkisini olduğu açık bir şekilde görölmektedir (Şekil 47-56). Bu olumlu etkiler krisinin oksidatif stres üzerine iyileştirici etkisine bağlanmıştır (26).



5. SONUÇ

Bu çalışma ile ratlarda bakır uygulamasının canlı ağırlığı düşürdüğü ve dokulardaki oksidatif stresi arttırdığı görülmüştür. Bu sonuçlar, bakırın böbrek fonksiyon bozukluğu ve karaciğer toksisitesi oluşturduğunu ve bunda oksidatif stres oluşumunun önemli bir role sahip olduğunu, ayrıca krisinin ve fluniksinin bakır kullanımı nedeniyle oluşan nefrotoksisite ve hepatiktoksisiteye karşı koruyucu potansiyelini açıkça ortaya koymaktadır. Krisin uygulaması, böbrek ve karaciğer dokularında lipid peroksidasyonunu kısmen engelleyerek, söz konusu dokularda SOD, GSH ve CAT içeriğinin muhafaza edilmesini sağlamıştır. Krisinin canlı ağırlıktaki azalmayı ve serbest radikalleri temizleyerek bakır toksisitesini iyileştirdiği ve antioksidan etkinliği artırdığı görüldü. Bu çalışma sonuçları ile doğal bir ürün olması yönüyle fluniksine göre öne çıkan krisinin, uygun dozda uygulanması durumunda, böbrek ve karaciğer toksisitesini azaltmada etkili bir antioksidan bileşik olabileceği ortaya çıkmıştır.

6. KAYNAKLAR

- 1-Morgil İ, Karaca G, Çelik S. “Ağır metallerin bitkiler üzerine etki nedir?”. http://www.kimyaegitimi.org/sites/default/files/kuresel_isinma_projeleri/proje_tabanli_ogrenme_modeli/agir_metallerin_bitkiler_uzerine_etkileri.pdf 29.02.2016.
- 2-Anonim. “Bakır”.https://tr.wikipedia.org/wiki/Bak%C4%B1r#Kullan.C4.B1m_Alanlar.C4.B1 29.02.2016b.
- 3-Harris ED. Basic and clinical aspects of copper. Crit Rev Clin Lab Sci 2003; 40: 547-586.
- 4-Sharp PA. Ctr1 and its role in body copper homeostasis. Int J Biochem Cell Biol 2003; 35: 288-291.
- 5-Kabak YB, Gülbahar MY. Sıçanlarda deneysel bakır zehirlenmesinde karaciğer ve böbrek dokularında apoptozisin belirlenmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2013; 60: 39-45.
- 6-Geberding JL. Toxicological profile for copper. 1nd Edition, Georgia: Atlanta, 2004.
- 7-Sönmez S, Kaplan M, Sönmez NK, Kaya H. Topraktan yapılan bakır uygulamalarının toprak pH’sı ve bitki besin maddesi içerikleri üzerine etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2006; 19: 151-158
- 8-Kaplan M. Accumulation of copper in soils and leaves of tomato plants in greenhouses in Turkey. Journal of Plant Nutrition 1999; 22: 237- 244.
- 9-Ozcelik D, Uzun H. Copper Intoxication; antioxidant defences and oxidative damage in rat brain. Biol Trace Elem Res 2009; 127: 45-52.
- 10-Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brien K, Khandwala RA, Loehr JP. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome C oxidase activity in rats with long-term copper overload. Gastroenterology 1993; 105: 178-187.
- 11-Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. Lab Invest 1982; 47: 5-18.
- 12-Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical Chemistry 1995; 41: 1819-1828.
- 13- Canayakın D. Nigella Sativa L. Etanol Ekstresinin Ratlarda Parasetamolle İndüklenen Akut Böbrek Toksisitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014.

- 14-Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Phys* 2007; 146: 443-459.
- 15-Rossi L, Lombardo MF, Ciriolo MR, Rotilio G. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. *Neurochem Res* 2004; 29: 493-504.
- 16-Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000; 5: 415-418.
- 17-Anonim. "Apoptozis". <https://tr.wikipedia.org/wiki/Apoptozis> 29.02.2016c.
- 18-Fong RN, Gonzalez BPE, Fuentealba IC, Cherian MG. Role of tumor necrosis factor- α in the development of spontaneous hepatic toxicity in Long-Evans Cinnamon rats. *Toxicol Appl Pharm* 2004; 200: 121-130.
- 19-Anonim. "Tümör nekroz faktör". https://tr.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCm%C3%B6r_nekroz_fakt%C3%B6r 29.02.2016d.
- 20-Kannan K, Jain S. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiol* 2000; 7: 153-163.
- 21-Rana, SVS. Metals and apoptosis: Recent developments. *J Trace Elem Med Biol* 2008; 22: 262-284.
- 22-Stavric B. Role of chemopreventers in human diet. *Clin Biochem* 1994; 27: 319-332.
- 23-Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoid as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990; 186: 343-355.
- 24-Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2002; 3: 1-8.
- 25-Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995; 33: 1061-1080.
- 26-Sultana S, Verma K, Khan R. Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64: 872- 881.
- 27-Anonim. "Chrysin". <https://en.wikipedia.org/wiki/Chrysin#Inflammation> 29.02.2016e.
- 28-Pulido MD, Parrish AR. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res* 2003; 533: 227-241.
- 29-Wang BJ, Lien YH, Yu ZR. Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chem* 2004; 86: 237-243.

- 30-Sur Aslan A, Tatlı Seven P, Yılmaz S, et al. The effects of propolis on performance, carcass and antioxidant status characteristics in quails feeding under stocking density. *Europ Poult Sci* 2014; 78.
- 31-Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 2002; 96: 67-202.
- 32-Pushpavalli G, Kalaiarasi P, Veeramani C, et al. Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 631: 36-41.
- 33-Khan R, Khan AQ, Qamar W, et al. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: Probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 258: 315-329.
- 34-Tras, B, Izci, C, Elmas, M. 1995. Fluniksin meglumin (FinadynR)'in eklem sivisina geçiş oraninin belirlenmesi. *Vet. Bil. Derg.* (1995), 11, 1: 65- 66
- 35-Luthman J, Kindahl H, Jacobsson SO. The influence of Fluniksin on the response to *Salmonella typhimurium* endotoxin in calves. *Acta Vet Scand* 1989; 30: 295-300.
- 36-Daels PF, Stabenfeldt GH, Hughes JP, et al. Effects of Fluniksin meglumine on endotoxin-induced prostaglandin F2 alpha secretion during early pregnancy in mares. *Am J Vet Res* 1991; 52: 276-281.
- 37-Toutain PL, Autefage A, Legrand C, et al. Plasma concentrations and therapeutic efficacy of phenylbutazone and Fluniksin meglumine in the horse: harmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *J Vet Pharmacol Ther* 1994; 17: 459-469.
- 38-Little D, Brown SA, Campbell NB, et al. Effects of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on recovery of ischemia-injured equine jejunum. *Am J Vet Res* 2007; 68: 614-624.
- 39-Mouithys-Mickalad AM, Zheng SX, Deby-Dupont GP, et al. In vitro study of the antioxidant properties of non steroidal antiinflammatory drugs by chemiluminescence and electron spin resonance (ESR). *Free Radic Res* 2000; 33: 607-621.
- 40-Soylu SM, Şireli M. Farelerde Fluniksin-Megluminin hematolojik parametreler üzerine etkisi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 2007; 78: 53-56.
- 41-Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 2001; 8: 829-838.

- 42-Fellenberg MA, Speisky H. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's Poultry Sci J* 2006; 62: 53-70.
- 43-Çelik L, Serbester U, Kutlu HR. Kanatlı hayvanlarda oksidatif stres oluşumu ve önlemi. Kümes Hayvanları Kongresi. Erciyes Üni Seyrani Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü 07-09 Ekim Kayseri 2010.
- 44-Tekcan M. Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. *Androloji Bülteni* 2009; 37: 131-136.
- 45- Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31: 51-56.
- 46-Freeman BA, Crapo JD. Biology of Disease, Free Radicals and Tissue Injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
- 47-Cheeseman KH, Slater TF. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *British Medical Bulletin* 1993; 49: 481-493.
- 48-Yılmaz S, Bahçecioğlu IH. Karbontetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzim ve pirüvat kinaz aktiviteleri. *Türk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 25-28.
- 49-Seven İ, Aksu T, Tatlı Seven P. Propolis ve hayvan beslemede kullanımı. *YYÜ Vet Fak Derg* 2007; 18: 79-84.
- 50-Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984; 105: 273-283.
- 51-Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem Phy Lipids* 1987; 44: 227-253.
- 52-Placer CA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1990; 16: 259-264.
- 53-Kalender S, Kalender Y, Ögütçü A, et al. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology* 2002; 202: 227-235.
- 54-Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological Aspect of Active Oxygens / Free Radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.
- 55- Aebi H. Catalase In Vitro. In: Willam BJ (Editor). *Methods in Enzymology. Enzyme Purification and Related Techniques, Part C, 1st Edition*, New York, USA 1984: 105; 121-126.
- 56-Lamoureux G, Bourbeau S, Dubais G, et al. A Rapid Method for Determining Catalase in Human Blood. *Clin Chim Acta* 1987; 167: 105-111.

- 57-Laurie D, Kaplowitz DN. Glutathione Metabolism and Its Role in Hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991; 52: 287-305.
- 58-Altınışık M. “Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar”. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf> 29.02.2016.
- 59-Anomim. “Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Oksidatif Stres Analiz Parametreleri ve Oksantest. Oksante Ar-Ge Laboratuvarı© 2012”. <http://www.oksante.com.tr/oksantest.pdf> 29.02.2016a.
- 60-Meister A. Glutathione, Ascorbate and Cellular Protection. *Cancer Res* 1994; 1: 1969-1975.
- 61-Zhang SZ, Noordin MM, Rahman SOA, Haron MJ. Effects of copper overload on hepatic lipid peroxidation and antioxidant defense in rats. *Vet Hum Toxicol* 2000; 42: 261-264.
- 62-Liu JY, Yang X, Sun XD, Zhuang CC, Xu FB, Li YF. Suppressive effects of copper sulfate accumulation on the spermatogenesis of rats. *Biol Trace Elem Res* 2016; 174: 356-361.
- 63-Konyalıoğlu S, Er A, Uney K, Elmas M, ve ark. Effect of flunixin meglumin on the antioxidant status in endotoxemia. *Acta Veterinaria (Beograd)* 2007; 57: 241-246.
- 64-AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists, 16th Edition, Washington DC, USA 1995: VA, pp. 4.1-4.17.
- 65-Crampton EW, Maynard LA. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. *J Nutr* 1938; 15: 383-395.
- 66-Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 67-Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1959; 82: 70-77.
- 68-Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
- 69-SPSS. IBM SPSS Statistics 21 CLIENT. IBM Corp. (c) Copyright, 2012.
- 70-Kornegay ET, Van Heugten PHG, Lindemann MD, Blodgett DJ. Effects of Biotin and High Copper Levels on Performance and Immune Response of Weanling Pigs. *J Anim Sci* 1989; 67: 1471-1477.

- 71-Chiou PWS, Chen KL, Yu Bi. Effect of dietary organic arsenicals and cupric sulfate on copper toxicity, liver accumulation and residue in eggs and excreta of laying hens. *Anim Feed Sci Technol* 1998; 73: 161-171.
- 72-Nath KA, Salahudeen AK. Induction of renal growth and injury in the intact rat kidney by dietary deficiency of antioxidants. *J Clin Invest* 1990; 86: 1179-1192.
- 73-Kasala ER, Bodduluru LN, Barua CC, et al. Chemopreventive effect of chrysin, a dietary flavone against benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Pharmacological Reports* 2016; 68: 310-318.
- 74-Anonim. "Kortizol Hormonu ve Etkileri". <http://www.saglik.im/kortizol-hormonu-ve-etkileri> 03.03.2016f.
- 75-Yilmaz O, Korkmaz M, Jaroszewski JJ, Yazici E, Ulutas E, Saritas ZK. Comparison of Flunixin meglumine and meloxicam influence on postoperative and oxidative stress in ovariectomized bitches. *Pol J Vet Sci* 2014; 17: 493-499.
- 76-Anonim. "Chrysin". <http://www.nutriline.org/article/28> 03.03.2016g.
- 77-Pari L, Sivasankari R. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22: 395-401.
- 78-Zhong Z, Li X, Yamashina S, et al. Cyclosporine A causes a hypermetabolic state and hypoxia in the liver: prevention by dietary glycine. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 858-865.
- 79-Kim KA, Lee WK, Kim JK, et al. Mechanism of refractory ceramic fiber-and rock wool-induced cytotoxicity in alveolar macrophages. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; 74: 9-15.
- 80-Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a neutral phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 2200-2206.
- 81-Dillard CJ, Tappel AL. Lipid peroxidation and copper toxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 1984; 7: 447-487.
- 82-Waggoner D, Bratnikas T, Gitlin J. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 221-230.
- 83-Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: Occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 1993; 50: 335-355.
- 84-Hwang JM, Wang CJ, Chou FP et al. Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. *Arch Toxicol* 2002; 76: 664-670.

- 85-Hung YC, Sava VM, Blagodarsky VA et al. Protection of tea melanin on hydrazineinduced liver injury. *Life Sci* 2003; 72: 1061-1071.
- 86-Ciftci O, Ozdemir I, Vardi N, Beytur A, Oguz F. Ameliorating effects of quercetin and chrysin on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicol Ind Health* 2012; 28: 947-954.
- 87-Tatli Seven P, Yilmaz S, Seven I, et al. Effects of Propolis on Selected Blood Indicators and Antioxidant Enzyme Activities in Broilers under Heat Stress. *Acta Veterinaria Brno* 2009; 78: 75-83.
- 88-Tatli Seven P, Yilmaz S, Seven I, Tuna Kelestemur G. Effects of Propolis in Animals Exposed Oxidative Stress. In, Volodymyr I. Lushchak (Ed): *Oxidative Stress-Environmental Induction and Dietary Antioxidants*. 267-288, Rijeka, Croatia, 2012.
- 89-Emmungil H, Aksu K. Anti-tümör nekrozis faktör- α tedavileri ile iliflkili otoimmün ve inflamatuvar hastalıklar. *RAED Dergisi* 2012; 4: 17-23.
- 90-Anonim. “NF-kappa B (NF- κ B, Nuclear Factor kappa B”. <https://tr.wikipedia.org/wiki/NF-%CE%BAB> 03.03.2016h.
- 91-Lee S, Kim YJ, Kwon S, Lee Y, Choi SY, Park J, Kwon HJ. Inhibitory effects of flavonoids on TNF- α -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB reports* 2009; 42: 265-270.
- 92-Suresh V, Asha VV. Preventive effect of ethanol extract of *Phyllanthus rheedii* Wight. on d-galactosamine induced hepatic damage in Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 447-453.
- 93-Lim H, Jin JH, Park H, Kim HP. New synthetic anti-inflammatory chrysin analog, 5,7-dihydroxy-8-(pyridine-4yl)flavone. *Eur J Pharmacol* 2011; 670: 617-622.
- 94-He XL, Wang YH, Bi MG, Du GH. Chrysin improves cognitive deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Eur J Pharmacol* 2012; 680: 41-48.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	Hakan GÜLLÜOĞLU
Doğum Yeri	İSKENDERUN/HATAY
Doğum Tarihi	25.12.1986
E-Mail	Hakan_1057@hotmail.com
Telefon	0 (507) 079 86 10

LİSANS EĞİTİM BİLGİLERİ

Üniversite	Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Fakülte	Veteriner Fakültesi
Bölüm	

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurum	Yüksekova İlçe Tarım Müdürlüğü/HAKKARİ
Görevi/Pozisyonu	Veteriner Hekimi
Tecrübe Süresi	5 yıl

KATILDIĞI

Sertifika Programları	
Seminer/Sempozyum	