

**RAT KARACİĞER HÜCRELERİNDE
TALYUM TOKSİSİTESİNİN
NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF STRESE KARŞI
METALLOTİONEİNLERİN ETKİLERİNİN
BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Gözde AYDOĞAN KILIÇ
Doktora Tezi

Anadolu Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı
Şubat-2010

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 061017**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gözde AYDOĞAN KILIÇ'ın “**Rat Karaciğer Hücrelerinde Talyum Toksisitesinin Neden Olduğu Oksidatif Strese Karşı Metallotioneinlerin Etkilerinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Olarak Araştırılması**” başlıklı, **Biyoloji** Anabilim Dalındaki Doktora Tezi, 29. 01. 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Mehtap KUTLU	
Üye :	Prof. Dr. Ahmet ÖZATA	
Üye :	Prof. Dr. Rıdvan SAY	
Üye :	Doç. Dr. Lütfi GENÇ	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

RAT KARACİĞER HÜCRELERİNDE TALYUM TOKSİSİTESİNİN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF STRESE KARŞI METALLOTİONEİNLERİN ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Gözde AYDOĞAN KILIÇ

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU
2010, 109 sayfa**

Bu çalışmada, talyum toksisitesinin neden olduğu oksidatif strese karşı metallotioneinlerin etkileri sıçan karaciğerinde incelenmiştir. 200-250 g ağırlığındaki erkek Wistar cinsi sıçanlar; kontrol, talyum (32 mg/kg) toksisitesine maruz bırakılmış, metallotionein (1 ve 2.5 mg/kg) uygulanmış-talyum (32 mg/kg) toksisitesine maruz bırakılmış ve metallotionein (1 ve 2.5 mg/kg) uygulanmış hayvanları içerecek şekilde 6 grup olarak çalışılmıştır. Deneylerde biyokimyasal ve histopatolojik teknikler kullanılmıştır. Karaciğer dokusundaki talyum konsantrasyonları ve toplam protein düzeyleri ölçülmüştür. Toplam glutatyon seviyeleri belirlenmiş, lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak malondialdehit seviyeleri ölçülmüştür. Lipid peroksidasyonu bulgularını desteklemek ve oksidatif stresi belirleyebilmek amacıyla, reaktif oksijen türevleri seviyesinin bir belirteci olarak, hidrojen peroksit seviyeleri ölçülmüştür. Antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz'ın aktiviteleri belirlenmiştir. Dokulardaki süperoksit dismutaz enzim düzeyleri, enzim aktivitesi sonuçlarını desteklemek amacıyla immunohistokimyasal olarak da tespit edilmiştir. Histopatolojik çalışmalar ışık ve elektron mikroskopik seviyede gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar, metallotioneinlerin talyumu bağlamak yoluyla hücre içi serbest talyum konsantrasyonunu azaltarak, talyum ve sülfhidrilce zengin protein etkileşimlerini önleyerek ve hücrede serbest radikallerin yakalayıcısı olarak görev yapmak yoluyla hücrelerin antioksidan kapasitesini arttırdığını ortaya koymaktadır. Artan antioksidan kapasite sayesinde, lipid peroksidasyonu azalmakta ve hücredeki zarlı yapılar korunmaktadır.

Hem biyokimyasal hem de histopatolojik bulgular metallotioneinin 2.5 mg/kg dozunda talyum toksisitesi ile meydana gelen oksidatif strese bağlı hücre ve doku hasarının önlenmesinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışma ile talyum, metallotionein ve hücrenin başlıca antioksidan bileşenleri arasındaki in vivo etkileşimler ilk defa ortaya koyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Metallotionein, Talyum, Oksidatif stres, Karaciğer, Histopatoloji

ABSTRACT**PhD Thesis****A BIOCHEMICAL and HISTOPATHOLOGICAL INVESTIGATION on
the EFFECTS of METALLOTHIONEINS AGAINST OXIDATIVE STRESS
CAUSED by THALLIUM TOXICITY in RAT LIVER CELLS****Gözde AYDOĞAN KILIÇ****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Department****Supervisor: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU
2010, 109 pages**

In the present study, effects of metallothioneins against the oxidative stress as a result of thallium intoxication were investigated on rat liver. Male wistar rats weighing 200-250 g were studied in 6 groups including control, thallium (32 mg/kg) intoxicated, metallothionein (1 and 2.5 mg/kg) administrated-thallium (32 mg/kg) intoxicated and metallothionein (1 and 2.5 mg/kg) administrated animals. Experiments were conducted by using biochemical and histopathological techniques. Thallium concentrations and total protein levels in the liver tissue were determined. Changes in the levels of total glutathione were determined and malondialdehyde levels as an indicator of lipid peroxidation were measured. Hydrogen peroxide levels, as a marker of reactive oxygen species, were measured to support lipid peroxidation findings and to determine oxidative stress. Activities of antioxidant enzymes, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were measured. Superoxide dismutase enzyme levels were also determined immunohistochemically to verify the enzyme activity results. Histopathological examinations were conducted on light and electron microscopic levels.

The results showed that metallothionein increases the antioxidant capacity of cells by decreasing the levels of intracellular free thallium, preventing the interactions between thallium and sulfhydryl-rich proteins and serving as a scavenger of reactive oxygen species inside the cells. Increased antioxidant capacity results in a decrease in lipid peroxidation and conservation of membranous structures of the cell.

Both biochemical and histopathological findings of this study showed that metallothionein at 2.5 mg/kg dose is effective on preventing the cellular and tissue damage caused by oxidative stress in thallium intoxication. In this study in vivo interactions between thallium, metallothionein and antioxidant components of the cell were exhibited for the first time.

Keywords: Metallothionein, Thallium, Oxidative stress, Liver, Histopathology

TEŞEKKÜR

Bu çalışma konusunun seçiminde bana destek olan, yardımını, bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU ile çalışmamın her aşamasında göstermiş olduğu ilgi ve destekle birikimlerinden faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında cihaz ve laboratuvar olanaklarından en verimli şekilde faydalanmamı sağlayan, başta değerli hocam Prof. Dr. Rıdvan SAY ve Doç. Dr. Lütfi GENÇ olmak üzere A.Ü. BİBAM yönetimine ve çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

A.Ü. Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi yönetimi ve çalışanlarına, başta Prof. Dr. Kevser EROL olmak üzere, O.G.Ü. TİCAM yönetimi ve çalışanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar ve cihaz olanaklarından faydalandığım, edindiğim tüm mesleki tecrübe ve birikimleri bünyesinde kazandığım A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na, gerek vermiş oldukları manevi destek, gerekse yardımlarıyla emeği geçen tüm çalışma arkadaşlarıma ve hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bana vermiş oldukları eğitim ve anlayışla bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışmalarım süresince yapmış olduğu yardımlar, fedakarlıklar ve özellikle de göstermiş olduğu sabır dolayısıyla eşim Volkan KILIÇ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gözde AYDOĞAN KILIÇ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x

1.GİRİŞ.....	1
1.1. Talyum Metali ve Çevresel Önemi.....	3
1.2. Talyum Metalinin Toksik Mekanizması.....	5
1.3. Metallotioneinler.....	6
1.3.1. Metallotioneinlerin Yapısı.....	7
1.3.2. Memelilerdeki MT izoformları.....	8
1.3.3. Metallotioneinlerin Fonksiyonları.....	9
1.3.3.1. Metallotioneinlerin Esansiyel Metallerin Homeostasisindeki Rolleri.....	9
1.3.3.2. Metallotioneinlerin Metal Detoksifikasyonundaki Önemi.....	10
1.3.3.3. Metallotioneinlerin Antioksidan Savunma Mekanizmalarındaki Önemi.....	10
1.3.4. Metallotioneinlerin Hücrel Yıkımı.....	11
1.4. Reaktif Oksijen Türevleri ve Lipid Peroksidasyonu.....	12
1.5. Antioksidan Mekanizmalar.....	14
1.5.1. Glutasyon.....	15
1.5.2. Süperoksit Dismutaz.....	17
1.5.3. Glutasyon Peroksidaz.....	18
1.6. Oksidatif Strese Bağlı Olarak Meydana Gelen Hücrel Değişiklikler... 19	
1.6.1. Hücrede Adaptasyon, Nekroz ve Apoptoz.....	21
1.7. Karaciğer ve Yapısı.....	25

1.8. Karaciğerin Toksisite Çalışmalarındaki Önemi.....	27
1.9. Karaciğer Patolojisi.....	28
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
2.1 Materyal.....	29
2.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	29
2.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	30
2.2. Yöntem.....	30
2.2.1. Biyokimyasal İncelemeler İçin Uygulanan İşlemler.....	30
2.2.1.1. Toplam Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....	30
2.2.1.2. Cu-Zn Süperoksit Dismutaz (Cu-Zn SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	30
2.2.1.3. Toplam Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	34
2.2.1.4. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	38
2.2.1.5. Malondialdehit (MDA) Tayini ile Dokulardaki Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi.....	39
2.2.1.6. Reaktif Oksijen Türevlerinin (ROS) Ölçümü.....	41
2.2.1.7. Talyum Analizleri İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması.....	43
2.2.2. Histopatolojik İncelemeler İçin Uygulanan İşlemler.....	43
2.2.2.1. Karaciğer Örneklerinin Tespiti.....	43
2.2.2.2. Doku Takip İşlemleri.....	43
2.2.3. Cu-Zn SOD Enziminin İmmunohistokimyasal Olarak İşaretlenmesi İçin Uygulanan İşlemler.....	45
2.2.3.1. Karaciğer Örneklerinin Tespiti.....	45
2.2.3.2. Doku Takip İşlemleri.....	45
2.2.3.3. İmmunohistokimyasal İşaretleme İşlemleri.....	46

3.BULGULAR.....	47
3.1. Biyokimyasal İncelemeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular	47
3.1.1. Toplam Protein Analizleri.....	47
3.1.2.Talyum Analizleri.....	47
3.1.3. Cu-Zn SOD Enzim Aktivitesi	48
3.1.4. Toplam GSH Düzeyleri.....	49
3.1.5. GSH-Px Enzim Aktivitesi.....	51
3.1.6. MDA Düzeyleri.....	53
3.1.7. ROS Düzeyleri.....	54
3.2. Histopatolojik Bulgular.....	56
3.2.1. Işık Mikroskobik Bulgular.....	56
3.2.2. Elektron Mikroskobik Bulgular.....	63
3.3.Cu-Zn SOD Enziminin İmmunohistokimyasal Olarak İşaretlenmesi Sonucunda Elde Edilen Bulgular.....	75
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER.....	82
KAYNAKLAR.....	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Talyum metalinin vücuttaki dağılımı ve vücut dışına atılımı.....	6
Şekil 1.2. Metallotioneinlerin şematik yapısı.....	8
Şekil 1.3. Reaktif oksijen türevlerinin metabolizması ve inaktivasyonunda görev alan hücresel savunma sistemleri	15
Şekil 1.4. Glutasyon molekülünün kimyasal yapısı.....	15
Şekil 1.5. Glutasyon sentez yolu.....	16
Şekil 1.6. Hücrelerinde oksidatif strese bağlı olarak gelişen olaylar.....	21
Şekil 1.7. Normal ve hasarlı hücrenin şematik yapısı.....	24
Şekil 1.8. Karaciğerin anatomik ve fonksiyonel bölümleri.....	26
Şekil 1.8. Karaciğer lobülünün şematik yapısı.....	27
Şekil 1.9. Karaciğer hücresinin şematik ince yapısı.....	27
Şekil 2.1. SOD aktivitesi belirlenirken meydana gelen reaksiyonlar.....	31
Şekil 2.2. Zamana karşı absorbands grafiği.....	33
Şekil 2.3. Toplam glutasyon düzeyleri belirlenirken gerçekleşen reaksiyonlar....	35
Şekil 2.4. Toplam glutasyon düzeyleri belirlenirken hazırlanan kalibrasyon grafiği.....	37
Şekil 2.5. Malondialdehit tiobarbitürik asit kompleksi sonucunda oluşan bileşiğin yapısı	40
Şekil 3.1. Cu-Zn SOD aktivitesi sonuçları sütun grafiği.....	49
Şekil 3.2. Toplam GSH düzeyi sonuçları sütun grafiği.....	51
Şekil 3.3. GSH-Px aktivitesi sonuçları sütun grafiği.....	52
Şekil 3.4. MDA tayini sonuçları sütun grafiği.....	54
Şekil 3.5. ROS ölçümü sonuçları sütun grafiği.....	55
Şekil 3.6. Kontrol grubu (% 0.9 NaCl i.p.) sıçanlarda karaciğer dokusu.....	58
Şekil 3.7. Talyum (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer dokusu.....	59
Şekil 3.8. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI ⁺ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer dokusu.....	60
Şekil 3.9. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI ⁺ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer dokusu.....	61

Şekil 3.10. MT I (1 mg/kg i.p.) ve MT I (2.5 mg/kg i.p.) grubu sıçanların karaciğer dokusu	62
Şekil 3.11. Kontrol grubu (% 0.9 NaCl i.p.) sıçanların karaciğer ince yapısı.....	65
Şekil 3.12. Kontrol grubu (% 0.9 NaCl i.p.) sıçanların karaciğer ince yapısı.....	66
Şekil 3.13. TI^+ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer ince yapısı.....	67
Şekil 3.14. TI^+ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer ince yapısı.....	68
Şekil 3.15. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer ince yapısı.....	69
Şekil 3.16. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) ve uygulanan sıçanların karaciğer ince yapısı.....	70
Şekil 3.17. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) ve uygulanan sıçanların karaciğer dokusu.....	71
Şekil 3.18. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer dokusu.....	72
Şekil 3.19. MT I (1 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer dokusu.....	73
Şekil 3.20. MT I (1 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer dokusu.....	74
Şekil 3.21. Kontrol grubu (% 0.9 NaCl i.p.) sıçanlarda grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	75
Şekil 3.22. Chang ve ark., (1988)'ın bulguları.....	75
Şekil 3.23. TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	76
Şekil 3.24. TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	76
Şekil 3.25. MT I (1 mg/kg) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	77
Şekil 3.26. MT I (1 mg/kg) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	77
Şekil 3.27. MT I (2.5 mg/kg) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	78

Şekil 3.28. MT I (2.5 mg/kg) + TI ⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	78
Şekil 3.29. MT I (1 mg/kg) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	79
Şekil 3.30. MT I (1 mg/kg) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu	79
Şekil 3.31. MT I (2.5 mg/kg) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	80
Şekil 3.32. MT I (2.5 mg/kg) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Vs/Vc oran tablosu.....	34
Çizelge 3.1. Deney gruplarına göre toplam protein değerleri.....	47
Çizelge 3.2. Deney gruplarına göre dokulardaki toplam TI ⁺ değerleri.....	48
Çizelge 3.3. Deney gruplarına göre SOD enzim aktivitesi değerleri (U/mg prt) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları.....	48
Çizelge 3.4. Deney gruplarının SOD aktiviteleri kontrol grubu ile kıyaslandığında elde edilen değişim değerleri	49
Çizelge 3.5. Deney gruplarına göre toplam GSH düzeyi değerleri ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları.....	50
Çizelge 3.6. Deney gruplarının toplam GSH düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında elde edilen değişim oranları.....	51
Çizelge 3.7. Deney gruplarına göre glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi değerleri (nmol/mg protein) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları.....	52
Çizelge 3.8. Deney gruplarının glutatyon peroksidaz aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında elde edilen değişim oranları.....	53
Çizelge 3.9. Deney gruplarına göre MDA değerleri (nmol/mg protein) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları.....	53
Çizelge 3.10. Deney gruplarının MDA düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında yüzde değişim değerleri.....	54
Çizelge 3.11. Deney gruplarına göre ROS düzeyleri $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{gr doku}$ ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları	55
Çizelge 3.12. Deney gruplarının ROS düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında yüzde değişim değerleri.....	56
Çizelge 3.13. İmmunohistokimyasal bulgular ile enzim aktivitesi bulguları kontrol grupları ile kıyaslandığında yüzde (%) değişim oranları.....	81
Çizelge 3.14. Cu-Zn SOD enziminin hücre içi dağılımında meydana gelen yüzde (%) değişim.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

gr	: Gram
mg	: Miligram
M	: Molar
mM	: Milimolar
μ M	: Mikromolar
N	: Normal
lt	: Litre
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
$^{\circ}$ C	: Santigrad derece
nm	: Nanometre
kDa	: Kilodalton
Abs	: Absorbans
dk	: Dakika
rpm	: Revolutions per minute (dakikada devir sayısı)
g	: Relative centrifuge force (Nisbi santrifüj gücü)
w/v	: ağırlık/hacim
v/v	: hacim/hacim
Tl	: Talyum
MT	: Metallotionein
MDA	: Malondialdehit
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Glutatyon disülfit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
ICP-OES	: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (Endüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi)

LD ₅₀	: Test edilen hayvanların % 50'sinin ölümüne neden olan doz (LD: lethal doz)
Cys	: Sistein
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
PBS	: Phosphate-buffered saline
OD	: Optik dansite

1. GİRİŞ

Ağır metaller ve metalloidlerin neden olduğu toksisite, reaktif oksijen türevleri oluşumunu ve oksidatif stres reaksiyonlarını kapsamaktadır. Özel koşullar altında, bu ajanlar biyolojik sistemlerde çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olan reaksiyonları indüklemektedir. Endojen antioksidanların, reaktif oksijen türevlerinin neden olduğu hücresel hasara karşı bir savunma sistemi oluşturdukları bilinmektedir. Bu sistemin temel bileşenleri redükte glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px)'dir. Canlılar tarafından tüketilen oksijenin yaklaşık olarak % 4-5 gibi bir bölümü süperoksit anyonlarını oluşturmaktadır ve bu anyonlar SOD tarafından kolaylıkla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tekil oksijen radikaline dönüştürülürler. Hidrojen peroksit daha sonra GSH-Px tarafından su (H_2O) ve oksijene (O_2)'e dönüştürülmektedir. GSH-Px reaksiyonu sırasında tüketilen GSH redükte formuna glutatyon redüktaz (GR) tarafından dönüştürülmektedir. Buna rağmen, reaktif oksijen ara ürünlerinin oluşumu onları ortadan kaldıran antioksidan sistemlerin sınırlarının üzerine çıkarsa, oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (Galván-Arzate ve ark. 2005).

Metallotioneinler (MT) başta metal detoksifikasyonu olmak üzere, antioksidan savunma mekanizmalarında rol oynamaktadır. MT'lerin Zn ve Cu gibi esansiyel metallerin homeostasisindeki rolleri, serbest radikal süpürücüsü olarak fonksiyonları ve başta kadmiyum (Cd^{2+}), Civa (Hg^{2+}) ve kurşun (Pb^{+}) olmak üzere metal detoksifikasyonundaki rolleri yapılan çeşitli çalışmalarda ortaya koyulmuştur. Çeşitli metallere maruz kalınma sonucunda böbrek, karaciğer ve bağırsak gibi dokulardaki MT düzeylerinde dikkate değer bir artış meydana gelmektedir. Memelilerde temel düzeyde MT'ler en yüksek konsantrasyonda pankreatik hücrelerde mevcuttur. İndüklenmiş olarak ise en fazla konsantrasyon değişimi karaciğer ve böbrek hücrelerinde belirlenmiştir (Klaassen ve ark. 1999).

Memeliler üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda MT'lerin fizyolojik koşullarda *in vivo* olarak çinko (Zn^{2+}) ve bakır (Cu^{+})'a bağlandıkları; Cd^{2+} , bizmut (Bi^{3+}), platin (Pt^{2+}), gümüş (Ag^{+}) ve Hg^{2+} ile hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kompleks oluşturdıkları belirlenmiştir. Toksik etki gösteren metallerin eşit

dozları farelere uygulandığında en yüksek indüklenme metallotionein I (MT I)'de gözlenmiştir. Bu durum MT I'in metal toksisitesinden kaynaklanan hücre hasarlarını önlemede rol aldığı ve metal detoksifikasyonunda biyolojik belirteç olarak kullanılabileceğinin bir kanıtıdır (Miles ve ark. 2000).

Son yıllarda MT'lerin intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmasının, özellikle merkezi sinir sistemi hasarlarının tedavisine yönelik olumlu etkileri rapor edilmiştir (Chung ve West 2004). Ancak MT'ler son 40 yıldır biliniyor olmalarına rağmen fizyolojik fonksiyonları halen tam olarak aydınlatılamamıştır.

Artan kullanım alanı ve yüksek toksisitesi göz önüne alındığında talyum (TI) metali, bugünün yanı sıra gelecek için de potansiyel bir kirlilik kaynağı olarak göze çarpmaktadır. Daha basit maddelere bölünemediğinden çevrede kalır. Topraktaki, yer altı ve yerüstü sularındaki çok düşük konsantrasyonları dahi kirlilik açısından önemli kabul edilmekte, bazı bitkilerin bünyesinde birikebilmektedir. Bu nedenle çeşitli yollardan TI'a maruz kalmak insanlar ve tüm canlılar açısından gün geçtikçe kaçınılmaz hale gelmektedir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından TI toksisitesinin neden olduğu biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklere yönelik sonuçlar rapor edilmiştir (Hanzel ve ark. 2005; Galván-Arzate 2000; Leung ve Ooi 2000). Bu çalışmalarda çeşitli TI bileşiklerinin i.p. uygulanmasına bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres enzimlerinin aktivitelerindeki değişiklikler ve histopatolojik değişiklikler ağırlıklı olarak rat beyin hücrelerinde çalışılmıştır.

TI'un rat karaciğer hücreleri üzerinde neden olduğu patolojik ve biyokimyasal değişikliklere karşı MT'lerin etkilerine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. TI toksisitesinin memeli sistemler üzerinde neden olduğu hasara karşı, i.p. olarak uygulanan MT'lerin koruyucu etkilerinin belirlenebilmesi açısından, rat karaciğer hücrelerindeki oksidatif stresin değerlendirilmesi ve bu hücrelerin histopatolojik olarak incelenmesi bu çalışmanın konusunu oluşturmaktadır.

1.1. Talyum Metali ve Çevresel Önemi

TI 1861 yılında İngiliz kimyacı William Crookes tarafından keşfedilmiştir. Periyodik tabloda, 81 atom numarası ve 204.37 atom kütlesi ile grup III A elementi olarak sınıflandırılmaktadır. Bu gruba giren metaller elektropozitif olup, atom ağırlıkları arttıkça bazik karakterleride artış göstermektedir. 11.83 gr/cm^3 yoğunluğu ile ağır metal sınıfına girmektedir. TI tek değerlikli [TI (I); TI^{1+}] veya üç değerlikli [TI (III); TI^{3+}] olarak bulunabilir. Tek değerlikli TI iyonları sulu solüsyonlarda üç değerlikli analoglarına göre daha karardır. Tek değerlikli TI^{1+} iyonları elektron çifti alıcısı olarak davranır ve özellikle inorganik ve organik sülfür (S), karbon (C), fosfor (P) iyonları ile etkileşime girer. Üç değerlikli TI^{3+} formları tek değerlikli formlara göre daha kararlı organik bileşiklerdir. TI özellikle sülfat (TI_2SO_4), asetat ($\text{TI}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$) ve karbonat (TI_2CO_3) gibi TI (I) bileşiklerinde toksiktir. Sülfid (TI_2S) ve iovid (TII) daha az çözünürlüğe sahip olduklarından daha az toksik bileşiklerdir (Galván-Arzate ve Santamaria 1998, Tremel ve ark. 1997).

TI doğal dağılımlı bir ağır metaldir. Çevrede düşük konsantrasyonlarda bulunmakla birlikte geniş bir yayılıma sahiptir. Yer kabuğundaki konsantrasyonu $0.3\text{-}0.5 \text{ } \mu\text{g/g}$ arasındadır. Daha basit maddelere parçalanamadığından çevrede kalır. TI'un tüm formları canlı organizmalar için toksik olabilecek düzeylerde suda çözünürlüğe sahiptir. İnsanlar için Hg, Cd, Pb, Cu ve Zn' dan daha toksik olduğu bilinmektedir. TI bileşiklerinin sudaki yüksek çözünürlüğü nedeniyle tek değerlikli TI (TI^{1+}), çevreye kolaylıkla yayılabilir. Toprakten ekinlere transfer olur ve bitkilerde de gözlenir. Doğal olarak bulunmasının yanı sıra, çevreye insan aktivitelerinin bir sonucu olarak buhar, toz, sıvı ve katı atık olarak yayılabilir (Peter veViraraghavan 2005).

TI sülfürik asit üretiminde kullanılan sülfidlerin (Fe, Pb, Zn) maden filizlerinde düşük konsantrasyonlarda mevcuttur. Çimento endüstrisinde de açığa çıkmaktadır. Oto emisyonları ve fosfat gübrelerinin tarımsal amaçlı kullanımı ile çevreye yayılmaktadır. Granit ve manganer nodüllerinde yüksek oranda bulunmaktadır. Volkanik kayalarda ve bitkilerde tespit edilmiştir. Demir (Fe), Cd, ve Zn'nun arındırma işlemleri sırasında ortaya çıkmaktadır. Düşük sıcaklık

termometreleri, yarı iletkenler, boyalar, pigmentler, infrared spektrometreler ve ışın sayaçlarının üretiminde, yüksek kırılma indeksi sağlaması nedeniyle mücevher imalatı, kristal ve optik lens imalatında kullanılmaktadır. İleri teknolojide gün geçtikçe artan bir kullanım alanına sahip olması nedeniyle gelecek için de potansiyel bir kirlilik kaynağı olarak dikkat çekicidir (Galván-Arzate ve ark. 2000).

TI^+ geçmişte, tüberküloz ve sıtma ile mücadelede klinik amaçlarla, ayrıca tüy dökücü olarak kullanılmıştır. Radyoaktif bir TI bileşiği olan TI^+ 201-klorür günümüzde miyokard perfüzyon görüntüleme testlerinde, hastalara intravenöz (i.v.) enjeksiyonla uygulanmaktadır. Son 30 yıldır TI^+ -201 ile miyokard görüntülemesi, perfüzyon ve sarkolemmal membran bütünlüğünde ve sonuçta miyokard canlılığının değerlendirilmesinde klinik olarak önemli bir yöntem olarak kabul edilmektedir. TI^+ -201'in melanom metastazının belirlenmesi amacıyla kullanılması tıptaki bir başka uygulama alanıdır (Rettenbacher ve ark. 1998; Turgut ve Erselcan 2002).

Dünya Sağlık Örgütü'nün kullanılmaması yönündeki uyarısına rağmen, TI tuzları pek çok ülkede insektisit (böcek öldürücü) ve rodentisit (kemirgen öldürücü) olarak kullanılmaktadır. 1973 yılında Dünya çapında yıllık yaklaşık 15 tonluk TI üretiliyor olmasının yanı sıra 2000-5000 ton TI endüstriyel işlemler sırasında çevreye salınmaktadır (Galván-Arzate ve Santamaria 1998; Leung and Ooi 2000).

TI mesleki nedenlerle ve kaza sonucunda zehirlenmelere neden olmaktadır. Vücutta herhangi bir miktarda tespit edilmesi normal dışı bir durumdur. Endüstriyel olarak maruz kalınarak zehirlenmeye yönelik bazı vakalar bilinmektedir. Çeşitli endüstrilerin yanı sıra, özellikle çimento ve tuğla fabrikalarında atık olarak ortaya çıktığı ve tarımsal alanları kirlettiği belirlendikten sonra TI çevresel bir kirleticisi olarak giderek daha fazla önem kazanmıştır (Galván-Arzate ve Santamaria 1998, Galván-Arzate ve ark. 2005, Leung ve Ooi 2000; Peter ve Viraraghavan 2005).

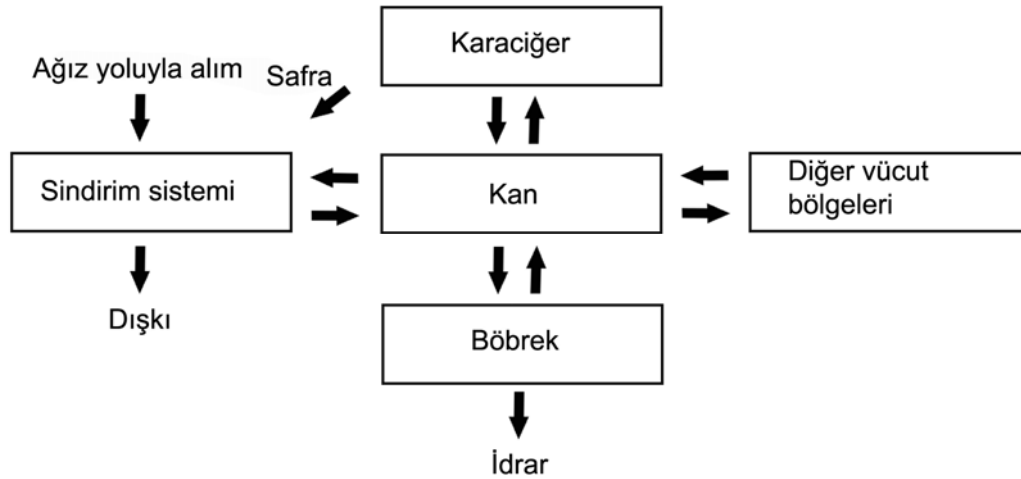
1.2. Talyum Metalinin Toksik Mekanizması

TI memelilerdeki letal dozu (LD_{50}) 5-70 mg/kg vücut ağırlığı arasında değişmektedir. Galván-Arzate ve ark. (2000) tarafından sıçanlarda LD_{50} 32 mg/kg i.p. olarak belirlenmiştir. Akut TI toksisitesine maruz kalmış insanlarda kusma, diare, saç dökülmesi, kardiovasküler bozukluklar, merkezi sinir sistemi hasarı ve depresyon gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır. TI toksisitesinin etkileri, sinir sistemi, akciğerler, kalp, karaciğer ve böbrekler üzerinde gözlenmektedir. Bu etkiler özellikle sinir hücreleri, böbrekler ve karaciğerdeki patolojik bulgular olarak gözlenmiştir. Kronik zehirlenmede gözlenen belirtiler ise, baş ağrısı, abdominal yaralar, saç ve vücut kıllarındaki dökülmelerdir. TI'un mutajenik (mutasyon oluşturan), karsinojenik (kansere neden olan) veya teratojenik (doğumsal hasara neden olan) etkileri bulunmamaktadır (Dmowski ve ark. 1998; Leonard ve Gerber 1997; Peter ve Viraraghavan 2005; Tsai ve ark. 2006).

TI vücuda solunum yoluyla, ağız yoluyla, dermal yolla veya damar yoluyla alınabilir. Diğer birçok metalin vücut dışına atılımında olduğu gibi, karaciğere gelen TI iyonlarının büyük bölümü safrayla birlikte ince bağırsağa, oradan da kalın bağırsağa verilerek dışkı yoluyla atılırlar. Yaklaşık % 35'lik bir bölümü ise, böbrekler yoluyla dışa atılır. Her iki yollarda atılım sırasında bazı geri emilimler gerçekleşmektedir. Geri emilim yoluyla hücrelere giren TI, glutatyona (GSH) ve MT'lere bağlanarak uzaklaştırılır (Moore ve ark. 1993). TI'un vücuttaki dağılımı ve vücut dışına atılımı Şekil 1.1' de gösterilmektedir.

TI metali hücrelerde, diğer ağır metaller gibi, proteinlerin sülfhidril gruplarına ve mitokondri membranlarına bağlanarak, enzim reaksiyonlarını inhibe etmektedir. Riboflavin ve riboflavin yapılı ko-faktörler ile ilişki kurduğu, bu sayede hücresel solunumu inhibe ettiği ayrıca kalsiyum homeostasisini etkilediği düşünülmektedir. TI^{+} özellikle hücrelerdeki potasyum (K) bağımlı işlemlere karışmaktadır. Herikisi de tek değerlikli iyonlar olmaları ve benzer iyonik kuvvete sahip olmaları nedeniyle TI^{+} hücre içi işlemlerde ve hücre içindeki birikimi açısından K'un tek değerlikli iyonunu (K^{+}) taklit edebilmekte, (Na^{+}/K^{+})-ATP az'a bağlı işlemlerde K^{+} gibi davranmaktadır. TI^{+} 'un tavşan böbreğinde (Na^{+}/K^{+})-ATP azı'na K^{+} 'a oranla 10 kat daha fazla ilgi göstermektedir. Tek değerlikli

katyonlarla aktive olabilen pirüvat kinaz, ATP az, aldehit dehidrojenaz gibi enzimlerin aktivasyonunda K^{+} 'un yerine geçerek inhibisyona neden olabilmektedir. Bu yolla özellikle hücredeki membranlı yapılar üzerinde hasar meydana getirerek çeşitli hücresel fonksiyonların zarar görmesine neden olmaktadır (Galván-Arzate ve Santamaria 1998).



Şekil 1.1. Talyum metalinin vücuttaki dağılımı ve vücut dışına atılımı (Moore ve ark. 1993)

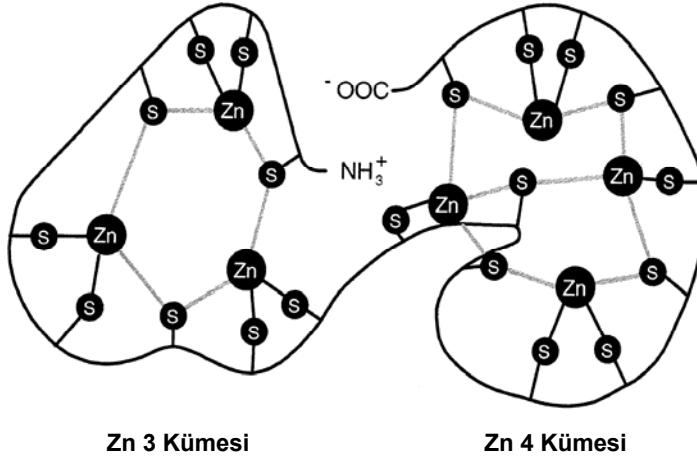
1.3. Metallothioneinler

MT' ler ilk olarak Margoshes ve Vallee (1957) tarafından at böbreğinde Cd bağlayıcı bir protein olarak tanımlanmış, daha sonra Kagi ve Vallee (1960) tarafından saflaştırılarak karakterize edilmiştir. MT'ler sitozöl ve çekirdekte bulunan, hücre dışında da tanımlanmış olan enzimatik olmayan düşük moleküler ağırlıklı (6-7 kDa) sisteince zengin metal-bağlayıcı proteinlerdir (Lynes ve ark. 2006). Hayvanlar aleminde, yüksek bitkilerde, ökaryot mikroorganizmalarda ve pek çok prokaryotta mevcuttur. MT genleri çeşitli fizyolojik ve toksikolojik uyarıcılar tarafından indüklenmektedir. MT'deki sisteinler türler boyunca tam olarak korunduğundan, sisteinlerin MT'lerin fonksiyonu için kesin olarak gerekli olduğu ve MT lerin yaşamsal öneme sahip moleküller oldukları düşünülmektedir. MT'lerin özellikle grup I b ve II b geçiş metallerine yüksek affinite gösterdikleri bilinmektedir. Özellikle Zn ve Cu homeostasisini düzenleyici ve çeşitli metallerin yüksek dozlarındaki toksisitelerini önleyici özellikleriyle MT'ler, metal

homeostasisi ve detoksifikasyonunda rol oynamakta, ayrıca serbest radikal süpürücüsü olarak görev yapmaktadırlar. MT'ler yüksek metal içerikleri, alışılmışın dışındaki biyolojik yapıları, hızlı metal transferi yapabilmelerini ve metal-düzenleyici özellik gösterebilmelerini sağlayan yüksek derecedeki kinetik özellikleri ile diğer tüm metalloproteinlerden ayrılmaktadırlar (Kagi 1991; Miles ve ark. 2000).

1.3.1. Metallotioneinlerin Yapısı

MT'lerin kendi aralarındaki çeşitlerine göre ve türden türe aralarında farklılık olsa da sekans ve homolojide benzerlik gösterirler. Yapıları x-ışını kristalografi ve NMR spektroskopi çalışmaları ile aydınlatılmıştır. MT'ler, N-terminalinde asetilmethionin, karboksil terminalinde ise sıklıkla alanin içeren tek zincirli polipeptitlerdir. Primer yapılarında yüksek lizin ve serin içeriğine sahiptirler. Hemem hemen Tüm MT'ler karakteristik cys-x-cys, cys-x-y-cys ve cys-cys sekanslarına sahiptir. Bu dizilerde x ve y sistein haricindeki diğer aminoasitlerdir. MT'ler histidin aminoasitinden ve aromati aminoasitlerden yoksundurlar. Birincisi 11 ikincisi 9 adet olmak üzere toplam 20 adet korunmuş sistein kalıntısına sahip iki alt birimden oluşan, 61-62 aminoasitlik polipeptitlerdir. Her 20 sistein için metal-tiolat kümelerini oluşturan 7 adet bivalent iyon mevcuttur. Bu sayede MT'ler 7-10 g atom metal/mol MT olmak üzere yapılarına metalleri bağlayabilmektedirler. Metal kompozisyonu türe, dokuya, gelişim kademesine ve organizmanın metale maruz kalma düzeyine göre değişiklik göstermekle birlikte memelilerde MT'lere dominant olarak Zn'nun bağlı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, iki alt kümenin de metallere karşı ilgisinde dikkate değer bir farklılık vardır. Metallerle etkileşimleri ve tüm biyolojik fonksiyonlarının ağırlıklı olarak merkaptid bağlarının (sülfür-metal bağları) kimyasal yapısıyla ilgili olarak gerçekleşen reaksiyonlara bağlı olarak gerçekleştiği bilinmektedir (Altuner 2005; Boulanger 1983; Hidalgo 2001; Klaassen ve ark. 1999; Miles ve ark. 2000; Suzuki ve ark. 2002). MT'in şematik yapısı Şekil 1.2'de gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Metallothioneinin şematik yapısı (Fischer ve Davie 1998)

1.3.2. Memelilerdeki MT İzofomları

Yapısal özelliklerine göre MT'ler çeşitli ailelere ayrılırlar. İlk olarak tanımlandıkları at böbreğindeki MT'ler ile benzerlikleri göz önüne alınarak, Sınıf I MT'ler yüksek derecede korunmuş sistein kalıntılarına sahip polipeptitlerdir ve memeli MT'lerini de içerisinde bulunduran sınıftır. Sınıf II MT'ler at böbreğindeki ile karşılaştırıldığında daha az oranda korunmuş sistein kalıntısına sahiptirler. Sınıf III MT'ler ise, yalnızca bitkilerde ve bazı mikroorganizmalarda bulunur. Translasyonel olarak sentezlenmeyen metal-tiolat polipeptitlerdir (Kagi 1991).

Memeli MT'leri MT-1, MT-2, MT-3 ve MT-4 olmak üzere dört alt gruptan oluşmaktadır. MT-1 ve MT-2 izofomları yük bakımından farklılık gösterir ve farklı dokularda en yaygın olarak ifade edilmekle birlikte karaciğer, pankreas ve böbrekte daha fazla bulundukları bilinmektedir. MT-3 temel olarak beyin dokusunda mevcuttur. Son yıllarda üreme ile ilgili dokularda, mide ve kalpte de ifade edildiği ortaya koyulmuştur. MT-4 ise epitelyum hücrelerinde sentezlenmektedir (Miles ve ark. 2000).

1.3.3 Metallotioneinlerin Fonksiyonları

1.3.3.1. Esansiyel Metallerin Homeostasisindeki Roller

Apo-MT (Herhangi bir metalle bağlanma yapmamış olan MT) serbest sülfhidril gruplarının Zn' ya olan yüksek ilgisi nedeniyle iyi bir Zn alıcısıdır. Bununla birlikte, birtakım değişim reaksiyonlarıyla Zn, MT' den başka proteinlere aktarılabilir. Sülfhidril gruplarının Zn' ya olan ilgisi MT'i etkili bir iyon süpürücüsü yapar. Gelişim ve protein sentezi sırasında Zn absorpsiyonu yapabilmesi, çeşitli enzimler ile transkripsiyon faktörleri için Zn vericisi olarak görev yapması nedeniyle MT'in Zn homeostasisi için yaşamsal bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir (Klaassen ve ark. 1999). Son yıllarda yapılan araştırmalarda, GSH ve GSSG (redükte ve okside glutatyon) gibi redoks moleküllerinin de Zn bağlı MT' den (Zn-MT) Zn salınımını düzenlediği ortaya çıkarılmıştır. Bu bağlamda, tiolat ligandlarının oksidasyonu proteinden metal salınımına neden olmaktadır (Vašák 2005). Normalden fazla MT sentezleyebilen transgenik farelerin Zn eksikliğine karşı daha dirençli oldukları görülmüştür (Dalton ve ark. 1996).

Cu metali Cu/Zn Süperoksit dismutaz ve sitokrom c oksidaz gibi birçok enzimin yapısal ve katalitik özellikleri için yaşamsal bir öneme sahiptir. Özellikle karaciğerde bakır birikimine neden olan Wilson hastalığına sahip bireyler ve hayvan modeller üzerinde yapılan çalışmalar MT'in karaciğerdeki en önemli Cu-bağlayıcı protein olduğunu ortaya koymuştur. Cu' ın yüksek dozlarında oluşan toksik etkisine karşı MT'lerin koruyucu etki gösterdikleri belirlenmiştir. Fetusta Cu eksikliğine neden olan Menkes hastalığına sahip bireyler ve hayvan modeller üzerinde yapılan çalışmalarda ise MT'in yaşam süresinin uzamasına etki ettiği belirlenmiştir. Bu sayede MT'nin Cu'ın vücuttaki normal biyolojik aktivitesini düzenleyici rol oynadığı ortaya koyulmuştur (Klaassen ve ark. 1999; Nartey ve ark. 1987; Suzuki ve ark. 2002).

1.3.3.2. MT'lerin Metal Detoksifikasyonundaki Önemi

Yapılan pek çok çalışmada, metallerin toksik olmayan düşük dozlarına maruz kalmanın daha yüksek toksik dozlarına karşı bir tolerans sağladığı belirlenmiştir. Sıçanlarda düşük dozda Cd uygulamasından sonra Cd'un yüksek konsantrasyonuna karşı oluşan toleransın karaciğer MT konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu belirlenmiştir (Klaassen ve Liu 1997). Düşük dozda uygulanan Cd, Zn gibi metaller MT sentezini indüklemektedir. Bazı metaller MT' lere bağlanıp, sentezini indüklerken, bazılarının sentezini indüklediği fakat MT ile *in vivo* olarak bağlanma yapmadıkları bilinmektedir. Kurşun gibi bazılarının ise, MT'lere bağlanmanın ve indüklemenin yanı sıra hücre içerisinde detoksifikasyonlarını sağlayan başka proteinlere de bağlandıkları veya sentezlerini indükledikleri bilinmektedir (Miles ve ark. 2000).

Metal detoksifikasyonunda MT indüklenmesinden bir önceki basamakta GSH savunma mekanizması yer almaktadır. Bunun yanı sıra MT'lerin metal detoksifikasyonundaki aktivitesini GSH ve GSSG varlığında gerçekleşen MT'den Zn'nun salınımının etkilediği düşünülmektedir. (Davis ve Cousins 2000; Kang 1999). Bu sayede Zn, *in vivo* olarak MT'e bağlanabilen metallerle yer değiştirebilmektedir. Serbest Zn'nun mikrozomal oksidasyonları önleyerek lipid peroksidasyonunu önlediği ve biyolojik membranların stabilitesini sağladığı bilinmektedir. MT' ler Zn ile birlikte metallerin hücre içerisine alınımını azaltarak da metallerin toksik etkilerini azaltabilirler (Cagen ve Klaassen 1979).

Farklı metallerin toksik dozlarının kültürdeki fare hepatosit hücreleri üzerine uygulandığı bir çalışmada, en fazla indüklenmenin MT-I genlerinde gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu nedenle MT-I'in metal toksisitesinin önlenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Durnam ve Palmiter 1984).

1.3.3.3. Metallothioneinlerin Antioksidan Savunma Mekanizmalarındaki Önemi

Metaller tarafından indüklenmelerinin yanı sıra MT'ler etanol, parakuat, tert-butil hidroperoksit gibi kimyasallar ve ağır egzersiz, soğuğa maruz kalma gibi

nedenlerle de indüklenebilmektedir. MT sentezinin indüklenmesinin hücrelerin serbest radikal hasarına karşı duyarlılıklarını azalttığı görülmüştür (Ghoshal ve ark. 1998). MT'lerin hidroksil radikalleri için birinci derecede hedef moleküller olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra in vitro çalışmalar MT'lerin hidrojen peroksit, süperoksit anyonu, ve peroksil radikali ile de reaksiyona girebildiklerini ortaya koymaktadır (Miles ve ark. 2000). HL-60 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, H_2O_2 'in MT'lerdeki tiolat gruplarına karşı ilgisinin, GSH'daki sülfhidril gruplarına oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir (Quesada ve ark. 1996). MT, reaktif oksijen türevleri toksisitesinden birinci derecede sorumlu olan hidroksil radikalını GSH'a oranla 300 kez daha fazla yakalama kapasitesine sahiptir. MT'deki tüm tiol grupları metallere bağlansa bile, molekülün metallere ve reaktif oksijen türevlerine karşı reaktivitesi devam eder (Kondoh ve ark 2003; Min ve ark 2005, You ve ark. 2002). Irato ve ark. (2001) çalışmalarında makrofajlarda kimyasal olarak stimüle edilen süperoksit anyonu üretimine karşı Cd ile indüklenen MT'in etkilerini araştırmış; MT indüklemesi yapılan hücrelerde süperoksit anyonunun miktarının azaldığını, bununla birlikte MT düzeyinde de azalma olduğunu belirtmişlerdir.

Hücre dışı MT'in lenfosit sayısındaki artışı indüklediği bilinmektedir. Bu sayede bir immün cevap oluşturmak yoluyla da hücrelerin metal toksisitesine karşı direncini arttırabilirler (Lynes ve ark. 1993).

1.3.4. Metallotioneinlerin Hücresel Yıkımı

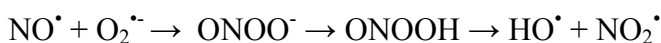
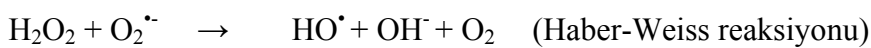
İn vitro çalışmalar MT'lerin yıkımının ağırlıklı olarak lizozomlarda katepsin B ve katepsin L enzimleri ile gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Bir kısım yıkım reaksiyonu ise sitoplazmada bulunan proteazlar tarafından gerçekleştirilir. Metal-bağlı MT'lerin yarı ömrü apo-MT'lere göre daha uzundur. Bu nedenle MT'lerin yarı ömrü bağlı bulundukları metale göre değişiklik göstermektedir. İn vitro olarak pH'ın azaltılması MT'den metal salınımını arttırmaktadır. Lizozomların 3.6-5 arasında değişen pH aralığında MT bağlı bulunduğu metalden ayrılmaktadır. Lizozomlarda yıkımı gerçekleştirilen MT'lerin hücre tarafından kullanılabilir bileşenleri, yeniden sitoplazmaya

verilmektedir. Hücre tarafından kullanılamayan bileşenler ise ekzositoz ile hücre dışına atılır ya da zarla kaplı artık cisim adı verilen yapılar şeklinde hücrede kalırlar. Bu artık cisimler zamanla lipofuksin adı verilen pigment birikimlerini oluştururlar (Miles ve ark 2000).

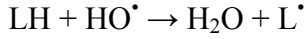
1.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Lipid peroksidasyonu

Reaktif oksijen türleri (ROS), yükseltgenme-indirgenme ve elektriksel uyarılmanın farklı basamaklarındaki süperoksit anyonu radikali ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 , hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$), hidroklorik asit ($HOCl$), nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi oksijen içeren hidrojenli, klorlu ve azotlu bileşikler temsil eder. $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$ ve $NO^{\cdot}$ gibi bazıları serbest radikallerdir. Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren ($\cdot$ ile sembolize edilir) atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller biyomembranlardaki doymamış lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrenel bileşenlerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olabilirler. Hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$) bilinen en reaktif radikaldır. H_2O_2 , $HOCl$ ve $ONOO^-$ gibi endojen prooksidanlarda $HO^{\cdot}$ oluşumu ile sonuçlanan parçalanma reaksiyonlarına girebildiklerinden dolayı canlı hücreler için potansiyel olarak zararlı sayılabilecek moleküllerdir.

H_2O_2 , H_2O 'ya detoksifiye edilmezse metal (demir) ile katalize olan Haber-Weiss ya da Fenton reaksiyonları sonucunda $HO^{\cdot}$ meydana gelebilir. $HO^{\cdot}$ son derece reaktif ve kısa ömürlü bir molekül olduğundan, biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonunu başlatma potansiyeline sahiptir.



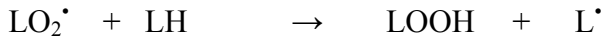
Canlı hücrelerde $\text{HO}^\bullet$, özellikle membran fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFA) ilgi duymaktadır. $\text{HO}^\bullet$ PUFA zincirindeki karbon atomlarının birinden hidrojen çıkararak su oluşturur.



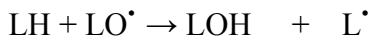
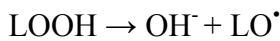
Lipid-Karbon merkezli alkil radikali ($\text{L}^\bullet$), bir molekül oksijenle birleşerek peroksil radikalini oluşturur ($\text{LO}_2^\bullet$).



Peroksil radikali diğer PUFA alkilerine karşı reaktivite göstererek onlardan hidrojen koparır. Bu reaksiyon sonucunda peroksil radikali açığa çıkan hidrojeni yapısına alarak lipid hidroperoksitlerini oluşturur. Ayrıca yeni bir lipid alkil radikali meydana gelir.



LOOH oldukça kararsız bir moleküldür. Parçalanarak PUFA ile reaksiyona girebilecek ve lipid-karbon merkezli radikali yeniden oluşturabilecek ikincil bir lipid alkoksil radikali meydana getirir.



LOOH yıkımı malondialdehit ve 4-hidroksinoneal gibi çok sayıda sitotoksik ürünün oluşumuna da neden olmaktadır. Lipid radikalleri sitotoksik aldehitlerdir. Membran proteinlerine zarar verebilmekte, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmektedirler. Lipidlerden araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise, “non-enzimatik lipid peroksidasyonu” adı verilir.

Lipid peroksidasyonu çeşitli serbest radikal kaynaklarının yanı sıra, metallerin varlığında da artış gösterir. Bu metaller redoks katalizörü olarak görev yaparlar. Süperoksitin ve hidrojen peroksitin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalize ederler.

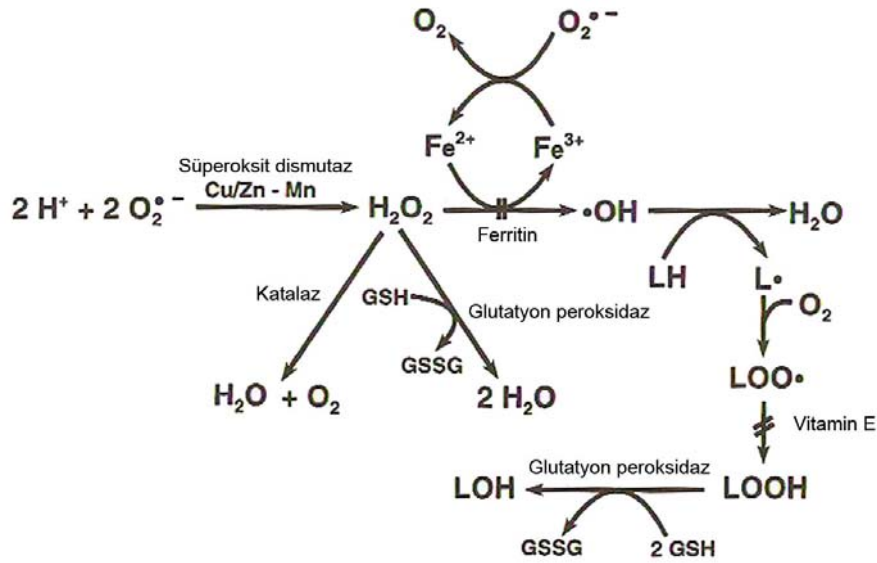
Lipid peroksidasyonu, toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılmazsa, otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam etmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri gibi antioksidan enzimler de, hidroksil radikalının hücrelerdeki birikimini önleyerek serbest radikal oluşumuna bağlı lipid peroksidasyonunu önleyebilmektedirler.

Lipid peroksidasyonunun başlangıç reaksiyonları 3 mekanizma ile gerçekleşmektedir.

Birincisi UV, iyonize radyasyon ve kimyasal etkenler gibi dış kaynaklı faktörlerin neden olduğu enzimatik olmayan mekanizmadır. Yarı-enzimatik olan ikinci mekanizma, mitokondriyal ve mikrozomal elektron transport zincirlerindeki NAD(P)H bağımlı oksidazlar tarafından oluşturulan $O_2^{\bullet}$ nin neden olduğu ve non enzimatik olarak devam eden lipid peroksidasyonudur. Son olarak lipid peroksidasyonu tamamen enzimatik olabilir. Araşidonik asite okside olan hem (hemoglobinde bulunan demirli porfirin proteini) içeren siklooksijenazlar ve demir iyonu içeren lipooksijenazlar tarafından yürütülen ve serbest radikal oluşumuyla sonuçlanan reaksiyonlar gerçekleşmektedir (Tomasi 2003).

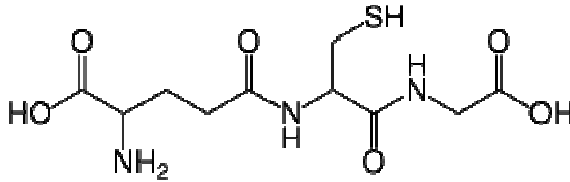
1.5. Antioksidan Mekanizmalar

ROS oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta çeşitli savunma mekanizmaları oluşmuştur. “Antioksidan savunma sistemleri” veya “antioksidanlar” olarak bilinen bu mekanizmalar peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Endojen antioksidanlardan oluşan savunma sisteminin temel bileşenleri GSH, SOD ve GSH-Px’ dir. Reaktif oksijen türevlerinin metabolizması ve inaktivasyonundaki hücrel savunma mekanizmaları Şekil 1.3’te gösterilmektedir.



Şekil 1.3. Reaktif oksijen türevlerinin metabolizması ve inaktivasyonundaki hücresel savunma mekanizmaları (Plaa ve Hewitt 1998)

1.5.1. Glutasyon

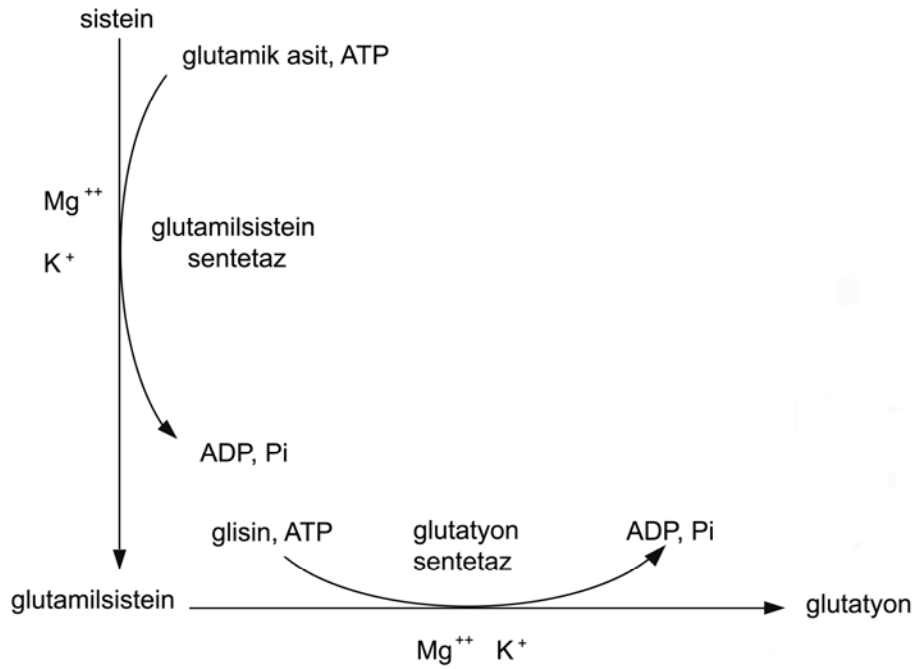


Şekil 1.4. Glutasyon molekülünün kimyasal yapısı

Tiol içeren bileşikler kolaylıkla okside ve redükte formlara dönüşebilmeleri nedeniyle çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarda yaşamsal bir öneme sahiptirler. Glutasyon, karaciğerde, genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan sentezlenen, glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptiddir. Biyolojik dokularda Glutasyon'un temel olarak redükte formunda bulunduğu bilinmektedir. GSSG, glutasyon Redüktaz (GR) enzimi sayesinde kolaylıkla GSH'a dönüşebilir (Hissin ve Hilf 1976).

Hücre içindeki düşük molekül ağırlıklı protein olmayan tiollerin en az %90'ını GSH oluşturmaktadır. Karaciğerdeki GSH konsantrasyonu ise, yaklaşık

olarak böbreklerdekinin iki, akciğerlerdekinin ise üç katından daha fazladır (Plaa ve Hewitt 1998).



Şekil 1.5. Glutasyon sentez yolu

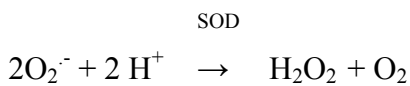
Glutasyon, canlılarda çeşitli kimyasalların biyoaktivasyonu sonucu ortaya çıkan veya moleküler oksijenin metabolize edilmesiyle oluşan hücresel hasarların önlenmesinde rol alan başlıca koruma sistemidir. Çeşitli bileşiklerin ve metabolitlerinin elektrofilik merkezlerini enzimatik ve kimyasal mekanizmalar yoluyla tioeter bağlarına çevirirken aynı zamanda da hidroperoksitlerin glutasyon peroksidaz bağımlı yıkımında kofaktör olarak görev yapmaktadır. GSH serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSSG protein sülfhidrilleri ile yer değiştirerek protein-glutasyon karışımı disülfidleri oluşturabilir. Aminoasitlerin membrandan transportunu sağlar. % 15-20 oranındaki bir GSH eksikliği, toksik maddeler ve metabolitlerinin yaratacağı hasara karşı hücreleri savunmasız bırakarak hücre hasarı ve ölümüne neden olabilir (Akkuş 1996; Pompella 2002).



Glutasyon molekülünün kimyasal yapısı Şekil 1.4'te, glutasyon sentez yolu ise Şekil 1.5'te gösterilmiştir.

1.5.2. Süperoksit Dismutaz

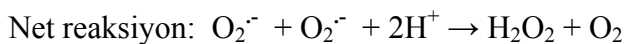
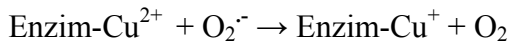
Süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) oksijenin indirgenmesi sonucu ortaya çıkan bir serbest radikaldir. Süperoksite karşı, vücuttaki temel enzimatik koruyucu süperoksit dismutaz enzimidir (SOD; EC1.15.1.1). SOD'lar süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen metalloenzimlerdir. Reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleşir.



Enzimin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerinden korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD'ın 4 izoformu bulunmaktadır. Bakır-Çinko SOD (Cu/Zn-SOD), manganez SOD (Mn-SOD), ekstraselüler SOD (EC-SOD) ve demir SOD (Fe-SOD). Cu/Zn SOD ökaryotlarda bulunur ve temel olarak sitozöl ve nukleusta yer almaktadır. Fe-SOD ve Mn-SOD hem prokaryot hem de ökaryotlarda mevcuttur. Mn-SOD mitokondrilerde yer alan tetramerik bir enzimidir. Fe-SOD memelilerde görülmez. EC-SOD ise hem prokaryot hemde ökaryotlarda mevcut olup, memelilerde de görülmektedir ve ekstraselüler matrikste yer alır (Whitaker 2002).

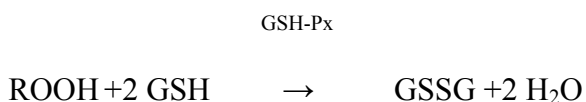
Tüm izomerler arasında hücrelerde en bol bulunan izomer Cu/Zn-SOD'dır. Yaklaşık 15.600 -16.500 D moleküler ağırlığındaki alt ünitelerden oluşan bir dimerdir. Her bir alt ünite bir zincir içi disülfid bağı, bir asetillenmiş terminal amino grubu ile bir Cu ve bir Zn atomu içeren bir aktif bölge mevcuttur. Cu^{+2} iyonu, SOD enzim aktivitesi için şarttır. Zn^{+2} ise Cu^{+2} ile birlikte enzim stabilitesinin sağlanmasında görevlidir. Cu/ Zn-SOD aktivitesi pek çok dokuda mevcut olmakla birlikte, özellikle karaciğer ve böbrek gibi metabolik açıdan aktif

dokularda yoğun olarak gözlenir. Cu/Zn-SOD enzimdeki Cu^{+2} iyonu dönüşümlü yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları ile dismutasyonu katalizlemektedir (Akkuş 1996).



1.5.3. Glutatyon Peroksidaz

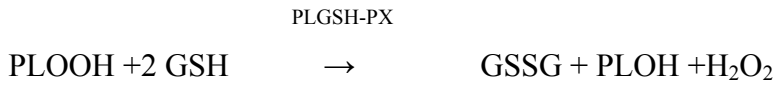
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px; EC 1.11.1.9) biyomembranları ve diğer hücrel bileşenleri oksidatif hasara karşı koruyan bir selenoenzimdir. Yaklaşık 85.000 D molekül ağırlığında tetramerik yapıdadır. Sitozölde bulunur ve 4 adet selenyum atomu içerir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



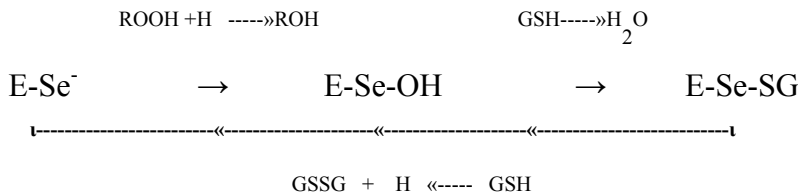
ROOH, H_2O_2 gibi bir hidroperoksit, tert-bütil hidroperoksit, kümene hidroperoksit gibi hidroperoksitlerdir.

4 çeşit GSH-Px tanımlanmıştır. Hücrel glutatyon peroksidaz (cGSH-Px), fosfolipid hidrojenperoksit glutatyon peroksidaz (PHGSH-Px), plazma glutatyon peroksidaz (pGSG-Px), gastrointestinal glutatyon peroksidaz (gi-GSH-Px). Bir diğer tip enzim ise, GSH-Px aktivitesine sahip fakat selenyum bağımsızdır. Endojen ve ksenobiyotik elektrofillerin glutatyon bağımlı nükleofilik yer değiştirme ve eklenme reaksiyonlarını ve H_2O_2 dışındaki organik hidroperoksitlerin indirgenme reaksiyonlarını katalizler.

PHGSH-Px membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.



GSH-Px' in selonat şekli (E-Se⁻) peroksit substratını alkole redüklerken, kendisi de okside selenik asite (E-Se-OH) dönüşür. Bu aşamada GSH reaksiyona katılarak selenosülfit (E-Se-SG) oluşumuna yol açar. İkinci bir glutatyonun selenosülfite bağlanması ile enzim, aktif formu olan selonat formuna dönerken, glutatyon okside hale dönüşür.



Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH'a dönüşür.

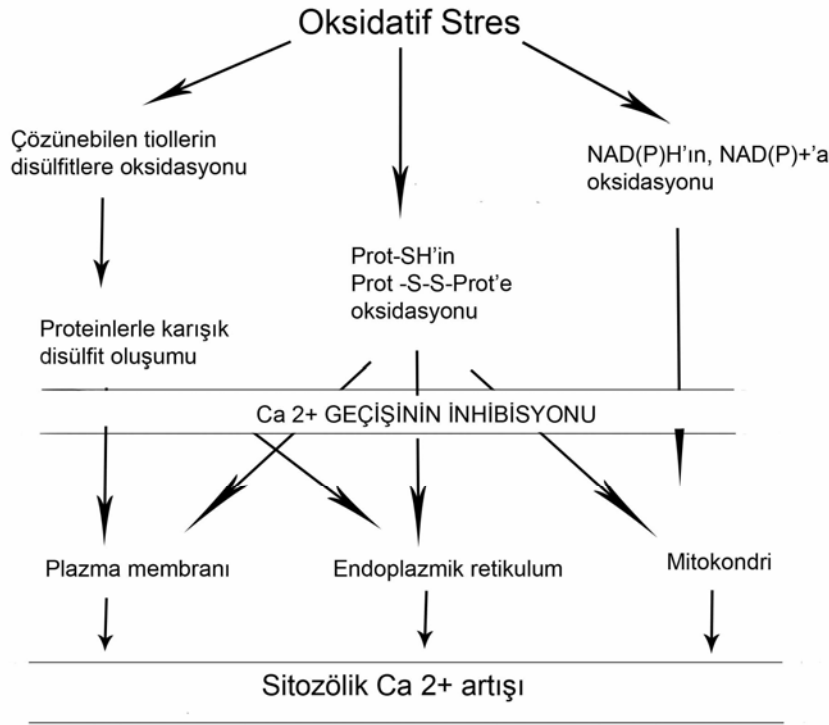


Fagositlerde bulunan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, solunum patlaması sırasında oluşan serbest radikallerin neden olduğu peroksidasyondan hücreleri korur. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır (Akkuş 1996; Whitaker 2002).

1.6. Oksidatif Strese Bağlı Olarak Meydana Gelen Hücresel Değişiklikler

Hücrede ve zarlı yapılardaki şişme, hipoksik ve toksik olayların neden olduğu hasarın ilk belirtisidir. Bu durum, sitozölik serbest kalsiyum iyonu (Ca²⁺) seviyesindeki artıştan kaynaklanmaktadır.

Hücrede meydana gelen son değişiklik ise geri dönüşümsüz hücre hasarıdır. Hücre morfolojisinde oksidatif strese bağlı olarak meydana gelen değişiklikler hücre iskeletinin zarar görmesinin bir sonucudur. Doku hasarına bağlı olarak ortaya çıkan inflamasyonda, lökositler tarafından süperoksit anyon radikali ve H_2O_2 üretimi gerçekleşir ve lizis başlar. Oksidan üretimi GSH'un yükseltgenmesine, NAD kaybına, poli-ADP riboz polimeraz aktivasyonuna eşlik eden tek zincir DNA kırılmalarına, hücresel ATP kaybına ve hücre içi serbest Ca^{2+} seviyesinde artışa neden olmaktadır. Hasarlı ve ölüme gitmekte olan hücrelerde şişme ve hücre zarında balonlaşma gibi değişiklikler meydana gelir. Hücre zarındaki balonlaşma, hücre içi GSH düzeyi ve Ca^{2+} homeostasisindeki değişikliğe bağlı olarak hücre iskeletinin organizasyonunun bozulmasının bir sonucudur. Buna, mitokondri ve diğer organellerdeki şişme eşlik eder. Sitozölik Ca^{2+} seviyesindeki artış, ağır metaller, organik sülfhidril reaktifleri ve oksidanların varlığında mitokondri zarlarının geçirgenliğinde bozulmaya yol açar. Mitokondri zarlarının geçirgenliğindeki bu bozukluk mitokondriden sitoplazmaya kontrolsüz olarak Ca^{2+} iyonları ve diğer iyonların salınımına yol açmaktadır. Mitokondri matriksinde proteinlerden oluşan koloidal bir karışım kalır. Sitoplazmadan mitokondri içine su girişi gerçekleşir ve bu durum mitokondrilerde şişme ile sonuçlanır (Duchen 2000; Plaa ve Hewitt 1998). Hücrede oksidatif strese bağlı olarak gelişen olaylar Şekil 1.6'da şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1.6. Hücrede oksidatif strese bağlı olarak gelişen olaylar (Plaa ve Hewitt, 1998)

1.6.1. Hücrede Adaptasyon, Nekroz ve Apoptoz

Hücreler, çeşitli fiziksel ve patolojik uyarılara maruz kaldıklarında adaptasyonla vücuttaki metabolik işlemlere ve enerji ihtiyaçlarına cevap oluştururlar. Adaptasyon; hücrelerin fonksiyonunda veya morfolojisinde çevre koşullarının etkisiyle oluşan değişiklikleri geri dönüşümlü olarak ayarlayan bir mekanizmadır. Eğer uyarılar ortadan kalkarsa, hücreler normal durumlarına geri dönerler. Karsinojenik kimyasallarla uzun süre uyarılma gibi belirli durumlarda, geri dönüşümlü hücresel değişiklikler geri dönüşümsüz hale gelebilir. Eğer dış uyarı hücrenin uyum kapasitesini aşarsa geri dönüşümsüz hücre hasarları meydana gelir ve sonunda hücre ölümleri oluşur. Oksidatif strese maruz kalan bir hücre ölüme gidebilir.

Hücre ölümü iki mekanizma yoluyla gerçekleşmektedir. “Nekroz” ve “Apoptoz”. Oksidatif stres bu iki olayın ortaya çıkışında pek çok nedenin arasında önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin kültürdeki memeli hücrelerine H_2O_2 'in milimolar (mM) düzeyde ilave edilmesi nekroza neden olurken, daha düşük

seviyedeki H_2O_2 , apoptoz'u tetiklemektedir. Nekrotik hücre ölümü sırasında organellerde şişme, mitokondri, peroksizom ve lizozom membranlarının yapısal bütünlüğünde bozulma meydana gelir. Sonunda hücre zarında meydana gelen parçalanma ile birlikte çeşitli enzimleri ve pro-oksidanları bulunduran hücre içeriği dağılarak komşu hücreleri etkilemektedir. Apoptoz hücrenin içsel intihar mekanizmasıdır. Apoptoz'a giden hücre içeriğini dış ortama bırakmaz ve genel olarak apoptoz çevredeki hücreleri etkilemez (Aldırmaz 2004; Halliwell ve Gutteridge 2007).

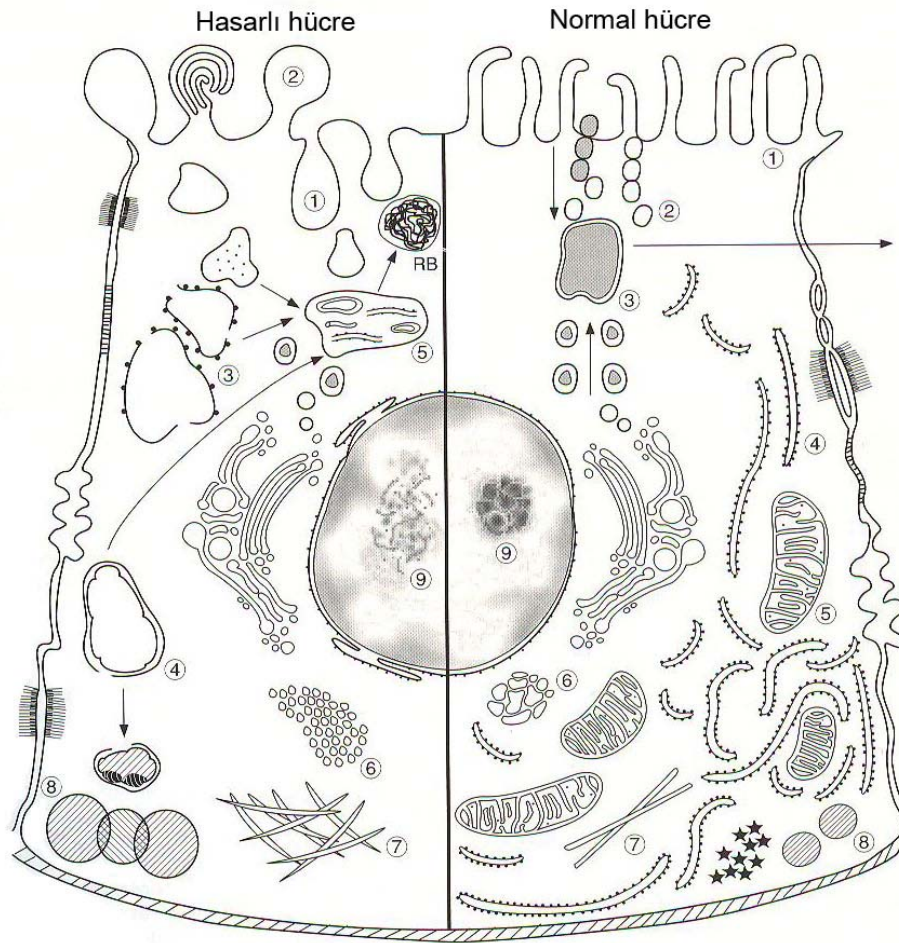
Nekroz'a giden hücrelerde şişme ve sitoplazmadaki ezinofilik granüllerde artış meydana gelmektedir. Ribozomların kaybına bağlı olarak bazofilik özellik azalır. Sitoplazmadaki vakuollerde artış ve mitokondrilerde şişme gözlenir. Nekrozun dokularda farklı çeşitleri görülebilmektedir. "Pıhtılaşan nekroz" hücrenin artan asiditesine bağlı olarak yapısal ve enzim proteinlerinin denatürasyonu ile gerçekleşir. Hücreler ana hatlarını nisbeten korurlar. Asidik sitoplazma ezinofilik hale gelir. "Sıvılaşan nekroz" ölü hücrelerin enzimatik parçalanması sonucunda meydana gelir. Dokular parçalanan, akışkan hücrelerden ibarettir. "Kazeöz nekroz" nekrotik alanda peynire benzeyen oluşumlarla karakterizedir. Pıhtılaşan nekroza farklı olarak doku yapısı tamamen bozulur. "Yağlı nekroz" yağlı dokularda enzimlerin lipolitik etkilerinin sonucunda ortaya çıkar. Pankreatik hasar nedeniyle aktif pankreatik enzimlerin dokulara salınımı sonucunda yağ hücrelerinin membranları zarar görür. Hücreler yağ hücreleri tarafından salınan serbest yağ asitlerine uzun süre maruz kaldıklarında sodyum, potasyum ve kalsiyumla bağlanarak sabunlaşır (Kumar ve ark. 2003).

Apoptoz'a giden hücrede ise büzülme gerçekleşir. Sitoplazmada balonlaşma ve sitoplazmik içerikte büzülme gözlenir. Çekirdek zarının çevresinde heterokromatin birikimler meydana gelir. Organeller hücre fragmentlerine ayrılınca dahi yapılarını korumaktadır. Hücre küçük fragmentlere ayrılarak apoptotik cisimcikler' i oluşturur. Komşu hücreler ve bölgesel makrofajlar apoptotik cisimcikleri fagosite ederek inflamasyonun başlamasını önlemektedir (Haschek ve Rousseaux 1998).

Geri dönüşümlü hücre hasarının belirtileri ise hücrelerde şişme (hidrofobik şişme ve dejenerasyon olara da adlandırılır), yağlı değişiklik ve hücre yüzeyindeki

balonlaşmalardır. Hücre şişmesi sitoplazmadaki su içeriğinin artmasının bir sonucudur. Hücre büyük, soluk renkli bir sitoplazmaya ve normal olarak lokalize olmuş bir çekirdeğe sahiptir. Bu değişiklik hücre zarındaki hasara bağlı olarak iyonik ve ozmotik dengelerin bozulması sonucunda meydana gelmektedir (Haschek ve Rousseaux 1998).

Hücrede meydana gelen adaptasyon olayları morfolojik değişiklikler olarak mikroskopta gözlenebilir. Bu değişiklikler hücre büyüklüğündeki artış (hipertrofi), hücrelerin sayıca artması (hiperplazi), hücrelerin boyutundaki azalma (atrofi), hücre çoğalmasının durması (aplazi), hücre sayısının azalması (hipoplazi) ve normal dışı hücre gelişimi (diplazi) şeklinde meydana gelebilir (Brown 2002). Bunun yanı sıra çeşitli maddelerin normal dışı miktarlarının hücre sitoplazması, organeller veya çekirdekte biriktiği gözlenebilir. “Yağlı değişiklik” hücrelerin sitoplazmasında trigliseritlerin depolanması sonucunda meydana gelir. Küçük damlalar şeklindeki birikimler, geniş vakuollerin içerisinde bir araya gelerek sitoplazmayı kaplar. Yağ metabolizmasında görev alan başlıca organ olması nedeniyle, yağlı değişiklik özellikle karaciğer hücrelerinde sıklıkla görülmektedir. Hücrelerde glukoz ve glikojen metabolizması ile ilgili hasarlar sonucunda glikojen birikimleri meydana gelebilir. Lipofuksin, melanin, hemoglobin gibi endojen kaynaklı veya karbon gibi eksojen kaynaklı maddeler olan çeşitli pigmentler de hücrelerde stres koşullarının neden olduğu hasarlara karşı bir adaptasyon mekanizması olarak birikebilmektedir. Adaptasyona bağlı morfolojik değişiklikler çekirdekte de gözlenmektedir. Çekirdek zarında şekilsel bozukluklar ve kopmalar, çekirdekte parçalanma (karyoreksis), kromatinlerde liziz (karyoliz), çekirdek içeriğinde kümeleşme (piknoz) meydana gelebilir (Kumar ve ark. 2003). Şekil 1.7’ de normal yapıdaki hücre ve hasar oluşturan etkene karşı meydana gelen hücresel yanıtlar şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil. 1.7. Normal ve hasarlı hücrenin şematik yapısı (Damjanow 1996)

Sağda: Normal hücre 1) Hücre membranı lipid, protein ve karbonhidratlardan oluşan seçici-geçirgen yapıdadır. ATP-bağımlı sodyum potasyum pompası (ATPaz) membran boyunca su-tuz gradienti sağlamakta, hücre içi kalsiyum seviyesini yüksek, potasyum seviyesini düşük tutmaktadır. 2) Absorbe edici vakuoller 3) Primer lizozomlarla birleşmiş absorbe edici vakuoller 4) Geanüllü endoplazmik retikulum 5) Mitokondri 6) Küçük veziküller içeren düz endoplazmik retikulum 7) Hücre iskeleti 8) Lipid, protein ve glikojen gibi metabolitler 9) Nukleus

Solda: Hasara karşı oluşan hücresel yanıt 1) Akut hücre hasarı ile hücre içine su girişi gerçekleşir ve hücre membranından içi sıvı dolu vakuoller meydana gelir 2) Mikrovilluslar ödemli ve şişkin durumdadır 3) GER sisternalarında su ve diğer sıvılar birikerek şişmeye neden olur. Ribozomlar zarar görür ve protein sentezi azalır 4) Su birikimi mitokondrilerde şişme ve parçalanmaya neden olur 5) Lizozomlardan otofagozomlar meydana gelir. Bu sindirim vakuolleri mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organelerin fragmentlerini içerir. 6) Düz endoplazmik retikulum genişler 7) Hücre iskeletini oluşturan fibriller agregatlar halinde sitoplazmik cisimcikleri meydana getirirler 8) Hücre içi lipid damlacıklarında artış meydana gelir 9) Hücre çekirdeğinin yapısında bozulmalar meydana gelir, çekirdekçik dağılır veya kaybolur

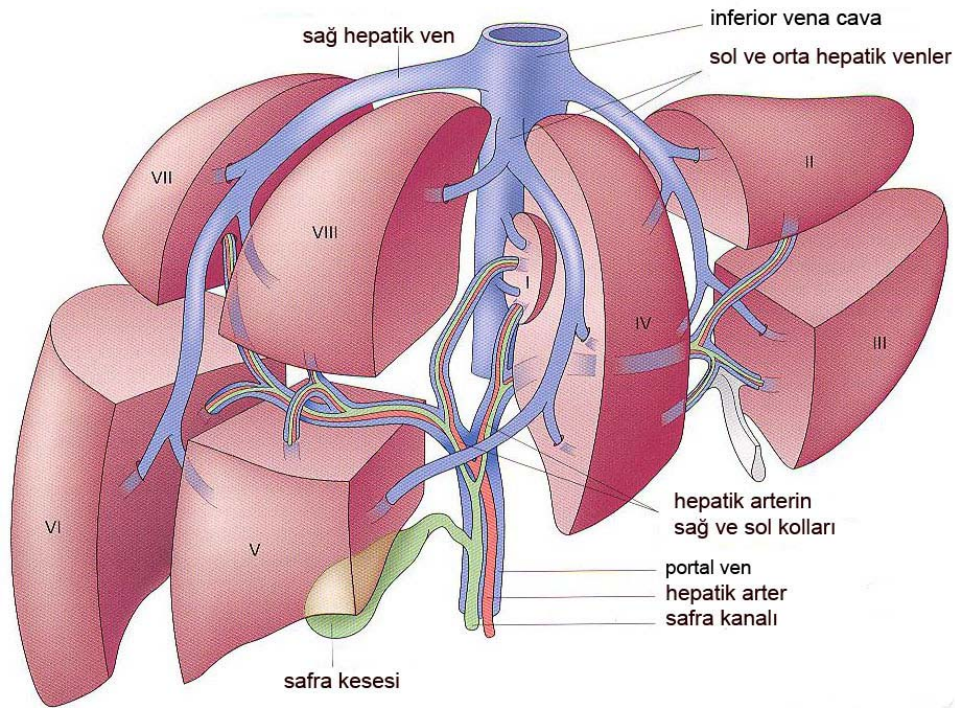
1.7. Karaciğer ve Yapısı

Karaciğer, her biri damar ve safra kanalı ile çevrelenmiş sekiz adet fonksiyonel segmentten meydana gelmektedir. Karaciğere iki kaynaktan kan gelir. Bunlardan biri dalak ve sindirim kanalından (bağırsaktan) kan getiren kapı toplardamarı (portal ven), diğeri ise aorttan ayrılan karaciğer atardamarı'dır. Karaciğerüstü toplardamarı (inferior vena cava) ise karaciğerden çıkan kanı kalbe taşımaktadır (Şekil 1.8).

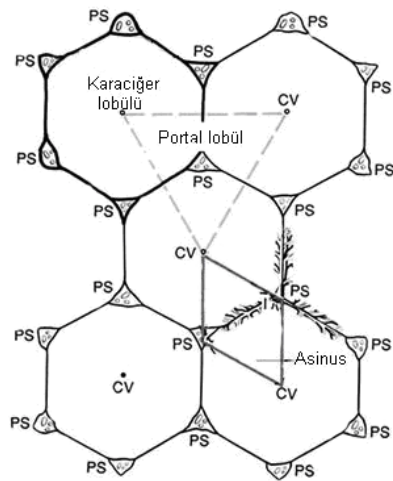
Karaciğerdeki hücrelerin % 65'ini, karaciğer hacminin % 80-88'ini hepatositler oluşturur. Hepatositler 25-40 µm çapında tek sıralı şeritler şeklinde organize olmuş hücrelerdir. Hepatositin bazolateral veya sinüzoidal yüzeyi, disse aralığına doğru uzanan mikrovillusları içerir (Şekil 1.10). Burada kan ile direkt temas sağlanır. Bu hepatositin yüksek emilim ve sekresyon aktivitesi için gereklidir. Sinüzoidal aralıkta; endotel hücreleri, perisinüzoidal hücreler, Kupffer hücreleri ve karaciğer ile ilişkili lenfositler bulunmaktadır. Perisinüzoidal hücreler disse aralığında, diğerleri ise sinüzoidlerde yer alır. Endotel hücreleri, düz ve uzunlamasına yapıya sahip, aralarında geniş porları olan hücrelerdir. Sinüzoidal kanla ilişkide olup, hepatositlerin küçük moleküllü besin maddeleri ile beslenmelerini sağlarken, büyük molekülleri hepatositlerden uzak tutarlar. Temel fonksiyonları fagositoz yapmak olan Kupffer hücreleri; partiküllerin, immün komplekslerin, lezyonlu eritrositlerin ve endotoksinlerin klerensi ile görevli makrofajlardır. Perisinüzoidal hücreler ise disse aralığında yer alan A vitaminince zengin hücrelerdir. Karaciğerde ekstrasellüler matriksin başlıca kaynağıdır. Ayrıca hepatosit büyüme faktörü kaynağı olup, sinüzoidal kan akımının kontrolünde rol oynadıkları düşünülmektedir (Demirci 2006; Kanel ve Korula 2005).

Karaciğerde köşelerde portal alanlar, merkezde ise terminal hepatik venül (santral ven) bulunan poligonal ünitelere "karaciğer lobülü" denilmektedir. Bir portal alanda portal ven ve hepatik arter dalları ile interlobüler safra kanalı bulunur. Asinus ise bir portal alan ile komşu santral ven arasında kalan üçgen şeklinde bir birimdir (Şekil 1.9). Hepatositler, biri diğerinin üzerinde olacak şekilde kordonlar yaparak bir portal mesafeden bir santral vene doğru uzanır. Bu

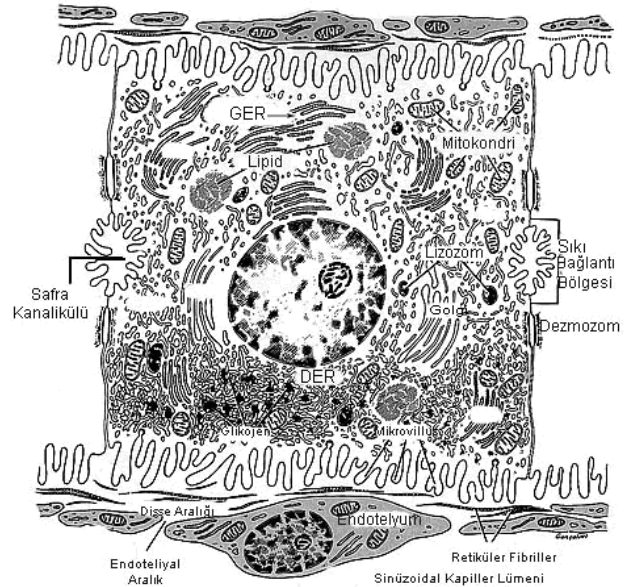
kordonların (Remarck kordonları) arasındaki mesafe “sinüzoid” olarak adlandırılır. Burada portal alanlardan santral vene kan akımları mevcuttur. Kesikli bir bazal laminaya sahip endotel hücreleri karaciğer sinüzoidal lümenini sınırlamaktadır. Endotel hücreleri ile hepatositler arasında ancak ince yapısal düzeyde görülebilen disse mesafesi bulunur. Disse mesafesinde kolajen fibriller mevcuttur. Bu fibriller hepatositlere destek olan retikülün çatıyı oluştururlar. Remarck kordonları, sinüzoidler ve sinüzoidal aralıkta bulunan hücreler, karaciğer parenkimasını oluştururlar (Demirci 2006; Pavelka ve Roth 2005).



Şekil. 1.8. Karaciğerin anatomik ve fonksiyonel bölümleri; sağ lateral (VI ve VII), orta (V ve VIII), sol orta (IV), yan (II ve III) ve kuyruk (I) segmentlerinden oluşmaktadır (Kanel ve Korula 2005)



Şekil 1.9. Karaciğer lobülünün şematik yapısı (Jungueira ve Carneiro 2005) PS: Portal alan, CV: Santral ven



Şekil 1.10. Karaciğer hücresinin şematik ince yapısı. (Jungueira ve Carneiro 2005) GER: Granüllü endoplazmik retikulum, DER: Düz endoplazmik retikulum.

1.8. Karaciğerin Toksisite Çalışmalarındaki Önemi

Laboratuvar hayvanları toksik maddelere maruz kaldığında meydana gelen yanıtlar diğer organlara oranla karaciğerde çok daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durum karaciğerin yüksek metabolik kapasitesinden ve portal kan kaynağına sahip olmasından ileri gelmektedir. Bağırsak yoluyla kana karışan toksinlere portal ven yoluyla direkt olarak maruz kaldığından, karaciğer bu toksinlerden diğer organlara göre daha fazla etkilenmektedir. Karaciğer, eksojen kimyasalların toksik metabolitlere dönüşümünün gerçekleştiği temel bir organdır. Böyle bir metabolik kapasiteden yoksun olan diğer organlar, metabolik aktivasyon gerektiren toksinlere karşı daha az duyarlılık gösterirler. Pek çok hayvan türü deneysel çalışmalarda kullanılmakla birlikte, sıçan ve fareler temel olarak kullanılan türlerdir. Karaciğerde meydana gelebilecek toksik yanıtların bu deney hayvanları üzerinde araştırılmasının temel amacı, bu maddelerin hayvanlar ve insanlar üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi için iyi bir model oluşturmalarıdır (Haschek ve Rousseaux 1998).

1.9. Karaciğer Patolojisi

Karaciğerde görülen nekrozların özel adları ve anlamları vardır. Birkaç hepatositten oluşan bir kümenin nekrozuna “fokal nekroz” adı verilir. Bu alanlarda lenfositler ve makrofajlar da bulunur. Nekrotik hepatositler hızla ortadan kaldırıldıkları için, nekroz alanında genellikle seçilemezler. Yalnızca kronik ve ilerleyici nitelikteki karaciğer hastalıklarında görülen “güve yeniği nekrozu” portal alanlardaki genişleme ve bağ dokusu artışı ile karakterizedir. “Köprüleşme nekrozu” ise çok sayıda hepatositten oluşan grupları etkileyen bir nekrozdur. “Masif nekroz” köprüleşme nekrozunun daha da ağır biçimidir; birkaç asinüsü birden hemen tümüyle tuttuğunda *submasif*, sağlam parankim hemen hiç kalmadığında *masif* terimi kullanılır. “Sentrilobüler nekroz” ise asinüsün belirli bir bölgesini tutan zonal bir nekrozdur. Karaciğerde her tür zedeleyici etkene karşı meydana gelen diğer bir yanıt dejenerasyon’dur “Balonlaşma dejenerasyonu” olarak da adlandırılan hücresel şişme geri dönüşlü bir hücre zedelenmesi bulgusudur. Bu görünüm her tür zedeleyici etkenle oluşabilir ve diğer tip nekroz alanlarına komşu hepatositlerde sıktır. Safranın zedeleyici etkisine maruz kalan hepatositlerde, daha küçük sitoplazmik vakuoller ile karakterli “tüylü dejenerasyon” izlenir. “Asidofilik cisimcikler” karaciğerde normal bir hepatositten daha küçük, koyu eozinofilik bir topakçık olarak izlenir. Bu oluşumlar aslında apoptozis ile eş anlamlıdır. “Fibroz”, yara iyileşmesinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkar. Dokuda kollagen üretimi ile karakterizedir. Disse aralığında meydana geldiği için, hepatositlerin kanla ilişkisi belirgin olarak azalabilir. Karaciğer fibrozu, çoğu olguda geri dönüşsüzdür. Hepatositler, rejenerasyon yeteneği yüksek hücrelerdir. Rejenerasyon, karaciğer dokusunda her tür nedene bağlı hepatosit kaybına eşlik edebilen bir yanıt olarak meydana gelmektedir (Demirci 2006).

2. MATERİYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmalarda, Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TICAM) ve Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilen yaklaşık 200-225 g ağırlığındaki Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Çalışmalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi deneysel hayvan araştırmaları etik kurulu kuralları doğrultusunda yürütülmüştür.

Çalışma;

Kontrol (% 0.9 NaCl i.p.)

TI⁺ (32 mg/kg i.p.)

MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.)

MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.),

MT I (1mg/kg i.p.)

MTI (2.5 mg/kg i.p.)

Bir gruptaki hayvan sayısı enzimatik ve histopatolojik çalışmalarda n=6, immunohistokimyasal çalışmalarda n=3 olmak üzere 6 grup üzerinde yürütülmüştür.

Çalışma başlamadan önce 3 gün boyunca deney hayvanları laboratuvar koşullarına alıştırmaya çalışılmıştır. Tüm gruptaki hayvanlar çalışmadan 1 gün önce ve deney süresi boyunca aç bırakılmış, 96 saatlik süre sonunda diseksiyona alınmıştır. Kontrol grubuna intraperitoneal (i.p.) olarak 0.5 ml % 0.9'luk serum fizyolojik uygulanmıştır. TI⁺'un akut toksik etkileri 32 mg/kg (LD₅₀) talyum asetatın i.p. olarak uygulandığı hayvanlar üzerinde incelenmiştir (Leung and Ooi 2000).

Akut TI^+ toksisitesine maruz bırakılmış sıçanlarda MT I'in etkileri, TI^+ uygulamasından 60 dakika önce 1 mg/kg ve 2.5 mg/kg'lık iki ayrı dozda i.p. olarak MT I uygulanan gruplar üzerinde incelenmiştir (Mimura ve ark., 1988). Diğer iki grup hayvana 1 mg/kg ve 2.5 mg/kg dozlarında i.p. olarak MT I uygulanmıştır.

2.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Talyum asetat, metallotionein I ve protein A 20 nm gold Sigma şirketinden, doku takip çalışmalarında kullanılan glutaraldehit, osmiyum tetroksit (O_2SO_4), propilen oksit, araldit reçine ve LR beyazı reçine Electron Microscopy Sciences (EMS) şirketinden satın alınmıştır. İmmunohistokimyasal işaretlemede kullanılan anti-CuZn SOD antibadi Santa Cruz Biotechnology. Inc.' den, süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ve toplam glutatyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan kitler Oxis International.Inc. firmasından satın alınmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Biyokimyasal İncelemeler İçin Uygulanan İşlemler

2.2.1.1. Toplam Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

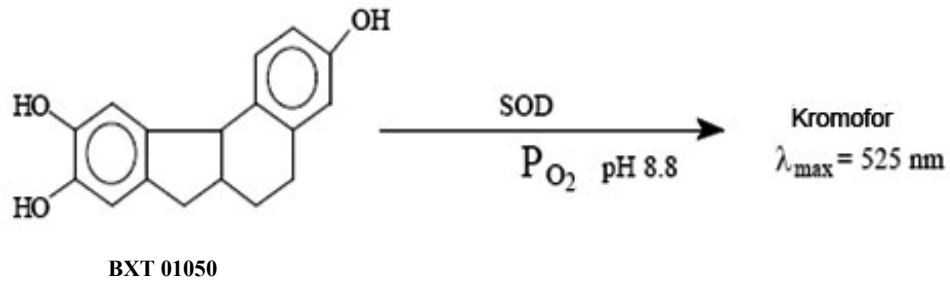
Toplam protein düzeyleri Lowry (1951) metoduna göre belirlenmiştir.

2.2.1.2. Cu-Zn Süperoksit Dismutaz (Cu-Zn SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Cu-Zn SOD enzim aktivitesi Nebot ve ark., (1993) metoduna dayalı ticari kit (Oxis SOD-525) kullanılarak yapılmıştır.

Prensip: SOD 525 metodu, 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10,-trihidroksibenzo [c] floren'in (BXT-01050) sulu alkali solüsyondaki Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimine bağımlı otooksidasyon oranının, reaksiyon sonucunda ortaya çıkan kromofora bağlı ölçümüne dayanmaktadır. 1-metil-2-vinilpiridinyum triflorometansülfonat (BXT 03077) merkaptanlara bağlı safsızlıkların giderilmesi amacıyla reaksiyon karışımında bulunmaktadır. Reaksiyon pH 8.8 de ve 37 °C'de, 3 mM borik asit ve 0,1 M dietilentriaminpentaasetik asit içeren 50mM 2 amino-2-metil-1,3-propandiol tampon içerisinde gerçekleşir. 525 nm' deki absorbans değişiminin kinetik ölçümü 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10,-trihidroksibenzo[c] floren'in 37 °C' deki reaksiyon karışımına eklenmesinden sonra gerçekleşir. SOD aktivitesi belirlenirken meydana gelen reaksiyonlar Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

1 ünite enzim: 37 °C sıcaklıkta ve pH 8.8'de 1 mikromol 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10,-trihidroksibenzo [c] floren'in (BXT-01050) 1 dakikadaki otooksidasyonunu sağlayan enzim aktivitesidir.



Şekil 2.1. SOD aktivitesi belirlenirken meydana gelen reaksiyonlar

Doku Homojenatının Hazırlanışı

- 1) -82 °C'den çıkarılan doku örneği 0.1 gr tartılarak, 0.16 mg/ml heparin içeren % 0.9'luk NaCl solüsyonu ile yıkanmıştır.
- 2) Doku üzerine 1 ml 0.25 M süktroz ilave edilir ve homojenize edilmiştir..
- 3) Homojenat 8500 g'de 10 dk +2 °C'de santrifüj edilmiştir.

Kloroform-Ethanol Ekstraksiyonu

Örneklerden Mn-SOD ve Fe-SOD'ın uzaklaştırılması amacıyla Kloroform-Ethanol Ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

- 1) 800 µl soğuk kloroform/ethanol 37.5 / 62.5 (v/v) ile 500 µl süpernatant 30 sn karıştırılmıştır.
- 2) +4 °C'de 2500 g'de santrifüj edilmiştir.
- 3) Süpernatant deney yapılıncaya dek + 2 °C'de bekletilmiştir.

Kullanılan Çözeltiler

Reaktif 1: 55 mM Tris/HCl (pH 8.8), 0.66 mM 5,5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroksibenzo[c]florene (BXT 01050), 0.5 mM dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA), %2.5 etanol.

Reaktif 2: 55 mM Tris/HCl (pH 8.8), 33.3 mM 1-metil-2-vinilpiridinyum triflorometansülfonat (BXT 03077).

Tampon: 3 mM borik asit, 0.11 mM DTPA (pH 8.8), 55 mM 2-amino-2 metil - 1,3-propandiol (AMPD).

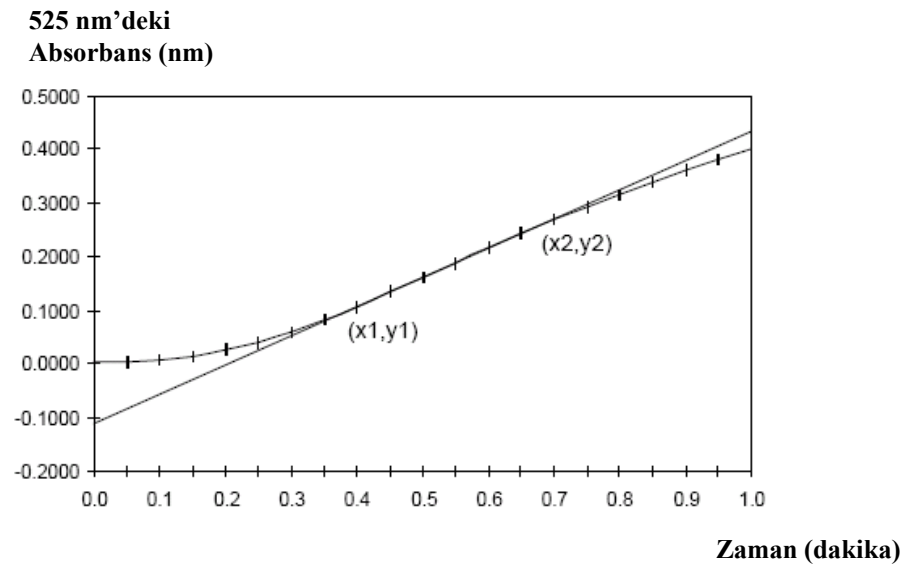
Deney

- 1) Kör için 900 µl tampon, 30 µl R1 ve 30 µl R2 bir tüp içerisinde karıştırılmıştır.
- 2) Deney için 900 µl tampon oksijene doymuş hale getirildikten sonra bir cam tüpe aktarılmıştır.

- 3) 40 µl süpernatant veya distile su (kontrol için) tüpe ilave edilmiştir.
- 4) 30 µl R2 test tüpüne ilave edilip karıştırılmıştır.
- 5) 37 °C'de 1 dk. süreyle inkübe edilmiştir.
- 6) 30 µl R1 test tüpüne ilave edilip karıştırılmıştır.
- 7) Yaklaşık 50 sn. bekletildikten sonra spektrofotometre küvetine aktarılarak 525 nm'de zamana karşı absorbans okunmuştur.

Cu- Zn SOD Aktivitesinin Hesaplanması

1 Dakikadaki Absorbans Değişiminin (ΔA) Belirlenmesi



Şekil 2.2. Zamana karşı absorbans grafiği

Zamana karşı absorbans (Şekil 2.2) belirlendikten sonra ortaya çıkan eğride eğim hesaplanarak, 1 dakikadaki absorbans değişimi (ΔA) hem örnek (V_s) ($n=6$) hem de kontrol (V_c) ($n=6$) grupları için hesaplanmıştır [Eğim = $(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$]. Her bir örnek için V_s/V_c değeri belirlenmiştir. Belirlenen değerler Çizelge 2.1'de gösterilen V_s/V_c oran tablosuna yerleştirilerek SOD aktivite ünitesi cinsinden belirlenmiştir.

Vs/Vc Oran Tablosu

Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units
1.00	0.00	2.00	1.00	3.00	2.18	4.00	3.57	5.00	5.25	6.00	7.32	7.00	9.93
1.05	0.05	2.05	1.06	3.05	2.24	4.05	3.65	5.05	5.35	6.05	7.44	7.05	10.08
1.10	0.09	2.10	1.11	3.10	2.31	4.10	3.73	5.10	5.44	6.10	7.56	7.10	10.23
1.15	0.14	2.15	1.17	3.15	2.37	4.15	3.80	5.15	5.54	6.15	7.68	7.15	10.38
1.20	0.19	2.20	1.22	3.20	2.44	4.20	3.88	5.20	5.63	6.20	7.80	7.20	10.53
1.25	0.24	2.25	1.28	3.25	2.50	4.25	3.96	5.25	5.73	6.25	7.92	7.25	10.69
1.30	0.29	2.30	1.34	3.30	2.57	4.30	4.04	5.30	5.83	6.30	8.04	7.30	10.85
1.35	0.33	2.35	1.39	3.35	2.64	4.35	4.12	5.35	5.93	6.35	8.16	7.35	11.01
1.40	0.38	2.40	1.45	3.40	2.71	4.40	4.21	5.40	6.03	6.40	8.29	7.40	11.17
1.45	0.43	2.45	1.51	3.45	2.77	4.45	4.29	5.45	6.13	6.45	8.42	7.45	11.34
1.50	0.48	2.50	1.57	3.50	2.84	4.50	4.37	5.50	6.23	6.50	8.55	7.50	11.50
1.55	0.53	2.55	1.63	3.55	2.91	4.55	4.46	5.55	6.34	6.55	8.68	7.55	11.67
1.60	0.58	2.60	1.68	3.60	2.98	4.60	4.54	5.60	6.44	6.60	8.81	7.60	11.84
1.65	0.63	2.65	1.74	3.65	3.06	4.65	4.63	5.65	6.55	6.65	8.94	7.65	12.02
1.70	0.69	2.70	1.81	3.70	3.13	4.70	4.71	5.70	6.65	6.70	9.08	7.70	12.20
1.75	0.74	2.75	1.87	3.75	3.20	4.75	4.80	5.75	6.76	6.75	9.22	7.75	12.38
1.80	0.79	2.80	1.93	3.80	3.27	4.80	4.89	5.80	6.87	6.80	9.35	7.80	12.56
1.85	0.84	2.85	1.99	3.85	3.35	4.85	4.98	5.85	6.98	6.85	9.50	7.85	12.74
1.90	0.90	2.90	2.05	3.90	3.42	4.90	5.07	5.90	7.09	6.90	9.64	7.90	12.93
1.95	0.95	2.95	2.11	3.95	3.50	4.95	5.16	5.95	7.21	6.95	9.78	7.95	13.12

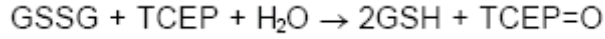
Çizelge 2.1. Vs/Vc oran tablosu

Sonuçlar Ünite/ mg protein cinsinden ifade edilmiştir.

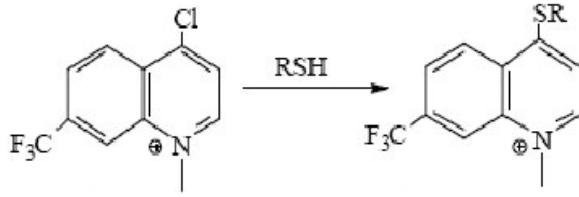
2.2.1.3. Toplam Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Belirlenmesi

Toplam glutasyon analizleri Owens ve Belcher (1965) metoduna dayalı ticari kit (Oxis GSH-400) kullanılarak yapılmıştır.

Prensip: Metod kromoforik tion oluşumuna dayanmaktadır. 420 nm’ de ölçülen absorbans GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Reaksiyon üç basamaktan oluşmaktadır. İlk olarak örnek tamponlanır ve redükleyici ajan olan tris (2-karboksimetil) fosfin (TCEP), okside glutasyonları (GSSG) redükte forma (GSH) indirgemek amacıyla reaksiyona katılır (Eşitlik-1). Kromojen 4-kloro-1-metil-7-triflorometilkuinolinum metilsülfat, örnek içerisinde bulunan tüm tioller tiöeterele dönüştürmektedir (Eşitlik-2). pH’ı 13’ün üzerine çıkarmak için ortama baz ilave edilmesiyle GSH-tiöeter’ine spesifik bir β -eliminasyon gerçekleşir ve kromoforik tion bileşiği oluşur (Eşitlik-3). Toplam glutasyon düzeyleri belirlenirken gerçekleşen reaksiyonlar Şekil 2.3’te gösterilmiştir.



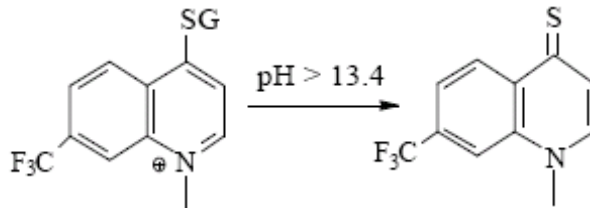
Eşitlik-1



Kromojen

Tioeter

Eşitlik-2



GSH-tioeteri

Tion

Eşitlik-3

Şekil 2.3. Toplam glutatyon düzeyleri belirlenirken gerçekleşen reaksiyonlar

Kullanılan Çözeltiler

Kromojen: 3 mM 1-metil-4-kloro-7-triflorometilquinolinum metilsülfat, 50 mM HCl

Renk Geliştirici: 2 N NaOH

İndirgeyici Ajan: 1.25 mM Tris (2-karboksimetil) fosfin (TCEP), 25 mM HCl.

Çöktürme Reaktifi: % 7.5 Trikloroasetik asit (TCA)

Tampon: 600 mM Potasyum fosfat, 600 pM Dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA), % 9 Lubrol (pH 7.8).

Kalibratörler: 1) 150 µM GSH, 125 mM potasyum fosfat tampon (pH 7.5)

2) 350 µM GSH, 125 mM potasyum fosfat tampon (pH 7.5)

3) Distile su

Doku Homojenatının Hazırlanması

- 1) Doku örnekleri % 0.9'luk NaCl solüsyonu içerisinde yıkanmıştır.
- 2) 1 / 20 (w/v) oranında çöktürme reaktifi içerisinde homojenize edilmiştir.
- 3) Homojenat 3000 g'de ve +4 °C' de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant toplam glutatyon analizinde kullanılmıştır.

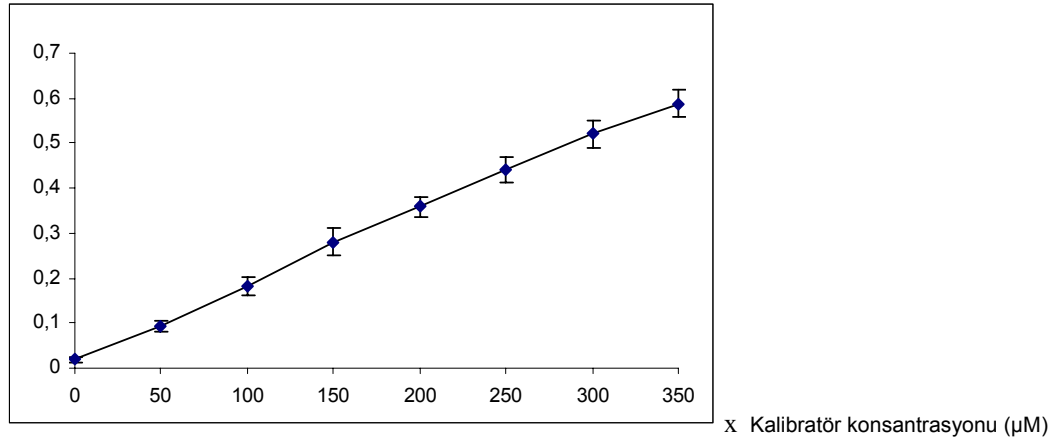
Testin Uygulanışı

- 1) 200 µl örnek süpernatant (veya kalibratör) bir test tüpü içerisine koyulmuştur.
- 2) 200 µl tampon reaksiyon karışımına ilave edilmiştir.
- 3) 200 µl redükleyici ajan da ilave edildikten sonra karıştırılmıştır.
- 4) 200 µl kromojen ilave edilip karıştırılmıştır. 200 µl renk geliştirici ilave edilip karıştırılmıştır.
- 5) Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dk inkübe edildikten sonra absorbans 420 nm'de ölçülmüştür.

Hesaplamalar

Toplam glutatyon düzeylerinin hesaplanması amacıyla bir kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır (Şekil 2.4).

y 420 nm' deki absorbans



Şekil 2.4. Toplam GSH düzeyleri belirlenirken hazırlanan kalibrasyon grafiği

$$[\text{GSH}] = \rho (A_{420} - b) / m$$

formülünden, toplam GSH düzeyi hesaplanarak mikromol / g doku cinsinden ifade edilmiştir.

ρ = seyreltme faktörü

A_{420} = 420 nm' deki örnek absorpsiyonu

m = eğim = 0.00178

b = regresyon sabiti = 0.019

$y = a x + b$ formülü grafiğe uyarlandığında;

a = eğim (slope)

b = regresyon sabiti (intercept) olacak şekilde,

eğim = 0.00178

regresyon sabiti = 0.019 olarak hesaplanmıştır.

2.2.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi Lawrence ve Burk (1976)'ya göre belirlenmiştir.

Prensip: GSH-Px ortamdaki H_2O_2 varlığında redükte glutasyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Reaksiyon ortamında NADPH ve glutasyon redüktaz enzimi bulunması durumunda bir önceki reaksiyonda oluşan okside glutasyon (GSSG) redükte forma çevrilirken, beraberinde redükte formdaki NADPH, okside forma ($NADP^+$) dönüşür. NADPH'ın 340 nm dalga boyunda oluşturduğu absorbanstaki azalma ölçülerek GSH-Px enziminin aktivitesi belirlenir.

1 ünite enzim: 25 °C sıcaklıkta ve pH 7'de H_2O_2 katalizörlüğünde, 1 mikromol redükte glutasyonu okside forma dönüştüren enzim aktivitesidir.

Doku Homojenatının Hazırlanması

- 1) Doku örnekleri 1/10 (w/v) oranında, 5 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tampon içerisinde homojenize edilmiştir.
- 2) Homojenat 15 dk süreyle 8000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- 3) Süpernatant alınarak enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Kullanılan Çözeltiler

Tampon: Potasyum fosfat 50mM pH:7.0, EDTA 5 mM

Sodyum azid (NaN_3): 1 mM

Redükte glutasyon: (GSH) 2 mM

Hidrojen peroksit (H_2O_2): 0.25 mM

NADPH 0.2 mM

Testin Uygulanışı

- 1) Spektrofotometre küvetinde 5 mM EDTA içeren 1 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu içerisinde son konsantrasyon 1mM NaN_3 , 0.2 mM $\text{NADPH}+\text{H}^+$, 2 mM GSH, 1.2 U/ml glutatyon redüktaz enzimi hazırlanmıştır.
- 2) Örnek tüpü için bu karışıma 20 μl süpernatant ilave edilmiştir.
- 3) 0.25 mM H_2O_2 ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır.
- 4) 1 dakikadaki optik dansite değişimi örnek ve kontrol tüpleri için 340 nm'de 37 °C'de belirlenmiştir.

Hesaplamalar

$$\text{Ünite/ml enzim} = \frac{(\Delta\text{OD}_{340\text{nm}} / \text{dk Örnek} - \Delta\text{OD}_{340\text{nm}} / \text{dk Kontrol}) (2) (V_t) (df)}{6.22 (V_e)}$$

2 : okside olan NADPH'nin mikromolü başına ortaya çıkan GSH miktarı (mikromol)

V_t : Toplam reaksiyon hacmi (ml)

df: Dilüsyon faktörü

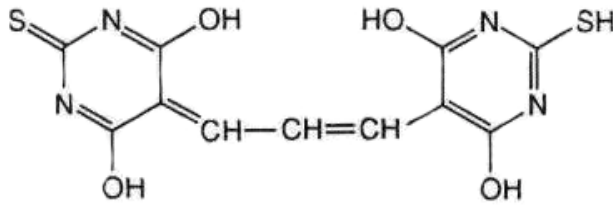
6.22: NADPH'nin 340 nm'deki ekstinksiyon katsayısı (milimolar)

(V_e): Kullanılan enzim hacmi (ml)

2.2.1.5. Malondialdehit (MDA) Tayini ile Dokulardaki Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi

MDA tayini Ohkawa ve Ohishi (1979) metoduna göre belirlenmiştir.

Prensip: 3 veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu tiobarbitürik asitle ölçülebilen Malondialdehit meydana gelmektedir. Tiobarbitürik asitle Malondialdehit spektrofotometrede 532 nm’de ölçülebilen pembe renkli bileşiği meydana getirmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Malondialdehit tiobarbitürik asit kompleksi sonucunda oluşan bileşiğin yapısı

Kullanılan Reaktifler

Sodyum dodesil sülfat çözeltisi % 8.1

Asetat Tamponu: % 20 pH 3.5

Tiobarbitürik asit solüsyonu: % 0.8

Bütanol/piridin karışımı: 15 / 1 (v:v)

Uygulanan İşlemler

Doku Homojenatının Hazırlanması

- 1) Doku örnekleri % 10 (w:v) olacak şekilde % 1.15’lik KCl içerisinde homojenize edilmiştir.
- 2) Karışım 4000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
- 3) Süpernatant MDA tayininde kullanılmıştır.

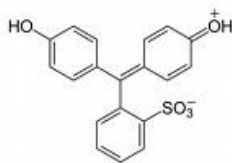
Testin Uygulanışı

- 1) 500 µl süpernatant üzerine 200 µl % 8.1'lik sodyum dodesil sülfat solüsyonu, 1500 µl % 20'lik asetat tamponu, 1500 µl % 0.8'lik tiobarbitürik asit solüsyonu ve 700 µl distile su ilave edilerek karıştırılmıştır.
- 2) Örnekler 95 °C'lik su banyosunda 1 saat bekletilmiştir
- 3) Örnekler soğutulduktan sonra üzerindeki berrak kısım fazla karıştırılmadan alınmıştır.
- 4) 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
- 5) Üstteki berrak kısım alınarak üzerine 1 ml distile su, 5 ml bütanol/piridin karışımı 15/1 (v:v) ilave edilmiştir.
- 6) Karıştırılıp 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 7) Üst kısımdaki sıvı alınarak 532 nm'de köre karşı absorbans belirlenmiştir.

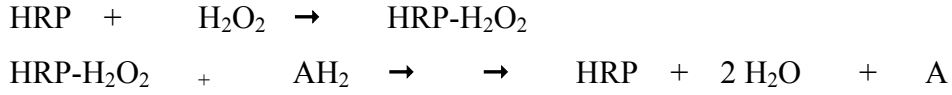
2.2.1.6. Reaktif Oksijen Türevlerinin (ROS) Ölçümü

Reaktif oksijen türevleri oluşumu, Pick ve Keisari (1980) metoduna göre belirlenmiştir.

Prensip: Fenol kırmızısı gibi hidrojen veren bileşikler (A), H₂O₂ tarafından, horseradish peroksidaz'ın (HRP) aracılık ettiği reaksiyon ile okside hale dönüştürülürler. 600 nm dalga boyunda ölçülebilen okside haldeki fenol kırmızısının miktarı, ortamda bulunan H₂O₂ miktarı ile doğru orantılıdır.



AH₂:Fenol kırmızısı



Kullanılan Reaktifler

PBS tampon: 50 mM, pH 7.0

Fenol kırmızısı: 0.1 mg/ml

Horseradish peroksidaz: 8.5 U ml⁻¹

Uygulanan İşlemler

Doku Homojenatının Hazırlanması

- 1) Doku örnekleri 0.1 gr tartılarak 500 µl 50 mM'lık PBS tampon içerisinde homojenize edilmiştir.
- 2) Karışım 8000 rpm'de, +4 °C'de 15 dk. santrifüj edilmiştir.
- 3) Süpernatant ROS tayininde kullanılmıştır.

Testin Uygulanışı

- 1) Bir deney tüpü içerisinde son konsantrasyon 0.1 mg/ml olacak şekilde, 100 µl fenol kırmızısı, 300 µl homojenat ve 500 µl 50 mM PBS tampon (pH 7.0) karıştırılmıştır.
- 2) Son konsantrasyon 8.5 U ml⁻¹ olacak şekilde 100 µl HRP, ortama ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır.
- 3) Reaksiyon sonlandıktan sonra 600 nm dalga boyunda absorbans belirlenmiştir. Farklı molaritelerde hazırlanan H₂O₂ standart olarak kullanılmıştır.

2.2.1.7. Talyum Analizleri İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması

- 1) Karaciğer dokusu kontrol ve tüm deney grupları için tartılmış (1 gr), 1 hafta süre ile 50 °C'lik etüvde kurutulmuştur.
- 2) Örnekler konsantre nitrik asit içerisinde (5 ml), 60 °C'lik etüvde çözelti tamamen berrak bir hal alıncaya dek bekletilmiştir.
- 3) Örnek hacimleri ölçüldükten sonra, 1:1 (v:v) oranında distile su ile sulandırılarak analiz için A.Ü. BİBAM ICP-OES ünitesinde ölçüme önderilmiştir.

2.2.2. Histopatolojik İncelemeler İçin Uygulanan İşlemler

2.2.2.1. Karaciğer Örneklerinin Tespiti

Bütün dokulardan diseksiyonla alınan karaciğer örnekleri hayvandan çıkarıldıktan hemen sonra otolize uğramamaları için % 4.5'luk glutaraldehit (pH 7.2-7.3) içeren tespit solüsyonuna alınmıştır.

2.2.2.2. Doku Takip İşlemleri

Yarı İnce Kesitlerin Hazırlanması

- 1) 1 mm³'lük parçalara bölünen dokular tespit solüsyonu içerisinde 24 saat boyunca ve + 4 °C sıcaklıkta bekletilmiştir.
- 2) Materyal 15 dakika boyunca 0.1 M'lık sodyum-fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanmıştır
- 3) Dokular bir diğer tespit solüsyonu olan % 2'lik O₂ SO₄ içerisinde 2 saat oda sıcaklığında fikse edilmiştir.

- 4) 15 dakika boyunca 2 kez 0.1 M'lık sodyum-fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanmıştır.
- 5) Dokular, suyun uzaklaştırılması amacıyla aşağıdaki alkol serilerinden belirtilen sürelerde geçirilmiştir.
 - % 50'lik alkol (2x15 dk)
 - %70'lik alkol (2x15 dk)
 - %90'lik alkol (2x15 dk)
 - %96'lik alkol (2x15 dk)
 - Absolü alkol (2x15 dk)
- 6) Sertliği sağlamak amacıyla dokular 2 kez 30'ar dk. propilen oksitte bekletilmiştir.
- 7) Aralditin hücre içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacıyla dokular araldit/propilen oksit (1/1) (v:v) karışımında oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir.
- 8) Dokular 1 gece boyunca saf aralditle muamele edilmiştir.
- 9) Gömme işleminin ardından oluşturulan bloklardan Leica ultracut mikrotom kullanılarak 800 nm kalınlığında kesitler alınmıştır.
- 10) Alınan kesitler toluidin mavisi ile boyandıktan sonra Leica DMLS2 ışık mikroskopunda incelenmiştir ve fotoğrafları çekilmiştir.

İnce Kesitlerin Hazırlanması

Leica ultracut mikrotom kullanılarak 70-80 nm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan ince kesitler %2'lik uranilasetat ve % 4'lük kurşun sitrat ile boyanmıştır. Preparatlar A.U. BIBAM'da bulunan Philips Biotwin Elektron mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.3. Cu-Zn SOD Enziminin İmmunohistokimyasal Olarak İşaretlenmesi için Uygulanan İşlemler

2.2.3.1. Karaciğer Örneklerinin Tespiti

Diseksiyonla alınan karaciğer örnekleri hayvandan çıkarılırken ve çıkarıldıktan hemen sonra 0.1 M soğuk fosfat tampon (PB Tampon) (pH 7.3) ile yıkanmış, aynı tampon içerisinde 1 mm³'lük parçalara ayrılmış, otolize uğramamaları ve antijenik özelliklerini kaybetmemeleri için hızlıca % 4'lük paraformaldehit ve % 1'lik glutaraldehit (pH 7.3) içeren tespit solüsyonuna alınmıştır.

2.2.3.2. Doku Takip İşlemleri

- 1) Dokular 2 saat süre ile oda ısısında fıkse edilmiştir
- 2) Dokulara;
% 50'lik etanolde 20 dk., % 70'lik etanolde 20 dk., % 90'lık etanolde 5 dk. olmak üzere dehidrasyon işlemleri uygulanmıştır.
- 3) Dokular 2:1 oranında LR Beyazı/ % 70'lik etanol karışımında 1 saat süre ile 40 rpm'de rotatorda döndürülmüştür.
- 4) Dokular saf LR beyazı reçinesi içerisinde 1 gece süre ile 40 rpm'de rotatorda döndürülmüştür.
- 5) Dokular saf LR Beyazı reçinesi içerisinde jelatin kapsüllere gömülmüştür.
- 6) 50 °C'lik etüvde 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
- 7) İnkübasyonun ardından ultramikrotomda 800 nm kalınlığında yarı ince kesitler alınmıştır.

- 8) Alınan yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanmıştır ve Leica DMLS2 ışık mikroskobunda incelenmiştir.
- 9) Yarı ince kesitler hazırlanan bloklardan 90 nm kalınlığında ince kesitler hazırlanarak gridler üzerine alınmıştır.

2.2.3.3. İmmunohistokimyasal İşaretleme İşlemleri

İmmunogold işaretleme LR beyazı kesitleri için uygun olan Skepper ve Powell (2006) metoduna göre yapılmıştır.

- 1) Gridler üzerindeki ince kesitler glisin içeren fosfat salin tamponu (PBSG) içerisinde 10 dk süre ile inkübe edilmiştir.
- 2) Kesitler, PBSG tampon (pH 7.3) içerisinde dilüsyonu yapılmış olan Cu-Zn SOD antibadi solüsyonu ile 1 gece boyunca inkübe edilmiştir.
- 3) Kesitlere 1X fosfat salin (PBS) tampon (pH 7.3) ile 2'şer dk 10 kez yıkama yapılmıştır.
- 4) Kesitler PBSG tampon içerisinde dilüe edilmiş protein A-20 nm gold ile oda sıcaklığında 2 saat süre ile inkübe edilmiştir.
- 5) Kesitler distile su ile 30-40 saniye yıkanmıştır.
- 6) Kesitler % 2'lik uranilasetat ve % 4'lük kurşun sitrat boyası ile boyanmıştır.
- 7) Kesitler A.Ü. BİBAM'da bulunan Philips Biotwin Elektron mikroskobunda incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal İncelemeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular

3.1.1. Toplam Protein Analizleri

Deney gruplarına göre toplam protein değerleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir

Deney Grupları	Toplam Protein Düzeyleri (miligram / ml)
Kontrol	10.0 ± 0.8
TI ⁺	12.0 ± 2.4
1 mg/kg MT I+TI ⁺	8.3 ± 2.1
2.5 mg/kg MT I +TI ⁺	10.0 ± 1.6
1 mg/kg MT I	9.0 ± 1.2
2.5 mg/kg MT I	9.5 ± 1.9

Çizelge 3.1. Deney gruplarına göre toplam protein değerleri (* P ≤ 0.005 Student't-test)

Deney grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında kontrol grubu ile aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür.

3.1.2. Talyum Analizleri

TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanların karaciğer dokusunda 3.295± 0.02 ppm talyum tespit edilmiştir. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanların karaciğer dokusunda bulunan talyum miktarının MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubuna göre azalmış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu, MT I (1 mg/kg i.p.) ve MT I (2.5 mg/kg i.p.) gruplarında ise beklenildiği şekilde dokuda TI⁺ a rastlanmamıştır (Çizelge 3.2).

Deney Grupları	Dokudaki toplam TI ⁺ Düzeyleri (ppm)
Kontrol	0
TI ⁺	3.295 ± 0.02
1 mg/kg MT I+TI ⁺	2.917 ± 0.06 *
2.5 mg/kg MT I +TI ⁺	2.135 ± 0.05 *
1 mg/kg MT I	0
2.5 mg/kg MT I	0

Çizelge 3.2. Deney gruplarına göre dokulardaki toplam TI⁺ değerleri (* TI grubu ile kıyaslandığında; P ≤ 0.005 Student't-test)

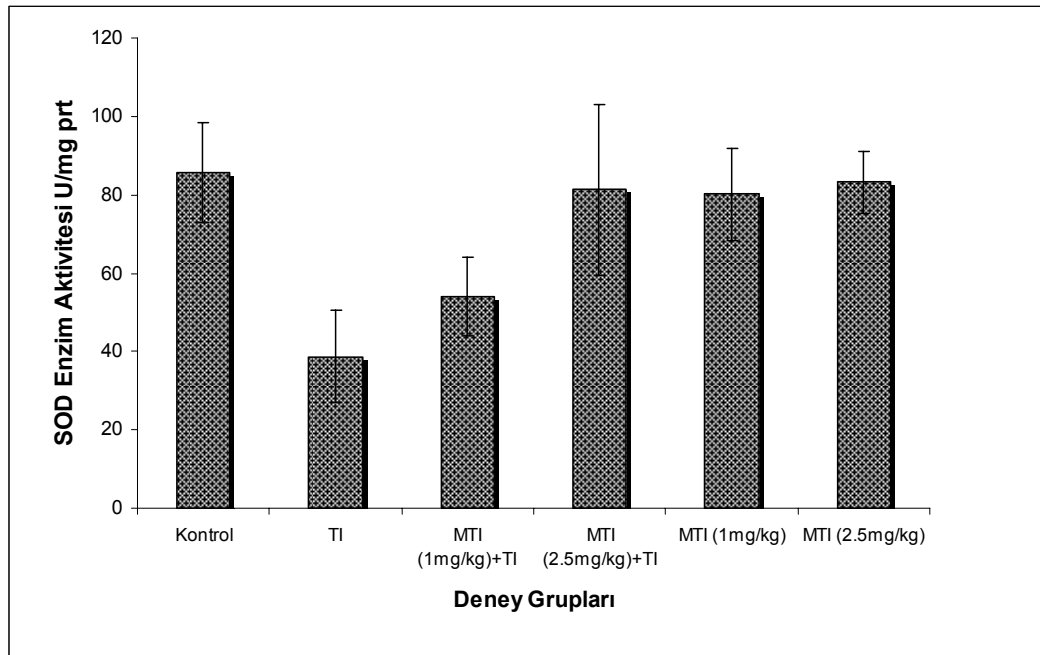
3.1.3. Cu-Zn SOD Enzim Aktivitesi

Cu-Zn SOD enzim aktivitesi Nebot et al., (1993)' e göre belirlenmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS student-t testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanların Cu-Zn SOD aktivitesi kontrol grubu sıçanları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (%54). MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanların Cu-Zn SOD aktivitesinde de kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma görülmüştür (%37). MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanların ve diğer deney gruplarının Cu-Zn SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim gözlenmemektedir (Çizelge 3.3).

Deney Grupları	Cu-ZnSOD Aktivitesi U/mg prt ± SD
Kontrol	85.71 ± 15.74
TI ⁺	38.75 ± 13.64 *
1 mg/kg MT I+TI ⁺	54.03 ± 11.92 *
2.5 mg/kg MT I +TI ⁺	81.25 ± 27.95
1 mg/kg MT I	80.16 ± 10.72
2.5 mg/kg MT I	83.15 ± 9.78

Çizelge 3.3. Deney gruplarına göre SOD enzim aktivitesi değerleri (U/mg prt) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* P ≤ 0.005 Student't-test)



Şekil 3.1. Cu-Zn SOD aktivitesi sonuçları sütun grafiği

Deney Grupları	Cu-Zn SOD enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre % değişim
TI+ (32 mg/kg i.p.)	% 54.7 azalma*
MT I (1 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 36.9 azalma*
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 5.2 azalma
MT I (1 mg/kg i.p.)	% 6.4 azalma
MT I (2.5 mg/kg i.p.)	% 2.9 azalma

Çizelge 3.4. Deney gruplarının SOD aktiviteleri kontrol grubu ile kıyaslandığında elde edilen değişim değerleri (*kontrolle göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık)

3.1.4. Toplam GSH Düzeyleri

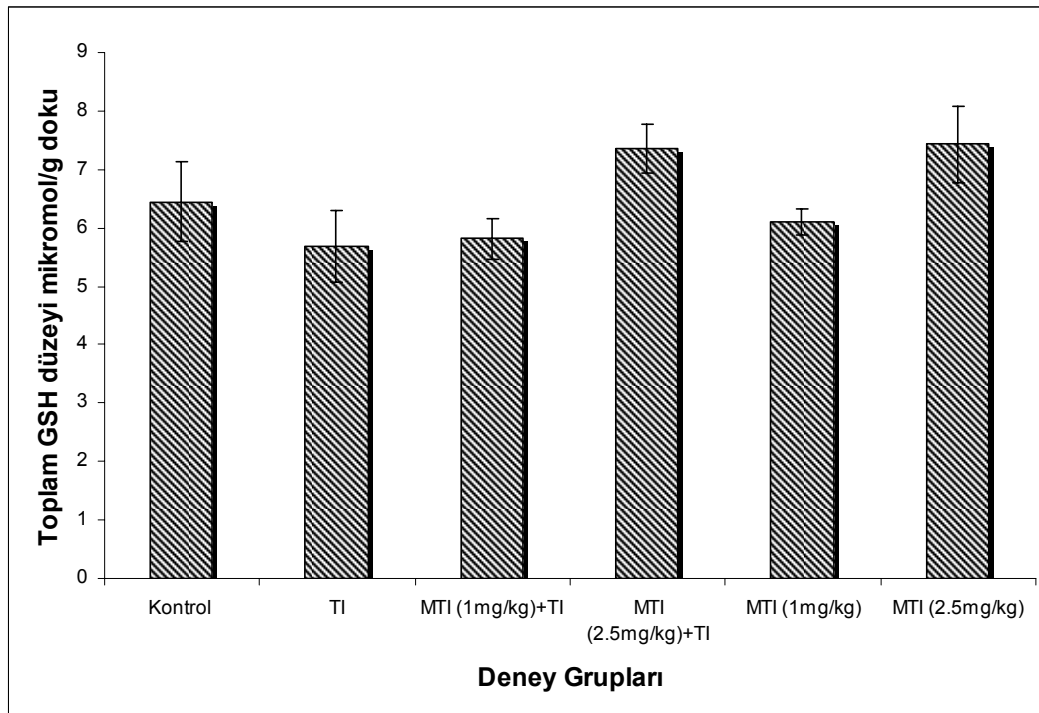
Toplam glutatyon analizleri Burns ve ark. (1991)'e göre belirlenmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS student-t testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubunda GSH'nın karaciğerdeki düzeyinin kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir

MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda ise GSH düzeyleri dikkat çekici şekilde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Aynı durum MT I (2.5 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda da gözlenmiş, GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı seviyede artmıştır. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda ise GSH düzeyinde kontrol grubuna göre bir artış gözlenmemiş, bu gruptaki GSH seviyesi TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlar ile yaklaşık olarak aynı seviyede kalmıştır. MT I (1 mg/kg i.p.) uygulanan grupta ise GSH kontrol grubu ile aynı düzeydedir (Çizelge 3.5).

Deney Grupları	Toplam GSH Düzeyleri (mikromol/g doku $\pm$ SD)
Kontrol	6.43 $\pm$ 0.68
TI ⁺ (32 mg/kg i.p.)	5.68 $\pm$ 0.61 *
MT I (1 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	5.81 $\pm$ 0.34 *
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	7.35 $\pm$ 0.42 *
MT I (1 mg/kg i.p.)	6.09 $\pm$ 0.22
MT I (2.5 mg/kg i.p.)	7.42 $\pm$ 0.64*

Çizelge 3.5. Deney gruplarına göre toplam GSH düzeyi değerleri ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* P $\leq$.005 Student t-test)



Şekil 3.2. Toplam GSH düzeyi sonuçları sütun grafiği

Deney Grupları	Toplam GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre % değişim
TI+ (32 mg/kg i.p.)	% 11.6 azalma*
MT I (1 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 9.6 azalma*
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 14.3 artış*
MT I (1 mg/kg i.p.)	% 5.3 azalma
MT I (2.5 mg/kg i.p.)	% 15.3 artış*

Çizelge 3.6. Deney gruplarının toplam GSH düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında elde edilen değişim oranları (*kontrolle göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık)

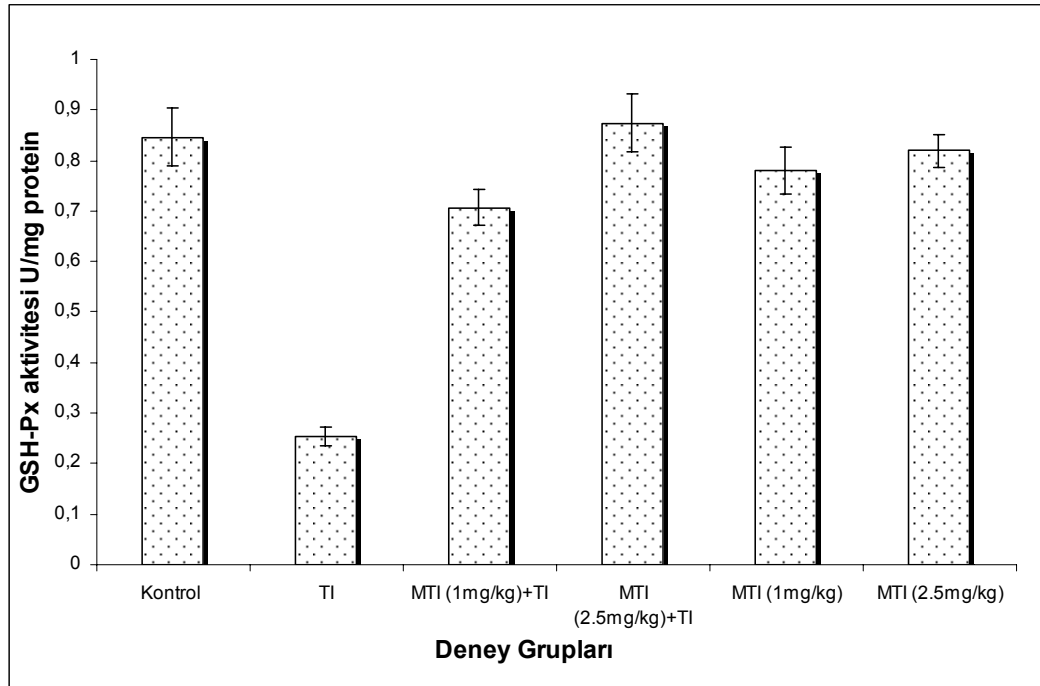
3.1.5. GSH-Px Enzim Aktivitesi

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi Lawrence ve Burk (1976)'ya göre belirlenmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS student-t testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

TI⁺ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda GSH-Px aktivitesi anlamlı azalmıştır. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda da kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmektedir. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda ve diğer gruplarda ise enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre değişmeden kaldığı görülmektedir (Çizelge 3.7).

Deney Grupları	GSH-Px aktivitesi (nmol/mg protein) $\pm$ SD
Kontrol	0.84 $\pm$ 0.05
TI+ (32 mg/kg i.p.)	0.25 $\pm$ 0.01*
MT I (1 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	0.70 $\pm$ 0.03*
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	0.87 $\pm$ 0.05
MT I (1 mg/kg i.p.)	0.78 $\pm$ 0.04
MT I (2.5 mg/kg i.p.)	0.82 $\pm$ 0.03

Çizelge 3.7. Deney gruplarına göre glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi değerleri (nmol/mg protein) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* P $\leq$ 005 Student t-test)



Şekil 3.3. GSH-Px aktivitesi sonuçları sütun grafiği

Deney Grupları	GSH-Px enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre % değişim
TI ⁺ (32 mg/kg i.p.)	% 70.2 azalma*
MT I (1 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 16.7 azalma*
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 3.5 artış
MT I (1 mg/kg i.p.)	% 7.1 azalma
MT I (2.5 mg/kg i.p.)	% 2.4 azalma

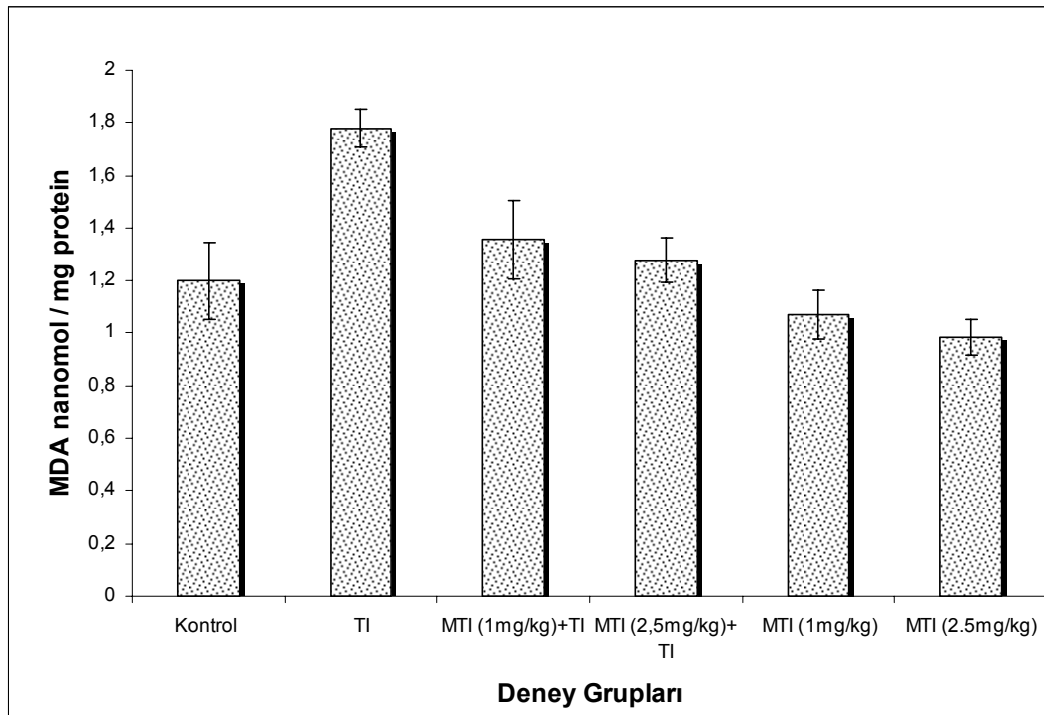
Çizelge 3.8. Deney gruplarının glutatyon peroksidaz aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında elde edilen değişim oranları (*kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık)

3.1.6. MDA Düzeyleri

TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda MDA düzeyi kontrol grubuna oranla anlamlı olarak artış göstermiştir. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda MDA düzeyinin TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubuna göre azaldığı görülmektedir. Ancak kontrolle kıyaslandığında MDA düzeyinde artış meydana gelmiştir. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubunda ise kontrole göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. MT I (1 mg/kg i.p.) ve MT I (2.5 mg/kg i.p.) gruplarında ise MDA düzeyi kontrole göre anlamlı şekilde azalmıştır (Çizelge 3.9).

Deney Grupları	MDA düzeyleri (nmol/mg protein) ± SD
Kontrol	1.19 ± 0.14
TI ⁺ (32 mg/kg i.p.)	1.77 ± 0.07*
MT I (1 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	1.35 ± 0.1*
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	1.27 ± 0.08
MT I (1 mg/kg i.p.)	1.07 ± 0.14*
MT I (2.5 mg/kg i.p.)	0.98 ± 0.06*

Çizelge 3.9. Deney gruplarına göre MDA değerleri (nmol/mg protein) ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* P ≤ 0.005 Student't-test)



Şekil 3.4. MDA tayini sonuçları sütun grafiği

Deney Grupları	MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre değişim
TI+ (32 mg/kg i.p.)	% 48.7 artış*
MT I (1 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 13.4 artış*
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 6.7 artış
MT I (1 mg/kg i.p.)	% 10.1 azalma*
MT I (2.5 mg/kg i.p.)	% 17.7 azalma*

Çizelge 3.10. Deney gruplarının MDA düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında yüzde değişim değerleri (*kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmaktadır)

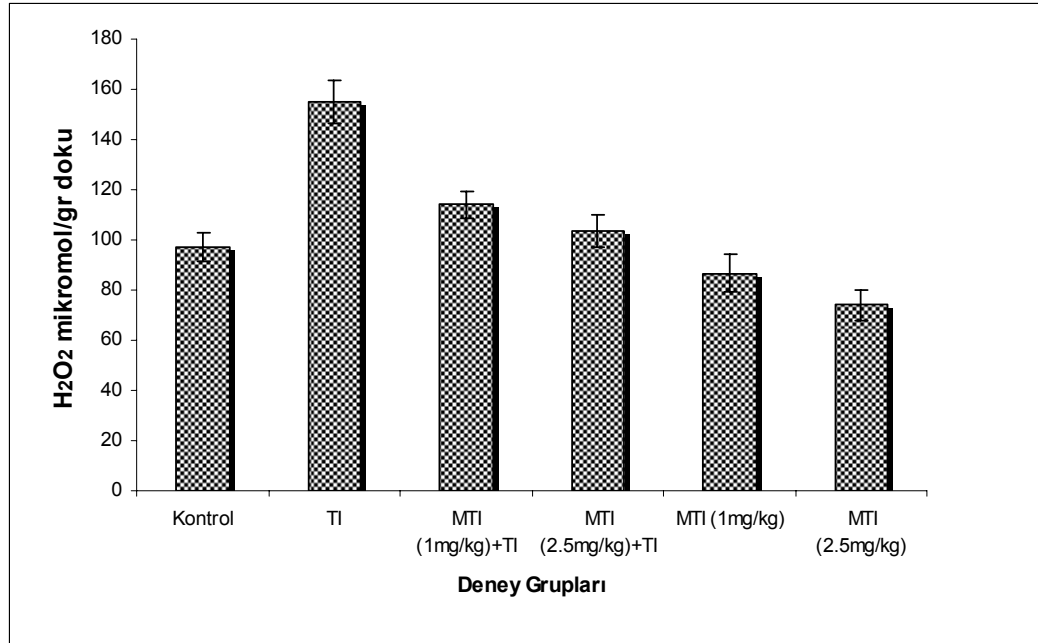
3.1.7. ROS Düzeyleri

ROS düzeyleri incelendiğinde, sonuçların dokudaki MDA düzeyleri ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir. TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda ROS düzeyi kontrol grubuna oranla anlamlı olarak artış göstermiştir. MT I (1 mg/kg

i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda ROS düzeyinin TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubuna göre azaldığı görülmektedir. Ancak kontrolle kıyaslandığında ROS düzeyinde artış meydana gelmiştir. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubunda ise kontrole göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. MT I (1 mg/kg i.p.) ve MT I (2.5 mg/kg i.p.) gruplarında ise MT I'in antioksidan etkisiyle ROS düzeyinin kontrole göre anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Çizelge 3.11).

Deney Grupları	ROS düzeyleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{gr doku}$) $\pm$ SD
Kontrol	97.03 $\pm$ 5.66
TI+ (32 mg/kg i.p.)	154.86 $\pm$ 8.52 *
MT I (1 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	114.04 $\pm$ 5.25*
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	103.62 $\pm$ 6.38
MT I (1 mg/kg i.p.)	86.54 $\pm$ 7.63 *
MT I (2.5 mg/kg i.p.)	74.02 $\pm$ 6.05 *

Çizelge 3.11. Deney gruplarına göre ROS düzeyleri $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{gr doku}$ ve kontrol grubu ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmaları (* $P \leq 0.005$ Student't-test)



Şekil 3.5. ROS ölçümü sonuçları sütun grafiği

Deney Grupları	ROS düzeylerinde kontrol grubuna göre değişim
TI+ (32 mg/kg i.p.)	% 59.6 artış*
MT I (1 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 17.5 artış *
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 10.3 artış
MT I (1 mg/kg i.p.)	% 10.8 azalma*
MT I (2.5 mg/kg i.p.)	% 23.7 azalma*

Çizelge 3.12. Deney gruplarının ROS düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında yüzde değişim değerleri (*kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmaktadır)

3.2. Histopatolojik Bulgular

3.2.1. Işık Mikroskopik Bulgular

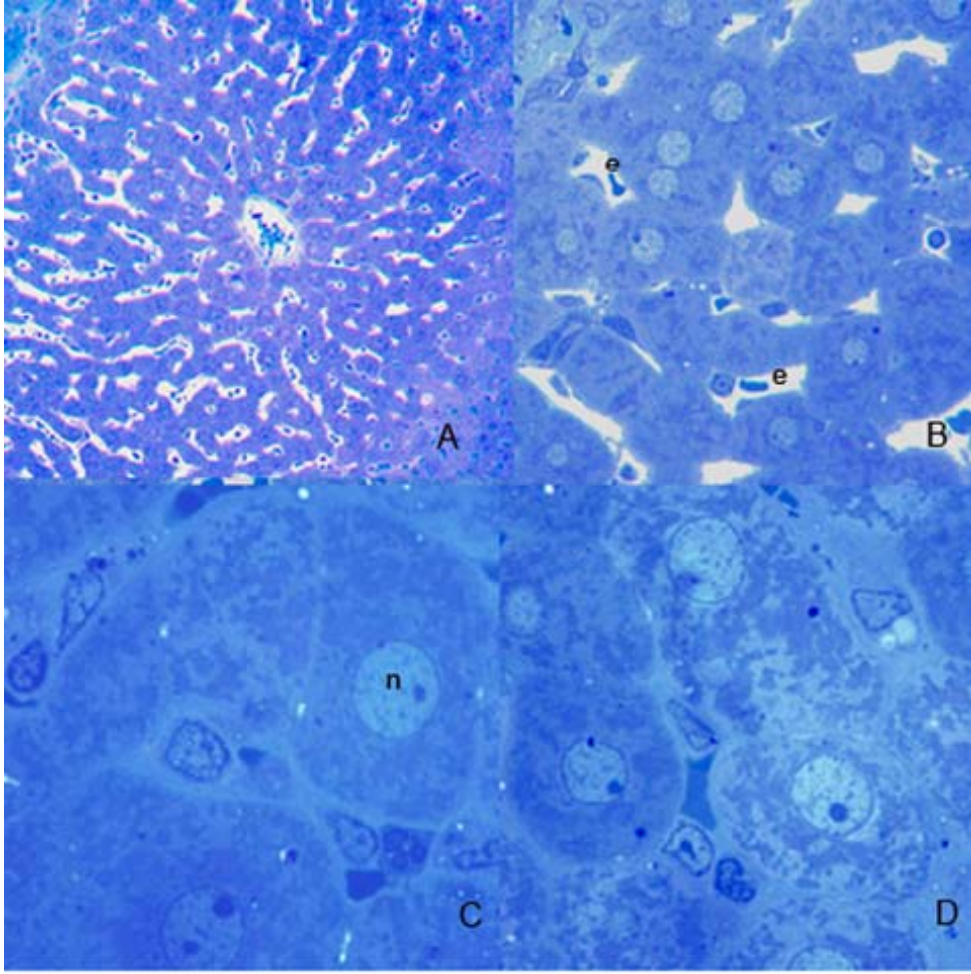
Kontrol grubundaki sıçanlarda sinüzoidler portal alan etrafında ince boşluklar halinde sıralanmaktadır. Karaciğer hücreleri sinüzoidlerin arasında düzenli şeritler şeklinde gözlenmektedir (Şekil 3.6.A). Hücre zarları bütünlüğünü korumakta, hücrelerin sınırları ve hücreler arası bağlantı bölgeleri belirgin olarak görülebilmektedir (Şekil 3.6C). Çekirdekler yuvarlak şekilli ve sınırları belirgindir (Şekil 3.6.C ve D). Kupffer hücreleri normal sayıda ve görünüş olarak yıldızlı şekillidir. Eritrositler yapılarını korumaktadırlar (Şekil 3.6 B).

Talyum (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda sinüzoidlerde genişleme meydana gelmiştir (Şekil 3.7 A). Kupffer hücreleri, aktivasyonlarındaki artışa bağlı olarak koyu renk sitoplazma ve uzamış çekirdeklere sahiptir. Ayrıca bu hücrelerin sayıca arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.7. B ve D). Hücrelerin sitoplazmasında damlacıklar halinde lipid biriktiği gözlenmiş, Hücrelerarası bağlantı bölgeleri hücre zarı yapısındaki bozulma nedeniyle kaybolmuş, çekirdek zarının hasar görmesine bağlı olarak hücre çekirdeği şekil değişikliğine uğramıştır. Oval yapılı veya sınırları düzensiz görünümlü çekirdekler mevcuttur (Şekil 3.7. C).

MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda sinüzoidler kontrol grubuna göre genişlemiş olarak gözlenmektedir. Hücrelerdeki metabolik aktivasyon farkından dolayı açık ve koyu renkli hücreler mevcuttur (Şekil 3.8 A). Kupfer hücreleri kontrol grubundakilere benzer şekilde yıldızsı şekilli ve normal sayıdadır (Şekil 3.8 B ve C). Hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıkları mevcuttur. Eritrosit zarları hasar görmüş, hücrelerin çoğu normal görünümünü kaybetmiştir (Şekil 3.8 D). Hücre zarı talyum (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarınkine göre daha az hasar görmüş, hücrelerarası bağlantı bölgeleri gözlenebilmektedir (Şekil 3.8 C ve D).

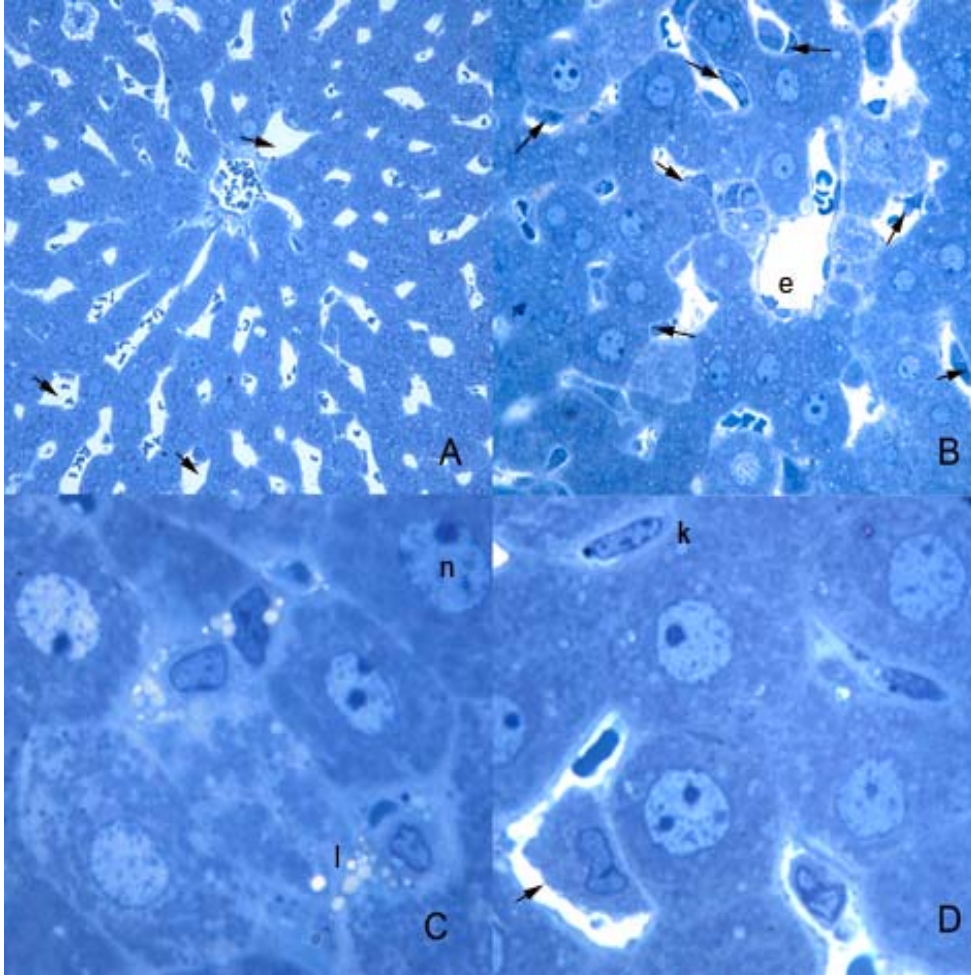
MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda sinüzoidlerde genişleme gözlenmemiştir. Açık ve koyu renkli boyanmış hücreler bu grupta da mevcuttur (Şekil 3.9 A). Karaciğer hücrelerinde hücre zarı belirgin ve hücreler arası bağlantılar görülebilmektedir (Şekil 3.9 C). Kupfer hücreleri yıldızsı görünümlü ve normal sayıdadır (Şekil 3.9 B ve C). Eritrosit zarları hasar görmemiş, disk şeklinde gözlenmiştir (Şekil 3.9 D).

MT I (1 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda ve MT I (2.5 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda karaciğer hücreleri ve sinüzoidler normal görünümlüdür. Kupffer hücrelerinde sayıca artış gözlenmemektedir (Şekil 3.10. A ve D). Her iki grupta da kontrol grubundakine benzer şekilde hücre sınırları belirgin, çekirdek hücrenin ortasında yuvarlak-oval yapıda, çekirdek zarı düzgün görünümlüdür. Eritrositler normal görünümlüdür (Şekil 3.10. B ve C).



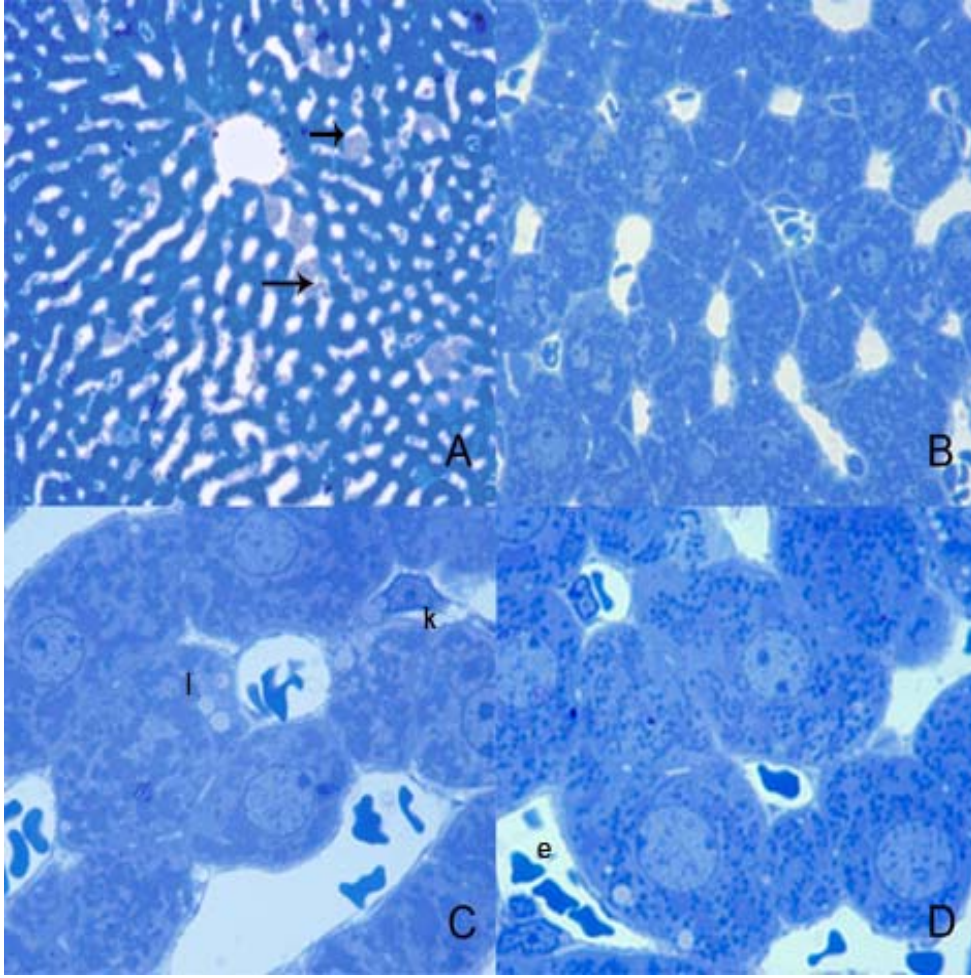
Şekil 3.6. Kontrol grubu (% 0.9 NaCl i.p.) sıçanlarda karaciğer dokusu

A) Portal alan çevresindeki sinüzoidlerin düzenli görünümü X10 Toluidin mavisi B) Karaciğer dokusunun genel görünümü ve normal görünümlü eritrositler (e) ve endotel hücreleri X40 Toluidin mavisi C) Hücre zarı ve çekirdeğin (n) genel görünümü, Hücrelerarası bağlantı bölgeleri (→) X100 Toluidin mavisi D) Kupfer hücresi ve karaciğer hücrelerinin genel yapısı X100 Toluidin mavisi



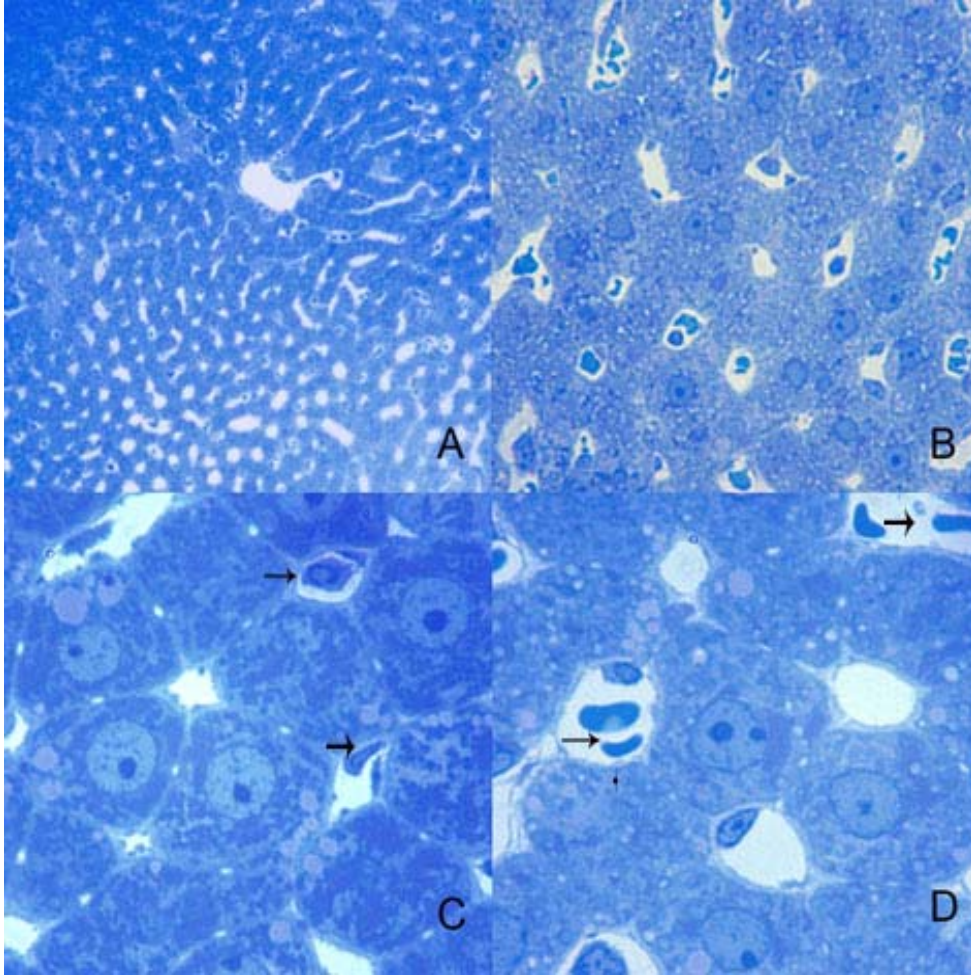
Şekil 3.7. Talyum (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer dokusu

A) Portal alan çevresindeki Sinüzoidlerde genişleme (→) X10 Toluidin mavisi B) Endotel hücrelerinde deformasyon (e), kupfer hücrelerinde sayıca artış ve aktivasyon (→), vakuolizasyon X40 Toluidin mavisi C) Hücre çekirdeğinde deformasyon (n) lipid damlacıklarında sayıca artış (l) X100 Toluidin mavisi D) Kupfer hücresi çekirdeğinde genişleme (k), hücre zarında deformasyon (→) X100 Toluidin mavisi



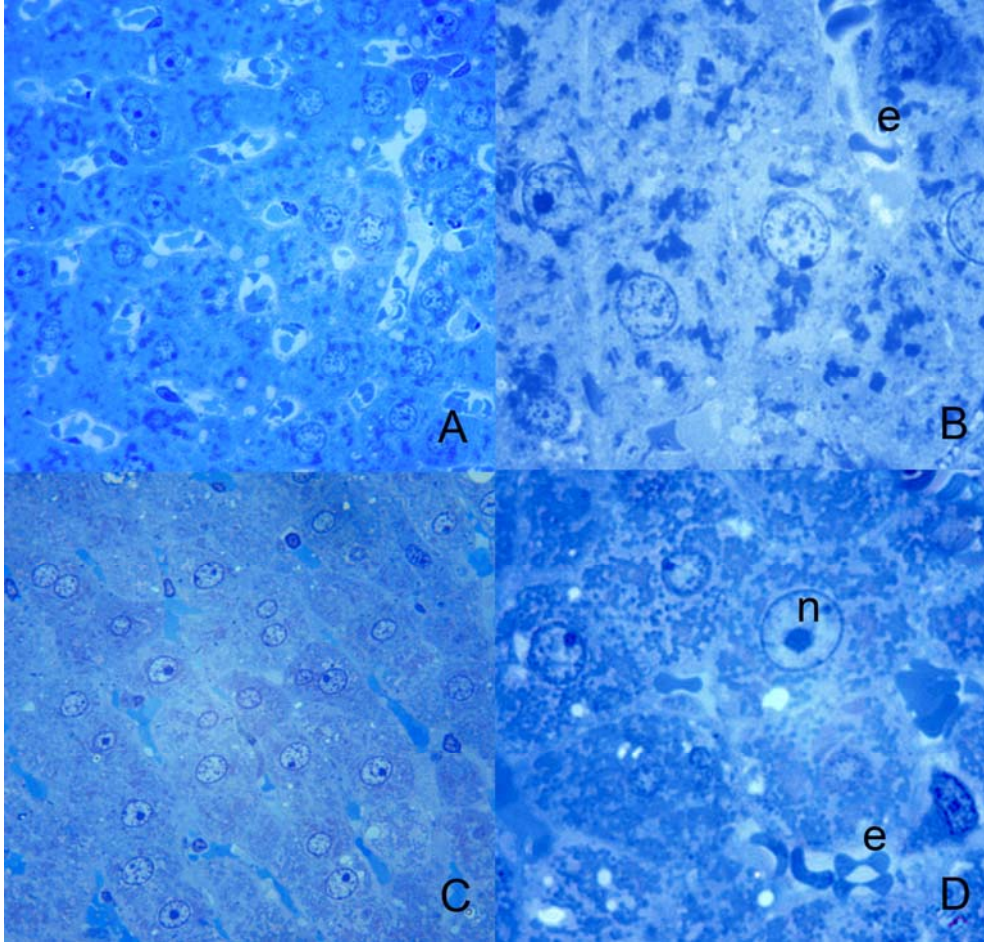
Şekil 3.8. MT I (1 mg/kg i.p.)+TI⁺ (32 mg/kg i.p.) ve uygulanan sıçanların karaciğer dokusu

- A) Düzenli sıralanmış açık ve koyu renkli boyanmış karaciğer hücreleri (→) X10 Toluidin mavisi
 B) Karaciğer hücrelerinin genel görünümü. Kupfer hücreleri sayıca ve şekilsel olarak normal görünümlüdür X 40 Toluidin mavisi C) Kupfer hücresi (k) ve lipid damlacıkları (I) X100 Toluidin mavisi C) Deforme olmuş eritrositler (e) X100 Toluidin mavisi



Şekil 3.9 MT I (2.5 mg/kg i.p.) +TI⁺ (32 mg/kg i.p.) ve uygulanan sıçanların karaciğer dokusu

A) Merkezi ven çevresinde sıralanmış düzenli görünümlü sinüzoidler X10 Toluidin mavisi B) Karaciğer dokusunun genel görünümü X40 Toluidin mavisi C) Normal görünümlü karaciğer hücreleri, kupfer hücreleri ve endotel hücreleri (→). Sitoplazmada az sayıda lipid damlacıkları gözlenmektedir X100 Toluidin mavisi D) Normal görünümlü eritrositler (→) X100 Toluidin mavisi



Şekil 3.10 MT I (1 mg/kg i.p.) ve MT I (2.5 mg/kg i.p.) grubu sıçanların karaciğer dokusu

A) MT I (2.5 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda karaciğer hücrelerinin genel görünümü. X 40 Toluidin mavisi B) MT I (2.5 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda normal görünümlü karaciğer hücreleri ve eritrositler (e) X 100 Toluidin mavisi C) MT I (1 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda karaciğer hücrelerinin genel görünümü. X 40 Toluidin mavisi D) MT I (1 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda normal görünümlü karaciğer hücreleri, nukleus (n) ve eritrositler (e) X 100 Toluidin mavisi

3.2.2. Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubu sıçanların karaciğer ince yapısında mitokondriler çekirdek çevresinde dağılmış ve normal görünümündedir (Şekil 3.11.B). Kristalar paralel olarak sıralanmıştır (Şekil 6a.A). Endoplazmik retikulum sisternaları yapısal bir bütünlük içinde paralel olarak gözlenmektedir (Şekil 3.11.A ve D). Çekirdek yuvarlak şekilli, çekirdek zarının yüzeyi düzgün görünümündedir (Şekil 3.11.C). Çekirdek içerisinde yuvarlak bir çekirdekçik gözlenmekte, zar çevresinde heterokromatin bölgelere rastlanmamaktadır. Hücre zarı ve sınırları belirgindir (Şekil 3.12.A). Endotel hücreleri, yan yana ve düzenli olarak sıralanmıştır (Şekil 3.12.B).

Talyum (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda özellikle mitokondri yapısında ileri derecede deformasyon gözlenmiştir. Mitokondride şişkinlik, mitokondri dış zarında balonlaşma mevcuttur. Kristaların birbirine paralel görünümü bozulmuş, bu yapılar parçalanarak küçük fragmentlere ayrılmışlardır (Şekil 3.13.A). Endoplazmik retikulum sisternalarında şişkinlik ve kopmalar meydana gelmiştir. Sitoplazma içerisindeki glikojen partiküllerinde sayıca artış meydana gelmiştir (Şekil 3.13.B). Çekirdeğin yuvarlak yapısı değişikliğe uğramış, çekirdek zarının yüzeyi girintili çıkıntılı bir görünüm almıştır. Çekirdek zarı çevresinde heterokromatin oluşumlar gözlenmiştir (Şekil 3.13.C). Çekirdek çevresindeki mitokondrilerde kümeleşmeler mevcuttur (Şekil 3.13.D). Kupfer hücre zarında ve çekirdeğinde ileri derecede deformasyon gözlenmiştir (Şekil 3.14.A). Endotel hücreleri hasar görmüş, karaciğer hücrelerinin disse aralığına doğru uzanan mikrovillusları parçalanmıştır (Şekil 3.14. B).

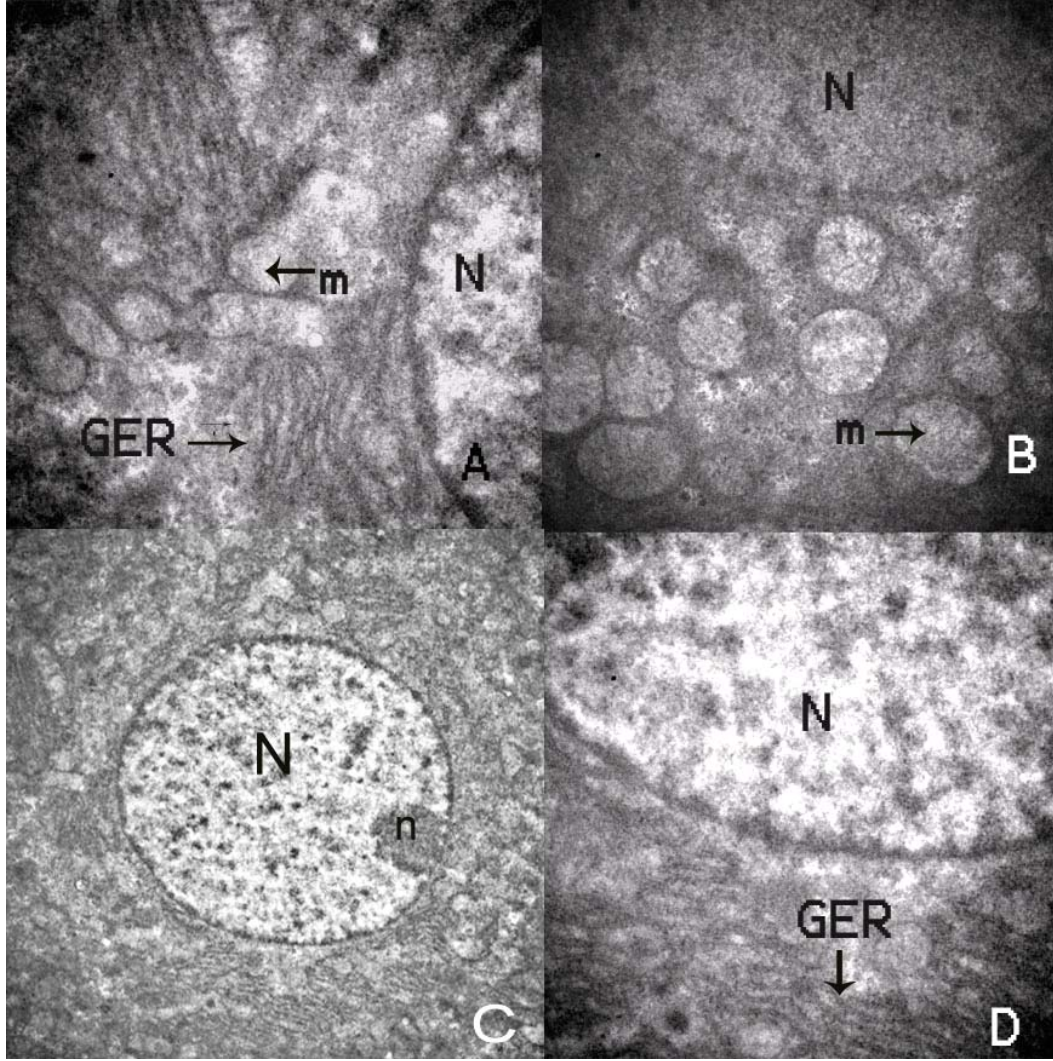
MT I (1 mg/kg i.p.) +TI⁺ (32 mg/kg i.p.) ve uygulanan sıçanlarda hücredeki zarlı yapılarda deformasyon gözlense de, bu bozukluklar Talyum (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlardaki ile aynı düzeyde gözlenmemiştir. Bu durum, düzenli görünümü bozulan ancak kopma ve parçalanma gözlenmeyen endoplazmik retikulum sisternalarında belirgindir Çekirdek zarı düzensiz görünümlü ve çekirdek yuvarlak görünümünü kaybetmiştir. Çekirdek zarı çevresinde az miktarda heterokromatin birikimler mevcuttur. (Şekil 3.15.A). Mitokondri kristalarında fragmentasyon yoktur. Bu organeller çekirdek çevresinde

kümeleşme göstermemekte, kontrol grubundakine benzer yapılarını korumaktadırlar (Şekil 3.15. B ve C). Endotel hücreleri hasar görmüştür (Şekil 3.15.D). Hücre zarı ve sınırları belirgin olmakla birlikte, hücreler arası boşluklar genişlemiştir (Şekil 3.16. A). Kupffer hücreleri ve çekirdeği yapısını korumaktadır (Şekil 3.16. B).

MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda MT I uygulamasına bağlı olarak hücredeki zarlı yapılarda deformasyon oldukça az olarak gözlenmiştir. Bu durum özellikle talyum uygulaması nedeniyle en fazla zarar gören organel olan mitokondrilerde belirgindir. Mitokondrilerde şişme gözlenmemiş, kristalar düzgün, paralel şekilde sıralanmıştır. Mitokondri dış zarı hasarsızdır. Mitokondri içerisinde opak kalsiyum granülleri gözlenmektedir. Mitokondriler, çekirdeğe yakın ve dağınık durumdadırlar (Şekil 3.17. A ve C). Endoplazmik retikulum sisternaları şişme ve parçalanma gözlenmeksizin kontrol grubundakine benzer yapılarını korumaktadır (Şekil 3.17 B). Kupffer hücresi ve çekirdeği şeklini korumakta, endotel hücreleri yapılarını koruyarak yan yana sıralanmaktadır. Mikrovillusların yapısı korunmuştur (Şekil 3.17. D, Şekil 3.18. A, Şekil 3.18. B).

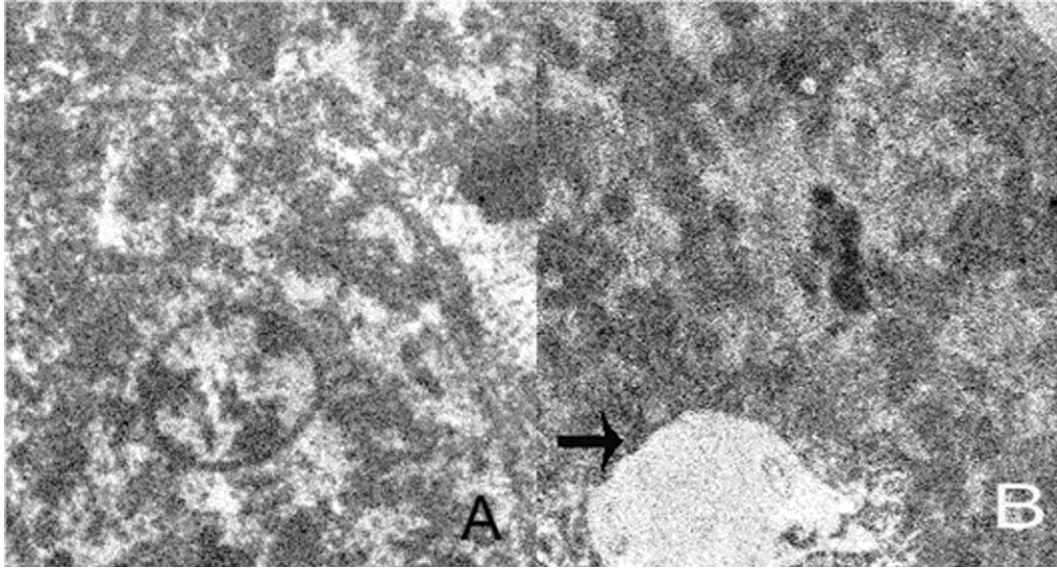
MT I (1 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda karaciğer ince yapısı kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir. Karaciğer hücresinin genel görünümü normal yapıda yuvarlak-oval yapıdaki çekirdek hücrenin ortasında ve sınırları belirgindir (Şekil 3.19 C). Granüllü endoplazmik retikulum sisternaları tek parça halinde paralel sıralanmaktadır (Şekil 3.19 A ve D). Mitokondriler çekirdek etrafında normal görünümlü olarak dağılmaktadır (Şekil 3.19 B).

MT I (2.5 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda karaciğer hücresi normal görünümlü, mitokondriler çekirdek etrafında dağılmış olarak normal yapıda gözlenmektedir (Şekil 3.20 A ve B). Granüllü endoplazmik retikulum sisternaları bütünlüğünü korumakta düzenli olarak sıralanmaktadır. Çekirdek zarı hasarsız, düzgün görünümlüdür (Şekil 3.20. C ve D).



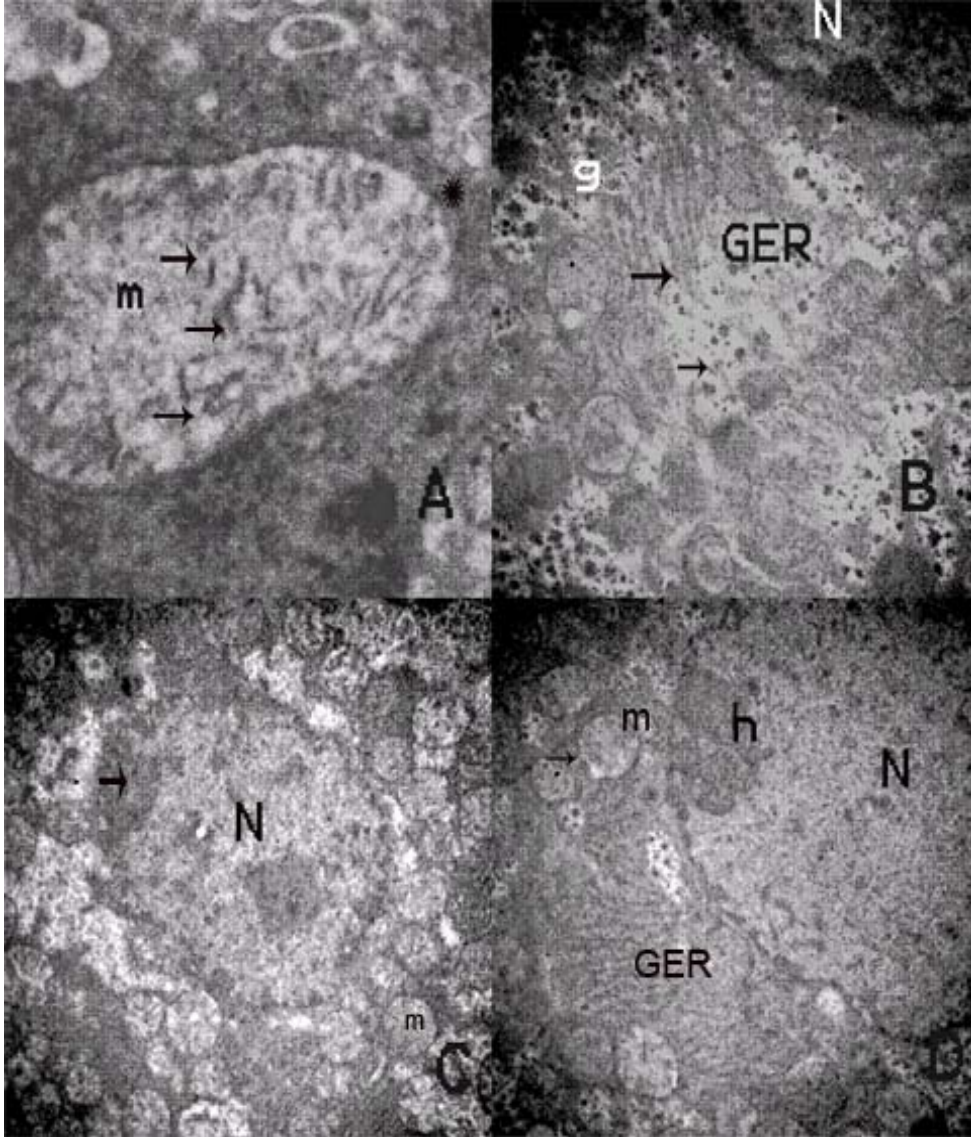
Şekil 3.11. Kontrol grubu (% 0.9 NaCl i.p.) sıçanların karaciğer ince yapısı

A) Deforme olmamış çekirdek zarı (N), normal görünümlü mitokondriler (m) ve granüllü endoplazmik retikulum (GER) (X 16500) B) Çekirdek (N) çevresinde belirgin olarak yer alan mitokondriler (m) (X11500) C) Küresel şekilli çekirdek (N) ve çekirdekçik (n). Çekirdek zarı çevresinde heterokromatin bölge gözlenmemektedir. (X6000) D) Çekirdek (N) ve paralel sıralanmış granüllü endoplazmik retikulum sisternaları (GER)



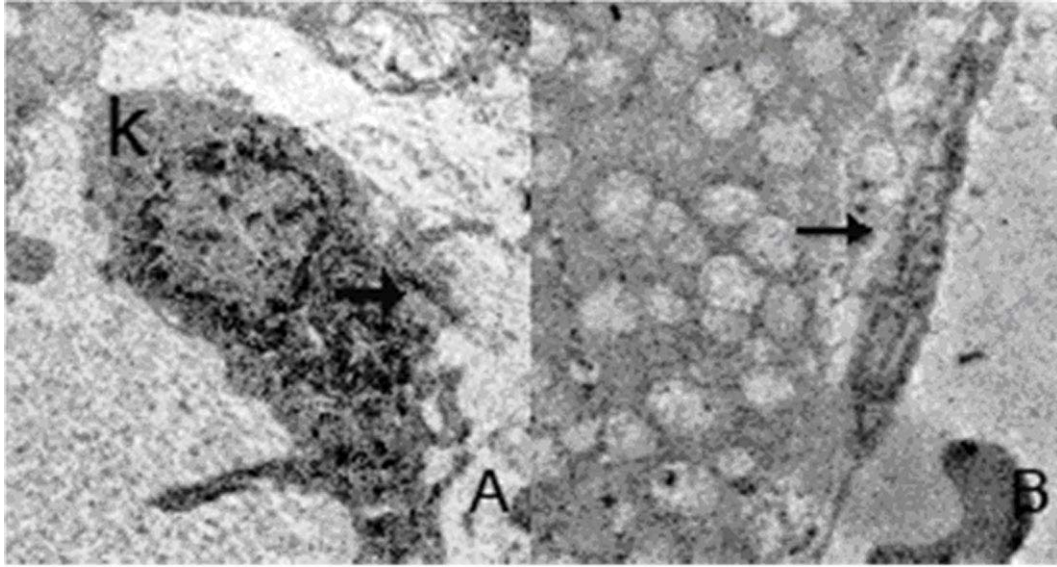
Şekil 3.12. Kontrol grubu (% 0.9 NaCl i.p.) sıçanların karaciğer ince yapısı

A) Karaciğer hücresi çekirdeği ve zarı, genel görünüm (X 1700) B) Endotel hücreleri yan yana sıralanmış düzenli görünümüdür (X 1700)



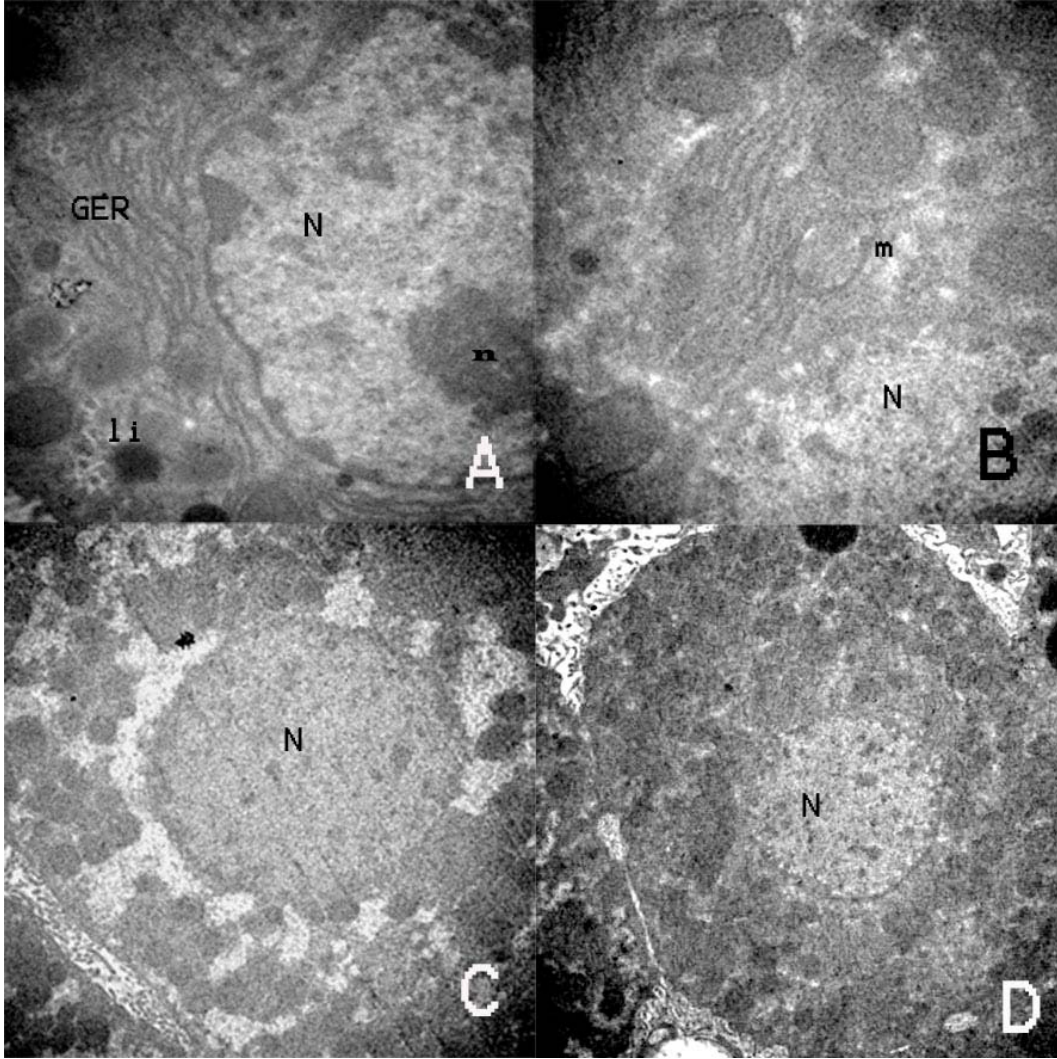
Şekil 3.13. Ti^{+} (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer ince yapısı

A) İç ve dış zarları ileri derecede deforme olmuş mitokondri. Kristalarda parçalanma (→) ve mitokondri dış zarında şişme (*) gözlenmektedir (X 99000). B) Granüllü endoplazmik retikulum sisternalarında kopma(→) (GER) ve glikojen partiküllerinde sayıca artış (g) (X 16500) C) İleri derecede deforme olmuş çekirdek (N) ve çekirdek zarı. Çekirdek zarı çevresinde heterokromatin bölgeler (→) ve çekirdekten uzaklaşarak kümeleşmiş mitokondriler (m) gözlenmektedir (X8200). D) Yüksek büyütmedeki deforme olmuş çekirdek zarı, heterokromatin birikimi (h), düzensiz görünümlü granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve şişkinleşmiş mitokondriler (m) (→) (X 9900)



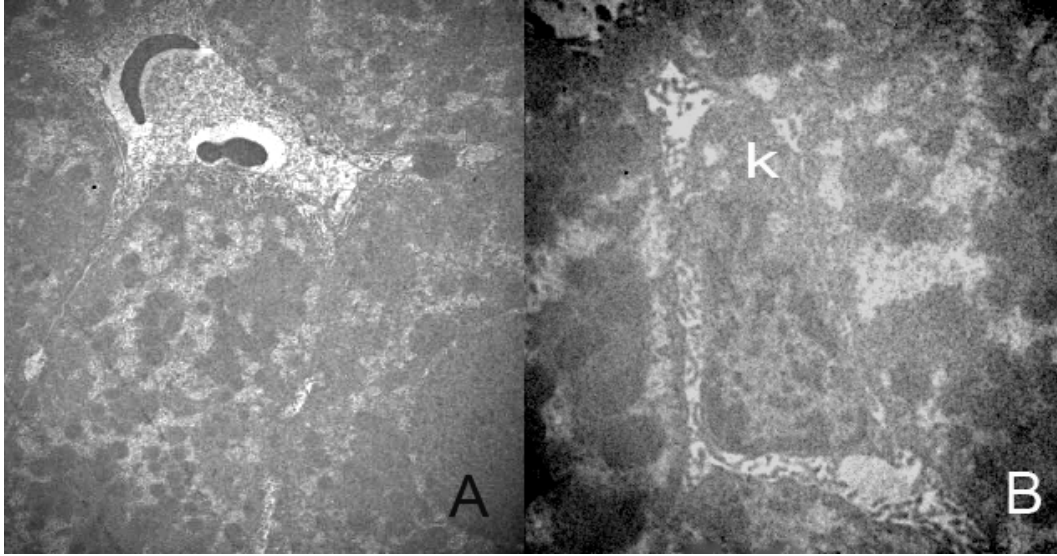
Şekil 3.14. Tl^+ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer ince yapısı

A) Kupffer hücresi (K). Çekirdek ve hücre zarında deformasyon gözlenmektedir (X 8200). B) Endotel hücre zarı ve çekirdeğinde deformasyon ve karaciğer hücresi mikrovilluslarında parçalanmalar ($\rightarrow$) (X 9900)



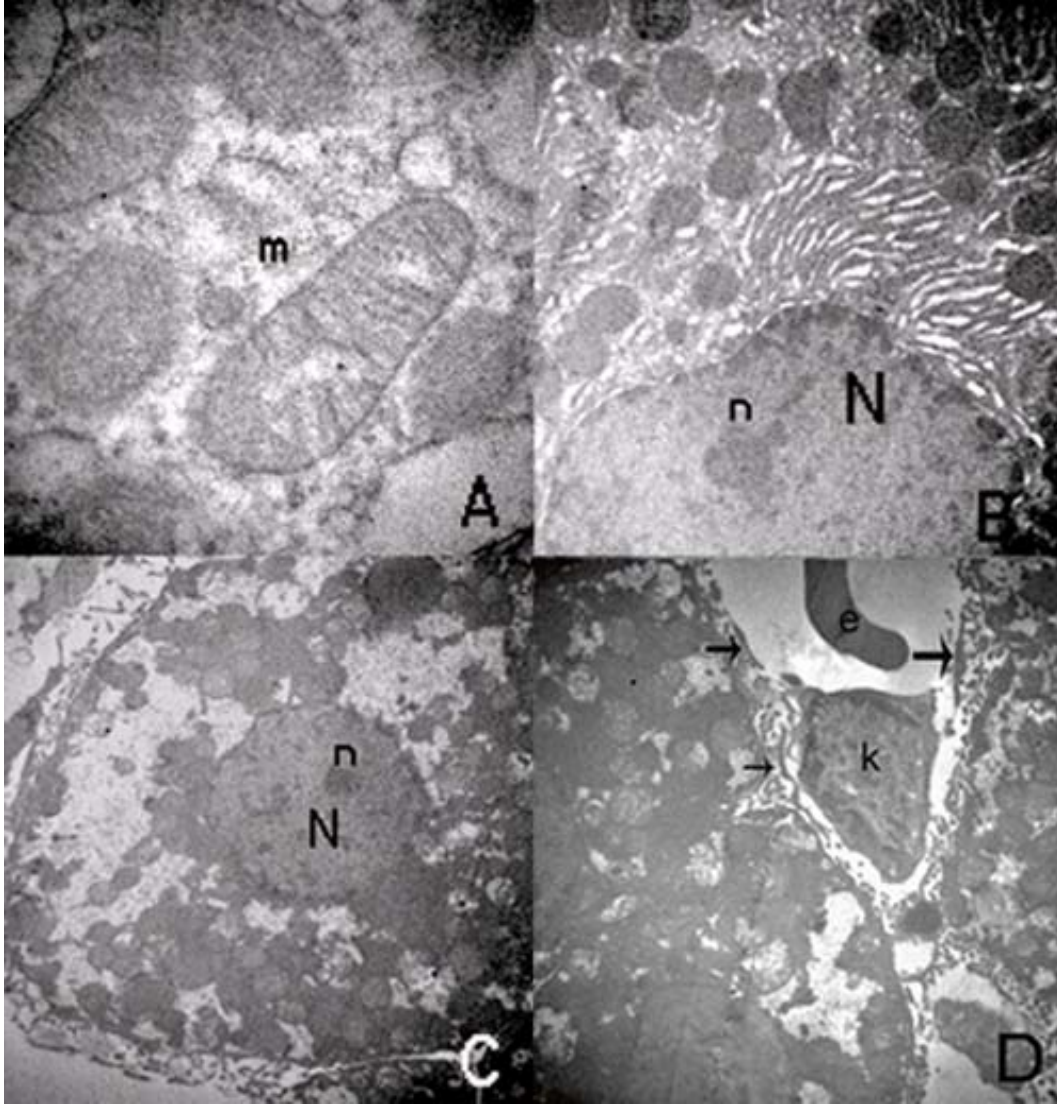
Şekil 3.15. MTI (1mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) ve uygulanan sıçanların karaciğer ince yapısı

A) Granüllü endoplazmik retikulum (GER) sisternaları düzensiz görünümlü ancak yapısal bütünlüğünü korumaktadır. Çekirdekte deformasyon ve az miktarda heterokromatin birikimleri (→) mevcuttur (X16500) B) Mitokondrilerde şişme (m) (X16500) C) Çekirdek (N) ve mitokondri kümelerinin genel görünümü, endotel hücreleri arasındaki genişlemiş boşluklar (X8200) D) Hasar görmüş endotel hücreleri (→) (X4200)



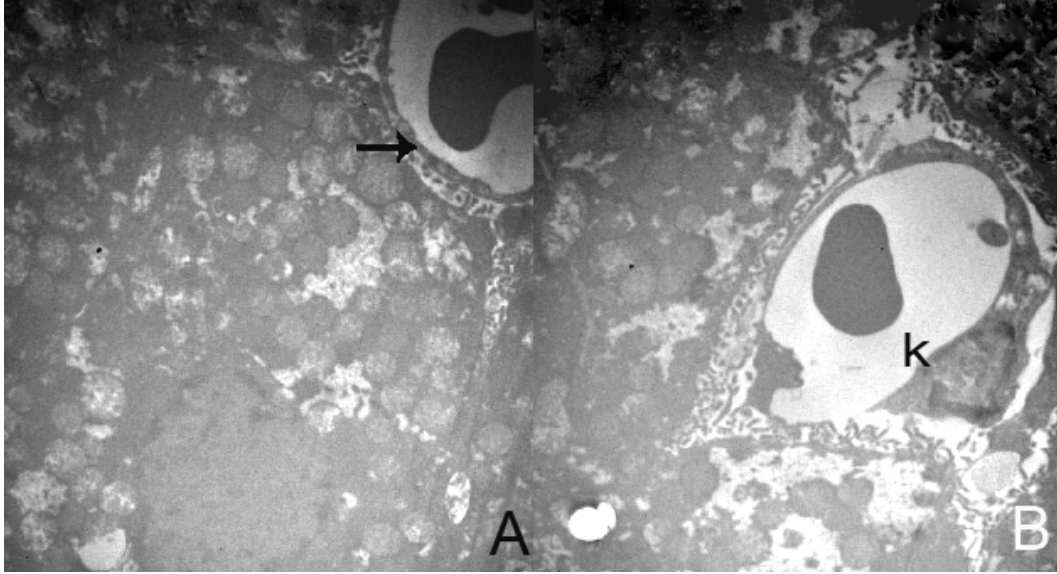
Şekil 3.16. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) ve uygulanan sıçanların karaciğer ince yapısı

A) Karaciğer hücrelerinin genel görünümü (X 4200) B) Kupffer hücresi ve mikrovillusların genel görünümü (X 8200)



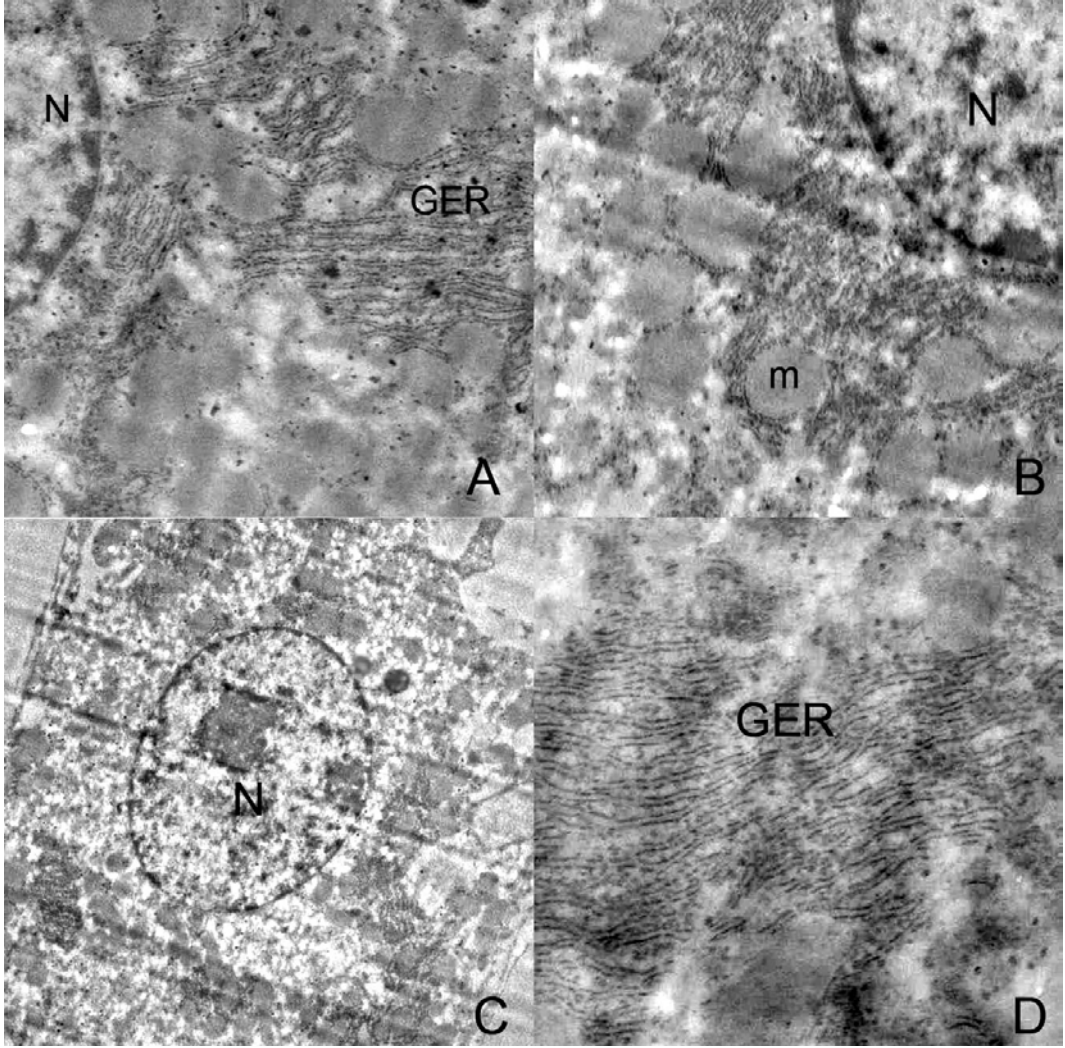
Şekil 3.17. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + Tl^+ (32 mg/kg i.p.) ve uygulanan sıçanların karaciğer dokusu

A) Mitokondri (m) iç ve dış zarları normal görümlü, kristalar paralel olarak sıralanmıştır. Kalsiyum granülleri gözlenmektedir (→) (X 43000) B) Granüllü endoplazmik retikulum (GER) sisternaları paralel olarak sıralanmış ve bütünlüğünü korumaktadır. Mitokondriler (m) çekirdek çevresinde dağılmış olarak görülmektedir (X11500) C) Karaciğer hücresinin genel görüntüsü (X 6000) D) Kupffer hücresi (k) ve hasar görmemiş endotel hücreleri (→). Normal görümlü eritrosit (e) (X 6000)



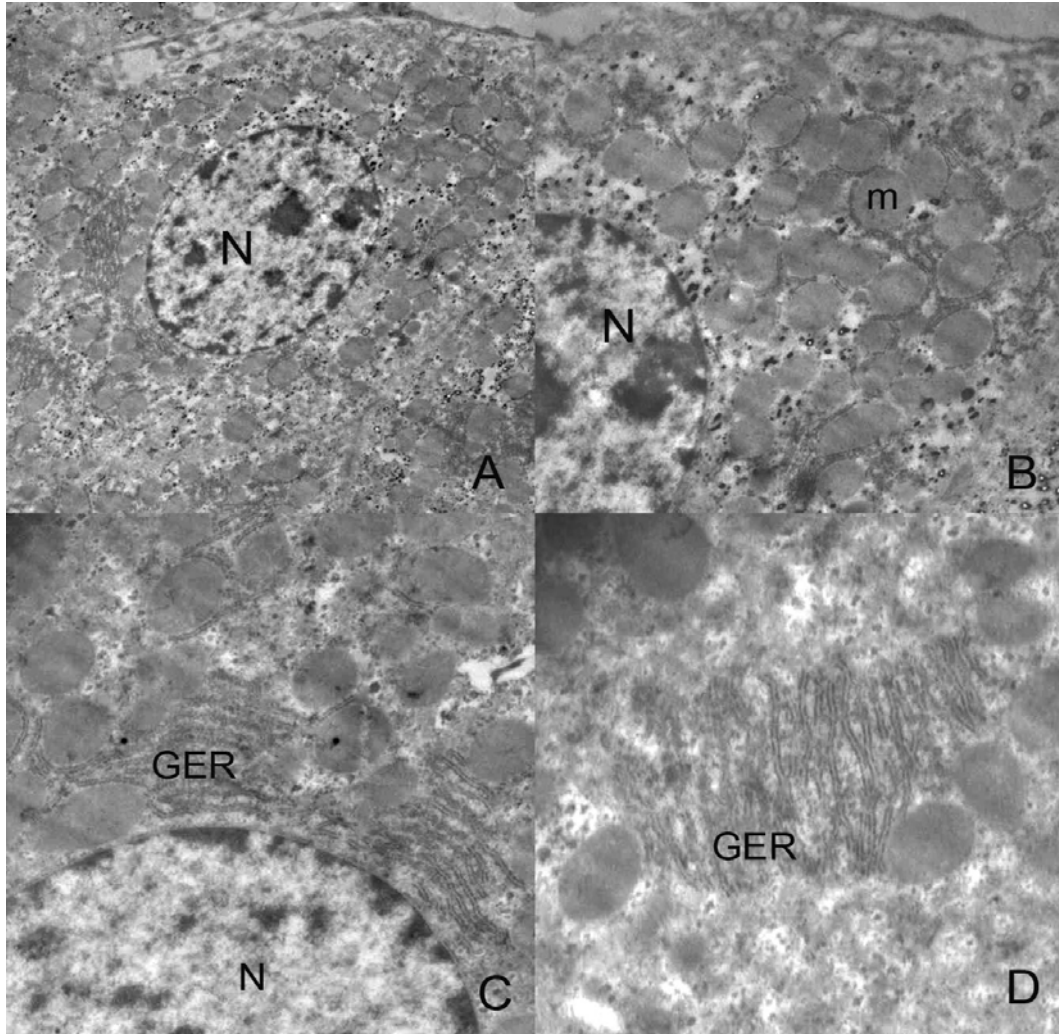
Şekil 3.18. MT I (2.5 mg/kg i.p.)+TI⁺ (32 mg/kg i.p.) ve uygulanan sıçanların karaciğer dokusu

A) Karaciğer hücresi, normal yapıda, düzenli olarak sıralanmış endotel hücreleri (→) ve mikrovilluslar (X 6000) B) Kupffer hücresi yıldızsı şekilli, hücre zarı ve çekirdek normal görünümlüdür. Mikrovilluslar belirgin olarak gözlenmektedir ve bütünlüğünü korumaktadır (X 6000)



Şekil 3.19. MT I (1 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer dokusu

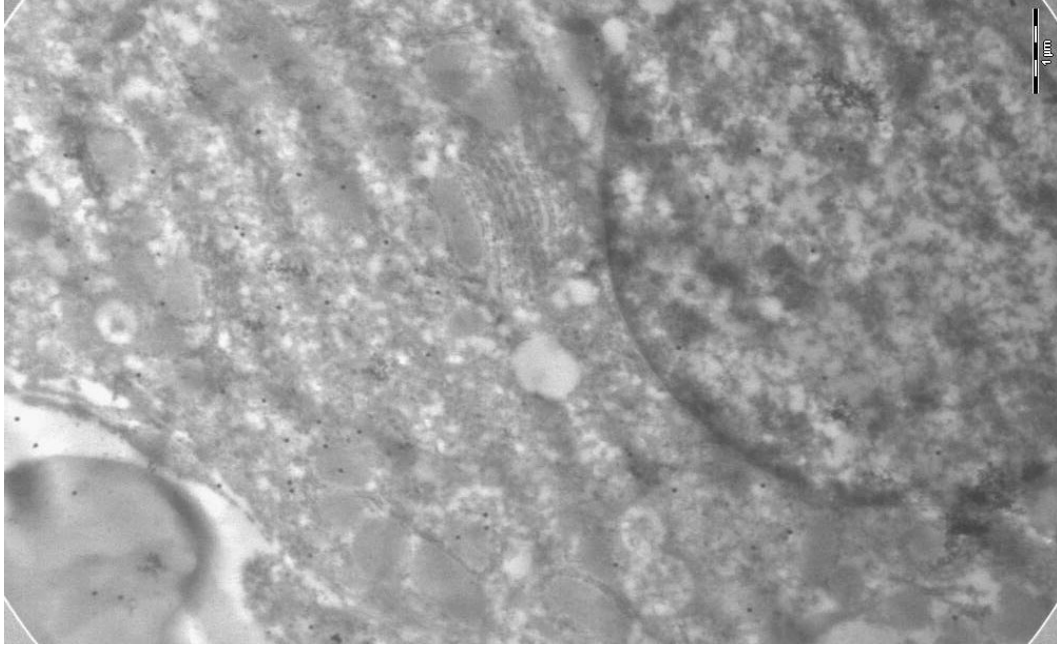
A) Düzenli yapıdaki GER sisternaları (X 16500) B) Normal görünümlü mitokondriler (m), düzgün görünümlü çekirdek (N) ve çekirdek zarı (X 16500) C) Karaciğer hücresinin genel görünümü (X 6000) D) Yüksek büyütmede normal yapıdaki GER sisternaları (26500)



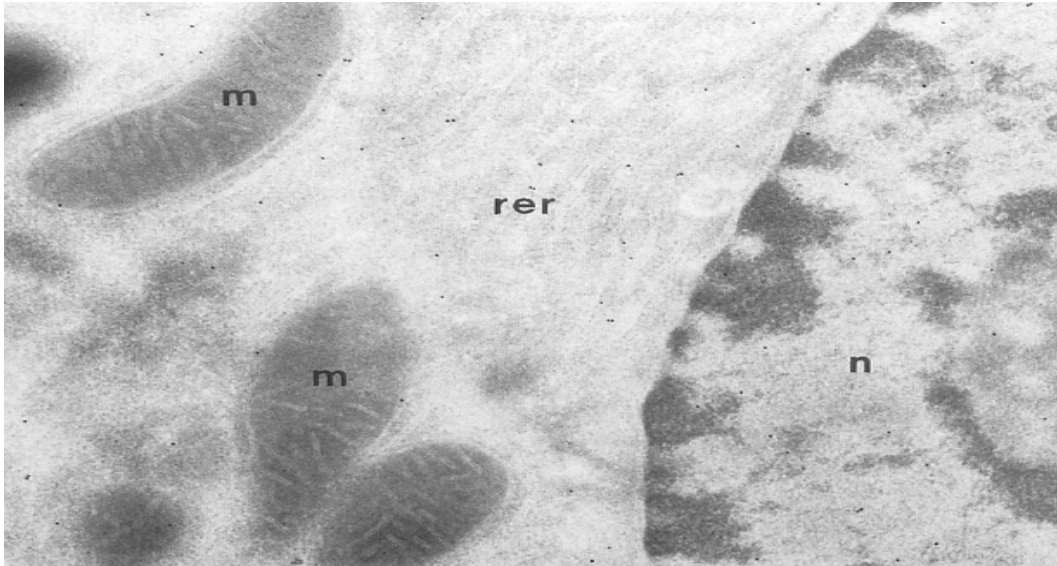
Şekil 3.20. MT I (2.5 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanların karaciğer dokusu

A) Karaciğer hücresi genel görünümü (X 6000) B) Çekirdeğin çevresinde dağılmış normal görünümlü mitokondriler (m) (X 11500) C) Normal yapıdaki çekirdek (N) ve GER (16500) D) Yüksek büyütmede normal yapıdaki GER sisternaları (X 20500).

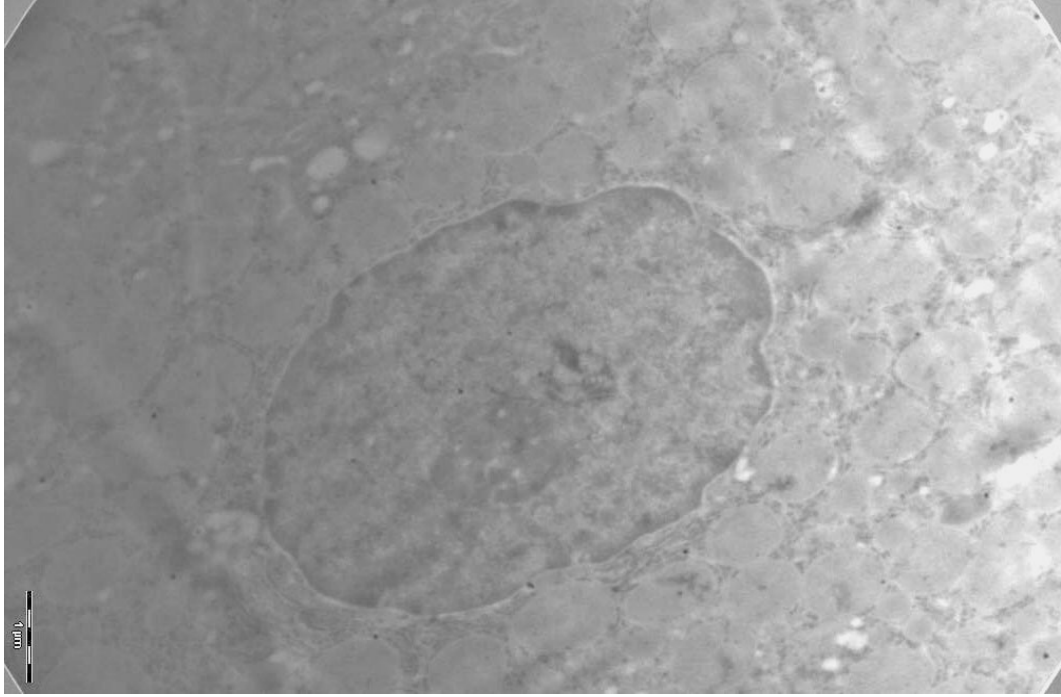
3.3. Cu-Zn SOD Enziminin İmmunohistokimyasal Olarak İşaretlenmesi Sonucunda Elde Edilen Bulgular



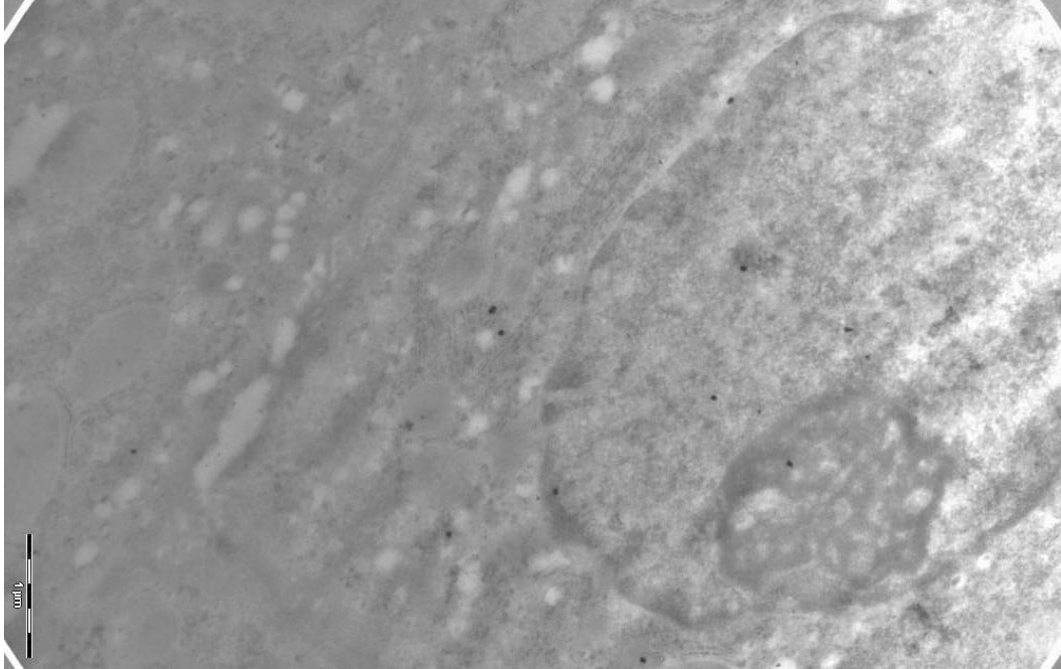
Şekil 3. 21. Kontrol grubu (% 0,9 NaCl i.p.) sıçanlarda grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu (X11500) 20 nm’lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir



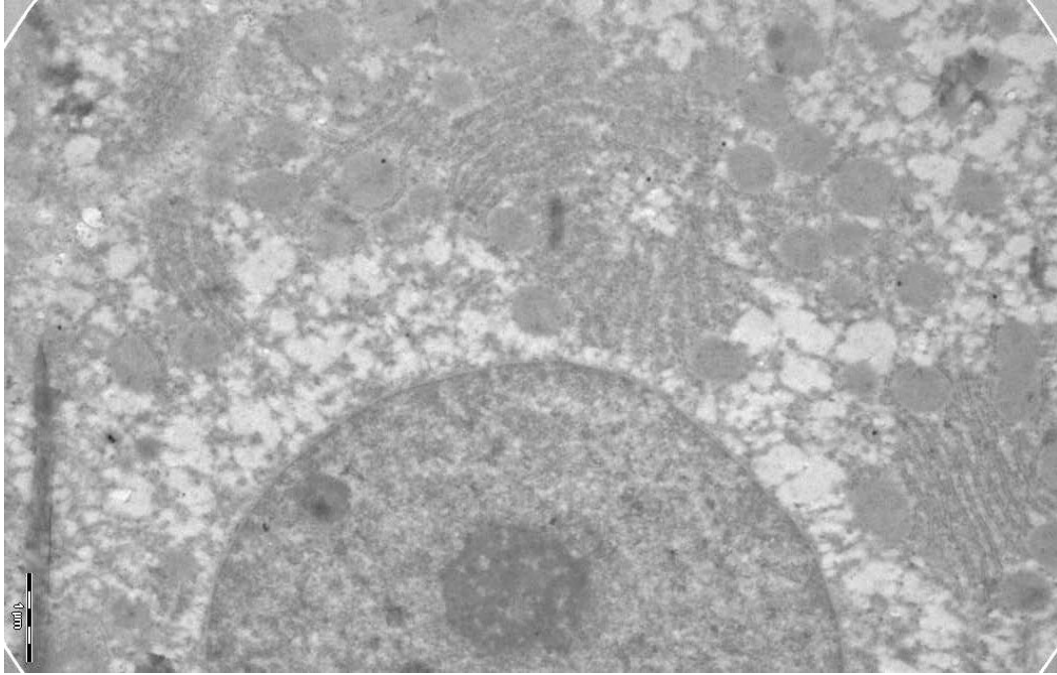
Şekil 3.22. Chang ve ark., (1988)’ın bulguları: Cu-Zn SOD wistar cinsi sıçanların karaciğerinde yaklaşık olarak % 73.1 oranında sitoplazmada, % 11.9 oranında çekirdekte, % 15 oranında ise diğer organellerde bulunmaktadır (X 20000). 10 nm’lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir



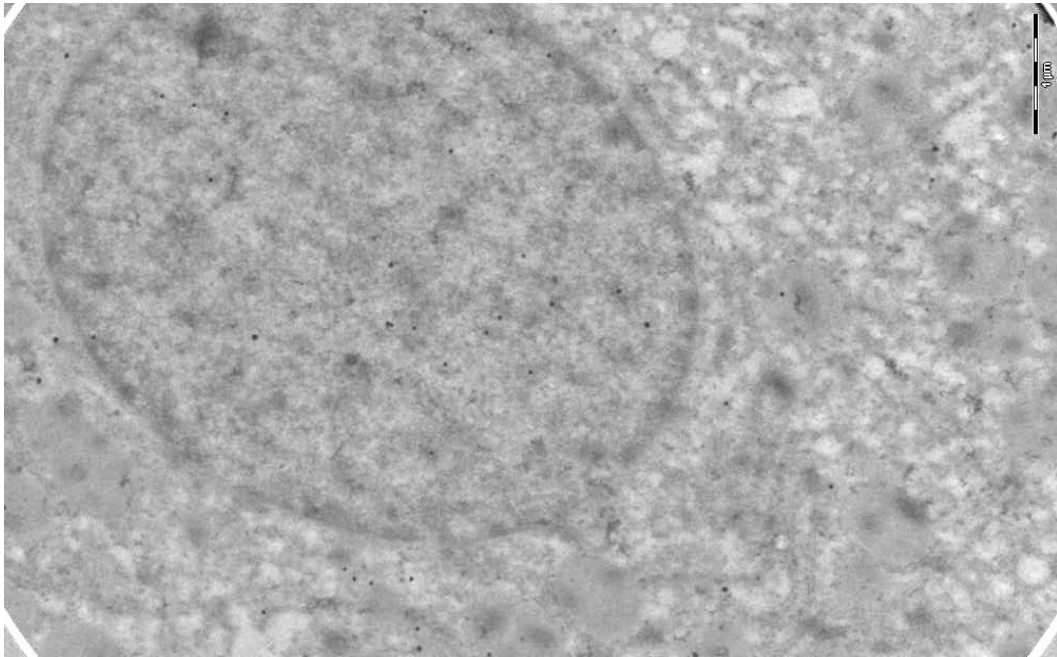
Şekil 3.23. TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu (X 11500) 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir



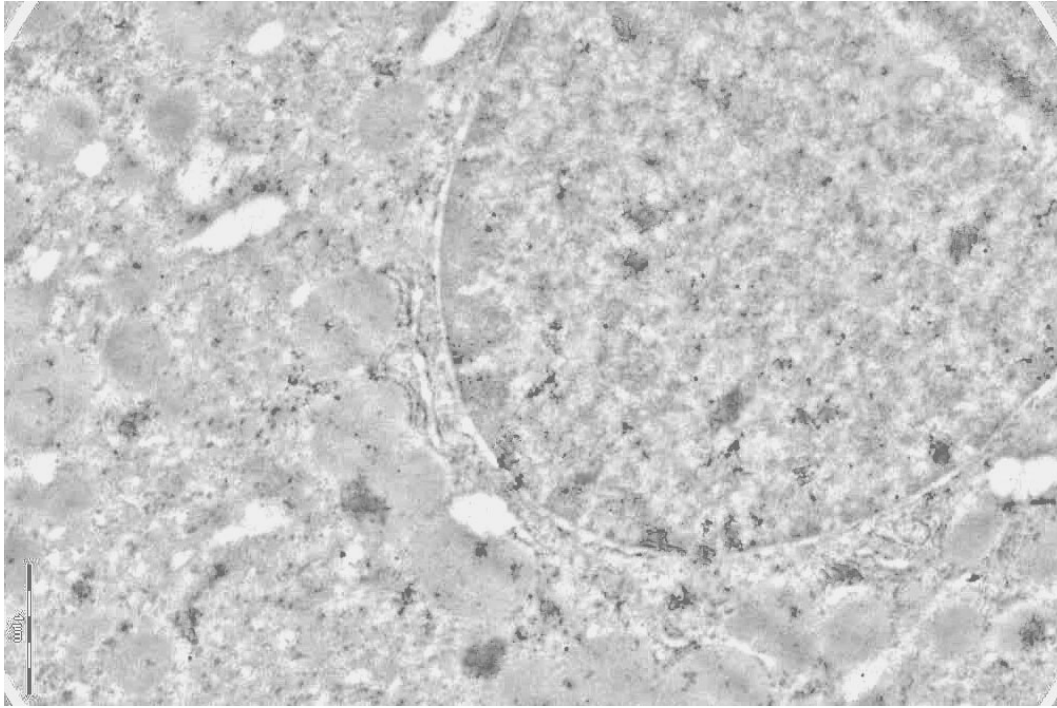
Şekil 3.24. TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu (16500) 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir



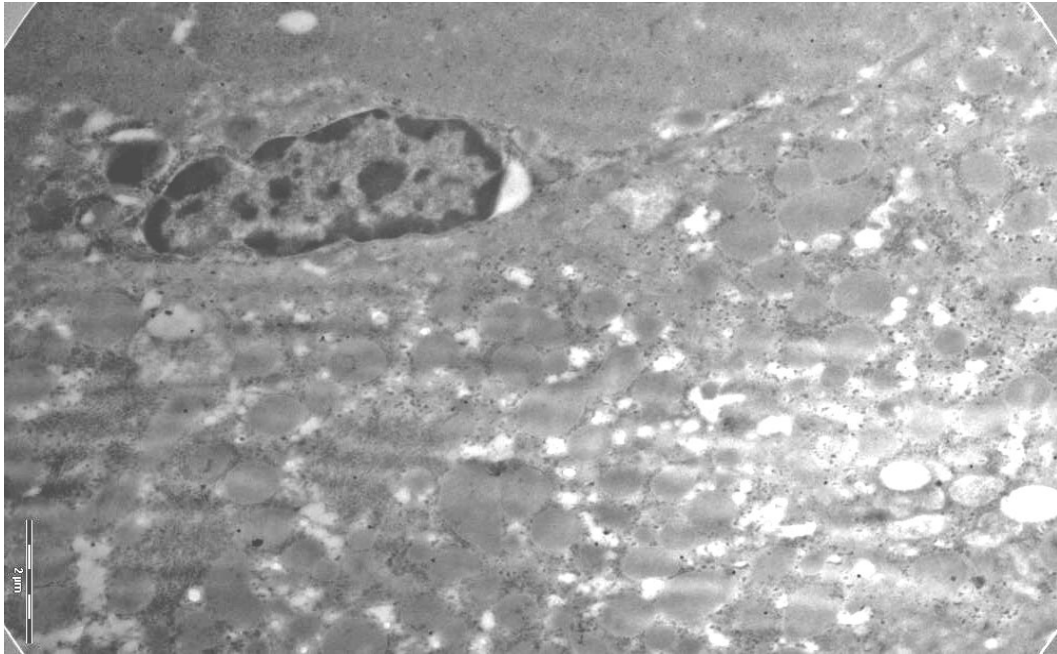
Şekil 3.25. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (X 11500) 20 nm’lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir.



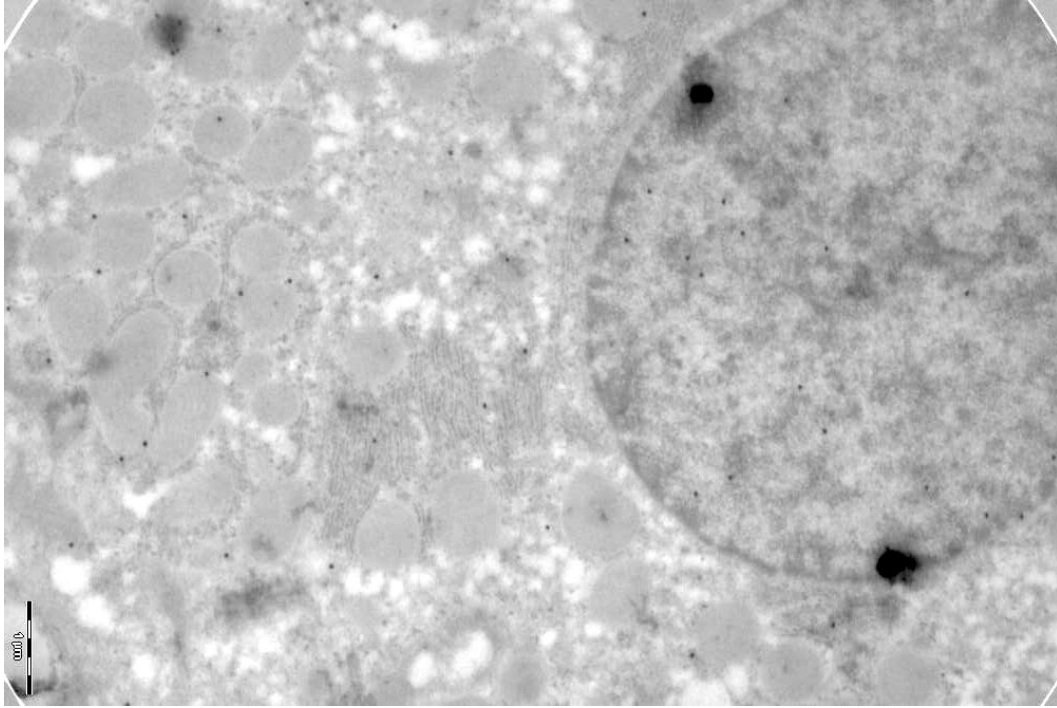
Şekil 3.26. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (X 11500) 20 nm’lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir.



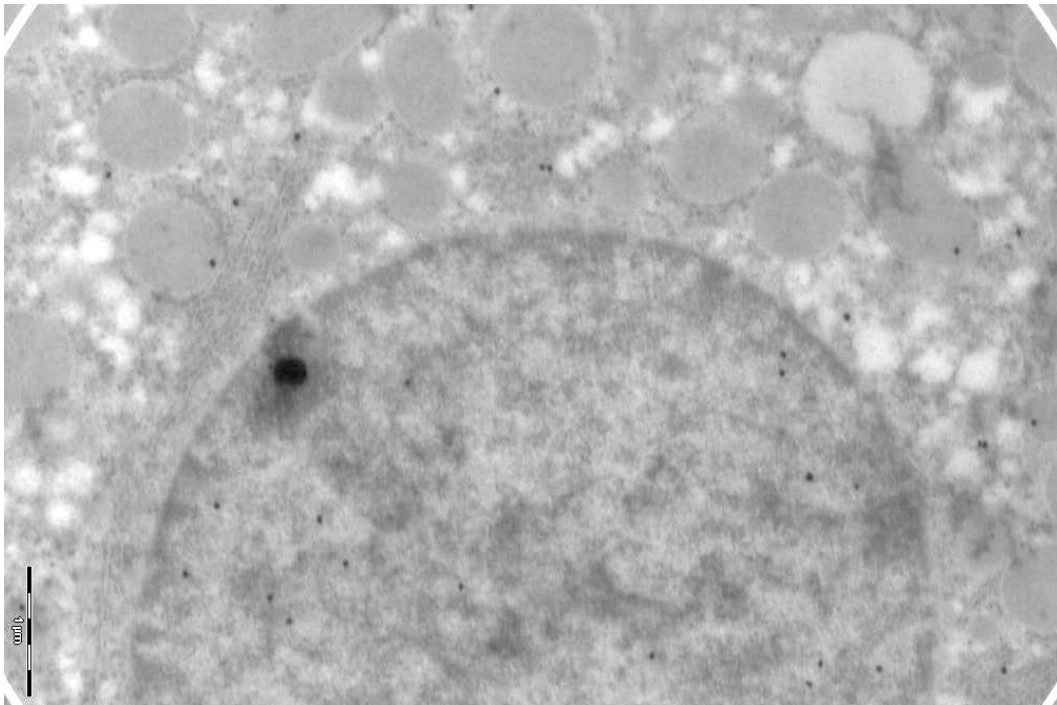
Şekil 3.27 MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu (X 16500) 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir.



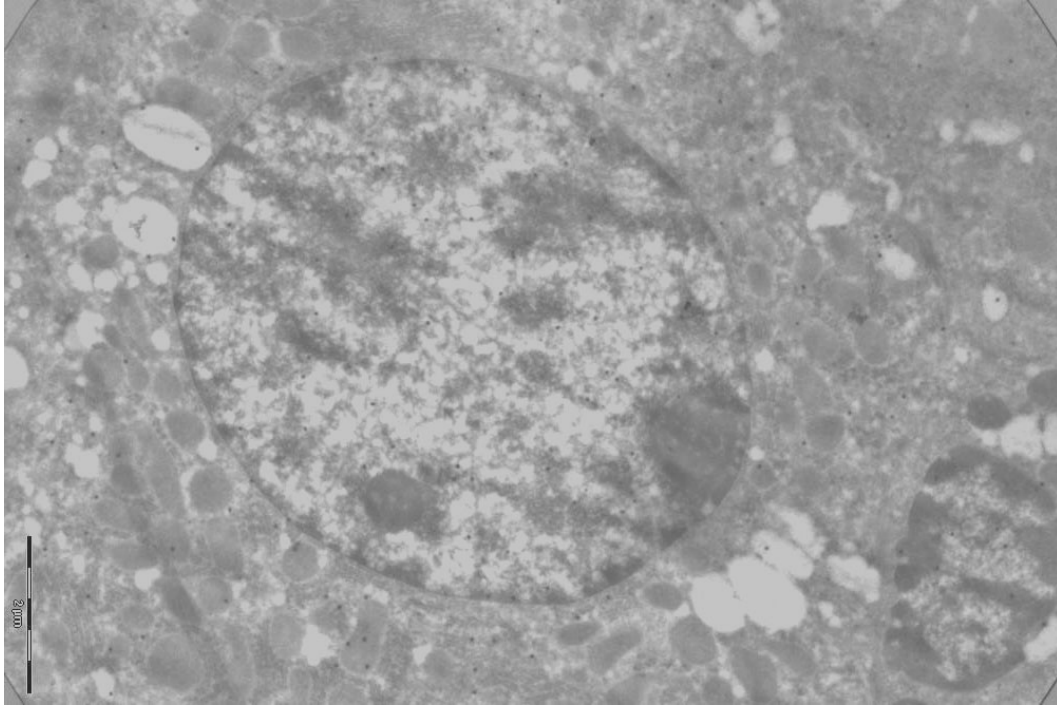
Şekil 3.28. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu (X 8200) 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir.



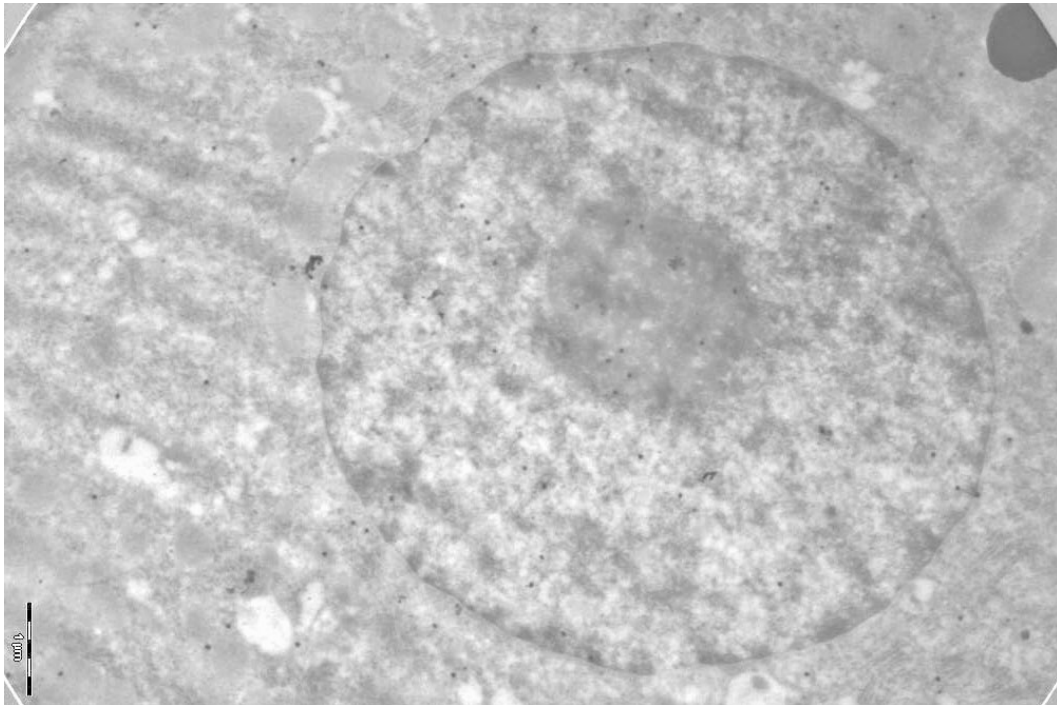
Şekil 3.29. MT I (1 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (X 11500) 20 nm’lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir



Şekil 3.30. MT I (1 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (X16500) 20 nm’lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir



Şekil 3.31. MT I (2.5 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu (X 9900) 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir



Şekil 3.32. MT I (2.5 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu (X 11500) 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiştir

Deney Grupları	İmmunohistokimyasal bulgular kontrol grubu ile kıyaslandığında % değişim	Enzim aktivitesi bulguları kontrol grubu ile kıyaslandığında % değişim
TI+ (32 mg/kg i.p.)	% 55 azalma	% 54 azalma
MT I (1 mg/kg) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 33 azalma	% 37 azalma
MT I (2.5 mg/kg) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 8 azalma	% 5 azalma
MT I (1 mg/kg)	% 5 azalma	% 6 azalma
MT I (2.5 mg/kg)	% 1 azalma	% 3 azalma

Çizelge 3.13 İmmunohistokimyasal bulgular ile enzim aktivitesi bulguları kontrol grupları ile kıyaslandığında yüzde (%) değişim oranları

Deney grupları	Deney gruplarında Cu-Zn SOD enziminin hücre içi dağılımı		
	sitoplazma	çekirdek	organeller
Kontrol	% 70	% 14	% 16
TI+ (32 mg/kg i.p.)	% 57	% 33	% 10
MT I (1 mg/kg) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 61	% 27	% 12
MT I (2.5 mg/kg) + TI (32 mg/kg i.p.)	% 69	% 17	% 14
MT I (1 mg/kg)	% 64	% 19	% 17
MT I (2.5 mg/kg)	% 67	% 14	% 19

Çizelge 3.14. Cu-Zn SOD enziminin hücre içi dağılımında meydana gelen yüzde (%) değişim

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Ağır metallerin tamamına yakın bir bölümünün canlı hücreler için toksik oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte, bazı ağır metallerin hücrelere verdikleri hasarın mekanizmaları halen tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Uzun bir süredir çinko (Zn), kadmiyum (Cd), civa (Hg), kurşun (Pb), talyum (TI) gibi metallerin, proteinlerin sülfhidril gruplarına bağlanarak enzim fonksiyonlarını inhibe ettikleri bilinmektedir. Yüksek teknolojik uygulamalarda bugün ve gelecekte yoğun kullanım alanlarının bulunması, medikal uygulamalarda geçmişte ağırlıklı olarak kullanılmış, günümüzde ise sınırlı da olsa kullanılmaya devam ediliyor olması, Pb ve Hg ile kıyaslandığında çok daha yüksek toksisiteye sahip olması nedeniyle TI metali potansiyel bir kirlilik kaynağı oluşturmaktadır. Ancak klasik analitik medtodlarla belirlenebilmesinin zor olması nedeniyle, diğer metallere oranla daha az çalışılmıştır (Peter ve Viraraghavan 2005).

6 kD'luk bir protein olan Metallothionein (MT), yüksek sistein içeriği nedeniyle ağır metal iyonlarının bağlanabilecekleri önemli hedef moleküllerdir. Cd, Zn ve Cu metallerinin kinetiklerinde önemli rol oynamasının yanı sıra, son zamanlarda MT'in galyum (Ga), germanyum (Ge), indium (In), antimon (Sb), telluryum (Te), itrium (Y), niobiyum (Nb), talyum (TI) ve bizmut (Bi) gibi yüksek teknolojiye kullanılmakta olan çeşitli metallerin metabolizmasındaki rolü de araştırma konusu olmaktadır (Zierold 2000). Daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda, MT'in metal detoksifikasyonundaki görevleri özellikle kadmiyum toksisitesi ile ilgili ağırlıklı olarak çalışılmış, karaciğerde bulunan MT'in yapısındaki çinko ile kadmiyumun yer değiştirdiği, MT'nin Cd'ü sitozölde bağladığı bu sayede karaciğer dokusunun Cd toksisitesinin etkilerinden korunduğu rapor edilmiştir (Klaassen ve Liu 1998; Nordberg ve ark. 1998). Çeşitli metallerin toksik olmayan düşük dozlarına in vivo veya in vitro olarak maruz bırakılan hücrelerde MT indüklenmesine bağlı olarak, daha sonraki yüksek dozlara karşı bir savunma mekanizması oluşmaktadır (Klaassen ve Liu 1998).

MT'in sentezi çeşitli metaller tarafından indükleniyor olsa da TI'un hücre içerisinde MT gibi sülfidril gruplarınca zengin moleküllerin sentezini

indüklediği rapor edilmiştir (Zierold 2000). MT'in ekstraselüler olarak uygulanmasıyla meydana gelen hücresel yanıtlar, çeşitli dokularda biyokimyasal, histopatolojik ve immünolojik açılardan çalışılmıştır. Mimura ve ark. (1988) Wistar cinsi sıçanlarda HCl-etanol ile indüklenen gastrik ülserin baskılanmasında MT enjeksiyonunun etkilerini araştırmış ve oluşan gastrik lezyonların analizine bağlı olarak, MT enjeksiyonunun gastrik ülser oluşumuna karşı koruyucu etkileri olduğunu ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde Youn ve ark. (2002)'nin çalışmalarında, kronik inflamatuvar otoimmün bir hastalık olan romatoid artrit tedavisinde MT'nin rolü, farelere i.p. MT enjeksiyonu yapılarak araştırılmış, elde edilen bulgular MT'in proinflamatuvar yanıtı inhibe ederek ve inflamatuvar otoimmün yanıtlara eşlik eden oksidatif hasarı azaltarak hastalığın oluşumunu engellediğini açığa çıkarmıştır.

TI metalinin toksik etkileri, MT'lerin çeşitli metallerle olan etkileşimleri ve deneysel olarak indüklenen çeşitli hastalık modelleri üzerinde MT'lerin etkilerinin belirlenmesine yönelik olarak yukarıda bahsedilenlere benzer pek çok çalışma bulunmakla birlikte, TI'un hücrelerde oluşturduğu oksidatif strese bağlı membran ve organel hasarlarına karşılık, MT'lerin etkileri daha önce hiçbir çalışmada araştırılmamıştır.

Karaciğer, başta alkol ve ilaçlar olmak üzere çeşitli ksenobiyotikleri metabolize eden ve bunların meydana getirebileceği hücresel hasarların önlenmesinde görev yapan çok sayıda enzim proteinlerinin sentezlendiği bir organ olarak, sitotoksitenin değerlendirilmesinde sıklıkla model olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda, TI toksisitesinin neden olduğu oksidatif stres ve bu strese karşı MT I'in koruyucu etkileri karaciğer dokusunun yapısal ve ince yapısal düzeylerde incelenmesiyle ortaya koyulmuştur. Elde edilen histopatolojik bulguları desteklemek amacıyla, antioksidan enzim düzeylerindeki değişiklikler, toplam glutasyon seviyeleri, lipid peroksidasyonu seviyeleri ve dokulardaki TI düzeyleri de ölçülerek biyokimyasal veriler olarak ortaya koyulmuştur.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, TI'un karaciğer hücrelerinin zarlı yapılarında, özellikle de mitokondrilerde oluşturduğu hasarı ortaya koymaktadır. TI'a maruz bırakılan sıçanlarda, metalin mitokondriyal zarlara bağlanması sonucunda mitokondrilerin iç ve dış zarlarında deformasyon görülmüş, kristalarda

lizis ile meydana gelen kopmalar, mitokondrilerde şişme ve sitoplazmada mitokondri kümeleşmeleri tespit edilmiştir (Şekil 3.13 .A ve C). Bununla birlikte granüllü endoplazmik retikulum sisternalarında genişleme ve parçalanma gözlenmiştir (Şekil 3.13 .B ve D). Mitokondri iç zarı katılara karşı geçirgen yapıda değildir. Ağır metaller ve buna bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres koşullarında, hücre içerisinde ATP seviyesi düşer. Hücredeki membran geçirgenliği bozulur. Buna bağlı olarak mitokondri iç zarı geçirgen hale gelebilir. Bu durumda Ca^{2+} ve diğer iyonlar sitoplazmaya geçer ve bozulan ozmolitik dengenin yeniden sağlanabilmesi için organel içine su girişi gerçekleşir. Bu durum mitokondrilerde şişmeye neden olmaktadır (Plaa ve Hewitt, 1998). Sitoplazmada çok sayıda küçük lipid damlacıkları meydana gelmiştir (Şekil 3.7. C). Sitoplazmadaki lipid damlacıklarının sayısındaki artış, hücre hasara bağlı olarak protein sentezinin kesintiye uğraması ve lipid-protein birleşimlerinin önlenerek, lipidlerin hücre içerisindeki kullanılabilirliğinin azalmasından kaynaklanmaktadır (Thophon ve ark., 2004). Hücre içi glikojen partiküllerinin boyutu ve sayısında artış meydana gelmiştir (Şekil 3.13.B). Ağır metaller gibi toksik maddeler, karaciğer hücrelerindeki glukoz-6-fosfataz enziminin işlevselliğini ortadan kaldırarak hücrelerde normalden fazla glikojen depolanmasına neden olmaktadır. Karaciğer hücrelerinin çekirdeklerinde heterokromatin birikimleri ve çekirdek zarında yapısal bozukluklar tespit edilmiştir (Şekil 3.13 C ve D). Dokudaki TI miktarı analiz edildiğinde TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubunda 3.295 ppm olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu hayvanların karaciğer dokularında TI bulunmamaktadır. Herman ve Bensch (1967), farklı dozlarda talyum asetatı maruz bırakılan ratların karaciğer, böbrek, bağırsak, beyin, seminal sıvı ve pankreaslarında mitokondrilerde meydana gelen morfolojik değişiklikleri incelemiş, TI'un etkilerinin özellikle mitokondrilerdeki şişme ve kristalarda parçalanma ile ortaya çıktığını, kalsiyum içeren mitokondriyal granüllerin ortadan kalktığını belirtmişlerdir. Hücrelerdeki lipid damlacıklarının sayısında artış rapor edilmiştir (Herman ve Bensch, 1967). Bu bulgular bizim elde ettiğimiz bulgulara benzerlik göstermektedir. Leung ve Ooi (2000) i.p. olarak uyguladıkları TI'un sıçanlar üzerindeki toksisitesi ve histopatolojik etkilerini araştırmış, karaciğer hücrelerinde vakuolizasyon,

sinüzoidlerde genişleme ve nekroz gibi bulgular elde etmişlerdir. TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda ayrıca, sinüzoidal endotel hücrelerinin yapısında deformasyon ve bazılarında şişme gözlenmiştir. Endotel hücre zarı ve çekirdek hasar görmüş, karaciğer hücrelerinin mikrovillusları deforme olmuştur (Şekil 3.14 B). Cogger ve ark (2004)' nın sinüzoidal epitelyum hücreleri üzerinde oksidatif stresin yarattığı hasarların elektron mikroskobu yardımıyla araştırıldığı çalışmada da, bizim çalışmamıza benzer şekilde endotel hücrelerinde şişme ve fenestralı yapıda bozulma gözlenmiş, ince yapılarından dolayı sinüzoidal endotel hücreleri oksidatif hasarın önemli hedef hücrelerinden biri olarak işaret edilmiştir. TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Kupffer hücrelerinde de hücre zarı ve çekirdekte deformasyon görülmüştür (Şekil 3.14 A). Ayrıca ışık mikroskobik bulgulara TI^+ maruz kalan hayvanlarda Kupffer hücrelerinde hiperplazi ve hücre çekirdeklerinde uzama gibi belirtilerle aktivasyon tespit edilmiştir (Şekil 3.7 B). Kupffer Hücreleri dokuda oluşan oksidatif strese bağlı olarak aktive olabilmektedirler. Bu hücrelerin kendileri de, aktivasyonla birlikte reaktif oksijen türevleri ortaya çıkarırlar ve sinüzoidal endotel hücrelerinin daha da ileri seviyede hasar görmesine neden olabilirler (Cogger ve ark. 2004; Kanel ve Korula, 2005).

MT I (1 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) ile MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) ve gruplarının her ikisinde de yarı ince kesitlerde koyu ve açık renkli boyanmış olan hücreler gözlenmiştir (Şekil 3.8 A ve Şekil 3.9 A). Çolakoğlu ve Kükner (2003) karaciğer hücrelerinde gözlenen boyanmadaki farklılıkların hücrelerdeki farklı metabolik aktivitelerden kaynaklanıyor olabileceğini belirtmişlerdir. Açık renkli hücrelerin sıklıkla iki çekirdekli hücreler oldukları ve daha yoğun metabolik aktivasyona sahip oldukları belirtilmiştir. Metallothionein I uygulanan hücrelerdeki değişimler de bazı hücrelerdeki metabolik aktivasyonun diğerlerine göre daha yoğun olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu gruplardaki hayvanlarda glikojen partikülleri sitoplazmada dağılmış, lipid damlacıklarının sayısının ise azaldığı gözlenmiştir. Bu grupların her ikisinde de Kupffer hücreleri normal görünümündedir (Şekil 3.16 B ve Şekil 3.17 D). Işık mikroskobik bulgulara bu gruplarda Kupffer hücre hiperplazisi gözlenmemektedir (Şekil 3.8 B; Şekil 3.9 B). Bozkurt ve ark. (1998) çalışmalarında bizim çalışmamıza benzer şekilde wistar cinsi erkek sıçanlarda i.p.

olarak endotoksemi oluşturmuşlar ve glutatyon eksikliğinin karaciğer üzerindeki histopatolojik etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri bulgulara sinüzoidal dilatasyon, intrasitoplazmik granüllerde belirginleşme ve vakuolizasyonun yanı sıra, Kupffer hücre hiperplazisi belirlenmiştir. Kupffer hücre hiperplazisinin i.p. olarak verilen toksini temizleme ve fagositik aktiviteyi artırma amacıyla gerçekleştiği belirtilmiştir. Dokudaki TI düzeyleri karşılaştırıldığında, MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺(32 mg/kg i.p.) ve grubu sıçanlarda 2.917 ppm olarak belirlenmiştir. Bu miktar, TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubundaki sıçanların karaciğer dokusu ile karşılaştırıldığında % 11.4 daha azdır. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda ise, dokudaki TI düzeyi 2.135 ppm olarak belirlenmiştir. Bu miktar TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu ile karşılaştırıldığında % 35.3 daha azdır. Bu durum karaciğer dokusunda toksisiteye neden olan TI'un bir bölümünün MT I ile birleşmiş olabileceğinin bir göstergesidir. Bu gruplarda Kupffer hücre hiperplazisinin görülmeyişi de bu sonuçlarla ilişkilendirilebilir. Ayrıca, bu iki deney grubundaki sıçanların hücre çekirdeklerinde de yapısal bozukluklar mevcuttur. MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanların karaciğer hücre çekirdeklerinde heterokromatin bölgeler gözlenmiştir (Şekil 3.15 A). Ancak MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanların karaciğer hücre çekirdeklerinde heterokromatin bölgeler nisbeten daha azdır (Şekil 3.17 B). Heterokromatindeki bu gibi değişiklikler çekirdek içeriğinin kademeli olarak inaktive olmaya başladığının göstergesidir (Yang ve Chen, 2003).

MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda hücredeki zarlı yapılar kısmen korunmuştur. Mitokondri iç ve dış zarları hasarsız ve normal görünümündedir. Ancak genel yapılarında şişme gözlenmektedir (Şekil 3.15.B). Blondin ve Green (1967), mitokondrilerdeki şişmenin mekanizmasını araştırdıkları çalışmalarında, mitokondriyal enerji üretimi ve mitokondriyal şişme arasında bir ters orantı olduğunu ve çeşitli tek ve çift değerlikli metal iyonlarının mitokondriyal enerji sistemlerine zarar vererek şişmeye neden olduklarını belirtmişlerdir. Endoplazmik retikulum sisternaları yapısal bütünlüğünü korumakta ancak düzensiz olarak sıralanmaktadır. Çekirdek zarının yüzeyi girintili çıkıntılıdır. Az miktarda heterokromatin birikimleri mevcuttur (Şekil 3.15 A ve C). Karaciğer hücrelerinin mikrovillusları TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubuyla

karşılaştırıldığında nisbeten korunmuştur. Sinüzoidal endotel hücrelerinin zarları, porlu yapıda olmalarından dolayı hücredeki diğer zarlı yapılara oranla hasar görmüş ve bazıları şişkinleşmiş, bu hücrelerin arasındaki boşluklar genişlemiştir (Şekil 3.15 C ve D). Kupffer hücre zarı ve çekirdeği korunmuştur. Kupffer hücresi, karaciğer hücreleri mikrovillusları ile yakın temas halindedir (Şekil 3.16 B). Kupffer hücresi ve karaciğer hücreleri arasındaki iletişim, karaciğer hasarının başlangıcında artmaktadır. Bu iletişim yaygın olarak reseptörlerle sağlanmaktadır. Bu reseptörler, erimiş immün komplekslerin fagositoz yoluyla temizlenmesinde rol oynar (Aktan ve ark., 2003).

MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda hücredeki zarlı yapılar büyük ölçüde korunmuştur. Mitokondriler normal görünümlü, kristaller birbirine paralel olarak sıralanmaktadır. Hücredeki TI'un büyük bir bölümü MT I tarafından tutularak detoksifiye edildiğinden, hücre içi Ca⁺² homeostasisi bozulmamıştır. Mitokondriyal matrikste kalsiyum (Ca⁺²) depo granülleri gözlenmektedir (Şekil 3.17 A). Endoplazmik retikulum sisternaları yapısal bütünlüğünü korumakta ve birbirine paralel olarak sıralanmaktadır (Şekil 3.17 B). Endotel hücreleri ince uzun şekilli ve normal büyüklükte, hücre membranı hasarsız şekilde sıralanmaktadır. Karaciğer hücrelerinin mikrovillusları disse aralığına doğru düzenli şekilde uzanmaktadır. Endotel hücreleri arasındaki boşluklar azalmış, hücreler ardışık olarak düzenli sıralanmaktadır. Dokulardaki oksidatif hasardan en fazla etkilenen yapılardan biri olan eritrositler yapılarını korumaktadır (Şekil 3.17 D).

TI proteinlerin sülfhidril grupları ile ligand oluşturarak çeşitli enzimleri inhibe etmekte, riboflavin ve riboflavin yapıli kofaktörlerle etkileşime girmekte, bu sayede hücresel solunumu baskılayarak ATP sentezini inhibe etmektedir. Bununla birlikte TI⁺ tek değerlikli katyonu, hücrede bağlanma bölgeleri için potasyum iyonu (K⁺) ile rekabet halindedir. Membran potansiyeli açısından büyük önem taşıyan K⁺ iyonunun yerine geçebilen TI, hücre zarının seçici geçirgen yapısına da zarar verebilmektedir (Galvan-Arzate ve Santamaria 1998; Peter ve Viraraghavan 2005). Ağır metaller hücredeki Ca⁺² homeostasisini bozarak sitoplazmadaki Ca⁺² seviyesinde anormal artışlara neden olmaktadır (Zierold 2000). Çalışmamızda TI (32 mg/kg i.p.) grubunda sitoplazmaya Ca⁺² salınımı

sonucunda mitokondrilerde Ca^{+2} depo eden granüller ortadan kalkmışken, MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg) grubunda mitokondrilerde Ca^{+2} depo granülleri gözlenmektedir (Şekil.3.17 A).

MT'lerin metal detoksifikasyonundaki rolleri göz önünde bulundurulduğunda, MT'lerin yapı ve fonksiyonlarında çinko (Zn^{+2}) iyonunun önemli bir yeri vardır. MT'in farklı metalleri bünyesine bağlayarak bir detoksifikasyon mekanizması oluşturmalarının yanı sıra, hücre içerisine yapısındaki Zn^{+2} 'u bırakarak sitozolik Zn^{+2} konsantrasyonunu arttırdığı ve bu sayede toksik metallerin hücre içerisine alımını azalttığı düşünülmektedir. Hücredeki oksidatif stres koşullarında GSH/GSSG oranı düşüktür. GSSG varlığında MT'den Zn^{+2} salınımı gerçekleşmektedir. Bu koşullarda MT başka bir metalle bağ yapabilir (Kang 1999; Miles 2000). Zn^{+2} 'nın sülfhidril gruplarını oksidasyona karşı koruduğu, geçiş metalleri tarafından reaktif oksijen türevlerinin oluşturulmasını inhibe ettiği, hücredeki membran fonksiyon ve geçirgenliği ile hücresel sinyal iletim mekanizmalarında görev yaptığı bilinmektedir (Suntres ve Lui 2006). Oksidatif strese karşı MT korumasının en önemli basamağının MT'den Zn^{+2} salınımı olduğu düşünülmektedir. Çünkü salınan Zn^{+2} pek çok hücresel fonksiyonu etkileyerek lipid peroksidasyonunu baskılayabilir. Bunun yanı sıra yine Zn^{+2} salınımına bağlı olarak, diğer bazı tek ve çift değerlikli metaller de Zn^{+2} ile yer değiştirerek MT' lere bağlanabilir. MT'lerdeki tiolat kümeleri hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler. Bu sayede MT' ler hücreleri metal detoksifikasyonuna karşı korumada hem metalleri bünyesine bağlayarak, hem de Zn^{+2} salınımına bağlı olarak antioksidan etki göstererek koruma sağlamaktadırlar.

MT'in yapısında bulunan sistein aminoasitinin yanı sıra, metionin aminoasitinin de, bu proteinin antioksidan etkisinde anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir. Metionin çeşitli reaktiflerce metionin sülfoksit'e yükseltgenirken, bu reaktifleri indirger ve hücredeki oksidatif stresi azaltır. Metionin sülfoksit redüktazlar metioninin sülfoksiti tekrar metionine indirgeme kapasitesine sahiptirler. Bu dönüşüm sayesinde hücredeki oksidatif stres kademeli olarak azaltılmış olur (Levine ve ark. 2000).

Çalışmamızda TI uygulamasından önce MT I uygulanan sıçanların karaciğer hücrelerinde, hücre zarları ve organeller özellikle 2.5 mg/kg'lık MT I dozunda hasar görmemiştir. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda karaciğer dokusundaki TI düzeyi MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlara oranla daha azdır. Bu durum MT I'e bağlanmış olması nedeniyle hücre içi TI konsantrasyonunun azalmış olduğunu, MT I'den sitozöle salınan Zn⁺² sayesinde reaktif oksijen türevlerinin oluşumunun azaldığını düşündürmektedir. MT I uygulanan sıçanların karaciğer hücrelerinde oksidatif stresin azalmış olmasına bağlı olarak membran bütünlüğü korunmuş, daha fazla TI'un hücre içine alınması engellenmiştir.

Çeşitli metallerin karaciğer üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, patolojik bulguların yanı sıra, antioksidan enzim seviyeleri de toksisitenin önemli bir belirteci olarak incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Ağır metallere maruz kalındığında ortaya çıkan hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri, hidroksil radikali ve lipid peroksitleri gibi yüksek derecede reaktif oksijen türevlerinin oluşumu; membran lipidleri, proteinler ve DNA üzerinde hasar oluşturarak hücre fonksiyonları olumsuz etkilemektedir (Karpinska ve Jakoniuk 2001, Pillai and Gupta 2005). TI⁺ iyonları, diğer metaller gibi protein moleküllerindeki sülfhidril gruplarına yüksek derecede ilgi göstermektedir. Bu nedenle dokulardaki glutatyon seviyelerinin düşmesine neden olduğu bilinmektedir (Nriagu 1998; Galvan-Arzate ve Santamaria, 1998). Hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitleri gibi redükte oksijen türevlerinin devamlı olarak üretilmesi de, hücre içi GSH'nı yükseltgenerek miktarının azalıp GSSG miktarının artmasına neden olmaktadır (Plaa ve Hewitt 1998). Glutatyonun karaciğer dokusunda diğer dokulara oranla çok daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ve hücrelerde oluşan oksidatif stresle mücadelede ilk sırada yer alan etkili bir savunma mekanizması olduğu bilinmekle birlikte, reaktif oksijen türevleri toksisitesinin en önemli bileşeni olan hidrojen peroksinin, MT'deki tiolat gruplarına karşı ilgisinin GSH'daki sülfhidril gruplarına oranla yaklaşık 300 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Kang 1999; Kondoh ve ark. 2003).

Çalışmamızda TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubunda GSH'nın karaciğerdeki düzeyinin kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Hg ve

Cd gibi sülfhidril reaktif metaller GSH'a bağlanarak safra ile birlikte atılır. Bu durumda, hücredeki GSH'nun miktarı azalır ve hücrenin antioksidan savunma kapasitesi düşer (Quig 1998). Çalışmamızda Tl^{+} (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda GSH seviyesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu grupta GSH kaybına bağlı olarak antioksidan savunma kapasitesi azaldığından lipid peroksidasyonunda da artış gözlenmiştir. Yapılan birçok çalışma, Tl^{+} 'un GSH'daki $-SH$ grubu ile reaksiyona girerek GSH seviyesini düşürdüğünü ortaya koymaktadır. Aoyama ve ark. (1988), oral yolla hemstırlara uyguladıkları tallus (I) malonat'ın karaciğer ve böbrekte GSH seviyesini azalttığını rapor etmişlerdir. Kültürdeki sıçan böbrek hücreleri üzerinde yapılan bir çalışma, tallus (I) ve tallik (III) katyonlarının toplam GSH düzeyini düşürdüğünü bununla birlikte GSH-Px aktivitesini de azalttığını ortaya koymuştur (Aoyama ve ark. 1988; Hanzel ve ark 2006).

MT I (2.5 mg/kg i.p.) + Tl^{+} (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda, GSH düzeyleri dikkat çekici şekilde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. GSH ve MT her ikisi de yapılarında sistein aminoasitini bulunduran moleküllerdir. Bu iki molekülün hücre içerisindeki kullanılabilir sistein için rekabet halinde oldukları da bilinmektedir (Susanto et al., 1998). Ayrıca MT'lerin hücredeki yıkımı lizozomlarda gerçekleşmekte ve bu yıkımın hücre tarafından kullanılabilir ürünleri tekrar sitozöle verilmektedir. Sıçanlara ekstraselüler olarak uygulanan 2.5 mg/kg dozundaki MT I, hücredeki talyumu bağlayarak talyumun GSH'a bağlanmasını engellemiş bu sayede GSH yıkımını azaltmıştır. Ayrıca MT moleküllerinin yıkımından sonra hücredeki sistein aminoasiti düzeyi artmış ve GSH yapımı hızlanarak hücredeki GSH seviyesi kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Hücredeki MT I'in yıkımıyla sitozöle verilen sistein aminoasitinin GSH yapımında kullanılmasından kaynaklanan GSH seviyesindeki artış MT I (2.5 mg/kg) grubu sıçanlarda da gözlenmiştir.

MT I (1 mg/kg i.p.) + Tl^{+} (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda, GSH düzeyinde kontrol grubuna göre bir artış gözlenmemiş, bu gruptaki GSH seviyesi Tl^{+} (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlar ile yaklaşık olarak aynı seviyede kalmıştır. Bu durumda akut talyum toksisitesi hücredeki savunma mekanizmaları duvarını aşmış ve MT I 1 mg/kg dozunda antioksidan kapasiteyi yeterli ölçüde destekleyememiştir. Hücrede GSH'ın talyuma bağlı yıkımı devam etmektedir.

Reaktif oksijen türevlerinin hücrede devamlı olarak üretilmekte ve lipid peroksidasyonu gerçekleşmektedir. MT I (1 mg/kg) grubu sıçanların GSH düzeyi kontrol grubu ile aynı seviyededir. Hücrede MT yıkımı gerçekleştiyse ve açığa çıkan sisteinler kullanılarak yeni GSH molekülleri sentezlendiyse bile toplam GSH düzeyinde anlamlı bir farklılık yaratacak düzeyde bir sentez gerçekleşmemiştir.

Hanzel ve ark. (2005), talyum (III) hidroksitin glutatyon (GSH) metabolizması üzerindeki etkilerini sıçan beyin sitozolik fraksiyonunda araştırmışlardır. Çalışmamızdaki bulgularla paralellik gösterecek şekilde, talyum (III) hidroksit, redükte glutatyon miktarında azalmaya neden olurken, glutatyon peroksidaz aktivitesini de azaltmıştır. Kondoh ve ark. (2003) fare karaciğerinde açlığa bağlı olarak meydana gelen oksidatif strese karşı, dışarıdan indüklenen MT'in antioksidan rolünü SOD, katalaz, GSH-Px ve lipid peroksidasyonu gibi parametreleri ölçerek araştırmıştır. Açlık koşullarında bu parametrelerde bir değişiklik tespit edilememiş ancak, MT düzeyinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Farelere eksojen olarak GSH verilmesi de antioksidan enzim aktiviteleri ve MT düzeyini değiştirmemiştir. Bu durumda, MT'in reaktif oksijen türevlerinin neden olduğu hücresel hasarla mücadelede GSH'dan daha etkili bir savunma mekanizması oluşturduğu sonucuna varılmıştır. MT'nin serbest radikal yakalayıcı etkisi benzeri pek çok çalışmada da rapor edilmiştir. Haidara ve ark., (1999), kültürdeki sıçan karaciğer hücrelerinde Zn ile indüklenmiş MT düzeylerini kimyasal olarak oluşturulan GSH eksikliği koşullarında ölçmüşlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer şekilde, indüklenerek hücredeki seviyesi artan MT'in, hücrede GSH düzeyinin de artmasına neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Antioksidan enzim aktivitelerinin de ölçüldüğü bu çalışmada, GSH eksikliğine neden olan koşulların Zn ile indüklenen MT düzeyinde de azalmaya neden olduğu ve GSH ile MT metabolizmaları arasında bir bağlantı olabileceği rapor edilmiştir. Min ve ark. (2005) sıçan karaciğerinde glutatyon eksikliği koşullarında, MT indüksiyonu yapılan hayvanlarda hücrelerin ferrik nitritoasetat toksisitesinden zarar görmediğini tespit etmişlerdir.

Glutatyon, peroksit radikaline elektron transfer etmek yoluyla lipidleri peroksidasyona karşı korumaktadır. GSH, kendi başına hücrede bir antioksidan

savunma mekanizması oluşturmanın yanı sıra, GSH-Px enziminin de substratı olarak görev yapmaktadır. Çalışmamızda TI^+ (32 mg/kg i.p.) uygulanan sıçanlarda GSH-Px aktivitesi anlamlı olarak ve önemli düzeyde (% 70) azalmıştır. GSH Px' aktif merkezinde seleno grubunun yanında bir sülfhidril grubu bulundurmaktadır ve sülfhidril reaktif metaller için hedef durumundadır. Bunun yanı sıra TI, selono grubu ile veya katalitik bölgenin yakınındaki aminoasitlerle de reaksiyona girebilir (Villaverde ve ark. 2004). TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubunda, GSH düzeyindeki azalma da başlı başına GSH-Px aktivitesindeki azalmanın sebeplerinden biri olabilir (Aoyama ve ark. 1988). Sonuç olarak TI hem aktif merkezle reaksiyona girerek, hem de toplam GSH seviyesini azaltarak GSH-Px enziminin aktivitesini baskılamaktadır. Çalışmamızın sonuçlarına göre, GSH-Px aktivitesi MT I (1 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda da kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (% 17). Aktivitedeki bu azalmanın TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda tespit edilenden daha az olması, MT I'in dokudaki mevcut TI'un bir bölümünü bağlayarak hücredeki TI seviyesini azaltması (% 11.5), bu sayede TI'un diğer hücresel bileşenlerle etkileşime girmesini engelleyerek böbrek yoluyla atılımını sağlaması, MT I'in serbest radikal yakalayıcı antioksidan etkisi ve bu gruptaki toplam GSH düzeyinin de TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubuna göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda ve diğer gruplardaki enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubunda 2.5 mg/kg dozundaki TI uygulamasıyla daha fazla miktarda TI, MT I tarafından bağlanmış ve dokudaki serbest TI düzeyi azalmıştır. Bu grupta dokuda kalan serbest TI'un oluşturduğu oksidan etki hücrenin savunma mekanizması sınırını aşmadığından dokuya hasar verecek düzeyde bir oksidatif stres yaratmamıştır.

TI^+ un sıçan beyin dokusu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışmada, lipid peroksidasyonunda artış tespit edilmiştir. Böyle bir oksidatif stres durumunda bazı enzimlerin aktivitelerinde de azalma olduğu rapor edilmiştir (Nriagu 1998; Galvan-Arzate ve ark 2005). TI^+ un sıçan beyin dokusundaki etkilerini incelerken, kan-beyin bariyerinden yoksun olan ve oksidatif strese karşı en duyarlı beyin bölgesi olan hipotalamusta 16 mg/kg TI

uygulanmasına bağılı olarak Cu-Zn SOD enzim aktivitesinin azaldığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda elde edilen bulgularda, kontrol grubu Cu-Zn SOD aktivitesi ile kıyaslandığında Tl^{+} (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanların Cu-Zn SOD aktivitesinin anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür. Gupta ve Shukla (1997) çalışmalarında, bazı ağır metallerin antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerini araştırmışlar, Cd, Hg ve Pb metallerinin sıçanlara i.p. olarak enjeksiyonunun, doz artışına bağılı olarak Cu-Zn SOD enziminin aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalttığını ortaya koymuşlardır. Aynı araştırmacılar enzim aktivitesindeki bu azalmanın Cu-Zn SOD'nin bir metalloenzim olması ve maruz kalınan ağır metallerle etkileşime girmiş olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Civa ve kadmiyum gibi bazı metallerin SOD enziminin kofaktörleri olan Zn ve Cu iyonlarının yerine geçebildikleri ve enzim aktivitesini inhibe edebildikleri bilinmektedir (Huang ve ark. 2006). Çalışmamızda sıçanlara uygulanan talyum asetat, sulu çözeltilerine talyumun tek değerlikli iyonlarını vermektedir. Bu nedenle SOD enzimindeki iki değerlikli Cu ve Zn iyonları ile talyum iyonlarının yer değiştirmesi olası görünmemektedir. Ancak, Cu-Zn SOD enzimi aktif merkezinde sülfhidril gruplarını yoğun olarak içermekte ve talyum metalinin bu gruplara olan ilgisi bilinmektedir. Bu durumda talyum iyonları Cu-Zn SOD enziminin aktif merkezindeki sülfhidril gruplarına bağlanmak yoluyla enzim molekülünün yapısını bozmuş ve işlevselliğini ortadan kaldırmıştır. MT I (1 mg/kg) + Tl^{+} (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Ancak Tl^{+} (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarla karşılaştırıldığında aktivitenin daha yüksek olduğu görülmektedir. MT I (2.5 mg/kg i.p.) + Tl^{+} (32 mg/kg i.p.) grubunda ise enzim aktivitesi dikkat çekici şekilde kontrol grubuna yakındır. Bu durum, dokudaki Tl^{+} 'un MT I'e bağlandığı, bu sayede Cu-Zn SOD ile etkileşime giren metal seviyesindeki azalmayla birlikte enzim aktivitesinin uygulanan MT I'in dozuna bağılı olarak arttığı şeklinde yorumlanabilir. Koh ve Kim (2000), antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine MT'in etkilerini araştırdıkları çalışmalarında in vitro olarak farklı enzim sistemlerine MT ilavesi ile aktivitedeki değişiklikleri izlemişlerdir. Ortama ilave edilen MT'in, SOD aktivatörü gibi rol aldığı ancak apo-MT'in SOD aktivitesini inhibe ettiği

gözlenmiştir. Araştırmacılar, MT'in Cu-Zn SOD aktivitesi ve stabilitesinde görevli iki değerlikli metal iyonlarının konsantrasyonunu arttırarak SOD aktivitesini arttırabileceğini, ayrıca MT geni ile Cu-Zn SOD geninin regülasyonunun taranskripsyonel seviyede bağlantılı olabileceğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada MT'in süperoksit radikalini yakalama kapasitesi iki farklı deney sisteminde ölçülmüş, her iki sistemde de ortama ilave edilen MT'in dozundaki artışa bağlı olarak ortamda bulunan süperoksit radikalinin % 80'e varan oranda azaldığı ortaya koyulmuştur. Çalışmamızda MT I (1 mg/kg i.p.) ve MT I (2.5 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda Cu-Zn SOD aktivitesinin kontrol grubu ile yaklaşık olarak aynı düzeyde olduğu belirlenmiştir. Koh ve Kim (2000)' in çalışmalarındaki sonuçlara bakılarak bu guruplardaki enzim aktivitelerinde de artış olması gerektiği düşünülse de, çalışmamızın in vivo olarak yürütüldüğü göz önünde bulundurulmalıdır.

Cu-Zn SOD enzimi için uygulanan immunohistokimyasal işaretleme sonuçları da enzim aktivite çalışmalarının sonuçlarını desteklemektedir. Kontrol grubuna kıyasla TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu ve MT I (1 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanların karaciğer dokusundaki işaretli bölgelerde azalma gözlenmiştir (sırasıyla yaklaşık % 55 ve % 33 oranlarında). MT I (2.5 mg/kg i.p.) + TI⁺ (32 mg/kg i.p.) grubu ve diğer deney gruplarındaki sıçanların karaciğerindeki işaretlenme oranının ise kontrol grubundakine yakın olduğu ve tüm bu bulguların enzim aktivite tayini bulguları ile paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. İşaretlenmeler ağırlıklı olarak hücre sitoplazmalarında ve daha az miktarlarda da çekirdekte gözlenmiştir. Liou ve ark. (1993)'nın çalışmaları da Cu-Zn SOD enziminin sıçan karaciğeri sitoplazmasında yoğun olarak bulunduğunu ortaya koymuştur.

Chang ve ark. (1988)' e göre Cu-Zn SOD enzimi wistar cinsi sıçanların karaciğerinde yaklaşık olarak % 73.1 oranında sitoplazmada, % 11.9 oranında çekirdekte, % 15 oranında ise diğer organellerde dağılmış olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda Cu-Zn SOD kontrol grubunda yaklaşık olarak % 70 oranında sitoplazmada, % 14 oranında çekirdekte ve % 16 oranında diğer organellerde tespit edilmiştir. Diğer deney gruplarındaki enzim dağılımlarına bakıldığında, TI toksisitesine bağlı olarak meydana gelen çekirdek zarı hasarı

nedeniyle, enzimin yoğun olarak bulunduğu sitoplazmada, miktarının azaldığı, çekirdekteki miktarının ise arttığı gözlenmiştir.

Metaller ile indüklenen oksijen radikalleri DNA'nın yanı sıra oksidasyona karşı son derece hassas olan, fosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ile de etkileşime girmektedir. Birçoğu reaktif elektrofiller olan çeşitli ürünler lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. Malondialdehit lipid peroksidasyonu sonucunda açığa çıkan mutajenik ve karsinojenik bir bileşiktir (Marnett 1999; Valko ve ark. 2005). Yaygın olarak kullanılan tiobarbitürik asit metodu (TBARS) ile dokudaki serbest MDA ölçülebilmektedir. MDA ölçümünde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) de kullanılmakla birlikte, Ohkawa ve Ohishi (1979)'nin TBARS yöntemi ile HPLC metodlarının karşılaştırıldığı Āurfinová ve ark. (2007)'nin çalışmalarında, MDA düzeyini ölçmede bu iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. PUFA'nin peroksidatif olarak yıkımı membranın yapısı ve çeşitli membran parametrelerini değiştirdiği gibi, membrana bağımlı pek çok enziminde aktivitesini etkilemektedir (Marnett 1999). Çalışmamızda TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda MDA düzeyi kontrol grubuna oranla anlamlı olarak artış göstermiştir. Genel olarak metallerin indüklediği toksisitenin mekanizması oksidatif stres ve bunun sonucunda ortaya çıkan lipid peroksidasyonu ile yakından ilişkilidir (Valko ve ark. 2005). Yüksek lipid içeriğinden dolayı lipid peroksidasyonunun en yoğun olarak gözlemlendiği beyin dokusu üzerinde TI 'un etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda TI 'un lipid peroksidasyonuna neden olduğu kanıtlanmıştır (Nriagu 1998). Çalışmamızdaki histopatolojik veriler de bu sonucu destekler niteliktedir. $MT I$ (1 mg/kg) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubu sıçanlarda MDA düzeyinin TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubuna göre azaldığı görülmektedir. Bu grupta MDA seviyesi kontrolle kıyaslandığında ise yüksektir. $MT I$ (2.5mg/kg i.p.) + TI^+ (32 mg/kg i.p.) grubunda ise kontrole göre anlamlı bir değişim görülmemiştir.

Bu verilere bakılarak $MT I$ 'in hücrenin antioksidan savunma kapasitesini arttırdığı, TI 'u bağlayarak diğer antioksidan enzim ve moleküllerin aktivitelerinin korunmasını sağladığı ve lipid peroksidasyonunu önlediği sonucuna varılmaktadır. $MT I$ (1 mg/kg i.p.) ve $MT I$ (2.5 mg/kg i.p.) gruplarında da MDA

düzeyi kontrole göre anlamlı şekilde azalmıştır. Bu gruplarda lipid peroksidasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı seviyede azalmış olması, MT I'in pek çok araştırmada ortaya konmuş olan antioksidan etkisini destekler niteliktedir.

Hücrelerdeki okside edici bileşenler nedeniyle ortaya çıkan stres, hücre tarafından tolere edilebilir düzeylerin üzerine çıktığında, oksidatif stres oluşur. Hücredeki antioksidan enzimler ve diğer antioksidanlar bu stresi azaltamıyorsa, oksijenin reaktif metabolitleri hücrede artış gösterir. Reaktif bir oksijen türevi olan H_2O_2 'in ölçümü, oksidatif stresin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir (Tarpey ve ark. 2004). Çalışmamızda ROS'nin ve oksidatif stresin bir belirteci olarak, lipid peroksidasyonu seviyelerinin yanı sıra, H_2O_2 düzeyleri de ölçülmüştür. Elde edilen bulgular, lipid peroksidasyonu için elde edilen sonuçları desteklemekte ve bu sonuçlarla paralellik göstermektedir. H_2O_2 , oksidatif stresin daha yoğun olduğu düşünülen Tl^+ (32 mg/kg i.p.) grubu ile, MT I (1 mg/kg) + Tl^+ (32 mg/kg i.p.) grubunda yüksek düzeydedir. MT I (2.5 mg/kg) + Tl^+ (32 mg/kg i.p.) grubunda ise, kontrole göre anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. MT I (1 mg/kg i.p.) ve MT I (2.5 mg/kg i.p.) gruplarında H_2O_2 düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olması da, lipid peroksidasyonu sonuçlarını destekleyen bir diğer bulgudur.

Oksidatif stresin yoğun olarak bulunduğu Tl^+ (32 mg/kg i.p.) grubu ile, MT I (1 mg/kg) + Tl^+ (32 mg/kg i.p.) grubunda Cu-Zn SOD aktivitelerinin H_2O_2 düzeyleri ile ters bir orantıda olduğu gözlenmiştir. Bu durum, bu gruplardaki reaktif oksijen türevlerinin (O_2^- gibi), antioksidan enzimler tarafından tolere edilebilir düzeylerin üzerine çıkmış olmasından kaynaklanmaktadır. Cu-Zn SOD aktivitesi ve H_2O_2 düzeyleri arasındaki ilişkinin hücredeki oksidatif stres koşullarına göre değiştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Teixeira ve ark. 1998; Gardner ve ark. 2002)

Çalışmamızda elde edilen tüm bulgular (antioksidan enzim seviyelerindeki değişiklikler, toplam glutatyon düzeyleri ölçümünde elde edilen sonuçlar ile ışık ve elektron mikroskopik bulgular) topluca değerlendirilerek, MT I'in wistar cinsi sıçanlara i.p. olarak uygulandığında TI toksisitesinin neden olduğu oksidatif stres, in vitro'da TI iyonlarının bir yakalayıcısı olarak, antioksidan savunma

mekanizması oluşturarak (serbest radikal yakalayıcı etkileri ve Zn salınımına bağlı olarak) ve lipid peroksidasyonunu baskılayarak azalttığı sonucuna varılmıştır. Buna bağlı olarak organel, hücre ve doku hasarını önlemektedir. Bu etkiler 2.5 mg/kg MT I dozunda gözlenmiştir.

TI'un toksik etkileri geçmişten günümüze dek yapılmış olan pek çok çalışma ile ortaya koyulmuştur. TI ve antioksidan savunma mekanizmalarını oluşturan bileşenlerin etkileşimleri hem in vivo, hem de in vitro olarak araştırılmış, bu sayede bu metalin toksik etkileri farklı yaklaşımlarla irdelenmiştir.

MT' ler de, metal detoksifikasyonundaki görevleri, antioksidan etkileri ve diğer antioksidan bileşenlerle olan etkileşimleri açısından pek çok çalışmaya konu olmuşlardır. Ancak MT'lerin TI metali ile olan etkileşimleri ve canlı sistemlerdeki TI toksisitesinde MT'lerin fonksiyonları ile ilgili olarak bugüne kadar yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın sonuçları TI, MT ve hücrenin başlıca antioksidan bileşenleri arasındaki in vivo etkileşimleri ilk defa ortaya koymuştur.

Tıpta tanıya yönelik görüntüleme amacıyla hastalara doğrudan enjekte edilmesi, çeşitli endüstriyel faaliyetler sonucunda çevreye salınımı, kaza ve adli vakalar sonucunda zehirlenmelere neden olması göz önüne alındığında, çalışmamızda elde edilen bulgular TI toksisitesinin neden olduğu oksidatif hasara karşı MT I'in koruyucu etkilerini ortaya koyması açısından önem taşımaktadır.

TI toksisitesine maruz kalmış bireylerde, bu metalin hem radyoaktif hem de radyoaktif olmayan formlarının vücuttan uzaklaştırılması için, katı bir iyon değişim materyali olan Prusyan mavisi kullanılmaktadır. Bu madde, TI metalini bağlayarak ortama K^+ iyonu vermekte, bu sayede TI toksisitesini azaltmakta veya önlemektedir. Bunun yanı sıra doğrudan KCI kullanılmak yoluyla da metalin toksik etkileri azaltılmaya çalışılmaktadır (Malbrain ve ark. 1997). TI toksisitesi ve MT'ler ile etkileşiminin belirlenmesine yönelik olarak bugüne kadar yapılmış bir çalışma bulunmaması ve saflaştırılmış MT'lerin ekstraselüler olarak uygulanmasına yönelik olan az sayıda çalışmanın mevcut olması nedeniyle, bu çalışmanın sonuçları TI toksisitesinin önlenmesinde MT'lerin kullanımı ile ilgili olarak ileride yapılması düşünülen çalışmalar için bir ön araştırma niteliği taşımaktadır.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, TI, MT, antioksidan moleküller (özellikle GSH) ve antioksidan enzimler arasındaki in vitro etkileşimlerin de daha detaylı araştırılması konuya farklı boyutlarda ışık tutacaktır. Ayrıca TI metalinin farklı formları ve MT I etkileşiminin, analitik teknikler kullanılarak ortaya koyulması yararlı olacaktır. Kronik TI toksisitesi sonucunda meydana gelebilecek etkilere karşı da MT I'in koruyuculuğunun ve etkili dozunun araştırılması bu molekülün TI toksisitesine karşı koruyucu olarak kullanımının temel basamaklarını oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Akkuş, İ. (1996), *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya.
- Aldırmaz, N., (2004), *Kurşun asetatın bir decapoda türü olan Palaemonetes turcorum'un hepatopankreatik seka hücreleri üzerindeki ince yapı değişiklikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Altuner, Y. (2005), *Sıçanlarda deneysel oluşturulmuş kolit üzerine metallotioneinlerin olası etkileri*, Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Aktan, T.M., Canbilen, A., Keklikoğlu, N. (2003), "Kupffer Hücresi" *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 34 (2), 110-113.
- Aoyama, H., Yoshida, M., Yamamura, Y. (1988), "Induction of lipid peroxidation in tissues of thallous malonate-treated hamster." *Toxicology* 53, 11–18.
- Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002), *Theory and Practice of Histological Techniques*, E.P. Churchill Livingstone, Edinburgh, İngiltere.
- Blondin, G. A., Gren, D. E. (1967), "The mechanism of mitochondrial swelling" *Biochemistry*, 58, 612-610.
- Boulanger, Y., Goodman, C.M., Forte, C.P., Fesik, S.W., Armitage, I.M. (1983), "Model for mammalian metallothionein structure" *Biochemistry*, 80, 1501-1505.
- Bozkurt, B., Koç, M., Coşkun, F., Cengiz, Ö., Bilgin, A., Demirpençe, E., Kılınç, K., Aksoy, F. (1998). "Ratlarda oluşturulan endotoksemide glutatyon eksikliğinin karaciğer histopatoloji ve fonksiyonlarına etkisi" *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 18, 388-397.
- Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Cashon, R.E., (1993), "A putative glutathione-binding site in CdZn-metallotionein identified by equilibrium binding and molecular-modelling studies." *Biochemistry Journal*, 294, 219–225.
- Burns, J.A., Butler, J.C., Moran, J., Whitesides, G.M. (1991) "Selective reduction of disulfides by Tris-(2-~arboxyethyl)-phosphine" *Journal of Organic Chemistry*. 56, 2648-2650.

- Cagen, S.Z., Klaassen, C.D. (1979), "Protection of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by zinc: Role of metallothionein" *Toxicology and Applied Pharmacology*, 51, 107-116.
- Chang, Y.L., Slot, J.W., Geuze, H.J., Capro, J.D. (1988), "Molecular immunocytochemistry of the Cu-Zn Superoxide dismutase in rat hepatocytes" *The Journal of Cell Biology*, 107, 2169-2179.
- Chung R.S. ve West K. (2004), "A role for extracellular metallothioneins in CNS injury and repair." *Neuroscience*, 123, 595-599.
- Cogger, V.C., Muller, M., Fraser, R., McLean, A.J., Khan, J., Le Couteur, D.G. (2004), "The effects of oxidative stress on the liver sieve." *Journal of Hepatology*, 41, 370-376.
- Çolakoglu, N. ve Kükner, A. (2003), "Effects of high dose retinoic acid on adult rat liver: electron microscopic and immunohistochemical study" *Nutrition Research*, 23, 509-517.
- Dalton, T., Kai F., Enders, G. C., Palmiter, R.D., Andrews, G.K. (1996), "Analysis of the Effects of Overexpression of Metallothionein-I in Transgenic Mice on the Reproductive Toxicology of Cadmium" *Environmental Health Perspectives*, 104 (1), 68-76.
- Damjanow, I. (1996), *Histopathology, A color Atlas and Textbook*, Williams and Wilkins Maryland, A.B.D.
- Davis, S.R. ve Cousins J.R. (2000), "Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function" *Journal of Nutrition*, 130, 1085-1088.
- Demirci, U. (2006), *Karaciğer hastalıklarında vasküler endotel büyüme faktör düzeyleri*, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul
- Dmowski, K., Kozakiewicz, A., Kozakiewicz, M. (1998), "Small Mammal populations and community under conditions of extremely high thallium contamination in the environment." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41, 2-7.
- Duchen, M.R. (2000), "Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death" *Journal of Physiology*, 529, 57-68

- Ďurfinová, M., Brechtlová, M., Líška, B., Barošková, Z. (2007), "Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in rat brain tissues" *Chemical Papers*, 61 (4), 321-325.
- Durnam D.M., Palmiter, R. D. (1984), "Induction of metallothionein-I mRNA in cultured cells by heavy metals and iodoacetate: evidence for gratuitous inducers." *Molecular and Cellular Biology*, 4(3), 484-491.
- Fischer, E. H., Davie, E.W. (1998), "Recent excitement regarding metallothionein", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 3333-3334.
- Galvan- Arzate, Santamaria, A. (1998), "Thallium toxicity." *Toxicology Letters*, 99, 1-13.
- Galvan-Arzate, S., Martinez, A., Medina, E., Santamaria, A., Rios, C. (2000), "Subchronic administration of sublethal doses of thallium to rats: effect on distribution and lipid peroxidation in brain regions." *Toxicology Letters*, 116, 37-43.
- Gardner, R., Salvador, A., Moradas-Ferreira, M. (2002), "Why does SOD overexpression sometimes enhance, sometimes decrease hydrogen peroxide production? A minimalist explanation" *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 1351-1357.
- Glavan-Arzate, S., Chaverri, J.P., Campos, O.N.M., Maldonado, P.D., Roman B.V., Rios C., Santamaria A. (2005), "Delayed effects of thallium in the rat brain: regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers but moderate alterations in antioxidants, after a single administration." *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1037-1045.
- Ghoshal, K., Wang, Y., Sheridan, J.F., Jakobs, S.T. (1998), "Metallothionein induction in response to restraint stress transcriptional control, adaptation to stress and role of glucocorticoid." *Journal of Biological Chemistry*, 273 (43), 27904-27910.
- Gupta, A., Shukla, G.S. (1997), "Enzymatic antioxidants in erythrocytes following heavy metal exposure: possible role in early diagnosis of poisoning" *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 198-205.

- Eisenthal, R., Danson, M.J.(1993), *Enzyme Assays, A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, A.B.D.
- Haidara, K., Moffatt,P., Denizaeu, F. (1999), “Metallothionein induction attenuates the effects of glutathione depletors in rat hepatocytes” *Toxicological Sciences*, 49, 297-305.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, A.B.D.
- Hanzel C.E., Villaverde M.S., Verstraeten S.V. (2005), “Glutathione metabolism is impaired in vitro by thallium (III) hydroxide.” *Toxicology*, 207, 501-510.
- Haschek, W.M., Rousseaux, C.G. (1998), *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, Academic Press, Londra, B.K.
- Herman., M.M., Bensch, K.G. (1967), “Light and electron microscopic studies of acute and chronic thallium intoxication in rats” *Toxicology and Applied Pharmacology*, 10 (2), 199-222.
- Hidalgo, J., Aschner, M., Zatta, P., Vařak, M. (2001), “Roles of metallothionein family of proteins in the central nervous system.” *Brain Research Bulletin*, 55, 133-145.
- Hissin, P.J., Hilf, R. (1976), “A fluorometric Method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues” *Analytical Biochemistry*, 74, 214-226.
- Huang, Y.H., Shih, C.H., Huang, C.J., Lin, C.M., Chou, C.M., Tsai, M.L., Liu, T.S., Chiu, J.F., Chen, C.T. (2006), “Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells.” *Journal of Cellular Biochemistry* , 98 (3), 577-589
- Irato, P., Santovito, G., Piccinni, E., Albergoni, V. (2001), “Oxidative burst and metallothionein as a scavenger in macrophages” *Immunology and Cell Biology* 79, 251–254.
- Jungueira, L.C., Carneiro, J. (2005), *Basic Histology: Text & Atlas* McGraw-Hill Companies, A.B.D.
- Kägi, J.H.R. ve Vallee, B.L. (1960), “Metallothionein: A cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex.” *Journal of Biological Chemistry*, 235: 3460-3465.

- Kagi, J. (1991), "Overview of metallothionein" *Methods in Enzymology*, 205, 613-626.
- Kanel, G.C. ve Korula, J.(2005), *Atlas of Liver Pathology*, Elsevier Saunders, Philadelphia, A.B.D.
- Kang, Y.J. (1999), "The antioxidant function of metallothionein in the heart." *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 222, 263-273.
- Karpińska K. E., Jakoniuk M. J. (2001), Lead and zinc influence on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde concentrations. *Polish Journal of Environmental Studies* , 10, 161-165.
- Klaassen C.D. Liu J. Choudhuri S. (1999), "Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity." *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*, 39, 267-294.
- Koh, M., Kim, H.J. (2001), "The effects of metallothionein on the activity of enzymes involved in removal of reactive oxygen species" *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 22 (4), 362-366.
- Kondoh, M., Kamada, K., Kuronaga, M., Higashimoto, M., Takiguchi, M., Y. Watanabe, Y., Sato, M. (2003), "Antioxidant property of metallothionein in fasted mice" *Toxicology Letters*, 143, 301-306.
- Koyu, A., Gokcimen, A., Özgüner, F., Bayram D.S., Kocak, A (2006), "Evaluation of the effects of cadmium on rat liver" *Biomedical and Life Sciences* , 284, 1-2.
- Klaassen, C.D. ve Liu, J. (1998), "Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury." *Environmental Health Perspectives*, 106, 297-300.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S. (1999), "Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity" *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 39, 267-294.
- Kulikowska-Karpinska, E, Moniuszko-Jakoniuk, J. (2001), "Lead and zinc influence on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde concentrations" *Polish Journal of Environmental Studies*, 10 (3), 161-165.

- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. (2003), "The liver and biliary tract.", *Robbins Basic Pathology*, Elsevier Saunders, Philadelphia, A.B.D., 592-633.
- Lan, C.H., Lin, T.S.(2005), "Acute toxicity of trivalent thallium compounds to *Daphnia magna*." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, 432-435.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F. (1976), "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(4): 952-958.
- Leonard A. Ve Gerber G.B. (1997), "Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds" *Mutation Research*, 387, 47-53.
- Leung, K.M., Ooi V.E.C. (2000), "Studies on thallium toxicity, its tissue distribution and histopathological effects in rats." *Chemosphere*, 41, 155-159.
- Levine, R.L., Moskovitz, J., Stadtman E.R. (2000), "Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation." *IUBMB Life* 50, 301-7.
- Liou, W., Chang, L.Y., Geuze, H.J., Strous, G.J., Crapo, J.D., Slot, J.W. (1993), "Distribution of Cu-Zn superoxide dismutase in rat liver." *Free Radical Biology and Medicine*;14 (2):201-7.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951), "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *Journal of Biology and Chemistry*, 193: 265-275.
- Lynes, M.A., Zaffuto, K., Unfricht, D.W., Marusov, G., Samson J.S., Yin, X. (2006), "The Physiological Roles of Extracellular Metallothionein." *Experimental Biology and Medicine* 231:1548-1554.
- Maret, W. (2000), "The function of zinc metallothionein: A link between cellular zinc and redox state." *Journal of Nutrition*, 130:1455-1458.
- Lawrence J. Marnett (1999) "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde" *Mutation Research*, 424, 83-95.

- Malbrain, Manu L.N.G., Lambrecht, Guy L.Y., Zandijk, Erik, Demedts, Paul A., Neels, Hugo M., Lambert, Willy, De Leenheer, André P., Lins, Robert L., Daelemans, Ronny (1997), "Treatment of Severe Thallium Intoxication". *Clinical Toxicology*, 35 (1): 97–100.
- Margoshes, M., Vallee, B.L. (1957), "A cadmium protein from equine kidney cortex". *Journal of the American Chemical Society*, 79: 4813-4814.
- L.J. Marnett (1999), "Lipid peroxidation–DNA damage by malondialdehyde." *Mutation Research*, 424, 83–95.
- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., Rodilla, V. (2000), "Induction regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (1), 35-70.
- Mimura, T., Tsujikawa, K., Yasuda, N., Nakajima, H., Haruyama, M., Ohmura, T., Okabe, M. (1988), "Suppression of gastric ulcer induced by stress and HCl-ethanol by intravenously administered metallothionein-II" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151 (2), 725-729.
- Min, K.S., Tanaka, N., Horie, T., Kawano, H., Tetsuchikawahara, N., Onosaka, S. (2005), Metallothionein enriched hepatocytes are resistant to ferric nitriloacetate toxicity during conditions of glutathione depletion. *Toxicology Letters*, 158, 108–115.
- Moore, D., House, I., Dixon, A. (1993), "Thallium poisoning. Diagnosis may be elusive but alopecia is the clue." *British Medical Journal*, 306 (6891), 1527–1529.
- Nartey N.O., Frei J.V., Cherian M.G. (1987), "Hepatic copper and metallothionein distribution in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration)." *Laboratory Investigation*, 57 (4), 397-401.
- Nebot C., Mouet M., Huet P., Xu P.H., Yadan J.C., Chaudiere J. (1993), "Spectrophotometric assay for superoxide dismutase activity based on the activated autooxidation of a tetracyclic catechol." *Analytical Biochemistry*, 214, 442-451.

- Nordberg, M. (1998), "Metallothioneins: historical review and state of knowledge" *Talanta*, 46, 243-254.
- Nriagu, O., (1998), *Thallium in the Environment*, Wiley-Interscience, New York, A.B.D.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979), "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction" *Analytical Biochemistry*; 95, 351-8.
- Owens, C.W.I., Belcher, R.V. (1965), "A colorimetric micro-method for the determination of glutathione", *Biochemistry Journal*, 94(3): 705–711.
- Pavelka, M., Roth, J. (2005), *Functional Ultrastructure*, Springer-Verlag, Avusturya.
- Peter, A.L.J., Viraraghavan T. (2005), "Thallium: a review of public health and environmental concerns." *Environment International*, 31, 493-501.
- Pick, E., Keisari, Y. (1980), "A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*, 38: 161-170.
- Pillai, A., Gupta, S. (2005), "Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: Effects of vitamin E and Mn2+." *Free Radical Research*, 39 (7), 707–712.
- Plaa, G.L. ve Hewitt, W.R. (1998), *Toxicology of the Liver*, Taylor and Francis, Washington, A.B.D.
- Pompella, A. (2002), *Thiol Metabolism and Redox Regulation of Cellular Functions*. IOS Press, Amsterdam, Hollanda.
- Quesada, A.R., Byrnes, R.W., Krezoski, S.O., Petering, D.H. (1996), "Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 334 (2), 241-250.
- Quig, D. (1998), "Cysteine metabolism and metal toxicity" *Alternative Medicine Review*, 3 (4), 262- 270.
- Rettenbacher, L., Koller, J., Kässmann, H., Galvan, G. (1998), "Detection of melanoma metastases with thallium-201 scintigraphy" *The Journal of nuclear medicine* 39, 798-802.

- Schroeder, J.J. ve Cousins, R.J. (1991), "Metallothionein and zinc metabolism in hepatocytes." *Methods in Enzymology*, 205, 575-584.
- Skepper, J.N. ve Powell, J.M. (2008), "Immunogold staining of London resin white sections for transmission electron microscopy (TEM)" *Cold Spring Harbour Protocols*, doi:10.1101/pdb.prot5016.
- Son-Min, K., Tanaka, N., Horie, T., Kawano, H., Tetsuchikawahara, N., Onosaka, S. (2005), "Metallothionein enriched hepatocytes are resistant to ferricnitriloacetate toxicity during conditions of glutathione depletion." *Toxicology Letters*, 158, 108-115.
- Suntres, Z.E. ve Lui, M.K.E. (2006), "Antioxidant effect of zinc and zinc-metallothionein in the acute cytotoxicity of hydrogen peroxide in Erlich ascites tumour cells." *Chemistry and Biology International*, 11-23.
- Susanto, I., Wright, S.E., Lawson, R.S., Williams, C.E., Deneke, M.S. (1998), "Metallothionein, glutathione, and cystine transport in pulmonary artery endothelial cells and NIH/3T3 cells" *American Journal of Physiology*, 274, 296-300.
- Suzuki, K.T., Someya, A., Komada, Y., Ogra Y. (2002) "Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice." *Journal of Inorganic Biochemistry*. 15; 88 (2):173-82.
- Teixeira, H.D., Schumacher, R.I., Meneghini, R. (1998) " Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing Cu-Zn-superoxide dismutase" *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 7872-7875.
- Tarpey, M.M., Wink, D.A., Grisham, M.B. (2004) "Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations" *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 286:R 431-R 444.
- Thophon, S., Pokethitiyook, P., Chalermwat, K., Upatham, S.E., Sahaphong, S. (2004), "Ultrastructural alterations in the liver and kidney of white sea bass *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure." *Environmental Toxicology*. 19: 11-19.

- Tremel, A., Mason, P., Sterckeman, T., Baize, D., Mench, M. (1997), "Thallium in French agrosystems-I. Thallium contents in arable soils." *Environmental Pollution*, 95, 293-302.
- Tomasi, A. (2003), *Free Radicals, Nitric Oxide and Inflammation. Molecular, Biochemical and Clinical Aspects*. IOS Press, Amsterdam, Hollanda.
- Tsai, Y.T., Huang, C.C., Kuo, H.C., Wang, H.M., Shen, W.S., Shih, T.S., Chu, N.S. (2006), "Central nervous system effects in acute thallium poisoning" *Neuro Toxicology*, 27, 291-295.
- Turgut, B., Erselcan, T. (2002), "Koroner arter hastalığında miyokard perfüzyon SPECT görüntülemenin önemi ve nükleer kardiyolojik uygulamalar" *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 24 (4): 215 –224.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D. (2005), "Metals, toxicity and oxidative stres" *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161-1208.
- Vašák, M. (2005), "Advances in metallothionein structure and functions" *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 19 (1), 13-17.
- Whitaker, J. R. (2002), *Handbook of Food Enzymology*. Marcel Dekker Incorporated, New York, A.B.D.
- Villaverde, M.S., Hanzel, C.E., Verstraeten, S.V. (2004) "In vitro interactions of thallium with components of the glutathione-dependent antioxidant defence system." *Free Radical Research*, 38, 977–984.
- Yang, J.L., Chen, H.C. (2003), "Serum metabolic enzyme activities and hepatocyte ultrastructure of common carp after gallium exposure" *Zoological Studies*, 42 (3), 455-461.
- You, J. H., Lee, J.K., Jeong, G.H. (2002), "Overexpression of human metallothionein-III prevents hydrogen peroxide-induced oxidative stres in human fibroblasts" *FEBS Letters*, 521, 175-179.
- Youn, J., Hwang, H.S., Ryoo, Y.Z., Lynes, M.A., Paik, D.J., Chung, H.S., Kim, H.Y. (2002), "Metallothionein supresses collagen-induced arthritis via induction of TGF- β and down-regulation of proinflammatory mediators." *Clinical and Experimental Immunology*, 129, 232-239.

Zierold, K. (2000), "Heavy metal toxicity studied by electron probe X-ray microanalysis of cultured rat hepatocytes." *Toxicology in Vitro*, 14, 557-563.