

SIÇANLARDA DENEYSEL BAKIR UYGULAMASININ OKSİDAN VE ANTIOKSİDAN SİSTEMLER ÜZERİNE ETKİLERİ *

Semlin TOPLAN, Nuran DARIYERLİ, Derviş ÖZÇELİK, M. Can AKYOLCU

Background.- Even though copper is necessary trace element for the organism, some recent studies report that copper may have some oxidative damage effects. Oxidative damage of copper has been reported in recent studies even though it is necessary for organism as a trace element. Present study has been planned to determine the oxidative effects of copper on blood and the defense system.

Design.- In this study Wistar albino type female rats weighting 200-250g were used. The control (n=9) and experimental groups (n=9) were fed normal diet and water, the experimental group also received copper in their drinking water for nine weeks. After experimental period serum copper concentrations, erythrocyte superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione (GSH) levels and plasma malondialdehyde (MDA) concentrations were measured in both group.

Results.- MDA concentrations and SOD activities of experimental group were found higher than controls (p<0.05) and GSH concentration in experimental group was found to be lower than control group animals (p<0.05).

Conclusion.- The results of this study may show that copper may lead to increase in lipid peroxidation and SOD activity and GSH levels may also be decreased by effect of copper in blood.

Toplan S, Darıyerli N, Özçelik D, Akyolcu MC. Effects of experimental copper application on oxidant and antioxidant systems. Cerrahpaşa J Med 2003; 34: 185-187.

Bakır organizmada bulunan ve bazı enzimlerin yapısında yer alan esansiyel bir eser elementtir. Bakır diyetle alındıktan sonra duodenumdan amino asitler ya da küçük peptidlerle birleşerek absorbe olur ve mukoza hücrelerinden kana geçer. Kana geçen bakır albumine bağlanır. Bakır albumin kompleksi karaciğere taşınır ve karaciğerden seruloplasmin olarak plazmaya verilir.^{1,2}

Bakır iyonları serbest radikal hasarının ortaya çıkmasında katalizör rolü oynayabilirler. Redoks aktive edici bir metal olduğu için oksidatif stres üzerine etkisi söz konusudur.^{3,4} Bakırın indüklediği oksidatif hasar genellikle yüksek derecede reaktif olan OH• radikalinin oluşumu ile gerçekleşir. OH• oluşumu dokularda hasara neden olan lipid peroksidasyonunu başlatabilir.^{5,6} Aynı zamanda organizmada başlayan oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri de gelişir. Çalışmamızda, sıçanlara deneysel koşullarda bakır yüklenerek, bakırın oksidatif hasar oluşturma etkisinin ve ge-

lişecek antioksidan savunma mekanizmasının incelenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışmamızda ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen Wistar albino türü dişi sıçan kullanıldı. Kontrol (n=9) ve deney (n=9) grubu olmak üzere iki ayrı grup oluşturuldu. Kontrol grup sıçanlar standart yem ve çeşme suyuyla beslendi. Deney grubu hayvanlar ise normal yem ile beslenirken, içme sularına dokuz hafta boyunca 250 mg/l bakır ilave edildi. Deney süresi sonunda eter anestezisi altında hayvanların abdominal aortalarından yaklaşık 5 ml heparinize kan örneği alındı. Kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra plazma ve eritrosit lizatları ayrıldı. Plazmada, bakır ölçümü atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Shimadzu AA-680)⁷ ile lipid peroksidasyonu MDA ölçümü ile tayin edildi.⁸ Eritrosit lizatları %0,9 NaCl ile yıkandıktan sonra, SOD ve GSH Bioxytech kitleri ile ölçüldü.^{9,10}

İstatistiksel analiz: Grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi uygulandı. p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi. Değerler ortalama±standart sapma olarak verildi.

* **Anahtar Kelimeler:** Bakır, süperoksit dismutaz, glutatyon, lipid peroksidasyonu; **Key Words:** Copper, superoxide dismutase, glutathione, lipid peroxidation; **Alındığı Tarih:** 27 Şubat 2004; Doç. Dr. Selmin Toplan, Dr. Derviş Özçelik, Prof. Dr. M. Can Akyolcu: İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul. Doç. Dr. Nuran Darıyerli: İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul. **Yazışma adresi (Address):** Doç. Dr. Selmin Toplan, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul.

BULGULAR

Çalışmamızda deney sonucu elde ettiğimiz bulgular Tablo I'de gösterilmektedir. Tabloda görüldüğü gibi içme sularına bakır ilave ettiğimiz deney grubunda plazma bakır konsantrasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). MDA düzeyleri ve SOD aktivitesi deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Glutasyon düzeylerinin ise deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

Tablo I. Deney ve kontrol grubuna ait parametrelerin ortalama ve standart sapma değerleri ($M\pm SD$) ($*p<0,05$)

Parametre	Kontrol n=9	Deney n=9
MDA (nmol/ml)	5,24±0,37	6,0±0,78*
SOD (U/ml)	2,09±0,29	2,65±0,52*
GSH (μ mol/l)	23,86±1,92	21,43±1,36*
Serum Cu (μ g/ml)	1,19±0,10	1,52±0,11*

TARTIŞMA

Çalışmamızda bakır uygulaması sonucu oluşabilecek oksidatif hasarı saptayabilmek için lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA tayin edildi. Bu hasara karşı gelişebilecek antioksidan savunmayı gösterebilmek için de SOD aktivitesi ve GSH düzeyi saptandı. Bilindiği gibi SOD enzimatik antioksidan savunmada rol oynarken, GSH non enzimatik radikal temizleyicisi olarak görev yapar.^{11,12} Araştırmamızda deney grubunda serum bakır konsantrasyonu kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu grubun MDA düzeyinin de kontrol grubuna göre yüksek olması ($p<0.05$) bize deney süresince uyguladığımız dozun sıçanlarda oksidatif hasara neden olduğunu göstermektedir. Birçok araştırmacı da benzer şekilde farklı dozlarda bakır yüklemesinin lipid peroksidasyonunu artırarak hasar oluşturduğunu bildirmektedir.^{5,6} Normal olarak tüm doku- lar da düşük düzeyde lipid peroksidasyonu gö-

rülür. Bu durum antioksidan sistemlerle kontrol edilemediği zaman özellikle membran lipidlerinin bozulmasına yol açarak oksidatif hasarlara neden olur.¹³ Bulgularımıza göre uyguladığımız dozun lipid peroksidasyonunu başlattığı söylenebilir. Araştırmamızda bu hasara karşı gelişen enzimatik savunma sistemi olarak SOD aktivitesine baktığımızda, kontrol grubuna göre deney grubunun SOD aktivitesinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Bakırın toksik etkisini araştıran çeşitli çalışmalarda SOD aktivitesi ile ilgili sınırlı sayıda ve çelişkili sonuçlar bildirilmektedir. Zhang ve ark.¹⁴ sıçanlarda bakır yüklemesi (500 mg Cu/kgbw) sonucu SOD aktivitesinin azaldığını vurgulamaktadırlar. Ancak Sansinanea ve ark.¹⁵ %0.2'lik $CuSO_4$ solusyonu verdikleri sıçanlarda SOD aktivitesinin arttığını saptamışlardır. Ossola ve ark.¹⁶ da bakır enjeksiyonu yaptıkları sıçanlarda benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmamızda uyguladığımız dozda (250 mg/l $CuSO_4$), SOD aktivitesindeki artış son iki araştırmacının bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Bu bulgulara göre antioksidan savunma sisteminin ortaya çıktığını söyleyebiliriz. SOD süperoksit anyon radikalının moleküller oksijen ve peroksida dönüşümünü katalizlediği bilinmektedir.¹¹ Oluşan H_2O_2 ise GSH ve GSH-Px tarafından elimine edilmektedir. GSH'nın proteinlerin sülfür gruplarının oksitlenme ve çapraz bağlanmasını önlemede ve Cu transportunda önemli rol oynadığı rapor edilmiştir.¹⁷ Çalışmamızda GSH düzeyinde azalma saptanmıştır ($p<0.05$). GSH metal toksisitesine karşı farklı yollarla koruyuculuk yapmaktadır. Yapısındaki SH grupları birçok metale affinite göstermektedir. GSH metallerin reaktivitelerini azaltarak yada konjugat oluşturarak ekstraselüler ortama metallerin eliminasyonunu sağlamaktadır.^{17,18} Bulgularımıza göre deney grubumuzda GSH düzeyinin kontrol grubuna göre düşük bulunması, Cu yüklemesi sonucu ortaya çıkan reaktif O_2 türlerine karşı GSH düzeyinin yetersiz kaldığını gösterebilir yada sentez mekanizmasında bir azalma söz konusu olabilir.

Sonuç olarak bakır yüklemesinin sıçanlarda plazma lipid peroksidasyonunu arttırdığını ve antioksidan savunmada, SOD enzim aktivitesinin ilk savunma sistemi olarak geliştiğini buna

karşılık GSH düzeyinin yetersiz kaldığını söyleyebiliriz.

ÖZET

Çalışmamız bakırın oksidatif ve defans sistemleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla planlandı. Deney hayvanı olarak ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen Wistar albino türü dişi sıçanlar kullanıldı. Kontrol sıçanlar normal diyet ve su ile beslenirken, deney grubunun içme sularına dokuz hafta süreyle bakır ilave edildi. Deney süresi sonunda her iki grubun serum bakır konsantrasyonu, SOD aktivitesi ve GSH düzeyleri ve plazma MDA konsantrasyonları ölçüldü. Bakır konsantrasyonu, MDA düzeyi ve SOD aktivitesinin deney grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). GSH düzeyi deney grubunda kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p<0.05$). Çalışmanın sonucu olarak bakır uygulamasının kan-da lipid peroksidasyonunu ve SOD enzim aktivitesini arttırdığını, GSH düzeyini azalttığını söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Marceau N, Aspin N. The intracellular distribution of radio-copper derived from ceruloplasmin and from albumin, *Biochem. Biophys Acta* 1973; 328: 338-350.
2. Gutteridge JMC, Stocks J. Ceruloplasmin: Physiological and pathological perspectives. *CRC. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1981; 14: 257-329.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity oxygen radicals transition metals and disease. *Biochem J.* 1984; 219: 1-14.
4. Hochstein P, Kumar KS, Forman SJ. Lipid Peroxidation and the cytotoxicity of copper. *Ann NY Acad Sci.* 1980; 355: 240-248.
5. Britton RS. Metal induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis.* 1996; 16: 3-12.
6. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003; 189: 147-163.
7. Brown A, Taylor A. Applications of aslotted quartz tube and flame atomic absorption spectrometry to the analysis of biological samples. *Analyst June.* 1985; 110: 579-582.
8. Slater TF. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzimology.* 1984; 105: 283-293.
9. Nebot C, Moutet M, Huet P, Xujz-Yadan JC, Chaudiere J. Spectrophotometric assay of Superoxide Dismutase Activity Based on the activated. Autoxidation of a Tetracyclic Catechol. *Analytical Biochemistry.* 1993; 214: 442-451.
10. Anderson ME. Enzymatic and chemical methods for the determination of Glutathione. In: *Glutathione Chemical, biochemical and medical aspects.* edited by Vol, A., Dolfin, D., Paulson, R. & Auramovic, O. John Wiley and Sons 1989; 339-365.
11. Fridovich I Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem* 1995; 64: 97-112.
12. Meister, A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983; 220: 472-477.
13. Yagi, K. In: *Lipid peroxides in biology and medicine.* Academic press, Orlando FL. 1982; 223-242.
14. Zhang SS, Noordin MM, Rahman SO, Haron J. Effects of copper overload on hepatic lipid peroxidation and defence in rats. *Vet Hum Toxicol.* 2000; 42:261-264.
15. Sansinanea AS, Cerone SI, Streitenberger, S.A., Garcia, C, Auza, N. Oxidative effect of hepatic copper overload. *Acta Physiol Pharmacol Ther. Latinoam* 1998; 48: 25-35.
16. Ossola JO, Groppa MD, Tomaro ML Relationship between oxidative stress and heme oxygenase induction by copper sulfate. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 337: 332-337.
17. Pedersen JZ. Cu-glutathione complexes under physiological conditions: Structures in solution different from the solid state coordination. *Biometals.* 1996; 9: 3-
18. Hanna PM, Mason RP. Direct evidence for inhibition of free radical formation Cu (I) and H₂O₂ by GSH and other potential ligands using the EPR Spin trapping technique. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295: 205-213.