

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM
DALI**

**RATLARDA SUBAKUT BAKIR MARUZİYETİNE KARŞI
DİOSMİNİN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Hazırlayan
Ömer Faruk KARTAL**

**Danışman
Prof. Dr. Gökhan ERASLAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2023
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM
DALI**

**RATLARDA SUBAKUT BAKIR MARUZİYETİNE KARŞI
DİOSMİNİN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Ömer Faruk KARTAL**

**Danışman
Prof. Dr. Gökhan ERASLAN**

**Aralık 2023
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Ömer Faruk KARTAL



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Ratlarda Subakut Bakır Maruziyetine Karşı Diosminin Etkisinin Değerlendirilmesi” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Ömer Faruk KARTAL

Danışman

Prof. Dr. Gökhan ERASLAN

Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Gökhan ERASLAN

Prof. Dr. Gökhan ERASLAN danışmanlığında **Ömer Faruk KARTAL** tarafından hazırlanan “**Ratlarda Subakut Bakır Maruziyetine Karşı Diosminin Etkisinin Değerlendirilmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

07/12/2023

JÜRİ

İmza

Üye : Prof. Dr. Gökhan ERASLAN (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Ebru YILDIRIM

Üye : Dr. Öğt Üyesi Muhammet Yasin TEKELİ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının tüm aşamalarında destekleri için Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Danışman hocam Prof. Dr. Gökhan ERASLAN'a teşekkür ederim. Hayvan deneyi ve laboratuvar çalışmalarında katkılarından dolayı Dr. Öğt Üyesi Muhammet Yasin TEKELİ, Doç. Dr. Zeynep SOYER SARICA, Dr. Coşkun ASLAN ve Dr. Sinem ÇALIMLI'ya teşekkür ederim.



RATLARDA SUBAKUT BAKIR MARUZİYETİNE KARŞI DİOSMİNİN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ömer Faruk KARTAL
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2023
Danışman: Prof. Dr. Gökhan ERASLAN

ÖZET

Bu çalışmada ratlarda bakır maruziyetine karşı diosminin etkinliği araştırılmıştır. Wistar Albino ırkı 2-3 aylık erkek 50 adet rat kullanılmıştır. Biri kontrol 4'ü deneme olmak üzere 5 grup oluşturulmuştur. Kontrol grubundaki hayvanlara herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Deneme grubundan Grup 2, 3, 4 ve 5'e sırasıyla dimetil sülfoksit (taşıt madde), 50 mg/kg.ca/gün dozunda diosmin, 200 mg/kg.ca/gün bakır sülfat, 200 mg/kg.ca/gün bakır sülfat ile birlikte 50 mg/kg.ca/gün dozunda diosmin 4 hafta süreyle ağızdan sondayla verilmiştir ve sürenin sonunda ratlardan heparinli/antikoagülanatsız tüplere kan alınmış ve organları (karaciğer, böbrek, beyin, kalp, testis) çıkarılmıştır. Serumda bazı biyokimyasal parametreler (trigliserit, kolesterol, BUN, kreatinin, ürik asit, total protein, albumin, LDH, AST, ALT ve ALP) ölçülmüştür. Doku örnekleri (karaciğer, böbrek, beyin, kalp, testis) ve kanda bazı oksidatif stres parametreleri (MDA, NO, glutasyon, SOD, CAT ve GSH-Px) değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışma sonunda vücut ve organ (karaciğer, böbrek, beyin, kalp, testis) ağırlıkları da alınmıştır. Sadece dimetil sülfoksit ve diosmin uygulanan grupta incelenen parametrelerde kontrol grubuna göre önemli bir farklılık bulunmamıştır. Yalnızca bakır verilen grubun değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı değişimler söz konusu olmuştur. Bakır ve diosmin birlikte uygulanan grupta değerlerin kontrol grubu değerlerine yaklaştığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, 200 mg/kg.ca/gün dozunda 4 hafta süreyle verilen bakır sülfat rat fizyolojik sisteminde olumsuz ekilere yol açarken 50 mg/kg.ca/gün dozunda diosmin uygulamasının bu olumsuz etkinin geriletilmesinde etkisinin olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Bakır; Diosmin; Oksidatif Stres; Biyokimyasal Parametre; Organ Hasarı; Rat.

EVALUATION OF THE EFFECT OF DIOSMIN AGAINST SUBACUTE COPPER EXPOSURE IN RATS

Ömer Faruk KARTAL
Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Pharmacology and Toxicology
Master of Science Thesis December 2023
Thesis Advisor: Prof. Dr. Gökhan ERASLAN

ABSTRACT

In this study, the effectiveness of diosmin against copper exposure in rats was investigated. Fifty male Wistar Albino rats, aged 2-3 months, were used. Five groups were created, one control and 4 experimental. No treatment will be applied to the animals in the control group. From the experimental group to Groups 2, 3, 4 and 5, dimethyl sulfoxide (vehicle), diosmin at a dose of 50 mg/kg.bw/day, copper sulfate at a dose of 200 mg/kg.bw/day, and combination of copper sulfate at a dose of 200 mg/kg.bw/day and diosmin at a dose of 50 mg/kg.bw/day was given orally by gavage for 4 weeks, respectively. At the end of the trial period, blood was collected into tubes with heparin/without anticoagulant and organs (liver, kidney, brain, heart and testicle) were removed from the rats. Some biochemical parameters (triglyceride, cholesterol, BUN, creatinine, uric acid, total protein, albumin, LDH, AST, ALT and ALP) were measured in serum. Some oxidative stress parameters (MDA, NO, glutathione, SOD, CAT and GSH-Px) were evaluated in tissue samples (liver, kidney, brain, heart, testis) and blood. In addition, body and organ (liver, kidney, brain, heart, testicle) weights were taken at the end of the study. There was no significant difference in the parameters examined in the groups administered dimethyl sulfoxide alone and diosmin alone compared to the control group. There were significant changes in the values of the copper-alone group compared to the control group. It was determined that the values in the combination of copper and diosmin applied group approached the control group values. As a result, it was understood that while copper sulfate applied at a dose of 200 mg/kg.bw/day for 4 weeks caused negative effects on the physiological system of rats, diosmin application at a dose of 50 mg/kg.bw/day had an effect on regressing this negative effect.

Key words: Copper; Diosmin; Oxidative Sress; Biochemical Parameters; Organ Damage; Rat.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK ..	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. BAKIR	5
2.1.1. Özellikleri ve Kaynakları.....	5
2.1.2. Maruziyet Şekilleri	6
2.1.3. Toksikokinetik.....	7
2.1.3.1. Emilme	7
2.1.3.2. Dağılım	7
2.1.3.3. Metabolizma	8
2.1.3.4. Atılım.....	9
2.1.4. Etki Şekli.....	9
2.1.5. Zehirliliği ve Klinik Belirtileri	10
2.1.6. Tanı.....	12
2.1.7. Zehirlenmelerde sağaltım.....	12
2.1.7.1. Metal zehirlenmelerinde genel sağaltım prensipleri .	12
2.1.7.2. Bazı kelatlayıcı maddeler ve kullanıldıkları alanlar	14
2.1.7.3. Bakır Zehirlenmesi ve Kelasyon Tedavisi.....	14

2.1.8. Geçmişte ve Yakın Zamana Kadar Kullanımı	16
2.2. OKSİDATİF STRES	18
2.2.1. Malondialdehit (MDA)	20
2.2.2. Nitrik Oksit (NO)	20
2.2.3. Glutasyon (GSH)	20
2.2.4. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	21
2.2.5. Katalaz (CAT)	22
2.2.6. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	22
2.3. FLAVONOİDLER	22
2.3.1. Fizikokimyasal Özellikleri.....	22
2.3.2. Kaynakları.....	23
2.3.3. Etkileri	24
2.3.3.1. Antioksidan Etki	24
2.3.3.2. Anti-İnflamatuar Etki	25
2.3.3.3. Kardiyovasküler Etki.....	26
2.3.3.4. Antibakteriyel ve Antifungal Etki.....	26
2.3.3.5. Antiviral/Antikanser Etki	27
2.3.4. Metabolizması	27
2.3.5. Kullanımları	28
2.3.6. Diosmin.....	28
2.3.6.1. Kaynağı.....	28
2.3.6.3. Metabolizması.....	29
2.3.6.4. Etkisi.....	29
2.3.6.4.1. Flebotonik Etki	29
2.3.6.4.2. Kardiyak Fonksiyonlara Etkisi	29
2.3.6.4.3. Anti-İnflamatuar Etki.....	30
2.3.6.4.4. Antioksidan Etki	30
2.3.6.4.5. Antidiyabetik Etki.....	30

2.3.6.4.6. Antihiperlipidemik Etki.....	30
2.3.6.4.7. Antifibrotik Etki.....	31
2.3.6.4.8. Antikanser Etki	31
2.3.6.5. Kullanımları	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. KULLANILAN CİHAZ, MALZEME VE KİMYASALLAR	33
3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuar Malzemeleri	33
3.1.2. Kimyasallar	34
3.2. YÖNTEM.....	35
3.2.1. Hayvan Materyali	35
3.2.2. Gruplar	36
3.2.3. Örneklerin Toplanması	36
3.2.4. Eritrositlerin Yıkınması ve Hemolizatların Hazırlanması....	37
3.2.5. Doku Homojenatının Hazırlanması.....	37
3.2.6. Biyokimyasal Analizler	37
3.2.6.1. Plazma ve Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü.....	37
3.2.6.2. Eritrosit Hemoglobin Düzeyi Ölçümü	38
3.2.6.3. Doku Protein Düzeyi Ölçümü.....	38
3.2.6.4. Eritrosit ve Doku Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü 39	
3.2.6.5. Eritrosit ve Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü.....	39
3.2.6.6. Eritrosit ve Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Ölçümü.....	39
3.2.6.7. Plazma ve Doku Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Ölçümü	40
3.2.6.8. Plazma ve Doku Glutasyon (GSH) Düzeyi Ölçümü .	40
3.2.6.9. Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Analizi	40
3.3. İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR	40
4. BULGULAR	41

4.1. DİMETİLSÜLFOKSİD	41
4.2. DİOSMİN.....	41
4.3. BAKIR	41
4.4. BAKIR VE DİOSMİN.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
5.1. DİMETİLSÜLFOKSİD	58
5.2. DİOSMİN.....	58
5.3. BAKIR	60
5.4. BAKIR VE DİOSMİN.....	63
6. KAYNAKLAR	66
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

Cu	: Bakır
CAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
MDA	: Malondialdehit
NO	: Nitrik oksit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
AST	: Aspartat amino transferaz
ALT	: Alanin amino transferaz
ALP	: Alkalın transferaz
LDH	: Laktad dehidrojenaz
BUN	: Kan Üre Azotu

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1.	Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda plazma/eritrosit bazı oksidatif stres parametreleri.	43
Tablo 4.2.	Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda karaciğer dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.	44
Tablo 4.3.	Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda böbrek dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.	51
Tablo 4.4.	Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda beyin dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.	52
Tablo 4.5.	Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda kalp dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.	53
Tablo 4.6.	Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda testis dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.	54
Tablo 4.7.	Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda serum bazı biyokimyasal parametreleri.	55
Tablo 4.8.	Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda canlı ağırlık, organ ağırlıkları ve organ ağırlığı/canlı ağırlık oranları (bağıl ağırlık).....	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	23
Şekil 2.2. A. Diosminin kimyasal yapısı B. Diosmetinin kimyasal yapısı	29



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bakır (Cu), adını ilk bulunduğu yer olan Kıbrıs'ın Latincesinden (aes cyprium: Kıbrıs cevheri, cyprium ve daha sonra Cuprum) almıştır. Atom numarası 29 ve atomik kütlesi 63,5 daltondur. Bu element, toprak, su, kaya ve hava gibi çeşitli yerlerde bulunur ve karakteristik kıvılcımsı bir renge sahiptir (Dorsey ve Ingerman, 2004; Özbolat ve Tuli, 2016; Collins, 2020). Yüksek elektrik ve ısı iletimi kabiliyeti, korozyona dayanıklılığı, antimikrobiyal olmaları ve canlı organizmalarda çeşitli biyokimyasal süreçlerde oynadığı aktif roller, bakırın endüstriyel sektörlerden ilaç endüstrisine kadar geniş bir uygulama yelpazesinde ticari açıdan önemli olmasını sağlar (Dorsey ve Ingerman, 2004; Henckens ve Worrell, 2020). Doğada serbest ya da bileşik halindedir. Kırmızı renklidir, dövülebilen ve işlenebilen bir elementtir. Kimyasal açıdan ağır metaller sınıfına girer ve 200'den fazla farklı mineral formu vardır. Kalkosit (Cu_2S), kovellit (CuS), kalkopirit (CuFeS_2), bornit (Cu_5FeS_4), tetrahedrit (Cu_3SbS_3), kubrit (Cu_2O), tenorit (CuO), malahit ($\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2$), azurit ($2\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2$) ve turkuaz ($\text{CuAl}_6(\text{PO}_4)_4(\text{OH})_8$) doğadaki başlıca bakır mineralleridir (Flemming ve Trevors, 1989; Okocha ve Adedeji, 2012). Metalik bakır, kolaylıkla eriyen ve işlenen bir maddedir. Pirinç ve bronz gibi pek çok alaşımda bulunur. Metal veya alaşım şeklinde kablo, levha, metal boru vb. ürünlerde kullanılır. En yaygın bakır bileşiği bakır sülfattır (Okocha ve Adedeji, 2012; Al-Saydeh ve ark., 2017). Yerkabuğunun sadece % 0,0007'sini oluşturur ve kaynağı doğal kayalardır. Jeolojik, meteorolojik veya biyolojik süreçlerle havaya, toprağa ve suya dağılır. Bakır üretimi 1900'lerden bu yana elektrik/elektronik tüketimi, inşaat, ulaşım ve endüstriyel uygulamalar için istikrarlı bir şekilde artmıştır. Bakır yaşam ve canlı organizmalar için de gereklidir. Demir ve çinko gibi diğer metallerle birlikte enerji metabolizması, mitokondriyal solunum ve antioksidan savunmalar da dahil bir çok

süreçte rol alan çeşitli enzimlerin katalitik ve yapısal kofaktörüdür (Pereira ve ark., 2016; Doguer ve ark., 2018).

Bakırın antibakteriyel amaçlı kullanımı birkaç bin yıl öncesine dayanır. MÖ 2400'lü yıllarda, eski Mısır'da yara dezenfeksiyonu için bakır tozu kullanılmıştır. Bakır müstahzarlarının kullanımı, 1945'te penisilin yaygın olarak kullanılmasına kadar devam etmiştir. Bir antibakteriyel madde olarak bakıra yeniden ilgi ilerleyen dönemlerde artmıştır (Hans ve ark., 2016; Arendsen ve ark., 2019). Tarım zararlılarına ve yumuşakçalara etkilidir. Fungusit ve biyosit amaçlı da tercih edilir. Ayrıca havuz balığı yetiştiriciliğinde bazı balık parazitleri ve salyangozlarla mücadelede kullanılır. Tarımda kullanılan Cu bazlı kimyasallar çevreye aşırı miktarda salınır. Bu durum topraktaki makro ve mikro canlı popülasyonunu değiştirir (Boyd ve Massaut, 1999; Rehman ve ark., 2019).

Bakır çeşitli oksidasyon-indirgeme enzim sistemlerinin önemli bileşenidir. Canlı organizmasında üretilemediğinden besin kaynaklarından alınması gerekir. Yetişkinlerde bakır eksikliği görülebilir fakat nadirdir. Eksikliğinde hematopoietik, bağışıklık, sinir ve kardiyovasküler sistemde olumsuz etkilerin yanısıra iskelet bozuklukları ve nötropeni ortaya çıkabilir (Williams 1983; Percival 1998; Rehman ve ark., 2019). Bakır oksijen metabolizması, cilt pigmentasyonu ve kollajen sentezi dahil kan damarlarının bütünlüğünü koruyan çeşitli fizyolojik süreçlerde; demir homeostazında, antioksidan savunma sisteminde ve nörotransmitterlerin üretiminde rol alır (Franchitto ve ark., 2008; Gromadzka ve ark., 2020; Tarnacka ve ark., 2021). Vücutta hem oksitlenmiş Cu (II) hem de indirgenmiş Cu (I) şeklinde iki oksidasyon formunda bulunur. Bakırın benzersiz yapısı, normal büyüme ve gelişme için gerekli biyolojik işlevleri gerçekleştiren birçok enzimde ve redoks reaksiyonlarında kofaktör şeklinde görev yapmasını sağlar. Bu enzimler arasında sırasıyla mitokondriyal elektron taşıma zincirinde, elastin ve kollajenin çapraz bağlanmasında ve reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda rol oynayan sitokrom c oksidaz, lizil oksidaz ve süperoksit dismutaz bulunur (Tapiero ve ark., 2003; Weiskirchen ve ark., 2019).

Bakırın vücutta emilimi etkileyen faktörlerin başında besin öğeleri gelir. Özellikle metiyonin, histidin ve sistein içeren amino asit taşıyıcılarıyla ince bağırsakta büyük ölçüde emilir. Emilen bakır, serum albüminine ve transküpreine bağlanarak karaciğere

taşınır. Hücresel bakır alımı sırasında Cu (II) doğrudan Cu (I)'e indirgenir. Glutasyon, metalotiyonein, Cu-taşıyan P-tipi ATPazlar, Menkes ve Wilson proteinleri gibi çeşitli proteinler ile bakır şaperonlar olarak adlandırılan sitoplazmik taşıma proteinleriyle hücre içi bölmelere iletilir. Glutasyon, bakırın intrasellüler detoksifikasyonunda görevlidir. Bakır eksikliği bağışıklık fonksiyonunu, nöropeptid sentezini ve antioksidan savunmayı değiştirirken; fazlalığı oksidatif strese, mitokondriyal hasara ve klinik hepatik belirtilere neden olur. Cd, Cr, Pb ve Hg gibi diğer ağır metallerle karşılaştırıldığında daha az toksiktir. Fakat düzeyi biyolojik sistemde normal aralığın üzerinde olursa toksisiteye yol açar (Lönnerdal, 1996, 1998; Barceloux ve Barceloux, 1999; Tapiero ve ark., 2003; Mahurpawar, 2015; Weiskirchen ve ark., 2019).

Diosmin (diosmetin 7-O-rutinozit), çeşitli bitkisel kaynaklardan izole edilebilen veya kimyasal/yapısal olarak çok benzeyen başka bir flavonoid hesperidinden türetilen doğal flavonoid glikozittir. Tıbbi alanlarda kullanılan ürünlerde bulunur. Bunlar arasında % 90 diosmin ve % 10 hesperidin içeren mikronize edilmiş saflaştırılmış flavonoid fraksiyonu (MPFF) da yer alır. Mikronizasyon, katı partiküllerin ortalama çapını küçültmekte kullanılan mekanik bir işlemdir ve bu sayede bağırsaklardan daha iyi emilim sağlanır. Hesperidinden de türetilir. Fakat diosmin (3',5,7-trihidroksi-4'-metoksiflavon 7-rutinosid), merkezinde karbon halkasındaki iki karbon atomu arasında bir çift bağın varlığıyla moleküler anlamda hesperidinden (3',5,7-trihidroksi-4'-metoksiflavon ramnoglukozid) ayrılır. Hesperidin alındıktan sonra diosmine dönüşür (Oh, 1992; Cazaubon ve ark., 2021). Bağırsak florasında hızla aglikon formu diosmetine çevrilir ve emilerek hızla vücuda dağılır. Ardından fenolik asitler veya glisin-konjuge türevlerine indirgenir ve idrarla; emilmeyen diosmin veya diosmetin kısmı ise dışkıyla atılır. Öncelikle antiinflamatuvar, serbest radikal temizleyici ve antimutajenik özellikler gösterir (Cova ve ark., 1992; Oh, 1992; Le-Devehat, 1997; Naso ve ark., 2016). Venöz tonusun stabilizasyonu, iskemide kan viskozitesine etkisiyle mikrodolaşımın devamı, yangısal reaksiyonların inhibisyonu ve kapiller geçirgenliğin sınırlandırılması gibi etkilere de sahiptir (Smith, 1999; Ramelet, 2000; Tanrikulu ve ark., 2013; Senthamizhselvan ve ark., 2014). Diosmin prostaglandin E₂ (PGE₂) ve tromboksan A₂ (TXA₂)'nin (lökosit aktivasyon, migrasyon ve adhezyon inhibitörleri) güçlü engelleyicileridir. Endotelial adhezyon moleküllerinin plazma düzeylerinde ve nötrofil aktivasyonunda anlamlı azalmaya yol açarak mikrosirkülasyon hasarına karşı

koruma sağlar (Manthey, 2000; Ramelet, 2000). Diosmin-hesperidin klinikte alt ekstremite, venöz yetmezlik ve hemoroid gibi damar hastalıklarında kullanılır. Lenfatik akımı ve basıncını artırır (Pecking, 1995, 1997; Jantet, 2002). Lökosit aktivasyonunu özellikle de serbest radikaller ve prostaglandinler gibi enflamatuar mediatörlerin üretimini baskılayarak venöz yangıyı azaltır. Normal kapiller geçirgenliği idame ettirir ve kapiller direnci güçlendirir (Manthey, 2000; Mohammed, 2022; Huwait ve Mobashir, 2022)

Ağır metal zehirlenmesinde yaygın tedavi yöntemi arasında kelasyon uygulaması gelir. Bu şekilde, metal verilen bileşiklerle bağ oluşturularak (kelasyon) vücuttan atılması hızlandırılır (Flora ve Pachauri, 2010; Aaseth ve ark., 2015). Kelatör maddeler de bireysel anlamda toksik bileşikler olabilir ve tedavi sırasında bazı olumsuz etkileri gözlenebilir (Domingo, 1998; Flora ve ark., 2009; Amadi ve ark., 2019). Antioksidanlarla desteklenen kelasyon tedavisinde daha etkili sonuçlara ulaşılabilmektedir (Amadi ve ark., 2019; Mehrandish ve ark., 2019; Vezzoli ve ark., 2023). Bakır maruziyetine bağlı oksidatif stres ile bu metalin yol açtığı diğer olumsuz etkilerin farklı hayvan türlerinde değerlendirildiği çalışmalar vardır (Ozcelik ve ark., 2003; Kumar ve ark., 2015; 2016; Yu ve ark., 2021). Çeşitli hayvan türlerinde bu metalle birlikte flavonoidlerin incelendiği araştırmalar da bulunmaktadır (Macar ve ark., 2019; Arowoogun ve ark., 2021; Parlak ve ark., 2022). Diosminin farklı alanlarda tedavi amaçlı kullanımının (Anon, 2004; Zheng ve ark., 2020) yanısıra bakır maruziyetlerindeki etkilerinin de araştırılmasının anlamlı olduğu düşünülmektedir. Zira doğal antioksidanlar ağır metal toksisitesinde koruyucu potansiyele sahip olabilir (Amadi ve ark., 2019, Mehrandish ve ark., 2019). Çünkü bakır zehirlenmesinde kullanılan kelatörlerin de bireysel anlamda toksisiteleri vardır (Domingo, 1998; Flora ve ark., 2009; Amadi ve ark., 2019). Söz konusu araştırma bu yönüyle önem taşımaktadır. Ayrıca, gelecekte yapılacak diğer çalışmalara rehberlik edebilir. Bu amaçla, farklı gruplar oluşturularak dört hafta süresince hayvanlara bakır ve diosmin ağızdan sondayla her gün tek başına ve birlikte verilmiştir. Çalışma bitince, serumda bazı biyokimyasal değişkenler ile kan/doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri analiz edilmiştir. Vücut ve doku ağırlıkları ölçülmüştür. Böylece, bakır maruziyetinin yol açtığı muhtemel olumsuzluklara karşı diosminin potansiyel etkisi konusunda kapsamlı bir değerlendirme yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BAKIR

2.1.1. Özellikleri ve Kaynakları

Bakır, simgesi Cu olan periyodik cetvelin IB grubunda nikel ve çinko arasında bir konuma sahiptir, altın ve gümüş gibi asil bir metaldir. Endüstriyel önemi görünüşü, alaşımlama yeteneği, düşük korozyon, işlenebilirlik ve yüksek termal/elektriksel iletkenlik gibi yararlı fiziksel özelliklerinden kaynaklanır. Genelde asidik ortamlarda çözünmez. Doğada temel formda çok çeşitli bileşiklerle birlikte olabilir. Hem oksitlenmiş hem de indirgenmiş halde bulunur. Bakır iyonu (Cu^{++}), Cu'nun genellikle suda karşılaşılan en önemli oksidasyon halidir (Barceloux ve Barceloux, 1999; Gaetke ve ark., 2014; Hans ve ark., 2016). Atom numarası 29, atom ağırlığı 63,5, yoğunluğu 8.96 g/mL, erime sıcaklığı 1083 °C ve kaynama noktası 2595°C'dur. Dünyada en yaygın kullanılan üçüncü metaldir (Stern, 2010; Wuana ve Okieimen, 2011). Kırmızı veya kahverengi renge sahiptir. Suda çözünmez fakat bakır sülfat 0 °C'da 14,3 g/L oranında çözünür. Kuprik bileşikler mavi veya yeşil renktedir. Cu (III) ise endüstriyel veya çevresel açıdan önemli olmayan güçlü bir oksitleyici ajandır. Bakır kütlelerinin yaklaşık % 25'i bakır sülfattır ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Dünya genelinde neredeyse her bölgede bulunabilir. Elektriksel iletkenliği, gümüşün ardından gelen en iyi metaldir (Barceloux ve Barceloux 1999; Stern, 2010; Wuana ve Okieimen, 2011).

Her canlı organizmanın biyokimyasında merkezi rol oynayan esansiyel elementtir. Vücutta hem oksitlenmiş Cu (II) hem de indirgenmiş Cu (I) formda iki oksidasyon durumunda bulunur. Vücudun büyük çoğunluğunda Cu^{+2} halindedir. Hayatta kalma için gereklidir. Büyüme ve gelişme gibi temel ve önemli biyolojik işlevleri yerine getiren

proteinler ile oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları için esaslı bir kofaktördür (Tapiero et al., 2003; Altarelli ve ark., 2019; Weiskirchen et al., 2019).

2.1.2. Maruziyet Şekilleri

Maruziyet hava, toprak ve suyla olmaktadır. Toprak bu bağlamda önemli bir unsurdur. Yüksek konsantrasyonlu Cu, bakır endüstrilerinden toz veya bakır partikülleri halinde rüzgarla taşınır ve toprağa yerleşir. Arıtma tesislerinden gelen kanalizasyon çamuru; doğal kaynakların yanı sıra, madencilik, izabe, endüstriyel-tarımsal atıklar ve tarım kimyasalları gibi çeşitli antropojenik unsurlar ve tarımda kullanılan inorganik gübreler toprakta yüksek Cu içeriğinin oluşmasına neden olur. Atmosferdeki ortalama bakır yoğunluğu 5-200 ng Cu/m³ aralığındadır. Hava emisyonu, çevreye salınan bakırın yalnızca küçük bir kısmını (% 0,4) temsil eder ve hem doğal kaynaklardan (rüzgarla savrulan toz, volkanlar, orman yangınları, deniz serpintisi) hem de insan kaynaklı faaliyetlerden ileri gelir (demir dışı metal üretimi, bakır izabe tesisleri, demir ve çelik üretimi, belediye çöp yakma tesisleri). Topraktaki doğal konsantrasyonu yaklaşık 50 ppm'dir. Sulu çözeltilerdeki bakır düzeyi pH, rakip katyonların varlığı, organik ve inorganik bakır maddelerini karmaşık hale getiren bileşiklerin seviyeleri ve çözünmeyen bakır tuzlarının anyonlarının yoğunluğu gibi faktörlere bağlıdır. Gıdalardaki miktarı yaş ağırlıkta değişkenlik gösterir. Bakır içeriği nispeten yüksek yiyecekler arasında mantar, kuru meyveler, baklagiller, tam tahıllı ürünler, fıstık ezmesi, kuruyemişler, sakatatlar (karaciğer) ve kabuklu deniz hayvanları (kabuklular, istiridye) yer alır. Deniz suyu çok daha yüksek yoğunluklara sahiptir ve derinlikle birlikte yükselir. Okyanus tabanlarından toplanan balık ve kabuklu deniz hayvanları daha yüksek bakır içeriği gözlenir. Tatlı su balıklarındaki konsantrasyon yaş ağırlığa göre 0,25-38,75 ppm Cu arasında değişir. Et ve süt ürünleri genellikle düşük seviyede bakır içerir. Bakırın normalde memelilere ve karada yaşayan organizmalara girmesinin tek yolu beslenmedir. Bitkilerde giriş kök veya yapraklarla olabilir (Barceloux ve Barceloux, 1999; Georgopoulos ve ark., 2001; Kumar ve ark., 2021).

2.1.3. Toksikokinetik

2.1.3.1. Emilme

Esas olarak hayvanların gastrointestinal sistemi yoluyla emilir. Diyetle alınan bakırın % 20 ila 60'ı emilir, geri kalanı dışkıyla atılır. Bakır emilimini, hayvansal protein, sitrat ve fosfat artırır. Diyetteki yüksek çinko ve kadmiyumun yanı sıra fitat ve basit şekerler (fruktoz, sukroz) emilimini engeller. Ağızdan bakır emilimi mide ve ince bağırsakta, özellikle de duodenum bölgesinde gerçekleşir. Mide-barsaktan iyonik veya amino asitlerle kompleks formu emilir. Özellikle yüksek affiniteli bakır taşıma geni Ctr1 (Ctr1) ile kodlanan "Kimotripsin Benzeri Proteaz" isimli enzim ve ATP7A adlı taşıma proteinleri, ağızdan bakır emiliminin düzenlenmesinde kritik rol oynar. İnce bağırsaktan emilim, büyük olasılıkla başlangıçta Ctr1'in aracılık ettiği proteinlerce gerçekleşir. İnce bağırsak enterositlerinin apikal membranında bulunan redüktaz aktivitesiyle oksitlenmiş Cu(II) Cu(I)'e indirgenir (Ohgami ve ark., 2006; van den Berghe ve Klomp, 2009; Husak, 2015; Nishito ve Kambe, 2018; Taylor ve ark., 2020). Cu(I) daha sonra Ctr1 ile enterositlere taşınır ve bu noktadan ince bağırsaktaki enterositlerin apikal membranında ve erken endozomlarında yoğunlaşır. Ardından, epitelyal hücrelerden bakır şaperonu aracılığıyla antioksidan-1'e (ATOX1) taşınır ve böylece portal venöz sistemdeki kana ulaşır. Bakır homeostazın sağlanması için diyetle alınan bakır miktarı arttıkça emilim azalır. Vücuttaki diğer metallerle yarışma bakır emilimini etkileyebilir. Demir ve çinko gibi metaller hücre zarları boyunca bakır alımını potansiyel olarak engeller. Artan çinko seviyeleri bakır emilimini azaltabilir. Yüksek maruziyette bakırın kinetiği normalden farklıdır. Mide-barsak emilimi bakır alımına göre değişir ve yüksek bakır alımında hasar görmüş mukoza varlığında fraksiyonel emilim muhtemelen daha yüksektir (Saravu ve ark., 2007; van den Berghe ve Klomp, 2009; Nishito ve Kambe, 2018; Alman ve ark., 2022).

2.1.3.2. Dağılım

Bakır, kanda başlangıçta albümine bağlıdır ve hepatik portal dolaşım yoluyla karaciğere taşınır ve seruloplazmine (hepatik mikrozomlarda sentezlenen bir alfa globulin) bağlanır. Serumda % 93'ü seruloplazmine sıkıca ve % 7'si albümine gevşek şekilde bağlı formda bulunur. Bakır-albümin kompleksi serum bakırının toksikolojik olarak

aktif kısmını temsil eder. Karaciğer, kalp, beyin, böbrekler ve kasta yüksek düzeyde olmak üzere tüm dokulara dağılır. Vücutta bakır dağılımı büyük ölçüde karaciğerde gerçekleşir ve hepatositlerde birikir. Bakırın dağılımında ATP7B genince kodlanan ATP7B proteini görev alır. ATP7B proteini, fazla bakır safra ve plazmaya atarak vücuttaki bakır düzeyini dengelemek için işlev görür. Bu protein, bakırın normal dağılımı için gerekli olduğu durumlarda iki farklı şekilde hareket eder. ATP7B, seruloplazmine aktarımı ve safrayla vücuttan atılımı için bakırın kanda serbest bırakılmasını sağlar (Saravu ve ark., 2007; Guttman ve ark., 2018). İlk aşama, bağırsaktan alınması ve portal dolaşıma aktarılmasıdır. Özellikle Ctr1 tarafından enterositlere taşınmasıyla gerçekleşir. Takiben bakır iyonları kan plazmasındaki proteinlere (örneğin albümin ve transkuprin makroglobulin) bağlandığından kandaki bakır düzeyi hızla yükselir. Albümin serbest bakırın büyük bir kısmını periferik dolaşımda taşır ve hücreye özgü alım için diğer taşıyıcılara devreder (Moriya ve ark., 2008; Van den Berghe ve Klomp, 2009; Alman ve ark., 2022). İlk aşamadan önce, bir miktar bakır sindirilmemiş diyet materyalleriyle kalın bağırsağa taşınır ve dışkıyla vücuttan atılır. Bakır dağılımının ikinci aşamasında ise seruloplazmine (bakır bağlayıcı bir serum feroksit) bağlanarak dolaşıma salınıp karaciğere taşınır. Karaciğerdeki hepatositler bakırın alınması, depolanması ve düzenlenmesinden sorumludur. Portal ven yoluyla gelen bakırın yaklaşık % 75'i karaciğere alınır geri kalanı ise dolaşımda kalır (Harvey ve ark., 2005; Van den Berghe ve Klomp, 2009).

2.1.3.3. Metabolizma

Bakır metabolizması büyük ölçüde bakır taşıyan P-tipi ATPazlarca (aynı zamanda Menkes proteini olarak bilinir, ATP7A, ATP7B) düzenlenir. Dokulardan alınması, depolanması ve salınmasında önemli rol oynayan seruloplazmin gibi özel bağlayıcı/taşıyıcı proteinler bulunur. Karaciğer ve diğer dokularda metallothionein gibi metal bağlayıcı proteinler ve bakıra bağımlı enzimlerle birlikte depolanır. Metal bağlayıcı protein metallothionein hücre içi bakırın depolanmasında kritik rol oynar. Bakıra maruz kalma, bakır homeostazını korumada hayati önem taşıyan metallothionein sentezini artırır (Tapia ve ark., 2004; van den Berghe ve Klomp, 2009; Alman ve ark., 2022).

2.1.3.4. Atılım

Bakır özellikle safrayla atılır ve bu atılım çoğunlukla dışkıyla gerçekleşir. Hepatositlerde biriken fazla miktardaki bakır ATP7B ile karaciğerden safraya taşınır. Safrayla atılan bakırın geri kazanımı ihmal edilebilir derecede düşüktür (van den Berghe ve Klomp, 2009; Alman ve ark., 2022). Safradaki bakır, makromoleküler bağlayıcılar ve düşük moleküler ağırlıklı bakır bağlayıcı bileşenlerle kompleks halindedir. Radyoaktif bakırın ağızdan verilmesinin ardından yaklaşık % 72'si bakır asetat şeklinde dışkıyla atılır. Yüksek lif içeren diyetler (örneğin patates lifi veya şeker pancarı küspesi), muhtemelen bakır emilimini azaltmasının bir sonucu olarak dışkıyla atılımı artırır. Safra ana boşaltım yoludur (Olivares ve ark., 2002; Alman ve ark., 2022).

2.1.4. Etki Şekli

Bakır hücrelerde birçok enzimin işlevinde önemli rol oynar. Özellikle de hücrelerin enerji üreten mitokondrilerinde demir homeostazı, serbest radikal temizleme, kollajen ve elastin bağlanması gibi mekanizmalarda yer alan enzimlerin katalizinde görev alır (Harris, 2003; Sharp, 2003). Bakır sülfatın ise canlı organizmalardaki etki mekanizması, bakır iyonlarının mantar ve alglerde bulunan enzimleri inhibe etmesi ve hücresel proteinlerin denatürasyonuna yol açması şeklindedir. Bu etkiler bakır sülfatın biyolojik sistemlere olan etkileriyle açıklanır. Bakır toksisitesi oksidatif strese ve ardından doku hasarına neden olabilir. Oksidatif stres kısmen redoks reaktivitesinin bir sonucudur. Serbest Cu veya düşük moleküler ağırlıklı Cu kompleksleri süperoksit anyonu ile hidroksil radikali üreten H_2O_2 arasındaki reaksiyonu katalize etme yeteneğine sahiptir. Ek olarak Cu, sisteinlerin serbest tiollerine doğrudan bağlanır; bu da oksidasyona ve ardından proteinler arasında aktivitenin bozulmasına yol açan çapraz bağlara neden olur (Siemering ve ark., 2005; Uriu-Adams ve Keen, 2005). Aşırı bakır maruziyeti, akut durumlarda gastrointestinal tahrişe ve mukozada erozyona, içeriğin ve duvarın mavi-yeşil renk almasına yol açar. Normal koşullarda hücre içindeki serbest bakır metalotiyonein, glutasyon ve bakır şaperon gibi bakır bağlayıcı proteinlerce düşük düzeyde tutunur. Fazla bakır, bu bağlayıcı proteinleri baskılayarak hücre içinde serbest bakır iyonlarının proteinlere ve nükleik asitlere doğrudan bağlanmasını sağlar. Serbest bakır reaktif oksijen türlerini ve hidroksil radikallerini oluşturarak hücre zarlarının lipid peroksidasyonuna ve nükleik asitler ile hücre proteinlere zarar verme potansiyeline

sahiptir (NRC, 2005; Gaetke ve ark., 2014). Koyunlarda kronik bakır toksikozu, artan bakır alımına karşılık safrayla bakır atılımının artıramamasından kaynaklanır. Bu birikme aşamasında karaciğerde olumsuz etkiler belirgin bir şekilde görülmez veya çok az kanıt olabilir. Birikim devam ederse, karaciğerde doğrudan yüksek bakır yoğunluğuna bağlı hasar görülür. Hasar şiddetli olduğunda hepatik nekroz gelişir ve bakır kana salınır. Hayvanın stres altında olması, bakırın karaciğerden kan dolaşımına geçişini hızlandırır. Kan dolaşımında artan bakır seviyeleri, transkuprein ve albümin gibi taşıyıcı proteinlerin etkinliğini zayıflatır ve bu da kırmızı kan hücre zarının iyonik bakırın oksidasyonu nedeniyle parçalanmasına yol açar. Karaciğerden mobilize olan bakır böbrekte birikir. Hemolitik olay sonrasında böbrek bakır birikiminin yanı sıra hemoglobinden de zarar görebilir. Sığırlar da kronik bakır toksikozundan etkilenir fakat bu durum ırk farklılıklarına bağlı olabilir. Hemoliz koyunlara göre daha az sıklıkta görülür (Du ve ark., 1996; Bremner, 1998). Kronik bakır toksikozuna genetik yatkınlık nedeniyle Terriyer ırkı köpekler daha duyarlıdır. Bu ırkların bazı cinslerinde hepatik bakır birikimi söz konusu olabilir. Köpeklerde kronik bakır toksikozunda, klinik belirtiler veya karaciğer hasarı olmadan dahi bakır birikimi söz konusu olabilir. Bakır seviyeleri arttıkça, hayvanlarda nekroz ve iltihaplanma ile kronik aktif hepatit gelişir. Koyunlardaki gibi yüksek düzeyde serbest bakır, karaciğerin birçok hücresel bileşenine zarar verebilir özellikle mitokondriyal zarların lipid peroksidasyonuna yol açabilir. Köpeklerde ani bakır salınımı sonucunda ortaya çıkan hemolitik kriz daha az olasıdır. Hastalık genellikle 2-6 yaş arasında görülür. Bu dönem öncesinde ise herhangi bir belirti göstermez (Speeti ve ark., 1998; Forman ve ark., 2005; Gupta ve ark., 2012).

2.1.5. Zehirliliği ve Klinik Belirtileri

Fazla miktarda bakırın alımı ciddi zehirlenmelere neden olur. Özellikle ağızdan maruziyette toksisiteye yol açabileceği rapor edilmiştir. Bakır zehirlenmesinde kandaki bakır düzeyi yükselir ve hemoliz görülür. Karaciğerle ilişkili biyobelirteçler etkilenir çünkü karaciğer bakır birikimine yatkındır. Aspartat amino transferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) aktiviteleri bu bağlamda önemli biyobelirteçler olarak kullanılır. Bakır maruziyetinde AST ve ALT aktiviteleri artar. Bu da bakır alımıyla ilişkilendirilir. Belirli yoğunluklarda özellikle karaciğer ve böbreklerde olmak üzere birçok dokuda birikerek hasara neden olsa da; bakır metabolizmasının gerçekleştiği esas organın

karaciğer olması nedeniyle karaciğer hücrelerinin çekirdek ve lizozomlarına zarar verir. Zarar gören yapılar kana karışarak böbrek tübüler epitel hücrelerince emilir ve sitoplazmalarında birikir (Geberding, 2004; Ozcelik ve Uzun, 2009a; Deng ve ark., 2016; Liu ve ark., 2020).

Çeşitli türlerde akut zehirlenme dozu genel olarak 25-50 mg/kg.ca aralığındadır. Bakır sülfat, çoğunlukla klinik vakalarda bakır kaynağı olarak öne çıkar. Örneğin, sığırlarda toksik bakır sülfat dozu 200-800 mg/kg iken koyunlar daha hassas oldukları için 20-100 mg/kg'dan etkilenirler (Radostits ve ark., 2007; Smith ve ark., 2008). Hayvanlarda salivasyon, gastroenterit ve karın ağrısı gibi klinik belirtiler dehidrasyon, şok ve ölüme doğru ilerleyebilir. Hayatta kalan hayvanlarda 24-48 saatte karaciğer ve böbrek hasarı gelişir ve akut hemolitik kriz oluşur. Ölüm sonrası bulgular mide-barsak yangısı ve içeriğindeki mavi-yeşil renk değişimidir. Çoklu organ yetmezliğine yol açar. İntravasküler hemoliz, karaciğer ve böbrek yetmezliği başlıca sonuçlarıdır (Giridharan ve ark., 2013; Pohanka, 2019). Akut ölümlerde hafif lezyonlar, ileriki dönemdeki ölümlerde karaciğer ve böbrek hasarı ortaya çıkar. Bağırsak içeriği analizi, yüksek bakır düzeylerini gösterir. Akut ölümlerde karaciğer ve böbrekte normal bakır düzeyleri gözlenirken hayvan 24 saatten uzun süre hayatta kalırsa yüksek bakır seviyeleri dikkati çeker. Bakır-molibden oranı (Cu/Mo) 6:1'in üzerine çıktıkça bakır birikim riski artar. Bu oran 20:1'i aşarsa yemler koyunlar için oldukça tehlikelidir. Etkilenen hayvanlarda akut hemolitik kriz meydana gelebilir ve zayıflık, iştah kaybı, sarılık, nefes darlığı ve soluk mukoza belirtileri gibi klinik belirtiler ile hemoglobinüri olabilir ve ciddi şekilde etkilenen hayvanlarda ölüm gözlenir (Taboada ve Thompson 1997; Eren ve ark., 2018; Gupta, 2018). Genetik yatkınlığı olan genç köpeklerde, kronik bakır toksikozuyla ilişkili akut halsizlik, kusma ve iştah kaybı gelişir. Daha yaşlı köpeklerde ise hepatik ensefalopati nedenli kronik kilo ve iştah kaybı vuku bulur. Tedavi edilmezse hayvan karaciğer fonksiyon bozukluğuna yenik düşer ve ölüm sonrası bulgular sirotik karaciğeri yansıtır. Şüpheli durumlarda karaciğer enzimlerinin değerlendirilmesinin yanı sıra yüksek bakır içeriğinin teyiti için karaciğer biyopsisine başvurulabilir (Sternlieb, 1989; McEntee ve ark., 2001).

2.1.6. Tanı

Bakır zehirlenmelerinin tanısında klinik belirtiler, laboratuvar testleri ve histopatolojik incelemeler gibi yöntemler kullanılır. Etkilenen hayvanlarda klinik belirtiler, bakır zehirlenmesinin tanısında önemli rol oynar. Salivasyon, gastroenterit (mide-barsak iltihabı), karın ağrısı, dehidrasyon, şok ve ölüme kadar ilerleyebilen durumlar olabilir (Radostits ve ark., 2007; Saravu ve ark., 2007; Giridharan ve ark., 2013). Antemortem dönemde, kan ve serum örneklerinin test edilmesi bakır zehirlenmesinin teşhisine yardımcı olur. Bu testler arasında serum bakır düzeyinin tespiti de vardır. Bakır zehirlenmesinde, serum bakır düzeyinin normalin üzerine çıkması beklenir. Ancak, sıvı tedavisi sonrasında bu düzey hızla düşebilir (Barceloux and Barceloux, 1999; NRC, 2005; Radostits ve ark., 2007). Ölüm sonrası dönemde, etkilenen hayvanların karaciğer ve böbrek dokuları histopatolojik olarak incelenebilir. Bu incelemeler, bakır birikiminin sebep olduğu hasarın derecesini ve özelliklerini gösterir. Karaciğerdeki hepatositlerin şişmesi, nekroz bölgeleri, hücre içi bakır birikimi ve fibrozis gibi belirtiler ortaya çıkar. Bakır alımını takiben serum, idrar, saç ve hepatik bakır seviyelerinde artış söz konusu olur. Maruziyetin kaynağı net değil ancak bakır zehirlenmesinden şüpheleniliyorsa, 24 saatlik idrarda bakır analizi yapılır (Georgopoulos ve ark., 2001; Radostits ve ark., 2007).

2.1.7. Zehirlenmelerde sağaltım

2.1.7.1. Metal zehirlenmelerinde genel sağaltım prensipleri

Ağır metal zehirlenmesinin tedavisinde ilk adım maruziyet kaynağını ortadan kaldırmak ve hastayı maruziyet kaynağından uzak tutmaktır. Birinci aşama semptomatik ve destekleyici tedavidir. Vücudun çeşitli organlarının (böbrek, karaciğer, solunum ve kardiyovasküler sistemler de dahil) durumu takibe alınmalıdır. Kelatlayıcı ajan uygulaması en yaygın tedavi yöntemidir (Trevor ve ark., 2010; Mehrandish ve ark., 2019; Amadi ve ark., 2019). Metal zehirlenmeleri durumunda sağaltım yaklaşımları genel olarak benzerlik gösterir. Metallere yüksek düzeyde maruziyet toksisiteye neden olur. Bakır ve diğer ağır metal zehirlenmeleri arasında farklılıklar olabilir ancak genel sağaltım ilkeleri aynıdır. Ağır metal terimi genellikle insan sağlığına ve çevreye potansiyel tehlike oluşturan metaller ve yarı metaller için kullanılır. Örneğin, bakır, demir, manganez ve çinko gibi metaller vücutta düşük miktarlarda bulunduğu

fizyolojik işlevlere sahip olabilir. Bakır ve çinko birçok enzimatik reaksiyon için önemli kofaktörlerdir. Kimyasal reaksiyonları fizyolojik olarak katalize eden çok sayıda enzimin (örn. Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, katalaz), aktif merkezlerinin ayrılmaz parçalarıdır. B vitamini çekirdeğinde kobalt atomu barındırırken hemoglobin demir taşır. Birçok ağır metalin insan fizyolojisi açısından bilinen herhangi bir faydası yoktur. Kurşun, civa ve kadmiyum gibi metal zehirlenmeleri ağır metal zehirlenmesi örneklerine dahildir. Bu metaller ve metal bileşikleri merkezi sinir sistemi, hematopoietik sistem, karaciğer ve böbrek gibi çeşitli organ ve sistemlerin işlevlerine müdahale edebilir (Amadi ve ark., 2019; Jomova ve ark., 2022). Toksik metaller, özellikle küçük yaşlardaki bireyler için ciddi risk oluşturur. Erken yaşta maruziyet, gelişimi etkileyebilir ve yaşam boyu fiziksel, bilişsel ve davranışsal sorunlara yol açabilir. Esansiyel katyonların işlevini etkileyerek enzim inhibisyonuna ve oksidatif strese neden olur. Canlı organizmalarca metabolize edilemediğinden zamanla toksik düzeylerde birikim gösterir. Küresel çevre kirliliği, arsenik, kadmiyum, kurşun ve civa gibi ağır metallerde ciddi bir sorundur. Bu tür kirlilik özellikle gelişmekte olan ekonomilere sahip ülkelerde daha yoğundur. Yüksek düzeyde ağır metale maruz kalan bireylerin hastalanma riski artar. Bu durum nörotoksisite, böbrek hasarı, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi sağlık sorunlarına yol açar. Ağır metaller metabolik süreçleri bozarak metabolik bozukluklara katkıda bulunur. Toksik metaller, damar ve dokularda yangıya neden olarak bölgeye daha fazla kalsiyum çekilmesine yol açar, arter duvarlarının sertleşmesine, tıkanmasına ve osteoporoz gelişimine katkıda bulunur. Kelatör uygulaması, ağır metal zehirlenmesinin yaygın tedavi yöntemidir. Kelatörler ağır metallerle reaksiyona girerek kompleks şekilde vücuttan atılmasını sağlar. Ancak söz konusu tedavinin bazı olumsuz etkileri vardır. Bu sebeple de tedavi protokollerine antioksidan desteği de eklenebilir. Doğal antioksidanların, ağır metal toksisitesine karşı koruyucu potansiyelleri vardır (Domingo, 1998; Flora ve ark., 2009; Amadi ve ark., 2019; Mehrandish ve ark., 2019). Kelatlayıcı maddeler, toksik metal iyonlarına bağlanarak karmaşık yapılar oluşturur ve bunları hücre içi/hücre dışı yapılardan kolaylıkla atabilme kapasitesine sahiptir. Tedavi oral, intravenöz veya intramüsküler yolla yapılır. Kelatlayıcı maddeler, vücut ligandlarından daha yüksek afiniteye sahiptir ve vücut sıvılarının pH'ında kelatlayıcı özelliklerini koruyabilir. Nörotoksisite

durumlarında, beyin bariyerini kolayca geçebilme yetenekleri olanlar tercih edilir (Kim ve ark., 2019; Flora ve Pachauri, 2010).

2.1.7.2. Bazı kelatlayıcı maddeler ve kullanıldıkları alanlar

Metallerle zehirlenmelerde en çok tercih edilen kelatörler dimerkaprol (arsenik, civa, kurşun ve altın), 2,3-dimerkapto-propansülfonat (DMPS) (arsenik ve civa), sodyum-kalsiyum EDTA ($\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$) (kurşun aynı zamanda çinko, bakır ve demir gibi endojen metallerde), deferoksamin (DFO) (demir ve alüminyum), penisillamin (özellikle bakır, Wilson hastalığı gibi durumların tedavisinde tercih edilebilir) ve dimerkaptosüksinik asittir (DMSA) (kurşun, civa ve arsenik). Ağır metal zehirlenmelerinde erken teşhis ve uygun tedavi önem taşır. Kelasyon tedavisi, zehirlenmenin yönetiminde etkili bir yol olabilir ancak her hasta için en iyi tedavi metodu uzman hekim tarafından belirlenir (Ala ve ark., 2007; Kalita ve ark., 2014; Kim ve ark., 2019).

2.1.7.3. Bakır Zehirlenmesi ve Kelasyon Tedavisi

Bakır zehirlenmesi genellikle imalat işlemleri, madencilik, çiftçilik ve endüstriyel atık sular gibi kaynaklarla ilişkilendirilir. Akut bakır toksisitesi, kusma, hipotansiyon, sarılık, gastrointestinal rahatsızlık ve karın ağrısı gibi belirtilere yol açar. Uzun süreli bakır maruziyeti karaciğer, beyin ve böbreklere zarar verir. Penisilamin, bakır toksisitesi ve Wilson hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılır (Ala ve ark., 2007; Kalita ve ark., 2014; Kim ve ark., 2019). Akut bakır toksikozu olan geniş getiren hayvanlarda tedavi etkisiz olabilir. Amonyum molibdat (günde bir kez 50 ila 500 mg PO [SID]) ve sodyum tiyosülfat (300 ila 1000 mg PO SID) gibi maddeler tedavinin başlamasından sonraki 4 gün içinde karaciğer bakır düzeyini düşürmeye yardımcı olur. Amonyum tetratiyomolibdat ise karaciğer bakır seviyesini 6 gün içinde belirgin şekilde azaltır. D-penisilamin (günde iki kez 10 ila 15 mg/kg ağızdan), bakırı kelatlar ve bakır hepatopatisi olan köpeklerde idrarla atılımını hızlandırır. Güçlü bir kelatör 2,3,2-tetramin, ticari formülasyonları olmasa da potansiyel bir seçenektir (Moeller ve ark., 2007). Köpeklerde akut zehirlenmelerde, sindirim kanalı mukoza hasarını engellemek için ağızdan süt veya tıbbi kömür verilir. D-penisillamin, aç karnına 12 saat arayla 10-15 mg/kg dozunda uygulanır. Aynı amaçla trientin de aynı doz ve aralıkla kullanılabilir. Çinko asetat, bakır emilimini azaltmak için aç karnına 50 mg dozda 12 saat arayla,

Çinko glukonat ise yemeden 30 dakika önce ağızdan 8 saat arayla 1 mg/kg dozda kullanılır. Oksidatif hasara karşı vitamin E (100-400 IU) ve S-adenozilmetiyonin (20 mg/kg) ağızdan 24 saat arayla; karaciğer hasarını önlemek için ise ursodeoksikolik asit, ağızdan 24 saat arayla 15 mg/kg dozda verilir. Karaciğerdeki yangısal hasara karşı prednizon (24 saat arayla 2,2 mg/kg) kullanılır. Destekleyici tedavide sıvı elektrolitler, taze kan veya dondurulmuş plazma, kusmayı nleyiciler, H₂ reseptör blokerleri ve proton pompası inhibitörleri gibi yöntemler uygulanır (Presley ve Macintire, 2008; Kara, 2016). Koyunlarda destekleyici amaçlı sıvı elektrolitler ve kan transfuzyonu yapılır. Amonyum veya sodyum molibdat (50-500 mg) ve sodyum tiyosülfat (0,3-1 g), zehirlenmiş veya etkilenmemiş tüm hayvanlara üç hafta boyunca rasyona katılarak verilir. Amonyum tetramolibdat, Dİ veya DA yoluyla 1,7-3,4 mg/kg dozunda  günde bir uygulanır. Rasyondaki molibden miktarı 5 ppm ve çinko miktarı ise 100 ppm'e yükseltilmelidir (Thomson ve Gupta 2007; Kara, 2016). Bakır sülfatın akut alımından sonra, müdahale öncesi derhal su veya sütle seyreltilmesi tavsiye edilir. Bu uygulamanın bulantı, kusma ve olası aspirasyona neden olabileceği için dikkatli olunmalıdır. Kusma yemek borusunda tahrişe neden olabilir. Bu sebeple antiemetik tedavi gerekebilir. Aktif kömür uygulaması düşünülebilir. Faydası kanıtlanmamış olsa da zararlı değildir ve bakır için potansiyel tutma kapasitesi olabilir. Genel doz 25-100 gramdır (30 g aktif kömür/240 ml su). Semptomatik methemoglobinemisi olan hastalar metilen mavisi ile tedavi edilmelidir. Metilen mavisi, methemoglobin redüktazın aktivitesini artırarak methemoglobinin hemoglobine dönüşümünü artırır. Başlangıç dozu 5 dakika boyunca intravenöz olarak 1-2 mg/kg.ca (0,1-0,2 ml/kg % 1'lik çözelti)'dir. Siyanoz bir saat içinde giderilmezse doz tekrarlanır. Bakırın uzaklaştırılmasına yönelik hemodiyaliz etkisizdir ancak bakır zehirlenmesi ile ilintili böbrek yetmezliği olanlarda ise endike olabilir. Dehidrasyon, elektrolit dengesizliği veya solunum sıkıntısı gibi belirtiler varsa tedavi edilir. D-penisilamin aşırı bakır yükünde yaygın kullanılır. Ancak 2,3-dimerkaptosüksinik asit veya tetratıyomolibdat günümüzde daha uygun alternatiflerdir (Saravu ve ark., 2007; Cao ve ark., 2015). D-penisilamin (DPA) ağızdan veya intravenöz yoldan verilir. Ağızdan verilmelerde % 50'si emilir esasta hücre dışı dağılım gösterir. Küçük bir kısmı karaciğerde metabolize olur ancak çoğu değişmeden idrarla atılır. Yarı mr 1-7 saat veya daha fazladır. DPA'nın bağışıklık sistemini, bağ dokusunu, böbrekleri bozan ve önceden nörolojik

sorunları olan hastaların nörolojik semptomlarını kötüleştiren yan etkileri vardır. Tetraetilentetraamin (TETA) veya trientin, akut bakır zehirlenmesinde kullanılır. Uygulama sonrası bakırın idrar atılımı artar. Genellikle ağızdan uygulanır fakat emilimi nispeten zayıftır (% 5-18 sistemik olarak emilir). Nitritotriasetik asit (NTA), bir poliamino karboksilik asittir ve Ca^{+2} , Cu^{+2} ve Fe^{+3} ile kelasyon oluşturur. Benzer şekilde EDTA kullanılır kolayca metabolize olma avantajı vardır (Yoshida ve ark., 1993; Lawson ve ark., 2016). Bakır sülfatın akut alımından sonra, hastane öncesinde derhal su veya süt ile seyreltilmesi tavsiye edilir. Zehirlenmede kusmanın kendiliğinden gelişmesi muhtemeldir ve bu nedenle hasta anti-emetik tedaviye ihtiyaç duyabilir. Aktif kömür yüksek düzey bakır maruziyetinde düşünülmelidir. Etkisi kanıtlanmamış olsa da zararlı değildir. Steroid kullanımı mortaliteyi düşürebilir. Bakırı uzaklaştırmak için hemodiyaliz etkisizdir ancak bakıra bağlı sekonder böbrek yetmezliğinde endike olabilir. Kelasyon tedavisi bazı nörodejeneratif hastalıkları veya kardiyovasküler bozuklukları tedavi etmek için de kullanılır (Saravu ve ark., 2007; Tegoni ve ark., 2014).

2.1.8. Geçmişte ve Yakın Zamana Kadar Kullanımı

Bakır insanoğlu tarafından bulunan ilk metaldir. Diğer bir deyişle, bakırın kullanımı tarihte taş devrinden maden devrine geçişi sağlamıştır. Neolitik ile Tunç Çağı arasında bir Bakır Çağı olduğu fikri, tarih öncesi Kuzey Amerika'da bakır kullanımının keşfedilmesinden ilham almıştır. Eski çağlarda doğada saf olarak bulunan bakır ilk olarak çekiç ile şekil verilerek kullanılmıştır. Daha sonra, bakır ve kalay cevherleri birlikte ergitilerek tarihteki ilk alaşım olan bronz (tunç) meydana gelmiştir. Bölgesel olarak Anadolu tarihi çağlarda metal ve özellikle de bakırın keşfi, üretimi ve kullanımı açısından önemli gelişmelere sahne olmuştur (Tegoni ve ark., 2014; Ehsani ve Yazıcı, 2016). Elektrik ve boya endüstrileri, boru üretimi ve montajı bakırın öne çıktığı alanlardır. Çoğu metalik bakır inşaat (yaklaşık % 25'ini oluşturur), makine, nakliye ve mühimmat ile elektrik uygulamaları için üretilir. Endüstriyel kullanımları arasında ağırlıklı olarak boya imalatı, petrol arıtma, su arıtma, metal terbiye, ahşap koruyucuları ve mineral köpük yüzdürme bulunmaktadır. Bakır, altın ve taklit takılarda kullanılan yeni alaşımların (nikel-kalay, paladyum) önemli bir bileşenidir (Barceloux ve Barceloux, 1999; Geberding, 2004).

Penisilinin kullanımıyla bakır gibi doğal antibakteriyel maddelerin uygulanması gerilemiştir. Bakırın çeşitli bakterilere karşı antibakteriyel potansiyeli vardır. Bugün, bakırın antibakteriyel özelliğinden birçok farklı alan ve sektörde istifade edilmektedir. Özellikle sağlık sektöründe bakırın, yüzeylerin ve ekipmanların bakteri ve mikroorganizma bulaşını önlemek için kullanılması yaygın bir uygulamadır. Ayrıca gıda endüstrisinde, su arıtma sistemlerinde ve diğer birçok alanda antibakteriyel özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bakır, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*'nin klinik izolatları, vankomisin dirençli *Enterococcus spp.* (VRE), *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* gibi mikroorganizmalarda etkilidir. Bakır yüzeylerin mikrobiyal yükünü azaltır (Noyce ve ark. 2006; Casey ve ark. 2010; Mikolay ve ark. 2010; Hans ve ark., 2016; Inkinen ve ark., 2017). Yaklaşık 300 bakır bileşiği ve alaşımı antimikrobiyal ajan olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, hastane su sistemlerinde su kaynaklı patojenleri kontrol etmek için bakır-gümüş iyonizasyon filtreleri kullanılmıştır. Alg öldürücü ve bakterisit olarak bakır sülfat kullanılmaktadır. Isıtma, havalandırma ve klima sistemlerinde mikrobiyal kontaminasyonu ve sağlıkla ilişkilendirilen enfeksiyonları azaltma potansiyeli vardır (Rohr ve ark., 1999; Huang ve ark., 2008; Lifset ve ark., 2012; Vincent ve ark., 2016).

Tıbbi alanda bakır bazlı alaşımlar (alüminyum, kobalt, manganez, nikel, çinko), köprüler ve diş kronlarının imalatı için kullanılır (Barceloux ve Barceloux, 1999; Vincent ve ark., 2016; Arendsen ve ark., 2019; NSF, 2021). Hastane kaynaklı enfeksiyonların önüne geçilmesi için hastane koğuşlarında masa, kolçak, serum askılarında bakır kullanımı değerlendirilmiştir. Bu tür yaklaşımlar, sadece sağlık hizmeti ortamlarında değil aynı zamanda gıda işleme tesislerinde de söz konusudur. Son olarak bakırın, anti-bakteriyel tekstil tasarımında giderek artan bir kullanımı bulunmaktadır. Bakır oksit nanopartikülleri ile işlevselleştirilmiş tekstiller antimikrobiyal özelliklerinden dolayı hastalıkların yayılmasını önlemede seçenek haline gelmiştir. Bu çabalar devam ederken, modern tasarım şartlarını karşılamak için piyasada yeni bakır alaşımları ortaya çıkmıştır. Renk ve malzeme özellikleri açısından bugün piyasada kapı kolları, banyo armatürleri, klozet kapakları, bakır kalemler, ışık anahtarları ve klavyeler vb. dahil olmak üzere bakır veya bakır alaşımlarından yapılmış birçok nesne bulunmaktadır (Hans ve ark., 2016; Román ve ark., 2020). Aynı zamanda

bakır sülfat, veteriner hekimlikte böcek kovucu ve tarımda fungusit amaçlı yaygın bir şekilde kullanılır. Tarımsal alanlarda, özellikle bağlarda kullanılan bakır (35-40 kg Cu/ha/yıl) toprakta birikmeye yol açar. Tarımsal kullanımlar (mantar öldürücüler, yosun öldürücüler, besin takviyeleri) bakır sülfat üretiminin çoğunu oluşturur. Özellikle Akdeniz bölgesinde bakır bazlı gübre ve fungusitlerin yoğun kullanıldığı örtü altı tarım vardır (Barceloux ve Barceloux, 1999; Geberding, 2004; Sönmez ve ark., 2006). Bakır, bitki büyüme ürünleri ve gübrelerde de bulunabilir. Bakır sülfat, tarımda meyve ve sebzeler için fungusit ve bakterisit; rezervuarlarda ve suyollarında alg öldürücü olarak kullanılır. Ayrıca multivitaminler, diyet takviyeleri ve takviyeli gıdalarda bakır içerir. Herbisit, insektisit ve molluskisit olarak da kaydedilmiştir (Borkow ve Gabbay, 2005; Lifset ve ark., 2012).

2.2. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, “prooksidan ile antioksidan dengesindeki bozulma” şeklinde tanımlanmıştır. Reaktif oksijen türleri (ROS), oksijenden türeyen ve çoğu biyomolekülle reaksiyona giren onları oksitleyen çeşitli yapılar için kullanılan genel bir terimdir. ROS, hidroksil radikal ($\text{OH}^{\bullet}$), süperoksit anyon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ve nitrik oksit ($\text{NO}^{\bullet}$) gibi serbest radikalleri içerir. Aynı zamanda hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit (HOCl) ve peroksinat (ONOO^-) gibi serbest radikal olmayan molekülleri de kapsar. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atomlar veya moleküllerdir. Oksidasyon, kimyasal bir süreçtir ve oksijen kazanımını veya elektron kaybını içine alır. Biyomoleküllerin oksidasyonu, onların hasar görmesine ve ardından fizyolojik süreçler veya işlev bozukluğu ile parçalanmasına neden olur. Ayrıca, ROS’lar önemli fizyolojik süreçlerde de rol oynar. Örneğin nitrik oksit (NO), damar yapısı için koruyucudur ve sinir sisteminin önemli bir nörotransmitteridir. Oksijen serbest radikalleri bağışıklık sistemi için hayati öneme sahiptir. Sürekli olarak oksijenle temas halinde olduğumuzdan ROS’lar vücudumuzda devamlı üretilir fakat olumsuz etkileri fizyolojik antioksidan savunma mekanizmalarınca karşılanır. Oksidatif stresin hem “normal” yaşlanmanın hem de ciddi patolojilerin etiyojisine önemli bir katkısı vardır. Mitokondri, hücre içi oksidatif stresi arttırdığı düşünülen reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir. Ayrıca daha az çalışılan çok sayıda ROS savunma sistemine de sahiptir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması hücre içi sinyal proteinlerini değiştirir böylece

patolojik süreçlere yol açar (Sies, 1991; Andreyev ve ark., 2005; Firuzi ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2016).

Bakır maruziyetinde, mitokondride serbest oksijen radikallerinin üretimi artarak lipid peroksidasyonu şekillenir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) zayıf bir oksitleyici ajandır ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve bazı peroksidazlar tarafından elimine edilir. Antioksidan savunma sistemi yetersiz kaldığında, hidrojen peroksit serbest radikallerin oluşumunda önemli rol oynar. Bu durum demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi geçiş metallerinin varlığında daha da belirgin hale gelir. Bu metaller süperoksit ile etkileşime girerek hidrojen peroksit üretilir (Weiss ve LoBuglio, 1982; Gutteridge, 1995). Süperoksit ve peroksil radikalleri de birbiriyle reaksiyona girerek biri oksitlenirken diğeri indirgenir. Bu reaksiyonlar sonucunda hidrojen peroksit ve oksijen oluşur. Geçiş metallerinin otoksidasyonunda da süperoksit radikalleri üretilir. Serbest radikaller mitokondri zarını etkileyerek geçirgenliğini bozar ve çözünür bileşiklerin zar içine girişine izin verir. Böylece mitokondrinin genişlemesine ve ozmolaritenin artmasına yol açar. Bu da sitokrom c'nin sitoplazmaya daha fazla salınmasına ve kaspaz-9'un aktive olmasına sebep olur (Simon ve ark., 2000; Rossi ve ark., 2004; Formigari ve ark., 2007). Kaspazlar (sistein aspartata spesifik proteazlar) bir grup sistein proteazdır. Aktif olmayan haldedirler ancak farklı mekanizmalarla aktive edilirler. Hücre ölümünün birçok aşamasında rol aldığı bilinir. Bakır, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) üretimini artırarak ve kaspazları aktive ederek serbest radikallerde artışa yol açar. TNF- α , çeşitli hücrelerce salınan 185 aminoasitlik bir glikoprotein hormondur. Makrofajlardaki artış, oksidanların, enflamatuar lipidlerin ve prostaglandin E_2 'nin üretimini uyarır (Fong ve ark., 2004; Lingen ve Kumar, 2015). Diğer ağır metaller gibi bakır da oksidatif strese yol açar. Oksidatif stresle apoptoz arasında kesin ilişki vardır. Normal koşullarda hücresel solunum sırasında mitokondride az miktarda serbest oksijen radikali üretildiği halde organellerde özellikle lizozomlarda bakır biriktiğinde, serbest oksijen radikali üretimi artar. Bakır toksisitesi, oksidatif stres parametrelerinde değişikliklere neden olur yani yüksek bakır düzeyleri reaktif oksijen türlerini artırır. Malondialdehit (MDA) seviyelerini yükseltir, antioksidan enzim aktivitesini değiştirir ve indirgenmiş glutasyonu (GSH) tüketir (Kannan ve Jain, 2000; Uriu-Adams ve Keen, 2005; Rana, 2018).

2.2.1. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), hücrelerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda oluşan bir aldehit bileşiğidir. ROS'ların neden olduğu lipid peroksidasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu nedenle oksidatif stresle sıkı ilişkilidir. Oksidatif stresin ana kaynakları arasında özellikle hücresel metabolizma, inflamasyon, radyasyon, ağır metallerin maruz kalması ve diğer çevresel faktörler yer alır. ROS'lar hücrelerde normalden daha yüksek seviyelerde birikir ve hücrelerin biyokimyasal bileşenlerine zarar verir. Hücresel lipitler, oksidatif stresin etkilerine duyarlıdır. Çünkü doymamış yağ asitleri oksidasyona yatkındır. Lipit peroksidasyonu ROS tarafından, membran lipit çift tabakalarında karbon-karbon çift bağları içeren lipitlerin oksidasyonuna neden olan oksidatif stres tepkimesinin sonucunda meydana gelir. MDA, hücre içinde ve dışında çeşitli biyomoleküllerle reaksiyona girerek DNA, protein ve diğer biyomoleküllerin yapısı ve fonksiyonunu etkiler. Bu nedenle, MDA'nın artan seviyeleri, hücrelerde oksidatif hasarın bir göstergesi olarak kabul edilir (Ozelik ve Uzun, 2009; Tegoni ve ark., 2014; Mandil ve ark., 2016; Mas-Bargues ve ark., 2021).

2.2.2. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO), biyolojik sistemlerde önemli rol oynayan gaz halindeki kimyasal bileşiktir. Vazodilatasyon (damar genişlemesi) gibi önemli fizyolojik işlevlere sahiptir ve sinir hücrelerinde iletişimi düzenler. Vasküler sistemde ve sinir sisteminde önemli sinyal molekülü olarak kabul edilir. Ancak, NO'nun fazla üretimi oksidatif stresin nedeni olabilir. NO'nun oksidatif stresle ilişkilendirilmesinin ana nedenlerinden biri, NO'nun reaktif bir kimyasal olabilmesidir. Özellikle oksijen radikalleri gibi diğer reaktif türlerle etkileşime girmesi peroksinitrit gibi daha zararlı bileşiklerin oluşmasına yol açar. Bu nedenle, NO'nun dengeli ve düzenli bir şekilde sentezi ve kullanımı önemlidir (Brennan ve ark., 2002; Thomas ve ark., 2002; Radi, 2004).

2.2.3. Glutasyon (GSH)

Glutasyon, biyokimyasal olarak vücudun temel bileşiği formunda bir tripeptittir. Üç amino asidin (glutamik asit, sistein ve glisin) bir araya gelmesiyle oluşur. Vücutta doğal bulunan bir antioksidandır ve hücresel sağlığını korumada önemli rol oynar. Hidrojen

iyonlarını kolayca salabilen bir bileşiktir. İçerdiği sülfür grupları nedeniyle dokuları peroksidatif etkilerden koruma görevi de vardır. GSH ayrıca oksitlenmiş glutasyon (GSSG) ile hidrojen peroksiti azaltan ve lipid hidroperoksitlerini doğrudan H_2O 'ya indirgeyen bir indirgeyici olarak da görev yapar. Hücresel GSH sürekli hücresel oksidatif stres koşullarında tükenir. Hücresel GSH'nin azalması, reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonunu ve hasarını tetikler. Metabolik detoksifikasyonun arttırılmasında ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde de önemli rolleri vardır. Nörodejenerasyon, mitokondriyal disfonksiyon, kanser gibi çeşitli kronik yaşa bağlı hastalıklar yetersiz glutasyon seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir (Pizzorno, 2014; Liu ve ark., 2018; Minich ve Brown, 2019).

2.2.4. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD), ROS ve süperoksit anyon radikallerine karşı en önemli antioksidan enzimlerdendir. Bir süperoksit radikalini O_2 molekülüne yükseltirken, diğerinin ise daha az reaktif molekül olan H_2O_2 'ye indirgenmesini katalize eder. Bu enzim grubu, ROS ve özellikle süperoksit anyon radikallerine karşı ilk ve en önemli antioksidan enzim savunma sistemleridir. Üç farklı SOD izoformu tanımlanmış olup bunlar; Cu-Zn-SOD (SOD 1), Mn-SOD (SOD 2) ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC-SOD veya EcSOD) (SOD 3)'dır. Cu-Zn-SOD (CuZnSOD), hücre sitoplazmasında bulunur ve bakır ve çinko iyonlarını içerir. Mn-SOD, mitokondride yer alır ve manganez iyonları barındırır. Mitokondriler, hücrelerin enerji ürettiği ve aynı zamanda ROS'ların üretildiği bölgelerdir. Bu nedenle Mn-SOD mitokondrilerde oksidatif hasarı azaltmada önemli rol oynar. Ekstrasellüler SOD (EcSOD), hücre dışı sıvılarda ve dokularda bulunur. Vasküler dokuda ve akciğerlerde özellikle yoğunudur ve bu bölgelerde oksidatif stresin azaltılmasına yardımcı olur. Ek olarak, aşırı reaktif oksijen türleri, özellikle süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hipertansiyon ve ateroskleroz dahil olmak üzere birçok kardiyovasküler hastalığın patogenezinde önemli rol alır (Zelko ve ark., 2002; Fukai ve Ushio-Fukai, 2011). SOD aynı zamanda pro-oksidan etkilere de sahip olabilir çünkü $O_2^{\bullet-}$ 'nin ayrışması toksik H_2O_2 üretir. Bu nedenle, diğer antioksidan sistemleri örneğin CAT ve GSH-Px varlığı, tehlikeli H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemlidir. Nihai olarak SOD aktivitesinin azalması serbest radikal oluşumunu artırır (Liochev ve Fridovich, 2007; Carillon ve ark., 2013).

2.2.5. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT) temel olarak peroksizomlarda bulunur. Bu organeller, özellikle yağ asitlerinin metabolizması, hidrojen peroksitin ayrıştırılması ve çeşitli biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi gibi süreçlerle rol alır. Mitokondrilerde oksijenin suya indirgenmesi, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi sitotoksik türlerin oluşumuna neden olur. Oluşan süperoksit radikalleri mitokondriye zarar verir. Mitokondride oluşan süperoksit radikalleri ilk olarak Mn-SOD (SOD 2) ve glutasyon peroksidaz tarafından etkisiz hale getirilir. Ancak yüksek düzeydeki H_2O_2 , mitokondriden ayrılarak sitoplazmaya geçer. Mitokondriden sitoplazmaya geçen H_2O_2 'nin detoksifikasyonu, peroksizomlarca sentezlenen CAT tarafından gerçekleştirilir. Serbest radikal üretmeden H_2O_2 'yi moleküler oksijen ve suya dönüştürür. Bu reaksiyonla oluşan oksijen diğer metabolik süreçlerde kullanılır. Katalaz karaciğer, böbrek, kan (eritrositler), kemik iliği ve mukoza zarlarında en yüksek aktivitede iken; bağ dokuda ise en düşük aktivitededir (Scibior-Bentkowska ve Czczot, 2006; Glorieux ve Calderon, 2017; Sies, 2017).

2.2.6. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

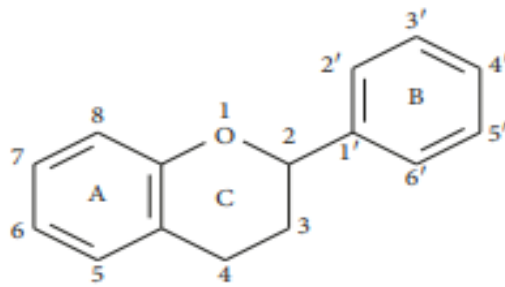
Glutasyon peroksidaz, mitokondri ve bazen sitozoldeki hidrojen peroksidi suya parçalayan önemli antioksidandır. Hücre içinde bulunan glutasyon isimli bir antioksidan molekülünü kullanarak hidrojen peroksit gibi zararlı bileşikler non-toksik ürünlere dönüştürür. Yani hidrojen peroksiti suya dönüştürür. Genellikle aktivitesi selenyuma bağlıdır. En az 8 farklı GSH-Px vardır ve bunlar çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynarlar. GSH-Px, vücudun farklı dokularında bulunur fakat karaciğer, böbrek, beyin gibi organlarda daha yüksek aktivitededir. Bu enzimin eksikliği veya düşük aktivitesi, oksidatif stresin artmasına ve bu da çeşitli sağlık sorunlarına neden olabilir (Brigelius-Flohé ve Maiorino, 2013; Handy ve Loscalzo, 2022).

2.3. FLAVONOİDLER

2.3.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Flavonoidler, bitkilerin enfeksiyonlara, yaralanmalara ve strese karşı korunmaları için bitkilerce üretilen fitokimyasal yapıda farklı derecelerde hidroksilasyona sahip benzo- γ -piron yapısında polifenolik bileşiklerdir. Bitkilerde bioaktif ikincil metabolitler şeklinde renk, aroma ve farmakolojik aktiviteleri sağlamakla sorumludurlar. Flavonoid

konsantrasyonları ile fizikokimyasal özellikleri büyük ölçüde değişebilir. Kimyasal anlamda, iki benzen halkasına (A ve B) bağlı heterosiklik piran halkasını (C) içeren on beş karbonlu (Şekil 2.1) temel flavan iskeletine sahiptir (Bogucka-Kocka ve ark., 2013; Kopustinskiene ve ark., 2020). Flavonoidlerin alt gruplara sınıflandırılması (lavonoller, flavanonlar, flavonlar, flavanol, izoflavonlar ve antosiyaninler) genellikle C halkasındaki değişikliklerine dayanırken; aynı gruptaki sınıflandırma ise A ve B halkasıyla ilintilidir. Flavonlar, flavonoller ve izoflavonlar, merkezi halkada çift bağın bulunması nedeniyle düzlemsel bir yapıya sahiptir. Flavanonlar ve flavanol, en az bir stereojenik merkezi sp^3 karbonun varlığı nedeniyle tetrahedral geometriye sahiptir. Flavonoidlar aglikonlar, glikozitler ve metillenmiş türevler olarak bulunurlar. Temel flavonoid yapısı aglikondur (Kumar ve Pandey, 2013; Cataneo ve ark., 2021). Flavonoidler, bağlı şekerlerle glikozitler veya bağlı şekerler olmadan aglikonlar adıyla varlığını sürdürür. Sitoplazmada (pH 7,4), flavonoidler fenolat anyonları ve nötr fenollerin bir karışımını oluştururlar. Oranları her fenolik grubun pK_a 'sına bağlıdır. Zayıf hidrofobik asit olduklarından, lipofiliklik özellikleriyle hücrel ve mitokondriyal membranları geçme potansiyeline sahiptirler ve protonoforlar olarak işlev görürler. Biyolojik membranların hem lipid hem de protein bileşenleriyle etkileşime girebilir ve özelliklerini değiştirebilirler. Lipidlerle etkileşimler çoğu zaman lipid çift katmanının kutup bölgesiyle sınırlıdır. Ancak flavonoidlerin membrana nüfuz etme derinliği yapılarına bağlıdır (Hendrich, 2006; Kopustinskiene ve ark., 2020).



Şekil 2.1. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı (Nunes ve ark., 2013).

2.3.2. Kaynakları

Flavonoidler özellikle meyvelerde, sebzelerde, kuruyemişlerde ve bazı içeceklerde yaygın olarak bulunan, polifenolik yapıya sahip bitki sekonder metabolitleridir. Bitkisel

fenolik bileşiklerin en yaygın grubunu oluşturur ve neredeyse tüm bitkilerde, özellikle fotosentez yapan hücrelerinde bulunur ve çiçekli bitkilerin başlıca renk bileşenidirler. İnsan ve hayvan beslenmesinin ayrılmaz bir parçasıdır fakat bu canlılarca sentezlenemez (Kumar ve Pandey, 2013; Panche ve ark., 2016). Bitkilerde flavonoidlerin varlığı toprak bileşimi, iklim, mevsim, depolama koşulları ve bitki türü gibi birçok faktöre göre değişebilir. Flavonoid ailesine ait 10.000'den fazla molekül bulunmaktadır. Bu sayı, sadece flavonoidlerden türetilen ürünleri değil, aynı zamanda gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında oluşan ürünleri; vücuda alındıktan sonra meydana gelen metabolitleri ve konjugeleri de içerecek şekilde düşünüldüğünde önemli ölçüde artar (Guven ve ark., 2019; Kopustinskiene ve ark., 2020; Cataneo ve ark., 2021). Flavonoller gıdalarda en yaygın bulunan flavonoidlerdir. Gıdalardaki flavonoidler renk, tat, yağ oksidasyonunun önlenmesi ile vitaminler ve enzimlerin korunmasından sorumludurlar. İnsan beslenmesinde yüksek miktarlarda bulunan flavonoidler soya izoflavonları, flavonoller ve flavonlardır. Yiyeceklerin hazırlanması ve işlenmesi, kullanılan yöntemlere bağlı flavonoid seviyelerini azaltabilir. Flavonoid miktarı bitki ve diğer gıda maddelerinde önemli ölçüde değişir. Bazı flavonoidler (kuersetin gibi) yüksek sıcaklıklara daha dayanıklı olabilir ancak depolama koşulları ve süresi bu bileşiklerin içeriğini etkiler. Flavonollardan özellikle soğan, lahana, pırasa ve yaban mersininde en yaygın olanları kuersetin ve kemferoldür. Kırmızı şarap ve çay önemli flavonol kaynaklarıdır. Flavanonlar ise domates ve domatese dayalı ürünlerle nane gibi bazı aromatik bitkilerdir (Corcoran ve ark., 2012; Kumar ve Pandey, 2013).

2.3.3. Etkileri

2.3.3.1. Antioksidan Etki

ROS'ların Doğrudan Temizlenmesi: Topluca RONS olarak bilinen reaktif oksijen ve nitrojen türleri (sırasıyla ROS ve RNS) miyeloperoksidaz, NADPH-oksidaz (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-oksidaz) ve nitrik oksit sentaz (NOS) gibi hücrel enzimlerce üretilir. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi hidroksil gruplarıyla ilişkilidir ve radikalleri bağlarlar. Flavonoid monomerlerin polimerizasyonu, moleküllerindeki hidroksil gruplarının sayısı, fenolik halkadaki çift bağlar ve hidroksil yan zincirlerin glikozilasyonu serbest radikal temizleme aktivitesini artırır (Ahmadinejad ve ark., 2017; Vicente ve Boscaiu, 2018).

Antioksidan Enzimlerin Aktivasyonu: Bazı flavonoidler serbest radikal üreten enzimlerin (örneğin nitrik oksit sentaz ve ksantin oksidaz gibi) aktivitelerini baskılayabilirler. Oksidatif strese karşı savunmadan sorumlu glutasyonla ilintili faz II detoksifikasyon enzimlerini (glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon-S-transferaz) aktive ederler ve GSH düzeyini artırır (Shih ve ark., 2007; Zeng ve ark., 2019).

Oksidazların İnhibisyonu: Flavonoidler, süperoksit anyonunun üretimini katalize eden ksantin oksidaz (XO) ve protein kinaz C'nin aktivitelerini inhibe etmesi; metalleri kelatlaması, α -tokoferol seviyesini artırması ve NO'nin yol açtığı oksidatif stresi hafifletmesi gibi mekanizmalarla da antioksidan aktivite sergilerler. XO'nun aktivitesini flavonoidlerin XO'nun aminoasit bağlanma yerine bağlanmalarının yanı sıra siklooksijenaz, NADH oksidaz, mikrozomal monooksijenaz ve lipooksijenaz aktivitelerini de farklı mekanizmalarla inhibe ederler (Chen ve ark., 2023; Xue ve ark., 2023).

2.3.3.2. Anti-İnflamatuar Etki

Flavonoidler, vücuttaki bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesine katkı sağlar. İnflamasyonu tetikleyen veya sürdüren kimyasal yolları engelleyerek anti-inflamatuar etki gösterirler. İleri boyuttaki inflamasyonun kontrol altına alınmasına yardımcı olur. Kemokinlerin baskılanmasına katkı sağlarlar. İnflamatuar prostaglandinlerin üretiminden sorumlu enzim COX-2 ve iltihaplı yanıtı düzenleyen sinyal molekülleri sitokinlerin aşırı üretimini inhibe ederek inflamasyonu geriletir (Chirumbolo ve ark., 2018; Gupta ve ark., 2018; Yahfoufi ve ark., 2018). İnflamasyon enfeksiyonlar, yaralanmalar ve hastalıklar gibi birçok nedenden kaynaklanabilir. Kronik inflamasyon kardiyovasküler hastalık, diyabet, kanser ve Alzheimer gibi yaşla ilişkili hastalıkların yaygın patolojik temelidir (Prince, 2011; Zhang ve ark., 2016). Bu bağlamda, flavonoidlerin anti-enflamatuar etkileri değerlidir. Örneğin, apigenin, TNF- α tarafından indüklenen mRNA seviyelerini azaltabilir ve endotel hücrelerinde intersellüler adhesion molekül-1 (ICAM-1), E-selektin ve vasküler hücre adhesion molekül-1 (VCAM-1) ifadelendirilmesini düzenleyerek inflamatuvar yanıtı kontrol eder. Birçok flavonoid, araşidonik asit üretimini azaltır, fosfolipaz A₂, siklooksijenaz ve NOS aktivitelerini inhibe eder. Böylece inflamatuvar mediatörlerin (prostaglandinler, lökotrienler ve NO)

sentezi sınırlanır. Lökosit infiltrasyonunu ve ödemi geriletir. Demiri kelatlayarak ve tamamlayıcı sistem aktivasyonunu bastırarak enflamasyonu kontrol eder. İnterlökin-1 beta (IL-1 β), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6)-8 (IL-8), aktivatör protein-1 (AP-1), hücreler arası yapışma molekülü-1 (ICAM) ve vasküler hücre gibi birçok proinflatuar molekülün gen ekspresyonunu düzenlerler (Al-Khayri ve ark., 2022; Chen ve ark., 2023).

2.3.3.3. Kardiyovasküler Etki

Flavonoidler, kardiyoprotektif ajanlar olarak kullanılır. Damar genişlemesine neden olur ve endotel hücre apoptozunu inhibe eder. Kardiyovasküler ölüm riskini azaltır. Damar genişletici etkilere sahiptir. Endotel disfonksiyonunu ve trombosit agregasyonunu iyileştirir. Aterosklerotik etkileri engeller ve kan basıncını düşürür. Hepatik steatoz, dislipidemi ve insülin dengesizliğini düzeltir. Bu etkilerini genellikle hepatik yağ asidi sentezini inhibe ederek ve yağ asidi oksidasyonunu artırarak gerçekleştirir. Naringenin, kuersetin ve hesperetin gibi flavonoidlerin damar genişletici özellikleri vardır. İzoflavonlar, monosit-endotel hücre yapışmasını inhibe ederek inflamatuvar vasküler hastalıklara karşı koruma sağlar (Mulvihill ve ark., 2016; Chen ve ark., 2023). Kuersetin, kalpte iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etki gösterir. Baikalin, kalp fonksiyon bozukluğunu iyileştirir ve kalpte apoptozu inhibe eder. Antosiyaninler miyokard enfarktüsü riskini azaltır, kan basıncını dengeler ve lipid profiline olumlu etki gösterir. Asasetin, aritmiyi düzenlemede önemli rol oynar (Liu ve ark., 2017; Shu ve ark., 2019).

2.3.3.4. Antibakteriyel ve Antifungal Etki

Flavonoidler, antibakteriyel etkilerini bakteriyel membran bozulması, biyofilm oluşumunun inhibisyonu, nükleik asit ve ATP biyosentezinin baskılanması ve elektron taşınmasının aksaması gibi mekanizmalarla gerçekleştirir. Örneğin, kuersetin, apigenin, naringenin, krisin, genistein gibi flavonoidler biyofilm oluşumunu engeller ve DNA replikasyonunu baskılar. Epigallocateşin galat ve baikalein ise bakterilerde ATP biyosentezini önler. Özellikle meyan kökünden elde edilen bazı flavonoidler, MRSA gibi bakterilere karşı etkili olabilir. *Coriolus versicolor*'dan elde edilen flavonoid ekstraktları da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*'e karşı güçlü antibakteriyel etkinlik gösterir. Flavonoidler ayrıca fungal enfeksiyonları inhibe etmede

umut vaat eden ilaçlardır. Bu etkiler plazma membranının bozulması, mitokondriyal disfonksiyonun indüksiyonu ve hücre duvarı oluşumunun inhibisyonu gibi mekanizmalarla açıklanabilir. Örneğin, baikalein ve apigenin antifungal etki göstererek ROS türlerini düzenler ve membran bozulmasını engeller. Kuersetin oksidatif fosforilasyonu inhibe eder ve ROS üretimini baskılar. Flavonoidlerin antibakteriyel ve antifungal etkileri, potansiyel terapötik ajanlar olarak kullanılmaları için umut vaat etmektedir (Cushnie ve Lamb, 2005; Ullah ve ark., 2020; Efenberger-Szmechtyk ve ark., 2021; Chen ve ark., 2023).

2.3.3.5. Antiviral/Antikanser Etki

Flavonoidler, antiviral etkilerini farklı mekanizmalarla gerçekleştirerek virüslerin çeşitli aşamalarını hedef alırlar. Örneğin, virüslerin hücrelere girişini engellerler, genomik materyalinin replikasyonunu ve çevirisini etkilerler. Bu nedenle, potansiyel antiviral ajanlar olarak kullanılabilirler. Aynı zamanda bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve viral yükün azaltılması gibi etkileri de vardır. Apigenin, baikalein, luteolin gibi flavonoidler, farklı RNA ve DNA virüslerine karşı antiviral etki sergiler. Örneğin, baikalein H5N1 kuş gribi virüsünün replikasyonunu engellerken, luteolin HIV-1 reaktivasyonunu inhibe eder (Sithisarn ve ark., 2013; Guntaka, 2019). Aynı zamanda kanserde de etkilidir. Özellikle meme, akciğer, kolon, prostat ve pankreas kanser riskini azaltmada olumlu etkileri vardır. Kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayabilir, apoptozis indüksiyonu yapabilir ve anjiyogenez gibi kanserle ilişkili süreçleri inhibe edebilirler. Çeşitli antikanser etkileri; oksijen türlerini (ROS) temizleyen enzim aktivitelerini modüle etmeleri, hücre döngüsünün durdurulmasına katılmaları, apoptozis-otofajiyi indüklemeleri ve kanser hücresi çoğalmasını/istilasını bastırmaları şeklindedir (Kopustinskiene ve ark., 2020; Chen ve ark., 2023).

2.3.4. Metabolizması

Besinlerdeki flavonoidlerin emilimi molekül boyutu, konfigürasyon, lipofilisite, çözünürlük ve pKa gibi fizikokimyasal özelliklere bağlıdır. Flavonoidler, ince ve kalın bağırsaktan emilir. Bu durum, flavonoidin yapısına yani glikozit mi yoksa aglikon mu olduğuna bağlıdır. Emilim sonrasında flavonoidler karaciğerde glukuronidasyon, sülfasyon veya metilasyonla konjuge edilir veya daha küçük fenolik bileşiklere metabolize edilir. Bu konjugasyon reaksiyonları nedeniyle, serbest flavonoid aglikonları

plazma veya idrarda bulunmaz sadece kateşinler istisnadır. Safrayla atılan flavonoidler ve ince bağırsaktan emilmeyenler, bağırsak mikroflorasıyla kolonda parçalanır ve böylece flavonoid halka yapısı bozulur. Flavonoid glikozitlerin şeker kısmı, biyoyararlılığın önemli belirleyicisidir (Hollman ve Katan, 1997; Kumar ve Pandey, 2013; Cassidy ve Minihane, 2017).

2.3.5. Kullanımları

Flavonoidlerin antioksidan, anti-enflamatuar, kardiyovasküler, antibakteriyel, antifungal, antiviral, immünomodülatör ve güçlü antikanser etkileri vardır (Kopustinskiene ve ark., 2020; Wen ve ark., 2022).

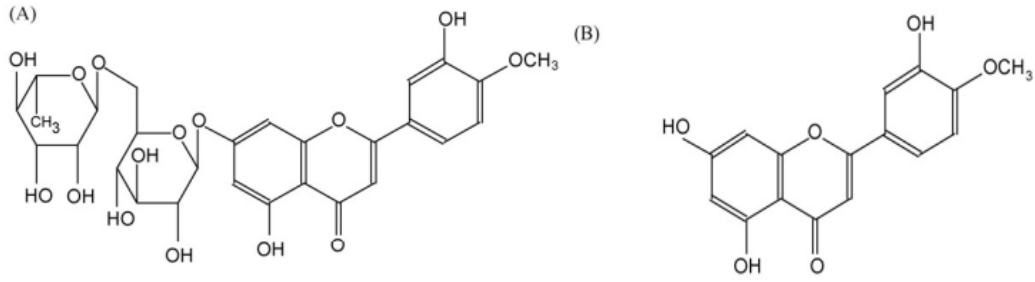
2.3.6. Diosmin

2.3.6.1. Kaynağı

Diosmin, doğal flavonoid glikozittir ve birçok bitkisel kaynaktan izole edilebilir ya da hesperidinden türetilir. İlk kez 1925’de "*Scrophularia nodosa*" bitkisinden izole edilmiş ve 1969 yılında terapötik ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır (Hodek ve ark., 2002; Oh, 2004; Nguyen ve ark., 2019).

2.3.6.2. Fizikokimyasal Özellikleri

Diosmin, flavanon glikozidi hesperidinin dehidrojenasyonu ile de elde edilebilen doğal biyoflavonoiddir. Üç halkalı flavonoid-şeker yapısına sahiptir. *Rutaceae* familyasındandır. Birçok narenciye meyvesinin kabuğunda da bol miktarda bulunan hesperidin, bazı tıbbi otlardan ekstrakte edilerek diosmine dönüştürülür. Fakat diosmin molekülü, C halkasında iki karbon atomu arasında bir çift bağ bulunmasıyla hesperidinden ayrılır (Şekil 2.2). Diosminin kimyasal adları 3',5,7-trihidroksi-4'-metoksi-flavon 7-ramno-glukozit, 3',5,7-trihidroksi-4'-metoksi-flavon-7-rutinozit, diosmetin 7-neohesperidozit ve diosmetin 7-O-rutinozittir (Bogucka-Kocka ve ark., 2013; Russo ve ark., 2018).



Şekil 2.2. (A) Diosminin kimyasal yapısı; (B) Diosmetinin kimyasal yapısı (Campanero ve ark., 2010).

2.3.6.3. Metabolizması

Oral uygulama sonrasında, diosmin barsak mikrobiyotasının enzimleriyle aglikon diosmetine hidrolize edilir ardından pasif difüzyonla barsak duvarından emilir. Diosmetin, CYP1A1, CYP1B1 ve CYP1A2 gibi sitokrom P450 enzimlerince demetilasyona uğrar ve luteolin oluşur. Luteolin, glukuronidasyonla glukuronit konjugatlarına dönüşür. Bu metabolitler atılım sırasında biyolojik aktivite de sergileyebilirler. Diosmin ve diosmetin gibi metabolitlerin dışında diosmin-7-O-glukozit gibi diğer metabolitler de tespit edilmiştir. Diosmin ve diosmetin gibi metabolitler, insan serum albümini gibi plazma proteini ile etkileşime girebilir. Bu etkileşimler diğer ilaçların metabolizmasını da değiştirebilir. Antiinflamatuvar, antioksidan, antidiyabetik, antihiperlipidemik ve antikanser özelliklere sahiptirler (Wang ve ark., 2017; Gerges ve ark., 2022).

2.3.6.4. Etkisi

2.3.6.4.1. Flebotonik Etki

Diosmin, venöz kan dolaşımını artırarak ve damar duvarlarının tonusunu düzenleyerek venöz hastalık belirtilerini hafifletir. Özellikle kronik venöz yetmezlik gibi durumlarında damarların daha sağlıklı görev yapmasına yardımcı olur (Amato,1994; Guilhou ve ark., 1997; Perumal ve ark., 2018; Gerges ve ark., 2022).

2.3.6.4.2. Kardiyak Fonksiyonlara Etkisi

Diosmin, kan damarlarına olan etkisiyle kardiyovasküler dolaşımı destekler. Bu durum, kanın daha iyi pompalanmasını ve oksijenin vücuda daha etkili taşınmasını sağlar. Kalp

dokusunu iskemik hasara karşı korur. Diosminin antioksidan ve anti-inflamatuar etkileri bu hasarı sınırlandırır. İskemi, kalp dokusunun yetersiz oksijen ve kanlanma durumudur (Friesenecker ve ark., 1994; Sirlak ve ark., 2010; Senthamizhselvan ve ark., 2014; Gerges ve ark., 2022).

2.3.6.4.3. Anti-İnflamatuar Etki

Diosminin venöz bozukluklara karşı yararlı etkilerinin altında yatan mekanizmalar arasında PGE₂ ve tromboksan A₂ sentezini azaltması gelir. Siklooksijenaz-2 (COX-2), nitrik oksit (NO), interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) üretimini engeller (Struckmann, 1994; Dholakiya ve Benzeroual, 2011; Berköz, 2019).

2.3.6.4.4. Antioksidan Etki

Diosmin, hücrelerde oluşan serbest radikalleri nötralize eder. Serbest radikaller, oksidatif stresin bir sonucu olarak hücrelerde hasara neden olur. Serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücrel hasar riskini azaltır. Antioksidan etkilere sahip bir bileşen olarak bilinir. MDA ve NO düzeyinde düşüşe diğer taraftan GSH ve antioksidan enzim aktivitesinde olumlu yönde değişime yol açar (Queenthly ve John, 2013; Jain ve ark., 2014; Ahmed ve ark., 2016; Gerges ve ark., 2022).

2.3.6.4.5. Antidiyabetik Etki

Diosminin kan şekerini düzenleme yeteneği vardır. Kan şekerinin yükselmesini engeller ve insülin direncini azaltır. İnsülin direnci, vücudun insülin hormonuna yanıt verme yeteneğinin azalmasıdır. Diosminin, hücrelerin insüline daha duyarlı hale gelmesine yardımcı olarak insülin direncini azaltabileceği düşünülmektedir (Struckmann, 1994; Pari ve Srinivasan, 2010).

2.3.6.4.6. Antihiperlipidemik Etki

Diosminin antihiperlipidemik etkisi, yani yüksek kolesterol ve trigliserit seviyelerini düşürme yeteneği gözlemlenmiştir. Hiperlipidemi, yüksek kolesterol ve trigliserit seviyeleri ile karakterize bir olgudur ve kardiyovasküler hastalık riskini artırır. Antihiperlipidemik etkileri iki şekildedir. Yüksek kolesterolü düşürmeye yardımcı olur. LDL (kötü kolesterol) seviyelerini düşürme yeteneğine sahiptir. LDL kolesterolün yüksek olması damar tıkanıklığı riskini artırır. Diosminin trigliserit düzeyini düşürme potansiyeli de vardır. Yüksek trigliseritin kalpteki olumsuz etkilerine karşı diosmin

trigliserit seviyelerini düşürerek kardiyovasküler riski azaltır (Queenthly ve John, 2013; Gerges ve ark., 2021).

2.3.6.4.7. Antifibrotik Etki

Diosmin fibrozis oluşumunu azaltır. Özellikle karaciğer ve akciğer gibi organlarda fibrozis, enflamasyon ve doku hasarına yanıt olarak gelişir. Diosminin anti-enflamatuar ve antioksidan özellikleri, fibrozis sürecini engellemeye ve sınırlamaya yardımcı olur. Kollajen birikimini azaltma potansiyeli vardır. Kollajen, fibrozisde önemli rol oynayan proteinlerden biridir. Diosmin bu proteinin aşırı birikimini engelleyerek doku skarlaşmasını ve sertleşmesini azaltır. Anti-enflamatuar etkileri fibrozis sürecini baskılamaya yardımcı olur. İnflamasyon, fibrozis oluşumuna yol açar ve bu sürecin sınırlanmasında anti-enflamatuar etkiler önemli rol oynar (El-Dakhly ve ark., 2020; Gerges ve ark., 2022).

2.3.6.4.8. Antikanser Etki

Angiogenez kanser tümörlerinin büyümesi için yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Diosminin angiogenez sürecini engelleme veya sınırlama potansiyelinin olduğu düşünülmektedir. Diosmin kanser hücrelerinde apoptozis adı verilen programlı hücre ölümünü uyarabilir. Apoptozis, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini ve yayılmasını engellemeye yardımcı olur. Antioksidan özellikleri, kanser gelişiminde rol oynayan serbest radikallerin etkilerini azaltır. Antioksidanlar, hücre hasarını engellemeye yardımcı olarak kanser riskini azaltabilir. Kronik venöz yetmezlik, hemoroid, lenfödem ve varis gibi durumların tedavisinde etkili bir damar-koruyucu ajan olarak bilinir. Antimutajenik özelliklere sahip bir flavonoid olarak da tanımlanmaktadır (Oh, 2004; Benavente-García ve ark., 2008; Lewinska ve ark., 2015).

2.3.6.5. Kullanımları

Diosmin, ağrı, bacakta ağırlık, şişkinlik hissi ve kramp gibi semptomlarla karakterize variköz venlerle ilişkilendirilen bir hastalık olan kronik venöz yetmezlik tedavisinde kullanılır. Alt ekstremitelerde venöz yetmezliği ve hemoroid gibi venöz sistem hastalıklarının tedavisinde tercih edilir. Venöz tonusu artırıcı, kapiller direnci ve permeabiliteyi düzenleyici etkileri vardır. Aynı zamanda serbest radikal tutucu ve lökosit adezyonunu azaltıcı özelliklere de sahiptir. Hemoroidin akut ve kronik

belirtilerinin tedavisinde faydalıdır. Ayrıca lenfatik akımı ve lenf onkotik basıncını artırarak lenfatik sistemi etkiler (Godeberge, 1994; Pecking, 1995, 1997; Jantet, 2002).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZ, MALZEME VE KİMYASALLAR

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuar Malzemeleri

1. ELISA mikropate okuyucu (Bio-Tek synergy H1 reader)
2. ELISA plate yıkayıcı (Bio-Tek Elx 50)
3. UV-VIS spektrofometre (Thermo Helios α)
4. Mekanik homojenizatör (Heidolph Silent Crusher M)
5. Derin dondurucu (Arctiko ULUF 550-2M -80 °C)
6. Hassas terazi (Sartorius TE3102S ve BP1215)
7. Buz makinesi (Kale Buzzbar)
8. Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard)
9. Soğutmalı santrifüj (Sigma 3K30)
10. Azot altında uçurma sistemi (Digital Dry Bath)
11. Deiyonize su cihazı (GLF, 2004)
12. Su banyosu (Nüve BM402)
13. Isıtıcı Blok (DLAB HCM-100 Pro)
14. Mikropipet (Termo Finn timer 1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l)
15. pH metre (Metler Toledo seven easy pH GmbH 8603)
16. Antikoagulanlı (Lidum heparin)/Antikoagulanlı tüp
17. Balon joje
18. Beher
19. Enjektör (21 G)
20. Ependorf tüp (200 μ l, 1,5 ml ve 2 ml)
21. Erlenmayer

22. Kanül
23. Spektrofotometre küveti (Quartz) (Helma)
24. Vida kapaklı tüp
25. Vorteks (Heidolph Reaxtop)

3.1.2. Kimyasallar

1. 1.1.3.3. tetraetoksipropan ($C_{11}H_{24}O_4$) (Sigma, T 9889)
2. 2-tiyobarbitürik asit ($C_4H_4N_2O_2S$) (Merck 108180)
3. 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ($[-SC_6H_3(NO_2)COH_2]_2$) (Sigma D8130)
4. Amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) (Merck 101217)
5. Bakır klorit dihidrat ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) (Merck 102733)
6. Bakır sülfat ($CuSO_4$) (Merck 102791)
7. Çinko sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck 108883)
8. Dimetil sülfoksit ($(CH_3)_2SO$) (Merck 102952)
9. Diosmin ($C_{28}H_{33}O_{15}$) (Sigma D3525-25G)
10. Di-sodyum hidrojen dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) (Merck 106573)
11. Etilendiamin tetraasetik asit potasyum (EDTA) ($(KOOCCCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2COOK)CH_2COOH \cdot 2H_2O$) (Merck 814696)
12. Flavın adenin dinükleotit (FAD) ($C_{27}H_{31}N_9Na_2O_{15}P_2 \cdot xH_2O$) (Sigma N6625)
13. Folin Ciocalteu's Fenol (C_6H_6O) (Merck 109001)
14. Glasiyel asetik asit (CH_3COOH) (Merck 100056)
15. Glutasyon redüktaz (NAD(P)H) (Sigma G3664)
16. Hemoglobın (Sigma H-2500)
17. Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck 108600)
18. Hidroklorik asit (HCl) (Merck, 100314)
19. Ksantin ($C_5H_4N_4O_2$) (Sigma X0626)
20. Ksantin oksidaz (Sigma X1875)
21. N-1-naftiletildiamin dihidroklorür ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$) (NED) (Merck 106237)
22. n-Butanol ($CH_3(CH_2)_3OH$) (Merck 100988)
23. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat tetrasodyum (NADPH+H) ($C_{21}H_{26}N_7Na_4P_3 \cdot xH_2O$) (Sigma N6505)

24. Nitrat redüktaz (Sigma N7265)
25. Nitro blue tetrazolium klorid ($C_{40}H_{30}N_{10}O_6 \cdot 2Cl$) (Sigma N6876)
26. Orto-fosforik asit (H_3PO_4) (Merck 100563)
27. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck 104873)
28. Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4) (Sigma 60356)
29. Potasyum heksosiyanoferat ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Merck 104971)
30. Potasyum klorid (KCl) (Merck 104936)
31. Potasyum siyanid (KCN) (Merck 104965)
32. Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4 H_2O$) (Merck 108087)
33. Pridin (C_5H_5N) (Merck 107462)
34. Redükte glutasyon ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) (Merck 104090)
35. Sığır albümini (Sigma A4503)
36. Sodyum azid (NaN_3) (Merck 106688)
37. Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) (Merck 106345)
38. Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma L3771)
39. Sodyum hidrojen karbonat ($NaHCO_3$) (Merck 106329)
40. Sodyum hidroksit (NaOH) (Carlo Erba 480507)
41. Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck 106392)
42. Sodyum klorit (NaCl) (Merck 116224)
43. Sodyum nitrit ($NaNO_2$) (Merck 106549)
44. Sülfanilamid ($C_6H_8N_2O_2S$) (Merck 11799)
45. t-bütül hidroperoksit (t-BOOH) ($(CH_3)_3COOH$) (Sigma-Aldrich 416665)
46. Tiyobarbitürik asit (TBA) (Merck 108180)
47. Triklorasetik asit (TCAA) (CCl_3COOH) (Merck 100810)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hayvan Materyali

Wistar Albino ırkı 2-3 aylık erkek 150-200 g ağırlığında toplam 50 adet rat kullanıldı ve hayvanlar aynı koşullarda (22-24 °C 12 saat aydınlık/karanlık) barındırıldı. Gruplar oluşturulurken polietilen yapıdaki hayvan kafeslerinin her birine en fazla 4 rat yerleştirildi. Deneme bitene kadarki süreçte yem (% 23 ham protein, % 7 ham selüloz ve 3100 kcal/kg metabolik enerji içeren pelet yem) ve içme suları *ad-libitum* verildi.

3.2.2. Gruplar

Grup 1: Kontrol olarak tutuldu hayvanlara herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup 2: Dimetil sulfoksit (taşıt madde, 2 ml/kg.ca) sondayla ağızdan 4 hafta süreyle her gün tek sefer uygulandı.

Grup 3: Diosmin (DMSO içinde) sondayla ağızdan 50 mg/kg.ca dozunda 4 hafta süreyle her gün tek sefer uygulandı.

Grup 4: Bakır sülfat sondayla ağızdan 200 mg/kg.ca/gün dozunda 4 hafta süreyle her gün tek sefer deiyonize su içinde uygulandı.

Grup 5: Bakır sülfatın 200 mg/kg.ca/gün dozunda deiyonize su içinde sondayla ağızdan verilmesini takiben 6 saat sonra diosmin (DMSO içinde) 50 mg/kg.ca/gün dozunda yine sondayla ağızdan 4 hafta süreyle her gün tek sefer uygulandı.

Hayvanlara verilen bakır sülfat (Liu ve ark., 2016; Arowoogun ve ark., 2020) ve diosmin (Eraslan ve ark., 2017; Bozdağ ve Eraslan, 2020) dozunun belirlenmesinde daha önceki çalışmalar esas alındı. Çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay (16/148) almıştır.

3.2.3. Örneklerin Toplanması

Denemeler tamamlandıktan sonra (4 haftanın sonunda) anestezi altında kalbe girilerek antikoagulantlı (lityum heparin)/antikoagulantsız tüplere kan örnekleri alındı. Takiben servikal dislokasyon yapılarak organları (karaciğer, böbrek, beyin, kalp, testis) çıkarıldı. Serum trigliserit, kolesterol, kan üre azotu (BUN), kreatinin, ürik asit, total protein, albümin, laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri/aktiviteleri değerlendirildi. Elde edilen kan ve dokularda; bazı oksidatif stres parametreleri [malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), glutasyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) düzey/aktiviteleri] analiz edildi. Çalışma sonunda kan alınmadan önce tüm hayvanların vücut ağırlıkları; organlar çıkarıldıktan sonra da organ ağırlıkları alındı.

3.2.4. Eritrositlerin Yıkanması ve Hemolizatların Hazırlanması

Antikoagulantlı tüplerdeki kanlar santrifüj edilerek plazmaları çıkarıldı. Devamında altta kalan kan şekilli elemanlarından trombosit-lökosit tabakası pipetle alındıktan sonra diğer kısım (eritrosit fazı) her seferinde tuzlu fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) eklenerek 3000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi takibinde tampon kısmı uzaklaştırıldı. İşlem tamamlandıktan sonra yine aynı tampon çözeltisiyle aynı hacimde yarı yarıya sulandırıldı (Winterbourn ve ark., 1975). Hazırlanan numuneler derin dondurucuya kaldırıldı (-80 °C). Analizler gerçekleştirileceği zaman numuneler oda ısısında erimeye bırakıldı 1 birim eritrosit üzerine 4 birim buz soğukluğunda tampon ilave edilerek hemoliz edildi. Hemolizat, hemoglobin miktarı ile CAT ve GSH-Px aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanıldı. Hemolizat ile kloroform/etanol (6/10 v/v) karışımı yarı yarıya katılarak vortekslendi takiben soğutmalı santrifüjde (+4 °C) 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üstteki kısım SOD aktivitesi tayini için kullanıldı.

3.2.5. Doku Homojenatının Hazırlanması

Tüm hayvanların karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testisi çıkarıldı ardından buz soğukluğunda tuzlu fosfat tamponla yıkandı. Tüm doku artıkları ve kan çıkarılan organdan uzaklaştırıldı. 1 gram doku 4 ml tampon çözeltisi (0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,0018 M KH₂PO₄ ve 0,01 M K₂HPO₄; 800 ml hacminde distile suda çözündürüldükten sonra 5 N NaOH ile pH'sı 7,4'ye ayarlandı ve son hacmi 1000 ml olarak ayarlandı) içinde mekanik homojenizatörle (20000 rpm'de 30 sn) homojenize edildi ve 15000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilerek süpernatant eppendorf tüplere alındı.

3.2.6. Biyokimyasal Analizler

3.2.6.1. Plazma ve Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü

Plazma MDA düzeyinin tespiti Yoshioka ve ark. (1979)'nın yöntemine göre gerçekleştirildi. Vida kapaklı cam tüplere 0,5 ml plazma ve üzerine 2,5 ml % 20'lik triklorasetik asit ile 0,5 ml % 0,67'lik tiyobarbitürik asit konuldu. Tüplerin ağızları kapatılarak 30 sn vortekslendi ardından su banyosuna alındı (95 °C) ve 30 dakika tutuldu. Süre sonunda su banyosundan çıkarılan tüpler hızla soğutuldu ve üzerine 4 ml n-butanol eklendi ve 30 sn vortekslendi. Santrifüje yerleştirilerek 3000 devirde 10

dakika santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli n-butanol fazı spektrofotometre küvetine alınarak 535 nm dalga boyunda n-butanol körüne karşı okundu. Miktarı 1.1.3.3. tetraetoksipropanda hazırlanmış standart eğrisine göre nmol/ml cinsinden hesaplandı.

Doku MDA düzeyinin ölçümü için ise Ohkawa ve ark. (1978)'nin yöntemi takip edildi. Vida kapaklı cam tüplere sırasıyla 0,2 ml doku süpernatantı, 200 µl sodyum loril sülfat (% 8,1), 1,5 ml asetat tamponu, 1,5 ml TBA çözeltisi (% 0,8) ve 600 µl deiyonize su ilave edildi hafifçe karıştırıldı. Su banyosuna alınarak burada 95 °C'de 60 dakika tutuldu. Ardından su banyosundan çıkarıldı ve hızla soğutuldu. Tüplere 1 ml deiyonize su ve 5 ml n-butanol/piridin (15:1) çözeltisi eklenerek 30 saniye vortekslendi. Tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte bulunan pembe renkli fazın absorbansı 535 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Miktarı, 1.1.3.3. tetraetoksipropanda hazırlanmış eğri kullanılarak nmol/mg-protein cinsinden hesaplandı.

3.2.6.2. Eritrosit Hemoglobin Düzeyi Ölçümü

Eritrosit hemoglobin düzeyi Fairbanks ve Klee (1987)'nin yöntemine göre belirlendi. 6 ml Drabkin reaktifinin [0,2 g $K_3Fe(CN)_6$, 0,05 g KCN ve 1,0 g $NaHCO_3$ tartıldı ve hacmi deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı] üzerine 20 µl hemolizat eklenerek oda ısısında 5 dakika tutuldu ve spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda köre karşı (drabkin reaktifi) okundu. Benzer işlemler hemoglobin standardı hazırlama aşamasında da yapıldı. Elde edilen veriler mgHb/ml hemolizat cinsinden hesaplandı.

3.2.6.3. Doku Protein Düzeyi Ölçümü

Doku protein düzeyi, Lowry ve ark (1951)'nin yöntemini esas alan Miller (1959)'in uyarladığı metod kullanılarak ölçüldü. Tüplere tuzlu fosfat tamponla 1/10 oranında seyreltilmiş doku süpernatantından 1 ml alındı ve üzerine 1 ml bakır reaktifi ilave edilerek 30 sn vortekslendi ardından oda ısısında 10 dakika tutularak üzerine 3 ml folin fenol reaktifi (1/10) eklendi tekrar 30 sn vortekslendi. Su banyosuna alınarak 50 °C'de 10 dakika bekletildi. Oluşan mavi renkli bileşiğin absorbansı spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanma amacıyla sığır albümini kullandı ve aynı işlemler tekrarlandı. Alınan absorbansların miktar tayini için birim olarak mg-protein/ml süpernatant kullanıldı.

3.2.6.4. Eritrosit ve Doku Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü

Eritrosit ve doku CAT aktivite tayininde Luck (1965)'un metodu esas alındı. Kör küvetine 2,95 ml 50 mmol'lük pH 7'de fosfat tampon (3,522 g KH_2PO_4 ve 5,796 g Na_2HPO_4 deiyonize suda çözündürülerek 1 litreye tamamlandı) ve 50 μl hemolizat/doku süpernatantı konuldu. Numune küvetine 2,95 ml fosfat tamponda hazırlanmış 10 mmol/L'lik hidrojen peroksitten 2,95 ml alınarak 50 μl hemolizat/doku süpernatantı ilave edildi. Kör küvete karşı 45 saniye boyunca absorbans düşüşleri 240 nm dalga boyunda spektrofotometrede takip edildi. Sonuçlar, k/mgHb ve k/mg-protein cinsinden belirlendi.

3.2.6.5. Eritrosit ve Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

Eritrosit ve doku SOD aktivitesi ölçümü Sun ve ark'nın (1988) metoduna göre yapıldı. Daha önce hazırlanmış olan kloroform/etanol (6/10 v/v) ekstraktından 0,5 ml alındı üzerine sırasıyla 2,45 ml SOD reaktifi [20 ml ksantin çözeltisi (3 mmol/L), 10'ar ml EDTA (0,6 mmol/L) ile NBT (0,15 mmol/L), 6 ml amonyum sülfat (2 mol/L), 3 ml sığır albumini (1 g/L)] ve 50 μl ksantin oksidaz (50 U/4,7 ml'lik ksantin oksidazdan 83 μl alınarak 2 ml 2 M'lık amonyum sülfat çözeltisine katıldı) eklenerek 25 °C'lik su banyosunda 20 dakika bekletildi. Süre bitiminde 1,0 ml CuCl_2 (0,8 mmol) ile reaksiyon durduruldu ve 560 nm'de alınan absorbanslar U/mgHb ve U/mg-protein cinsinden hesaplandı.

3.2.6.6. Eritrosit ve Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Ölçümü

Eritrosit ve doku GSH-Px aktivite tayininde Paglia ve Valentine (1967)'nin yöntemi kullanıldı. Numune ve kör tüplerine sırasıyla 1 ml fosfat tampon (pH 7,0; 100 mmol/L), 0,1 ml EDTA (10 mmol/L), 0,1 ml NaN_3 (20 mmol/L), 0,1 ml $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (3 mmol/L), 0,1 ml redükte glutasyon (20 mmol/L) ve 0,2 ml aktivitesi ayarlanmış glutasyon redüktaz (2 U/numune) eklendi. Devamında numune tüplerine 0,05 ml hemolizat/doku süpernatantı, kör tüpüne 0,05 ml fosfat tampon ilave edilerek 37°C'deki su banyosunda 2-3 dakika tutuldu. Üzerine distile suda yoğunluğu ayarlanmış tersiyer butil hidro peroksit (t-BOOH) çözeltisinden 0,2 ml eklendi. Absorbans düşüşü, 366 nm dalga boyunda 1 dakika takip edildi. Okunan absorbanslar, $\mu\text{mol NADPH}^+/\text{dk/gHb}$ ve $\mu\text{mol NADPH}^+/\text{dk/g-protein}$ cinsinden hesaplandı.

3.2.6.7. Plazma ve Doku Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Ölçümü

Plazma ve doku nitrik oksit düzeyinin belirlenmesi Tracey ve ark'nın (1995) metoduna göre yapıldı. Tüplere sırasıyla 25 µl plazma/doku süpernatantı, 8 µl NADPH (200 mikromol/L), 1 µl FAD (10 mikromol/L), 20 mmol'lük 126 µl fosfat tampon ve 40 µl nitrat redüktaz (1 U/ml) ilave edilerek vortekslendi ve 37 °C'lik su banyosunda 20 dakika bekletildi. Tüpler çıkarıldı ve 10 µl çinko sülfat çözeltisi (300 mg/L) ilave edilerek soğutmalı santrifüjde (+4 °C) 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi takibinde üstteki fazdan 50 µl alınarak 50 µl Griess reaktifi [NEDD (1 mg/ml) ve sülfanilamid (20 mg/10 ml fosforik asit çözeltileri) 1:1] eklendi. Işık almayan ortamda 10 dakika inkübe edilerek köre karşı 540 nm'de okundu. Benzer işlemler standart eğrisi için de yapıldı. Sonuçlar, nmol/ml veya nmol/mg-protein cinsinden hesaplandı.

3.2.6.8. Plazma ve Doku Glutasyon (GSH) Düzeyi Ölçümü

Plazma ve doku GSH analizi Sedlak ve Lindsay (1968)'in metoduna göre yapıldı. 200 µl plazma alınarak üstüne 2000 µl 0,1 M (pH: 8) sodyum fosfat tamponu ve 250 µl DTNB ilave edildi. Hafifçe çalkalandı 3 dakika bekletildi 412 nm'de absorbansları ölçüldü. Doku GSH ölçümü için 1 ml süpernatant alındı üzerine 4 ml % 5'lik TCA ilave edilerek 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst kısım ölçümler için kullanıldı plazmadakine benzer işlemler yapıldı. Standart eğrisi içinde aynı aşamalar takip edildi (plazma veya doku süpernatantı yerine GSH kullanıldı). Sonuçlar, nmol/ml veya nmol/mg-protein cinsinden hesaplandı.

3.2.6.9. Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Analizi

Serum trigliserit, kolesterol, BUN, kreatinin, ürik asit, LDH, AST, ALT, ALP, total protein ve albümin düzey/aktivite analizinde Roche Cobas marka kit ve aynı marka otoanalizör kullanıldı.

3.3. İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR

Verilerin istatistiksel hesaplanması SPSS 13,0 istatistik programında yapıldı. Sonuçlar, aritmetik ortalama ve standart sapma şeklinde ifade edildi. Gruplar arası farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan Mutiple Range test ($p < 0,05$ esas alınarak) ile belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. DİMETİLSÜLFOKSİD

Kontrol grubuna göre sadece DMSO verilen grubun oksidatif stres parametrelerinde (MDA, NO, GSH, SOD, CAT ve GSH-Px aktivite/düzeyleri); trigliserit, kolesterol, BUN, kreatinin, ürik asit, total protein, albümin, LDH, AST, ALT, ALP, aktivite/düzeyleri; canlı ağırlık, organ ağırlıkları ve organların bağıl ağırlıklarında anlamlı bir farklılık söz konusu değildir (Tablo 4.1-4.8).

4.2. DİOSMİN

Kontrol grubuna göre sadece diosmin uygulanan grubun MDA, NO, GSH, SOD, CAT ve GSH-Px aktivite/düzeyleri ile biyokimyasal parametrelerde (trigliserit, kolesterol, BUN, kreatinin, ürik asit, total protein, albümin LDH, AST, ALT ve ALP); canlı ağırlık, organ ağırlıkları ve organların bağıl ağırlıklarında istatistiksel olarak önemli bir değişim mevcut değildir (Tablo 4.1-4.8).

4.3. BAKIR

Bakır uygulanan hayvanlarda kontrol grubuna göre analizleri gerçekleştirilen tüm doku/plazma MDA ve NO düzeylerinde önemli bir artış varken plazma GSH düzeyinde önemli düşüş belirlenmiştir. Eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Karaciğer SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı düşüş; böbrek ve beyin SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde önemli artış kaydedilmiştir. Kalp SOD ve CAT aktivitelerinde önemli bir gerileme söz konusu iken GSH-Px aktivitesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Testis SOD aktivitesinde anlamlı bir artış mevcutken CAT ve GSH-Px aktivitesinde önemli bir azalma bulunmuştur (Tablo 4.1-4.6). Kontrol grubuna göre bakır verilen grupta biyokimyasal parametrelerden trigliserit, kolesterol, total protein ve albumin düzeyinde anlamlı bir azalma varken BUN, kreatinin, ürik asit, LDH, AST, ALT, ALP aktivitesinde/düzeyinde önemli artış tespit

edilmiştir (Tablo 4.7). Canlı ağırlıkta da önemli bir düşüş saptanmıştır. Karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis ağırlıklarında önemli düşüş söz konusudur. Aynı durum belirtilen organların bağıl ağırlıkları için de geçerlidir (Tablo 4.8).

4.4. BAKIR VE DİOSMİN

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında incelenen tüm parametre değerlerinin kontrol grubu sonuçlarına doğru yaklaştığı gözlenmiştir. Kontrole göre eritrosit SOD, CAT aktivitesinde; karaciğer NO ve SOD aktivitesi/düzeyinde; böbrek NO, GSH ve GSH-Px aktivite/düzeylerinde; beyin MDA, NO, SOD, CAT ve GSH-Px aktivite/düzeylerinde; kalp GSH, SOD ve CAT aktivite/düzeylerinde; testis MDA ve SOD aktivitesi/düzeyleri açısından önemli farklılıklar devam etmiştir (Tablo 4.1-4.6). Biyokimyasal parametrelerden trigliserit, ürik asit, AST ve ALT aktivite/düzeylerinde önemli değişimler söz konusudur (Tablo 4.7). Tüm organların ağırlığında, böbrek bağıl ağırlığında ve canlı ağırlıklarında da halihazırda anlamlı değişimler bulunmaktadır (Tablo 4.8).

Tablo 4.1. Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda plazma/eritrosit bazı oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup				
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (DMSO)	Grup 3 (Diosmin)	Grup 4 (Bakır)	Grup 5 (Bakır+Diosmin)
MDA (nmol/ml)	5,47±0,90 ^a	5,59±0,91 ^a	5,62±1,15 ^a	7,37±2,01 ^b	6,27±0,79 ^{ab}
NO (nmol/ml)	22,99±5,35 ^a	23,59±4,21 ^a	22,71±4,82 ^a	33,21±10,62 ^b	18,24±4,60 ^a
GSH (nmol/ml)	6055,88±1512,24 ^a	5988,97±2009,41 ^a	5790,13±2074,01 ^a	3683,34±966,93 ^b	4769,26±1291,53 ^{ab}
SOD (U/mgHb)	0,36±0,06 ^a	0,40±0,11 ^a	0,35±0,03 ^a	0,26±0,04 ^b	0,29±0,06 ^b
CAT (k/gHb)	54,86±8,64 ^a	48,42±15,29 ^{ab}	46,99±12,87 ^{ab}	29,11±7,38 ^c	41,06±14,23 ^b
GSH-Px (μmol NADPH ⁺ /dk/gHb)	145,424±19,71 ^a	151,08±61,78 ^a	167,82±42,58 ^a	109,04±9,72 ^b	140,41±39,82 ^{ab}

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri içeren veriler istatistiksel anlamda önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.2. Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda karaciğer dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup				
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (DMSO)	Grup 3 (Diosmin)	Grup 4 (Bakır)	Grup 5 (Bakır+Diosmin)
MDA (nmol/mg-protein)	1,49±0,42 ^a	1,83±0,89 ^a	1,60±0,78 ^a	3,26±0,68 ^b	1,60±0,51 ^a
NO (nmol/mg-protein)	0,73±0,18 ^a	0,92±0,31 ^a	0,96±0,28 ^a	2,16±1,08 ^b	1,70±0,18 ^b
GSH (nmol/mg-protein)	376,71±77,22 ^a	343,22±86,28 ^a	365,20±67,32 ^a	233,25±57,49 ^b	314,14±55,56 ^a
SOD (U/mg-protein)	0,81±0,21 ^a	0,83±0,17 ^a	0,81±0,27 ^a	0,54±0,12 ^b	1,09±0,26 ^c
CAT (k/g-protein)	1414,50±210,48 ^a	1558,02±258,37 ^a	1556,08±249,80 ^a	1005,36±120,18 ^b	1409,27±348,46 ^a
GSH-Px (μmol NADPH ⁺ /dk/g-protein)	530,62±161,50 ^a	525,62±175,84 ^a	573,68±245,31 ^a	266,48±99,24 ^b	463,93±196,89 ^a

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri içeren veriler istatistiksel anlamda önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.3. Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda böbrek dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup				
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (DMSO)	Grup 3 (Diosmin)	Grup 4 (Bakır)	Grup 5 (Bakır+Diosmin)
MDA (nmol/mg-protein)	2,00±0,43 ^a	1,92±0,58 ^a	1,65±0,39 ^a	2,82±1,47 ^b	2,07±0,55 ^a
NO (nmol/mg-protein)	1,08±0,20 ^a	1,10±0,31 ^a	1,33±0,35 ^{ab}	1,88±0,54 ^c	1,47±0,26 ^b
GSH (nmol/mg-protein)	219,30±26,70 ^a	236,23±64,52 ^a	223,28±54,62 ^a	155,49±49,61 ^b	174,71±42,44 ^b
SOD (U/mg-protein)	1,10±0,22 ^a	1,29±0,64 ^a	1,35±0,44 ^a	1,98±0,56 ^b	1,38±0,39 ^a
CAT (k/g-protein)	438,26±102,37 ^a	444,93±110,18 ^a	428,37±96,60 ^a	608,50±198,03 ^b	350,08±98,67 ^a
GSH-Px (μmol NADPH ⁺ /dk/g-protein)	239,95±57,74 ^a	299,86±126,78 ^{ab}	273,45±63,67 ^{ab}	443,80±132,02 ^c	351,20±88,00 ^b

a, b,c. Aynı satırda farklı harfleri içeren veriler istatistiksel anlamda önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.4. Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda beyin dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup				
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (DMSO)	Grup 3 (Diosmin)	Grup 4 (Bakır)	Grup 5 (Bakır+Diosmin)
MDA (nmol/mg-protein)	7,15±1,72 ^a	6,91±1,90 ^a	5,56±2,12 ^a	16,13±6,91 ^b	14,20±3,04 ^b
NO (nmol/mg-protein)	0,58±0,24 ^a	0,54±0,34 ^a	0,66±0,33 ^a	1,78±0,43 ^b	1,45±0,57 ^b
GSH (nmol/mg-protein)	163,33±42,71 ^a	177,53±43,89 ^a	187,21±33,32 ^a	109,42±26,49 ^b	174,62±54,87 ^a
SOD (U/mg-protein)	2,83±1,19 ^a	2,84±1,20 ^a	1,88±0,37 ^a	5,53±2,16 ^b	4,43±2,08 ^b
CAT (k/g-protein)	5,23±1,99 ^a	5,61±2,84 ^a	5,46±2,27 ^a	12,41±3,99 ^b	8,31±2,10 ^c
GSH-Px (μmol NADPH ⁺ /dk/g-protein)	119,32±40,34 ^a	112,29±31,48 ^a	92,99±38,97 ^a	205,99±74,97 ^b	172,53±61,69 ^b

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri içeren veriler istatistiksel anlamda önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.5. Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda kalp dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup				
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (DMSO)	Grup 3 (Diosmin)	Grup 4 (Bakır)	Grup 5 (Bakır+Diosmin)
MDA (nmol/mg-protein)	5,75±2,10 ^a	5,40±1,09 ^a	5,72±1,98 ^a	8,08±2,13 ^b	4,88±1,58 ^a
NO (nmol/mg-protein)	2,16±0,54 ^a	1,98±0,71 ^a	2,05±0,85 ^a	3,50±1,35 ^b	2,41±0,74 ^a
GSH (nmol/mg-protein)	881,77±68,74 ^a	850,07±76,42 ^a	823,43±101,62 ^a	621,39±157,22 ^b	680,01±116,98 ^b
SOD (U/mg-protein)	4,55±1,04 ^a	3,81±1,06 ^a	4,09±1,36 ^a	1,98±0,87 ^b	2,55±0,91 ^b
CAT (k/g-protein)	61,90±14,57 ^a	54,46±18,84 ^{ab}	50,37±15,14 ^{ab}	33,86±12,82 ^c	41,33±18,65 ^{bc}
GSH-Px (μmol NADPH ⁺ /dk/g-protein)	527,35±190,35 ^a	540,33±208,39 ^a	542,79±211,93 ^a	824,75±245,29 ^b	423,21±223,10 ^a

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri içeren veriler istatistiksel anlamda önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.6. Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda testis dokusu bazı oksidatif stres parametreleri.

Parametre	Grup				
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (DMSO)	Grup 3 (Diosmin)	Grup 4 (Bakır)	Grup 5 (Bakır+Diosmin)
MDA (nmol/mg-protein)	1,52±1,08 ^a	1,41±0,46 ^a	1,31±0,64 ^a	3,30±0,99 ^b	2,99±1,48 ^b
NO (nmol/mg-protein)	1,64±0,70 ^a	1,50±0,68 ^a	1,24±0,51 ^a	3,44±0,62 ^b	1,77±0,80 ^a
GSH (nmol/mg-protein)	88,75±19,94 ^a	77,50±29,75 ^a	83,85±18,38 ^a	49,82±12,28 ^b	83,39±25,10 ^a
SOD (U/mg-protein)	0,95±0,28 ^a	0,74±0,25 ^a	0,89±0,47 ^a	2,08±0,77 ^b	1,82±0,57 ^b
CAT (k/g-protein)	6,54±1,95 ^a	5,68±2,12 ^a	5,80±1,98 ^a	3,22±1,01 ^b	5,97±1,13 ^a
GSH-Px (μmol NADPH ⁺ /dk/g-protein)	225,98±76,40 ^a	207,89±83,88 ^a	215,26±88,21 ^a	116,76±44,80 ^b	204,31±82,17 ^a

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri içeren veriler istatistiksel anlamda önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.7. Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda serum bazı biyokimyasal parametreleri.

Parametre	Grup				
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (DMSO)	Grup 3 (Diosmin)	Grup 4 (Bakır)	Grup 5 (Bakır+Diosmin)
Trigliserit (mg/dL)	173,20±33,09 ^a	176,90±11,96 ^a	160,60±34,64 ^a	111,10±13,24 ^b	132,10±27,54 ^b
Kolesterol (mg/dL)	66,50±8,97 ^a	67,60±8,27 ^a	68,90±7,80 ^a	53,50±16,00 ^b	65,60±5,33 ^a
BUN (mg/dL)	18,24±2,33 ^a	17,96±1,53 ^a	17,62±2,64 ^a	24,40±8,43 ^b	17,04±1,12 ^a
Kreatinin (mg/dL)	0,32±0,04 ^a	0,33±0,03 ^a	0,32±0,02 ^a	0,43±0,14 ^b	0,32±0,05 ^a
Urik asit (mg/dL)	0,96±0,25 ^a	1,03±0,35 ^a	0,94±0,29 ^a	1,41±0,37 ^b	1,39±0,51 ^b
Total protein (mg/dL)	5,94±0,16 ^a	5,98±0,10 ^a	5,97±0,20 ^a	5,37±0,87 ^b	5,82±0,31 ^a
Albumin (mg/dL)	3,89±0,26 ^a	3,91±0,22 ^a	3,90±0,26 ^a	3,25±0,75 ^b	3,97±0,23 ^a
LDH (U/L)	975,80±236,34 ^a	969,10±268,39 ^a	907,10±289,34 ^a	1384,90±452,06 ^b	789,90±343,69 ^a
AST (U/L)	100,70±12,73 ^a	97,20±10,25 ^a	92,00±8,61 ^a	363,20±81,17 ^b	162,90±52,81 ^c
ALT (U/L)	52,20±1,98 ^a	48,20±6,19 ^a	54,00±4,98 ^a	334,50±99,58 ^b	141,50±72,32 ^c
ALP (U/L)	216,70±39,42 ^a	205,00±16,03 ^a	208,50±23,76 ^a	261,70±36,39 ^b	197,50±41,96 ^a

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri içeren veriler istatistiksel anlamda önemlidir (p<0,05).

Tablo 4.8. Bakır sülfat ve diosminin tek başına ve birlikte uygulandığı ratlarda canlı ağırlık, organ ağırlıkları ve organ ağırlığı/canlı ağırlık oranları (bağıl ağırlık).

Organ		Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (DMSO)	Grup 3 (Diosmin)	Grup 4 (Bakır)	Grup 5 (Bakır+Diosmin)
Karaciğer	Organ Ağırlığı (g)	12,60±1,00 ^a	13,31±1,86 ^a	12,31±1,35 ^a	8,57±0,91 ^b	10,89±0,86 ^c
	Bağıl Ağırlık	3,86±0,30 ^a	4,12±0,62 ^a	3,85±0,23 ^a	3,23±0,33 ^b	3,87±0,69 ^a
Böbrek	Organ Ağırlığı (g)	3,04±0,35 ^a	2,84±0,37 ^a	2,98±0,19 ^a	1,72±0,36 ^b	2,07±0,16 ^c
	Bağıl Ağırlık	0,93±0,12 ^a	0,87±0,12 ^a	0,94±0,10 ^a	0,65±0,14 ^b	0,73±0,11 ^b
Beyin	Organ Ağırlığı (g)	2,25±0,62 ^a	2,10±0,53 ^a	2,12±0,12 ^a	1,07±0,18 ^b	1,63±0,22 ^c
	Bağıl Ağırlık	0,69±0,20 ^a	0,64±0,15 ^a	0,66±0,05 ^a	0,40±0,08 ^b	0,58±0,14 ^a
Kalp	Organ Ağırlığı (g)	1,08±0,19 ^a	1,19±0,22 ^a	1,11±0,09 ^a	0,52±0,06 ^b	0,88±0,26 ^c
	Bağıl Ağırlık	0,33±0,05 ^a	0,36±0,07 ^a	0,35±0,03 ^a	0,19±0,02 ^b	0,31±0,08 ^a
Testis	Organ Ağırlığı (g)	3,30±0,79 ^a	3,35±0,44 ^a	3,10±0,19 ^a	1,77±0,42 ^b	2,56±0,59 ^c
	Bağıl Ağırlık	1,00±0,22 ^a	1,03±0,15 ^a	0,97±0,06 ^a	0,66±0,14 ^b	0,90±0,20 ^a
Canlı Ağırlık (g)		326,40±18,49 ^a	323,70±11,78 ^a	318,70±24,57 ^a	265,70±20,89 ^b	286,20±35,01 ^b

a,b,c. Aynı satırda farklı harfleri içeren veriler istatistiksel anlamda önemlidir (p<0,05).

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Vücut hücreleri ve dokuları, normal fizyolojik faaliyetler sırasında oksijenlenmeyle üretilen serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin yol açtığı hasar sebebiyle sürekli tehdit altındadır. Serbest radikallerin en önemli etkilerinden biri hücrenel membran hasarına yol açan lipid peroksidasyonudur aynı zamanda genel inflamatuvar yanıtta da katkıda bulunur. Lipitler hücrenel membranların bütünlüğünün korunmasından sorumlu olduğundan, yoğun peroksidasyonu, lipit membranların düzenini, bileşimini, yapısını ve dinamiklerini değiştirir. Hücre net yükünde kayma olur. Ozmotik basınç değişir bu durum hücrelerde şişmeye ve sonunda ölüme yol açar. Oldukça reaktif bileşikler olarak bilinen lipit peroksitler aynı zamanda ROS oluşumunu da hızlandırır (Nijveldt ve ark., 2001; Blokhina ve ark., 2003; Gaschler ve Stockwell, 2017). Serbest radikallere karşı enzimatik ve enzimatik olmayan hücrenel savunma sistemleri vardır. Enzimatik savunma sistemlerindeki önemli enzimler süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidazdır. Non-enzimatik sistemlerin başını ise glutasyon çeker. İnsan vücudunda oluşan serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türlerinin birçoğu yararlı fizyolojik işlevlere hizmet eder. Ancak aşırı üretildiğinde toksik olabilirler ve bu toksisite genellikle demir veya bakır gibi geçiş metallerinin varlığıyla şiddetlenir. DNA'ya, lipitlere, proteinlere ve karbonhidratlara zarar verir. Geçiş metali iyonlarıyla ilişkili toksisitelerde biyolojik makromoleküllerin oksidatif bozulmasında demir, bakır ve krom gibi metaller redoks döngüsüne girerken; kadmiyum, civa, nikel ve kurşun hem glutasyon ve hem de proteine bağlı sülfidril gruplarını tüketerek süperoksit iyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin üretimine yol açar. Böylece lipit peroksidasyonu artar. DNA hasarı ve değişen kalsiyum ve sülfidril homeostazisi

meydana gelir (Aruoma ve ark., 1991; Stohs ve Bagchi, 1995; Blokhina ve ark., 2003).

5.1. DİMETİLSÜLFOKSİD

Sadece DMSO verilen grubun oksidatif stres parametrelerinde (MDA, NO, GSH, SOD, CAT ve GSH-Px aktivite/düzeyleri); trigliserit, kolesterol, total protein, albümin, BUN, kreatinin, ürik asit, LDH, AST, ALT ve ALP aktivite/düzeylerinde; canlı ağırlık, organ ağırlıkları ve organların bağıl ağırlıklarında kontrol grubuna göre önemli bir değişimin saptanmaması (değerlerin kontrol grubuna benzer olması) uygulanan dozun incelenen parametreler açısından olumsuz etki oluşturmadığını göstermektedir. Zira bu bileşik gerek yüksek çözücü özelliği gerekse toksik olmayan bileşik sınıfında yer alması dolayısıyla çalışmalarda sıklıkla taşıt madde olarak kullanılmaktadır (Willhite ve Katz, 1984; Brayton, 1986; Santos ve ark., 2003).

5.2. DİOSMİN

Flavanoidler serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasarı farklı mekanizmalarla gidermeye çalışır. Bu aşamalardan biri serbest radikallerin doğrudan temizlenmesidir. Radikalin reaktif bileşiğiyle reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini stabilize eder. Flavonoidlerdeki hidroksil grubunun reaktivitesi radikalleri (süperoksit ve peroksinitrit gibi) etkisiz hale getirilir. Radikalleri temizleyerek in-vitro LDL oksidasyonunu engeller. Birçok flavonoid indüklenebilir nitrik oksit sentaz aktivitesine müdahale ederek NO oluşumunu azaltır. Bu bileşikler doğal antioksidan savunma sisteminin kapasitesini de artırır (Nijveldt ve ark., 2001; Es-Safi ve ark., 2007). Nitrik oksit, serbest radikallerle reaksiyona girerek son derece zararlı peroksinitritleri üretir. Flavonoidler nitrik oksit moleküllerini doğrudan temizler. Ayrıca ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ederek oksidatif hasarı geriletir. Ksantin oksidaz, oksijensiz radikallerin kaynağıdır ve moleküler oksijenle reaksiyona girerek süperoksit serbest radikallerini oluşturur. Reaktif oksijen türleri demir varlığında lipid peroksidasyona yol açar. Bazı flavonoidler demiri kelatlayarak serbest radikallerin gelişimine sebep olan bu faktörü ortadan kaldırır. Peroksidaz salınımını da azaltarak reaktif oksijen türlerinin üretimini engeller. Antiinflamatuvar özelliğiyle araşidonik asit metabolizmasını inhibe eder (Shih ve ark., 2007; Ahmadinejad ve ark., 2017; Vicente ve Boscaiu, 2018; Zeng ve ark., 2019; Chen ve

ark., 2023; Xue ve ark., 2023). Birincil ROS üreticileri NADPH oksidazlardır. Ksantin oksidaz (XO), monoamin oksidazlar (MAO), lisil oksidazlar (LO), lipoksijenaz (LOX) ve siklooksijenaz (COX) gibi diğer birçok enzim birincil metabolik fonksiyonlarına ek olarak süperoksit ve H₂O₂ üretir (Pietta 2000; Robert ve ark., 2001; Blokhina ve ark., 2003; Knaus, 2021). Diosminin de antioksidan etki mekanizmaları arasında antienflamatuvar karakteri (ksantin oksidaz, aldoz redüktaz, fosfodiesteraz gibi çeşitli enzimleri inhibe ederek), serbest radikalleri bağlayıcı potansiyeli ve antioksidan enzim sentezini inhibe etmesi bulunur. Çeşitli hastalıklarda oksidatif dengesizliğe bağlı bir dizi değişkenin (enzimler ve biyobelirteçler dahil) aktivitelerini başarılı bir şekilde modüle eder. Anti-kanser özellikleri ve aktivitesi vardır (Anon 2004; Ibrahim ve ark. 2018; Serafim ve ark., 2020; Huwait ve Mobashir, 2022). Antihiperglisemik aktivite de gösterir (Gerges ve ark. 2022; Huwait ve Mobashir 2022). Lipidlerin peroksidasyonunda sınırlayıcı etki oluşturur ve toplam antioksidan kapasiteyi arttırır (Bubols ve ark. 2013; Pietta 2000). Çalışmada tek başına diosmin uygulanan grubun incelenen tüm parametrelerinin kontrol grubuna yakınlık göstermesi (istatistiksel bir değişimin olmaması) ifade edilen süre ve dozda verilen diosminin rat fizyolojik sisteminde olumsuz bir etkiye yol açmadığını ortaya koymaktadır. Benzer araştırmalardan, Eraslan ve ark. (2017) 21 gün 50 mg/kg.ca dozunda verdikleri diosminin rat eritrosit/plazma, karaciğer ve böbrek MDA düzeyleri ile SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde (böbrek GSH-Px dışında) önemli bir değişiklik oluşturmadığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında da glukoz, trigliserit, kolesterol, BUN, kreatinin, ürik asit, total protein, albümin, LDH, AST, ALT ve ALP gibi biyokimyasal parametrelerde de anlamlı farklılıklar tespit etmemişlerdir. Ağır ve Eraslan (2019), 100 mg/kg.ca dozunda 30 gün uyguladıkları diosminin ratlarda AST, ALT, ALP ve LDH aktivitelerinde, ayrıca karaciğer/eritrosit MDA, NO, GSH düzeylerinde ve SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını raporlamışlardır. Benzer şekilde, Tekeli ve ark. (2021) 28 gün 50 mg/kg.ca dozunda uyguladıkları diosminin rat karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis oksidatif stres parametreleri (MDA, NO, GSH, SOD, CAT ve GSH-Px düzeyleri/aktiviteleri) ile biyokimyasal parametrelerde (kreatinin, BUN, ALT, AST) anlamlı bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Bozdağ ve Eraslan (2020) ratlara 6 hafta süreyle 50

mg/kg.ca dozunda verdikleri diosminin glukoz, trigliserit, kolesterol, BUN, kreatinin, ürik asit, LDH, AST, ALT, ALP, total protein, albumin gibi biyokimyasal parametrelerde; kan ve doku oksidatif stres parametrelerinde (MDA, NO, SOD, CAT, GSH-Px, GSH); canlı ağırlık ve organ ağırlıklarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını gözlemlemişlerdir. Sharmila-Queenthly ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, ratlara 10 mg/kg.ca dozunda 10 gün verdikleri diosminin LDH ile kalp TBARS, SOD, GSH-Px ve GSH düzey/aktivitelerinde önemli bir değişiklik oluşturmadığı belirtilmiştir. Rehman ve ark. (2013), 40 mg/kg.ca dozunda 20 gün ratlara diosmin uygulamışlar böbrek GSH, GSH-Px, MDA, SOD ve CAT düzeyleri/aktivitelerinde; BUN, kreatinin ve LDH aktivitelerinde/düzeylerinde herhangi bir farklılığa neden olmadığını doğrulamışlardır. Srinivasan ve Pari (2012), ratlara 100 mg/kg.ca dozunda 45 gün verilen diosminin karaciğer, böbrek ve plazma TBARS, karaciğer ve böbrek SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde önemli bir değişime yol açmadığını ortaya koymuşlardır. Alkhalaf (2020) ratlara 14 gün boyunca diosmini (100 mg/kg.ca) ağızdan vermişler, karaciğer, böbrek ve beyin MDA, NO, GSH, GSH-Px, SOD ve CAT ile AST, ALT, ALP, üre ve kreatinin düzey/aktivitesinde kontrole göre anlamlı bir değişime yol açmadığını bildirmişlerdir. Germoush (2016), ratlara ağızdan 50 mg/kg.ca dozunda 15 gün verdikleri diosminin serum AST, ALT, ALP aktiviteleri ile karaciğer GSH, SOD, CAT, GSH-Px aktivite/düzeylerinde anlamlı bir farklılık oluşturmadığını rapor etmişlerdir. Elhelaly ve ark. (2019), 10 mg/kg.ca dozunda 14 gün süreyle farelere verdikleri diosminin biyokimyasal (ALT, AST, ALP, üre ve kreatinin) parametreler ile karaciğer, böbrek ve beyin lipid peroksidasyon (MDA) ve hücrel antioksidan parametrelerinde (SOD, GSH, CAT) anlamlı bir farklılığa neden olmadığını saptamışlardır. Al-Asmari ve ark. (2021) ratlara 17 gün ağızdan diosmin vermişler ratların karaciğer MDA, NO, GSH düzeylerinde ve SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde önemli bir farklılığa yol açmadığını bulmuşlardır. Mevcut çalışma sonuçları, bu bağlamda daha önceki çalışmalarla uyumludur.

5.3. BAKIR

Bakır, memeli dokularında biriken ve düzeyleri kritik noktaya ulaştığında toksik etki gösteren bir metaldir. Bu metale maruz kalındığında, özellikle başta karaciğer ve böbrek olmak üzere diğer önemli organlarda da bir dizi patolojik değişiklikler

gelişebilir. Normalde bir mikro besindir. Bakır zehirlenmesine duyarlılık tür, genetik, yaş ve diyet gibi birçok faktöre bağlıdır (Bremner, 1998; Harris, 2003; Lutsenko ve ark., 2007). Hücre içinde serbest oksijen radikalleri mitokondri, mikrozom, peroksizom ve lizozomlarca üretilir (Richter ve ark., 1995; Anderson ve ark., 1999; Pourahmad ve ark., 2001; 2003). Fazla miktarda bakır, serbest oksijen radikallerinin üretimini artırarak oksidatif strese yol açar (Rossi ve ark., 2004; Formigari ve ark., 2007). Mitokondri, hücre içindeki serbest radikallerin en önemli kaynağıdır ve aynı zamanda ilk hedefidir. Serbest radikaller, mitokondrial membranda lipid peroksidasyonuna yol açarak mitokondriyal membranının geçirgenliğini bozarak Ca^{+2} iyonlarının hücre dışına geçişine, osmotik basıncın artmasına, mitokondrinin su alıp şişmesine, sitokrom-c'nin sitosole (hücre sitoplazmasına) sızmasına ve kaspaz-9'un aktive olmasına neden olur (Kannan ve Jain, 2000; Simon, 2000; Pourahmad ve ark., 2003). Bakır, redoks döngü reaksiyonlarına girme yeteneğine sahiptir ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu teşvik eder. Süperoksit, askorbik asit veya GSH gibi indirgeyici ajanların varlığında, Haber-Weiss reaksiyonu ile hidrojen peroksitten hidroksil radikallerinin oluşumunu katalize eder. Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde en güçlü oksitleyici radikaldir. Bu radikal lipid membranda bozulmaya yol açar, DNA ipliğinde kırılmaya sebep olur ve bazların oksidasyonunu indükler. Tüm geçiş metali iyonlarının zehirleyici etkilerinin altında yatan mekanizma süperoksit ve hidroksil radikali ile diğer ROS'ların oluşumu ve ardından malondialdehit, 4-hidroksinonenal ve diğer ekzosiklik DNA bileşenlerinin üretimidir. Bakır kan/karaciğer vitamin E depolarını tüketir. Bakıra maruz kalma, metalotionein ve katalazı; ayrıca p53'e bağlı/bağımsız yollarla da apoptozu indükler. Yüksek düzeyde bakır maruziyeti lipid metabolizmasını, antimikrobiyal savunma sistemini, nöronal aktiviteyi, tümör hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara direncini, kinaz aracılı sinyal iletimini ve diğer temel hücresel süreçleri etkiler (Valko ve ark., 2005; Jomova ve Valko, 2011; Gaetke ve ark., 2014). Hücredeki serbest indirgenmiş bakır, sülfidril gruplarına bağlanır böylece sülfidril yapısı barındıran glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ve glutasyon redüktaz gibi enzimleri inaktive eder. Oksijen türleriyle (örn. süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit) ve reaktif toksik hidroksil radikalleriyle etkileşime girer ve üretimini katalize eder. Bakır ve bakır iyonları oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarında rol oynar. Askorbik asit veya GSH gibi biyolojik indirgeyicilerin

varlığında bakır iyonu (Cu(II)), reaktif hidroksil radikallerinin ($\bullet$ OH) oluşumunu katalize edebilen bakır iyonuna (Cu(I)) indirgenir. Hidroksil radikali biyolojik molekülle reaksiyona girer ve doymamış yağ asitlerinden bir lipid radikali oluşturur. Bakır DNA kırılmasını arttırmada demirden daha aktiftir. DNA hasarı esas olarak bölgeye özgü bir Fenton reaksiyonuyla meydana gelir. Bakır LDL ve HDL oksidasyonuna sebep olur. Lipitlerin peroksidasyonu ayrıca Cu(I) katalizli Fenton kimyası yoluyla hidroksil radikallerinin üretilmesiyle de sağlanır (Valko ve Morris, 2005; Saravu ve ark., 2007). Demir-bakır aracılı kataliz, biyomolekülleri doğrudan hedef alan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açar. Reaktif nitrojen türleri (RNS) de üretilerek hücresel bileşenlerin oksidatif bozulmasına ek aromatik yapıların nitrasyonuna da yol açabilir. Bakır maruziyeti sonucu, MDA, NO artışı ve SOD, CAT aktivitesinde ve GSH düzeyinde azalma gözlenir. Söz konusu farklılıklar oksidatif stresin ve hücre hasarının işaretidir. Dolayısıyla bu ve diğer hücresel antioksidan enzimatik/enzimatik olmayan savunma sistemi serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri oksidatif strese karşı korur (Videla ve ark., 2003; Valko ve ark., 2005; Brewer, 2010). Bakır maruziyetinin, doku/plazma MDA ve NO miktarında önemli bir artışa diğer taraftan GSH düzeyinde önemli düşüşe yol açması; dokularda bazı antioksidan enzimlerde de iki yönlü değişimin gözlenmesi (eritrosit ve karaciğer SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde düşüş aksine aynı enzimlerde böbrek ve beyinde artış; kalp SOD, CAT aktivitesinde düşüş GSH-Px aktivitesinde artış; testis CAT ve GSH-Px aktivite/düzeyinde düşüş, SOD aktivitesinde artış; biyokimyasal parametrelerden BUN, kreatinin, ürik asit LDH, AST, ALT, ALP aktivitesinde/düzeyinde artış; trigiliserit, kolesterol, total protein ve albumin düzeyinde düşüş; canlı ağırlık, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve testis dokusu ağırlığında/bağıl ağırlığında önemli düşüş); bakırın yukarıda ifade edilen mekanizmaların biri veya birkaçı ile serbest radikal oluşturduğu, bu serbest radikalleri biyolojik sistemdeki antioksidan savunma sistemlerinin elimine edemediği böylece oksidatif stres şekillendiği ve bunun da doku hasarına yol açtığı takiben de fizyolojik dengenin bozularak patolojik sınırlara doğru ilerlediği anlamına gelmektedir. Konuya ilişkin deney hayvanlarında gerçekleştirilen çalışmalardan, Peng ve ark. (2021) farelere 28 gün günde 200 mg/kg.ca dozunda CuSO₄'ı ağızdan vermişler böbrek MDA ve NO düzeyinde artış GSH, GSH-Px, SOD ve CAT

düzy/aktivitelerinde düşüş görmüşlerdir. Jian ve ark. (2020) fare akciğerlerindeki çalışmalarında deney gruplarına sırasıyla 42 gün 10 mg/kg.ca, 20 mg/kg.ca ve 40 mg/kg.ca dozunda CuSO₄ uygulamışlar MDA ve NO düzeylerinde artış, GSH, GSH-Px, SOD ve CAT aktivite/düzeylerinde belirgin gerileme gözlemişlerdir. Ozcelik ve Uzun (2009b) 28 gün ratlara 1 g/L dozunda içme suyuyla Cu vermişler sonuçta ALT ve AST aktivitelerinde artış rapor etmişlerdir. Beyin dokusu SOD ve GSH düzey/aktivitelerinde azalma ve MDA seviyelerinde artış bulmuşlardır. Zhang ve ark. (2000) ratlara 56 gün 500 mg Cu/kg.ca bakır sülfat verilmişler serum/karaciğer homojenatlarında MDA seviyelerinde artış, SOD ve GSH-Px aktivitesinde gerileme gözlemişlerdir. ALT ve AST aktivitelerinde ise artış saptamışlardır. Temiz ve ark. (2021) ratlara 28 gün 10 mg/kg.ca dozunda bakır sülfat vermişler ve karaciğer GSH, SOD, GPx ve CAT aktivite/düzeylerinde gerileme MDA düzeyinde yükselme, serum ALT ve AST aktivitelerinde artış bulmuşlardır. Kumar ve ark. (2016) ratları 90 gün 100 mg/kg.ca dozunda bakır sülfata maruz bırakmışlar; karaciğer, böbrek ve beyin GSH seviyelerinde azalma, MDA düzeyinde artış belirlemişlerdir. Hashish ve Elgaml (2016) ratlara 30 gün ağızdan bakır sülfat vermişler karaciğer ve böbrek CAT, SOD, GSH aktivitelerinde azalma ve MDA düzeyinde artış saptamışlardır. Ayrıca, kan biyokimyasal parametrelerinden serum AST, ALT, ALP ve GGT aktivitesinde artış, serum total protein düzeylerinde azalma ve üre ve kreatinin seviyelerinde artış bulmuşlardır. Arowoogun ve ark. (2021) 7 hafta süreyle ağızdan 200 mg/kg.ca dozunda bakır sülfat uygulamışlar ve rat beyinde SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde azalma MDA seviyesinde artış gözlemişlerdir. Liu ve ark. (2020) 21 ve 42 gün farelere ağızdan sırasıyla gruplara 0, 4, 8 ve 16 mg/kg.ca dozunda bakır sülfat vermişler MDA ve NO düzeyinde artmaya, GSH, GSH-Px, CAT ve SOD düzey/aktivitelerinde azalmaya yol açtığını belirlemişlerdir. Elde edilen veriler bu bakımdan daha önceki çalışmalarla örtüşmektedir.

5.4. BAKIR VE DİOSMİN

İncelenen tüm parametrelerin kontrol grubuna yaklaştığı gözlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bazı parametreler için eritrosi/dokuda kontrol grubuna göre farklılıkların devam etmesi (eritrosit SOD, CAT aktivitesi; karaciğer NO ve SOD aktivitesi/düzeyi; böbrek NO, GSH ve GSH-Px aktivite/düzey; beyin MDA, NO, SOD, CAT ve GSH-Px aktivite/düzeyi; kalp GSH, SOD ve CAT aktivite/düzeyleri,

testis MDA ve SOD aktivite/düzeyi; trigliserit, ürik asit, AST ve ALT aktivite/düzeyi; tüm organların ağırlığında, böbrek bağıl ağırlığında ve canlı ağırlıklarında anlamlı farklılıkların sürmesi) diosminin belirtilen doz ve sürede bakırın yol açtığı oksidatif stresi geriletme yönünde etkili olduğu bunu diosminle ilişkili yukarıda/aşağıda ifade edilen mekanizmaların biri veya bir kaçı ile yapabileceği fakat bu olumlu etkinin bakırın yol açtığı toksisiteyi tam anlamıyla gideremediği anlamı taşımaktadır. Flavonoidlerin en önemli etkisi serbest radikal temizleyicisi olmalarıdır. Düşük yoğunluklarda bile oksitlenebilen bir maddeye maruz kaldıklarında, oksidasyonu önlemek veya geciktirmek için önemli ölçüde reaksiyonlara girebilen kimyasal yapıları vardır. Bu bileşiklerin diğer genel antioksidan etki mekanizması biyolojik sistemlerdeki metalik iyonları (oksidasyonda rol oynayan bakır veya demir gibi) bağlamalarıdır. Dolayısıyla, katalitik metal iyonlarının kelasyonuyla, Fenton reaksiyonu gibi son derece reaktif hidroksil radikalini oluşturan reaksiyonları önleyebilir (Croft, 1998; Pietta, 2000; Fernandez ve ark., 2002; Erlund, 2004; Nkhili ve ark., 2014). Bir flavonoid olan diosminin de bu etkilere sahip olduğunu söyleyebiliriz. Daha açık bir ifadeyle, diosmin aktif metalleri (özellikle demir ve bakır) bağlar, böylece serbest radikal aracılı biyolojik zar membranlarındaki lipid peroksidasyonunu önler (Kanaze ve ark., 2009; Campanero ve ark., 2010). Yine radikal oluşumunda rol alan yukarıda ifade edilen enzimleri de inhibe eder (Ahmadinejad ve ark., 2017; Vicente ve Boscaiu, 2018; Zeng ve ark., 2019; Xue ve ark., 2023). Farklı bileşiklerin deney hayvanlarında yol açtığı toksisiteye karşı diosminle gerçekleştirilmiş çalışmalar değerlendirildiğinde; Eraslan ve ark. (2017), ratlarda 21 gün aflatoksin (500 µg/kg) uygulamasına karşı aynı süreyle 50 mg/kg.ca dozda verdikleri diosminin karaciğer ve böbrek MDA, NO, SOD, CAT, GSH-Px, AST, ALT, ALP ve LDH aktivite/düzeylerinde olumlu yönde değişime yol açtığını tespit etmişlerdir. Al-Asmari ve ark. (2021) doksorubisinin yol açtığı hepatotoksisiteye karşı ratlara 100 mg/kg.ca dozunda 17 gün ağızdan uyguladıkları diosminin serum ALT, AST ve ALP aktivitesindeki artışı normal seviyeye çektiği, oksidatif stres parametrelerinden SOD, CAT, GSH-Px aktivitelerini artırdığını NO ve MDA düzeylerini düşürdüğünü gözlemişlerdir. Lamidi ve ark. (2021) gerçekleştirdiği çalışmada ratlarda kurşun asetatın yol açtığı oksidatif strese karşı 42 gün 200 mg/kg.ca dozunda verilen diosminin olumsuz etkilenen SOD, CAT,

GSH-Px, GSH aktivitelerini artırdığını; MDA ve NO düzeylerini gerilettiğini diğer taraftan serum biyokimyasal parametrelerini ise normal düzeye yaklaştırdığını tespit etmişlerdir. Ağır ve Eraslan (2019) çalışmasında, 30 gün süresince ratlara 100 mg/kg dozunda uyguladıkları diosminin kadmiyumun yol açtığı hasarı hafiflettiğini yani AST, ALT, ALP ve LDH aktivitelerini düşürdüğünü MDA ve NO düzeylerini gerilettiğini SOD, CAT, GSH-Px, GSH aktivitelerini artırdığını ortaya koymuşlardır. Mirzaei ve ark. (2023) diosmini sodyum arsenit kaynaklı toksisiteye karşı farelere sırasıyla 25, 50, 100 mg/kg.ca dozunda ağızdan vermişler karaciğer SOD, CAT, GSH-Px, GSH aktivite/düzeylerini artırdığını ve NO ve MDA seviyesini gerilettiğini gözlemişlerdir. Bu çalışmanın verileri, daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olup, diosminin çeşitli oksidatif stres durumlarında olumlu etkiler oluşturduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak belirlenen doz ve sürede verilen bakır ratların biyolojik sisteminde ciddi olumsuz etkiye sebep olmuştur. Uygulanan diosmin ise incelenen parametrelerde olumlu yönde iyileşmeye yol açmıştır. Tek başına diosmin uygulamasının ise olumsuz etkilerine ratlanmamıştır. Bu bağlamda diosmin diyetle veya bakırla zehirlenme olgularında radikal sağaltım seçenekleri yanında destekleyici/sağaltımda kullanılan ilaçların (özellikle kelatörlerin) olumsuz etkisini azaltıcı amaçla kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Aaseth J, Crisponi G, Andersen O. Copper. In: Chelation Therapy in the Treatment of Metal Intoxication, 1st ed, 2016, pp. 133-137.
- Ağır MS, Eraslan G. The effect of diosmin against liver damage caused by cadmium in rats. *J. Food Biochem*, 2019; 43: e12966, doi: 10.1111/jfbc.12966.
- Ahmadinejad F, Geir Møller S, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Bidkhor G, Jami MS. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*, 2017; 6: 51, doi: 10.3390/antiox6030051.
- Ahmed S, Mundhe N, Borgohain M, Chowdhury L, Kwatra M, Bolshette N, et al. Diosmin modulates the NF-kB signal transduction pathways and downregulation of various oxidative stress markers in alloxan-induced diabetic nephropathy. *Inflammation*, 2016; 39: 1783-1797.
- Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet*, 2007; 369: 397-408.
- Al-Asmari AF, Alharbi M, Alqahtani F, et al. Diosmin alleviates doxorubicin-induced liver injury via modulation of oxidative stress-mediated hepatic inflammation and apoptosis via NfκB and MAPK pathway: A preclinical study. *Antioxidants*, 2021; 10: 1998, doi: 10.3390/antiox10121998.
- Alkhalaf MI. Diosmin protects against acrylamide-induced toxicity in rats: Roles of oxidative stress and inflammation. *J. King Saud Univ Sci*, 2020; 32: 1510-1515.
- Al-Khayri JM, Sahana GR, Nagella P, Joseph BV, Alessa FM, Al-Mssallem MQ. Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review. *Molecules*, 2022; 27: 2901, doi: 10.3390/molecules27092901.

- Alman B, Antezana A, Fay M, Derrick H, Chiger A, Hall S, Meghan BS, Sonawane, B. (2022). Toxicological profile for mercury: Draft for public comment: April 2022.
- Al-Saydeh SA, El-Naas MH, Zaidi SJ. Copper removal from industrial wastewater: A comprehensive review. *J Ind Eng Chem*, 2017; 56, 35-44.
- Altarelli M, Ben-Hamouda N, Schneider A, Berger MM. Copper deficiency: Causes, manifestations, and treatment. *Nutr Clin Ptact*, 2019; 34: 504-513, doi:10.1002/ncp.10328.
- Amadi CN, Offor SJ, Frazzoli C, Orisakwe OE. Natural antidotes and management of metal toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019; 26: 18032-18052.
- Amato C. Advantage of a micronized flavonoidic fraction (Daflon 500 mg) in comparison with a nonmicronized diosmin. *Angiology* 1994; 45: 531-536.
- Anderson RS, Patel KM, Roesijadi G. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev Comp Immunol*, 1999; 23: 443-449.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 2005; 70: 200-214.
- Anon. Monograph. Diosmin. *Altern Med Rev* 2004; 9: 308-311.
- Arendsen LP, Thakar R, Sultan AH. 2019. The use of copper as an antimicrobial agent in health care, including obstetrics and gynecology. *Clin Microbiol Rev*, 32: e00125-e00128. 10.1128/CMR.00125-18.
- Arowoogun J, Akanni OO, Adefisan AO, Owumi SE, Tijani AS, Adaramoye OA. Rutin ameliorates copper sulfate-induced brain damage via antioxidative and anti-inflammatory activities in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021; 35: e22623, doi: 10.1002/jbt.22623.
- Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B. Oxygen free radicals and human diseases. *JR Soc Health*, 1991; 111: 172-177.
- Barceloux DG, Barceloux D. Copper. *Clin Toxicol*, 1999; 37: 217-230, doi: 10.1081/Clt-100102421.
- Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem*, 2008; 56: 6185-6205.

- Berköz M. Diosmin suppresses the proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages via NF- κ B and MAPKs signal pathways. *Gen Physiol Biophys*, 2019; 38: 315-324.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Bot* 2003; 91: 179-194.
- Bogucka-Kocka A, Woźniak M, Feldo M, Kockic J, Szewczyk K. Diosmin-isolation techniques, determination in plant material and pharmaceutical formulations, and clinical use. *Nat Prod Commun*, 2013; 8: 545-550.
- Borkow G, Gabbay J. Copper as a biocidal tool. *Curr Med Chem*, 2005; 12: 2163-2175.
- Boyd CE, Massaut L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquac Eng*, 1999; 20: 113-132.
- Bozdağ M, Eraslan G. The effect of diosmin against lead exposure in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020; 393: 639-649.
- Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): A review. *Cornell Vet*, 1986; 76: 61-90.
- Bremner I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 1069-1073.
- Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusi AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem*, 277: 17415–17427.
- Brewer GJ. Copper toxicity in the general population. *Clin Neurophysiol*, 2010; 121: 459-460.
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*, 2013; 1830: 3289-3303.
- Campanero MA, Escolar M, Perez G, Garcia-Quetglas E, Sadaba B, Azanza JR. Simultaneous determination of diosmin and diosmetin in human plasma by ion trap liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: Application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*, 2010; 51: 875-881.

- Cao Y, Skaug MA, Andersen O, Aaseth J. Chelation therapy in intoxications with mercury, lead and copper. *J Trace Elem Med Biol*, 2015; 31: 188-192.
- Carillon J, Rouanet JM, Cristol JP, Brion R. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: Several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. *Pharm Res*, 2013; 30: 2718-2728.
- Casey AL, Adams D, Karpanen TJ, Lambert PA, Cookson BD, Nightingale P, Miruszenko L, Shillam R, Christian P, Elliott TSJ. Role of copper in reducing hospital environment contamination. *J Hosp Infect*, 2010; 74: 72-77.
- Cassidy A, Minihane AM. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr*, 2017; 105: 10-22.
- Cataneo AHD, Ávila EP, Mendes LAO, de Oliveira VG, Ferraz CR, de Almeida MV, Frabasile S, Duarte Dos Santos CN, Verri WA Jr, Bordignon J, Wowk PF. Flavonoids as molecules with anti-Zika virus activity. *Front Microbiol*, 2021; 12: 710359, doi: 10.3389/fmicb.2021.710359.
- Cazaubon M, Benigni JP, Steinbruch M, Jabbour V, Gouhier-Kodas C. Is there a difference in the clinical efficacy of diosmin and micronized purified flavonoid fraction for the treatment of chronic venous disorders? Review of available evidence. *Vasc Health Risk Manag*, 2021; 17: 591-600.
- Chen S, Wang X, Cheng Y, Gao H, Chen X. A Review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. *Molecules*, 2023; 28: 4982, doi: 10.3390/molecules28134982.
- Chirumbolo S, Bjorklund G, Lysiuk R, Vella A, Lenchyk L, Upyr T. Targeting cancer with phytochemicals via their fine tuning of the cell survival signaling pathways. *Int J Mol Sci*, 2018; 9: 3568, doi: 10.3390/ijms19113568.
- Collins JF. Chapter 24-Copper. In: Marriott BP, Birt DF, Stallings VA, Yates AA (Eds.), *Present Knowledge in Nutrition (Eleventh Edition)*, Academic Press, 2020; pp. 409-427.
- Corcoran MP, McKay DL, Blumberg JB. Flavonoid basics: Chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. *J Nutr Gerontol Geriatr*, 2012; 31: 176-189.

- Cova D. Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1992; 30: 29-33.
- Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann NY Acad Sci*, 1998; 854: 435-442.
- Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag*, 2005; 26, 343-356.
- Deng H, Kuang P, Cui H, Chen L, Fang J, Zuo Z, Deng J, Wang X, Zhao L. Sodium fluoride induces apoptosis in cultured splenic lymphocytes from mice. *Oncotarget*, 2016; 7: 67880-67900.
- Dholakiya SL, Benzeroual KE. Protective effect of diosmin on LPS-induced apoptosis in PC12 cells and inhibition of TNF- α expression. *Toxicol Vitro*, 2011; 25: 1039-1044.
- Doguer C, Ha JH, Collins JF. Intersection of iron and copper metabolism in the mammalian intestine and liver. *Compr Physiol*, 2018; 8: 1433-1461.
- Domingo JL. Developmental toxicity of metal chelating agents. *Reprod Toxicol*, 1998; 12: 499-510.
- Dorsey A, Ingberman L. Toxicological profile for copper. *Toxic Substances and Disease Registry*, 2004, 1-314.
- Du Z, Hemken RW, Harmon RJ. Copper metabolism of Holstein and Jersey cows and heifers fed diets high in cupric sulfate or copper proteinate. *J Dairy Sci*, 1996; 79, 1873-1880.
- Efenberger-Szmechtyk M, Nowak A, Czyzowska A. Plant extracts rich in polyphenols: Antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021; 61: 149-178.
- Ehsani A, Yazıcı EY. Anadolu'da bakır madenciliği ve kullanımının kısa tarihçesi. *Journal of Underground Resources*, 2016; 9: 43-48.
- El-Dakhly SM, Salama AAA, Hassanin SOM, Yassen NN, Hamza AA, Amin A. Aescin and diosmin each alone or in low dose-combination ameliorate liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *BMC Res Notes*, 2020; 13: 259, doi: 10.1186/s13104-020-05094-2.
- Elhelaly AE, Al-Basher G, Alfarraj S, Almeer R, Bahbah EI, Fouda MDA, Bungău SG, Aleya L, Abdel-Daim MM. Protective effects of hesperidin and diosmin

- against acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative damage in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019; 26: 35151-35162.
- Eraslan G, Soyer Sarıca Z, Çakır Bayram L, Tekeli MY, Kanbur M, Karabacak M. The effects of diosmin on aflatoxin-induced liver and kidney damage. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017; 24: 27931-27941.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metal and oxidative stress part 1: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*, 2001; 1: 529-539.
- Eren M, Şentürk M, Yıldırım H. Investigation of the chronic copper poisoning in sheep in Konya. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2018; 24: 757-763.
- Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 2004; 24: 851-874.
- Es-Safi NE, Ghidouche S, Ducrot PH. Flavonoids: Hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. *Molecules*, 2007; 12: 2228-2258.
- Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspect of hematology. In: Tietz NW (Ed) *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 3rd Edn, WB Saunders, Philadelphia, 1987; pp 803-806.
- Fernandez MT, Mira ML, Florêncio MH, Jennings KR. Iron and copper chelation by flavonoids: An electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem*, 2002; 92: 105-111.
- Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, Saso L. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Curr Med Chem*, 2011; 18: 3871-3888.
- Flemming CA, Trevors JT. Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. *Water Air Soil Pollut*, 1989; 44: 143-158.
- Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Altern Med Rev*, 2009; 14: 87-88.
- Flora SJS, Pachauri V. Chelation in Metal Intoxication. *Int J Environ Res Public Health*, 2010; 7: 2745-2788.
- Fong D, Otte J, Yu H, Zheng H, Lakshminarayana S, Reis RL, Rodrigues MT, Gomes ME, Oliveira JM. Development of high-throughput profiling of

- glycans from human plasma by microscale liquid chip-based tandem mass spectrometry and glycoblotting techniques. *Anal Chem*, 2004; 92: 11626-11631.
- Forman OP, Boursnell MEG, Dunmore BJ, Stendall N, Van De Sluis B, Fretwell N, Jones P, Characterization of the COMMD1 (MURR1) mutation causing copper toxicosis in Bedlington terriers. *Anim Genet*, 2005; 36: 497-501.
- Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C: Toxicol Pharmacol*, 2007; 146: 443-459.
- Franchitto N, Gandia-Mailly P, Georges B, Galinier A, Telmon N, Ducassé JL, Rougé D. Acute Copper Sulphate Poisoning: A Case Report and Literature Review. *Resuscitation*, 2008; 78: 92-96.
- Friesenecker B, Tsai AG, Allegra C, Intaglietta M. Oral administration of purified micronized favonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: In vivo observations in the hamster skin fold. *Int J Microcirc Exp*, 1994; 14: 50-55.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*, 2011; 15: 1583-1606.
- Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Arch Toxicol*, 2014; 88: 1929-1938.
- Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017; 482: 419-425.
- Geberding JL. Hospital infections in the 21st century: The significance of infection control practices. *Clin Infec Dis*, 2004; 39: 1173-1176.
- Georgopoulos PG, Roy A, Yonone-Lioy MJ, Opiekun RE, Lioy PJ. Environmental copper: Its dynamics and human exposure issues. *J Toxicol Environ Health Part B*, 2001; 4: 341-394.
- Gerges SH, Wahdan SA, Elsherbiny DA, El-Demerdash E. Pharmacology of diosmin, a citrus flavone glycoside: An updated review. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2022; 47: 1-18.

- Germoush MO. Diosmin protects against cyclophosphamide-induced liver injury through attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Int J Pharmacol*, 2016; 12: 644-654.
- Giridharan P, Radhakrishnan R, Karthickeyan SMK. Copper toxicosis in livestock: A review. *Int J Pharm Biol Arch*, 2013; 4: 890-896.
- Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem*, 2017; 398: 1095-1108.
- Godeberge P. Daflon 500 mg in the treatment of hemorrhoidal disease: a demonstrated efficacy in comparison with placebo. *Angiology*, 1994; 45: 574-578.
- Gromadzka G, Tarnacka B, Flaga A, Adamczyk A. Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases-therapeutic implications. *Int J Mol Sci*, 2020; 21: 9259, doi: 10.3390/ijms21239259.
- Guilhou J, Dereure O, Marzin L, Ouvry P, Zuccarelli F, Debure C, van Landuyt H, Gillet-Terver M, Guillot B, Levesque H, Mignot J, Pillion G, Février B, Dubeaux D. Efficacy of Dafon 500 mg in venous leg ulcer healing: A double-blind, randomized, controlled versus placebo trial in 107 patients. *Angiology*, 1997; 48: 77-85.
- Guntaka RV. New insights to prevent liver fibrosis by targeting YB-1 and collagen genes. *OBM Hepatol Gastroentol*, 2019; 3: 1-16.
- Gupta SC, Kunnumakkara AB, Aggarwal S, Aggarwal BB. Inflammation, a double-edge sword for cancer and other age-related diseases. *Front Immunol* 2018; 9: 2160, doi:10.3389/fimmu.2018.02160.
- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
- Guttmann S, Bernick F, Naorniakowska M, Michgehl U, Groba SR, Socha P, Zibert A, Schmidt HH. Functional characterization of novel ATP7B variants for diagnosis of Wilson disease. *Front Pediatr*, 2018; 6: 106, doi: 10.3389/fped.2018.00106.
- Güven H, Arici A, Simsek O. Flavonoids in our foods: A short review. *J Basic Clin Health Sci*, 2019; 3: 96-106.

- Handy DE, Loscalzo J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radic Biol Med*, 2022; 188, 146-161.
- Hans M, Mathews S, Mücklich F, Solioz M. Physicochemical properties of copper important for its antibacterial activity and development of a unified model. *Biointerphases*, 2016; 11, 018902, doi: 10.1116/1.4935853.
- Harris E. Basic and clinical aspects of copper. *Crit Rev Clin Lab*, 2003; 40: 547-586.
- Harris ED. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr*, 2003; 23: 107-130.
- Harvey LJ, Dainty JR, Hollands WJ, Bull VJ, Beattie JH, Venelinov TI, Hoogewerff JA, Davies IM, Fairweather-Tait SJ. Use of mathematical modeling to study copper metabolism in humans. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81: 807-813, doi: 10.1093/ajcn/81.4.807.
- Hashish EA, Elgaml SA. Hepatoprotective and nephroprotective effect of curcumin against copper toxicity in rats. *Indian J Clin Biochem*, 2016; 31: 70-277.
- Henckens M, Worrell E. Reviewing the availability of copper and nickel for future generations. The balance between production growth, sustainability, and recycling rates. *J Clean Prod*, 2020; 264: 121460.
- Hendrich AB. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacol Sin*, 2006; 27: 27-40, doi: 10.1111/j.1745-7254.2006.00238.x.
- Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact*, 2002; 139: 1-21.
- Hollman PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* 1997; 51: 305-310.
- Huang HI, Shih HY, Lee CM, Yang TC, Lay JJ. In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: Implications for on-site disinfection for hospital infection control. *Water Res*, 2008; 42: 73-80.
- Husak V. Copper and copper-containing pesticides: Metabolism, toxicity and oxidative stress. *J Vasyl Stefanyk Precarpath Nat Univ*, 2015; 2: 38-50.

- Huwait E, Mobashir M. Potential and therapeutic roles of diosmin in human diseases. *Biomedicines*, 2022; 10: 1076, doi: 10.3390/biomedicines10051076.
- Ibrahim SRM, Mohamed GA, Alshali KZ, Al Haidari RA, El-Kholy AA, Zayed MF. Lipoxygenase inhibitors flavonoids from *Cyperus rotundus* aerial parts. *Rev Bras Farmacogn*, 2018; 28: 320-324.
- Inkinen J, Makinen R, Keinanen-Toivola MM, Nordstrom K, Ahonen M. Copper as an antibacterial material in different facilities. *Lett Appl Microbiol*, 2016; 64: 19-26.
- Jain D, Bansal MK, Dalvi R, Urganlawar A, Somani R. Protective effect of diosmin against diabetic neuropathy in experimental rats. *J Integr Med*, 2014; 12: 35-41.
- Jantet G. Chronic venous insufficiency: Worldwide results of the RELIEF study. *Angiology*, 2002; 53: 245-256.
- Jian Z, Guo H, Liu H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Oxidative stress, apoptosis and inflammatory responses involved in copper-induced pulmonary toxicity in mice. *Aging*, 2020; 12: 16867-16886.
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 2011; 283: 65-87.
- Jomova K, Makova M, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Rhodes CJ, Valko M. Essential metals in health and disease. *Chem Biol Interact*, 2022; 367: 110173.
- Kalita J, Kumar V, Chandra S, Kumar B, Misra UK. Worsening of Wilson disease following penicillamine therapy. *Eur Neurol*, 2014; 71: 126-131.
- Kanaze FI, Termentzi A, Gabrieli C, Niopas I, Georgarakis M, Kokkalou E. The phytochemical analysis and antioxidant activity assessment of orange peel (*Citrus sinensis*) cultivated in Greece-Crete indicates a new commercial source of hesperidin. *Biomed Chromatogr*, 2009; 23: 239-249.
- Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 2000; 7: 153-163.
- Kara H. (2016). Veteriner hekimliği alanında civa, kurşun, kadmiyum, arsenik ve bakır toksikasyonları. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 2016; 2: 30-37.

- Kim JJ, Kim YS, Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *J Trace Elem Med Biol*, 2019; 54: 226-231.
- Knaus UG. Oxidants in Physiological Processes. *Handb Exp Pharmacol*, 2021: 264: 27-47.
- Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 2020; 12 (2): 457, doi: 10.3390/nu12020457.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal* 2013; 2013: 162750, doi: 10.1155/2013/162750.
- Kumar V, Kalita J, Bora HK, Misra UK. Relationship of antioxidant and oxidative stress markers in different organs following copper toxicity in a rat model. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016; 293: 37-43.
- Kumar V, Kalita J, Misra UK, Bora HK. A study of dose response and organ susceptibility of copper toxicity in a rat model. *J Trace Elem Med Biol*, 2015; 29: 269-274.
- Kumar V, Pandita S, Sidhu GPS, Sharma A, Khanna K, Kaur P, Bali AS, Setia R. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere*, 2021; 262: 127810, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127810.
- Lamidi IY, Mikail HG, Adamu S, et al. Flavonoid fractions of diosmin and hesperidin mitigate lead acetate-induced biochemical, oxidative stress, and histopathological alterations in Wistar rats. *Toxicol Res*, 2021; 37 (4): 473-484.
- Lawson MK, Valko M, Cronin MTD, Jomová K. Chelators in Iron and Copper Toxicity. *Curr Pharmacol Rep*, 2016; 2: 271-280.
- Le Devehat C. Evaluation of haemorheological and microcirculatory disturbances in chronic venous insufficiency: activity of Daflon 500 mg. *Int J Microcirc Clin Exp*, 1997; 17: 27-33.
- Lewinska A, Siwak J, Rzeszutek I, Wnuk M. Diosmin induces genotoxicity and apoptosis in DU145 prostate cancer cell line. *Toxicol In Vitro*, 2015; 29: 417-425.

- Lifset RJ, Eckelman MJ, Harper EM, Hausfather Z, Urbina G. Metal lost and found: dissipative uses and releases of copper in the United States 1975-2000. *Sci Total Environ*, 2012; 417-418: 138-147.
- Lingen MW, Kumar V. Neoplasia. *Robbins Basic Pathology*, 10th Edition. 2015, Elsevier.
- Liochev SI, Fridovich I. The effects of superoxide dismutase on H_2O_2 formation. *Free Radic Biol Med*, 2007; 42: 1465-1469.
- Liu H, Guo H, Jian Z, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Copper induces oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. *Oxid Med Cell Longev*, 2020; 1359164, doi: 10.1155/2020/1359164.
- Liu JY, Yang X, Sun XD, Zhuang CC, Xu FB, Li YF. Suppressive Effects of copper sulfate accumulation on the spermatogenesis of rats. *Biol Trace Elem Res*, 2016; 174: 356-361.
- Liu XM, Liu YJ, Huang Y, Yu HJ, Yuan S, Tang BW, Wang PG, He QQ. Dietary total flavonoids intake and risk of mortality from all causes and cardiovascular disease in the general population: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Mol Nutr Food Res*, 2017; 61, 1601003, doi: 10.1002/mnfr.201601003.
- Lönnerdal B. Bioavailability of copper. *Am J Clin Nutr*, 1996; 63 (5): 821S-9S.
- Lönnerdal B. Copper nutrition during infancy and childhood. *Am J Clin Nutr*, 1998; 67 (5 Suppl): 1046S-1053S.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-275.
- Luck HS. Catalase. In: Bergmeyer HU (eds), *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, London, 1965; pp: 885-894.
- Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiol Rev*, 2007; 87: 1011-1046.
- Macar O, Macar TK, Çavuşoğlu K, Yalçın E. Protective effects of anthocyanin-rich bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract against copper(II) chloride toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020; 27: 1428-1435.
- Mahurpawar M. Effects of heavy metals on human health. *International Journal of Research-Granthhaalayah*, 1-7.

- Mandil R, Rahal A, Prakash A, Garg SK, Gangwar NK, Swain DK. Ameliorative potential of α -tocopherol against flubendiamide and copper-induced testicular-insult in Wistar rats. *Chem Biol Interact*, 2016; 260: 91-101.
- Manthey J. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*, 2000; 7: 29- S34.
- Mas-Bargues C, Escriva C, Dromant M, Borrás C, Vina, J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Arch Biochem Biophys*, 2021; 709, 108941.
- McEntee K, Skorupski K, Reimer S, Menrath V, Werner P, Dhaliwal R, Teclaw R. Chronic Hepatitis and Hepatic Copper Accumulation Leading to Cirrhosis in a Bedlington Terrier. *Vet Pathol*, 2001; 38: 311-314.
- Mehrandish R, Rahimian A, Shahriary A. Heavy metals detoxification: A review of herbal compounds for chelation therapy in heavy metals toxicity. *J Herb Med Pharmacol*, 2019; 8: 69-77.
- Mikolay A, Huggett S, Tikana L, Grass G, Braun J, Nies DH. Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010; 87, 1875-1879.
- Minich DM, Brown BI. A review of dietary (phyto) nutrients for glutathione support. *Nutrients*, 2019; 11: 2073, doi: 10.3390/nu11092073.
- Mirzaei M, Moosavi M, Mansouri E, Mohtadi S, Khodayar MJ. Diosmin exerts hepatoprotective and antihyperglycemic effects against sodium arsenite-induced toxicity through the modulation of oxidative stress and inflammation in mice. *J Trace Elem Med Biol*, 2023; 78: 127154.
- Moeller SM, Reedy J, Millen AE, Dixon LB, Newby PK, Tucker KL, Guenther PM. Dietary patterns: challenges and opportunities in dietary patterns research. *J Am Diet Assoc*, 2007; 107: 1233-1239.
- Mohammed RA. Diosmin for Treatment of Menorrhagia in Women Using Copper IUD Egypt *J Hosp Med*, 2022; 89: 5728-5732.

- Moriya M, Ho YH, Grana A, Nguyen L, Alvarez A, Jamil R, Ackland ML, Michalczyk A, Hamer P, Ramos D, Kim S, Mercer JF, Linder MC. Copper is taken up efficiently from albumin and alpha2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008; 295: 708-21.
- Mulvihill EE, Burke AC, Huff MW. Citrus Flavonoids as Regulators of Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Annu Rev Nutr*, 2016; 36, 275-299.
- Naso L, Martínez VR, Lezama L, et al. Antioxidant, anticancer activities and mechanistic studies of the flavone glycoside diosmin and its oxidovanadium (IV) complex. Interactions with bovine serum albumin. *Bioorg Med Chem* 2016; 24: 4108-4119.
- Nguyen V, Huynh T, Nguyen T, Hoang T. Oxidation of hesperidin into diosmin using ionic liquids. *Org Commun*, 2019; 12: 101-108.
- Nijveldt RJ, Nood E van, van Hoorn D E, Boelens P G, van Norren K, van Leeuwen P A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001; 74: 418-425.
- Nishito Y, Kambe T. Absorption mechanisms of iron, copper, and zinc: an overview. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2018; 64: 1-7.
- Nkhili E, Loonis M, Mihai S, El Hajji H, Dangles O. Reactivity of food phenols with iron and copper ions: Binding, dioxygen activation, and oxidation mechanisms. *Food & Funct* 2014; 5: 1186-1202.
- Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J Hosp Infect* 2006a; 63: 289-297.
- NRC. National Research Council, Copper, Mineral Tolerance of Animals. Second revised ed. The National Academies Press, Washington, DC. 2005; pp. 134-153.
- NSF. 2021. NSF product and service listings. NSF/ANSI/CAN 60. Drinking water treatment chemicals-health effects. NSF International. <http://info.nsf.org/Certified/PwsChemicals/Listings.asp?ChemicalName=Copper+Sulfate&PlantCountry=UNITED+STATES&>. April 9, 2021, NSF, 2021.

- Nunes AR, Vieira ÍGP, Queiroz DB, Leal ALAB, Morais MS, Muniz DF, Calixto-Junior JT, Coutinho HDM. Use of flavonoids and cinnamates, the main photoprotectors with natural origin. *Adv Pharmacol Sci*, 2018; 28: 5341487, doi: 10.1155/2018/5341487.
- Oh O. Diosmin. *Altern Med Rev*, 2004; 9: 308-311.
- Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 2006; 108: 1388-1394.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res*, 1978; 19: 1053-1057.
- Okocha RO, Adedeji OB. Overview of copper toxicity to aquatic life. *Rep Opin* 2012; 4: 57-68.
- Olivares M, Lönnerdal B, Abrams SA, Pizarro F, Uauy R. Age and copper intake do not affect copper absorption, measured with the use of ⁶⁵Cu as a tracer, in young infants. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76: 641-615.
- Özbolat G, Tuli A. Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2016; 25: 502-521.
- Ozcelik D, Ozaras R, Gurel Z, Uzun H, Aydin S. Copper-mediated oxidative stress in rat liver. *Biol Trace Elem Res*, 2003; 96: 209-215.
- Ozcelik D, Uzun A. Plasma amino acid profile and plasma lipid profile in copper deficiency. *Biol Trace Elem Res*, 2009a; 130: 196-206.
- Ozcelik D, Uzun H. Copper intoxication; antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Biol Trace Elem Res*, 2009b; 127: 45-52.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967; 70: 158-169.
- Panche A N, Diwan AD, S R Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*, 2016; 29: 5: e47, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- Pari L, Srinivasan S. Antihyperglycemic effect of diosmin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother*, 2010; 64: 477-481.

- Parlak Ak T, Tatli Seven P, Gur S, Gul B, Yaman M, Seven I. Chrysin and flunixin meglumine mitigate overloaded copper-induced testicular and spermatological damages via modulation of oxidative stress and apoptosis in rats. *Andrologia*, 2022; 54: e14327, doi: 10.1111/and.14327.
- Pecking AP. Efficacy of Daflon 500 mg in the treatment of lymphedema (secondary to conventional therapy of breast cancer). *Angiology*, 1997; 48: 93-98.
- Pecking AP. Evaluation by lymphoscintigraphy of the effect of a micronized flavonoid fraction (Daflon 500 mg) in the treatment of upper limb lymphedema. *Int Angiol*, 1995; 14: 39-43.
- Peng X, Dai C, Zhang M, Das Gupta S. Molecular mechanisms underlying the protective role of quercetin on copper sulfate-induced nephrotoxicity in mice. *Front Vet Sci*, 2021; 7: 586033.
- Percival SS. Copper and immunity. *Am J Clin Nutr*, 1998; 67: 1064-1068.
- Pereira TCB, Campos MM, Bogo MR. Copper Toxicology, Oxidative Stress and Inflammation using Zebrafish as Experimental Model. *J Appl Toxicol*, 2016; 36: 876-885.
- Perumal S, Langeshwaran K, Selvaraj J, Ponnulakshmi R, Shyamaladevi B, Balasubramanian MP. Effect of diosmin on apoptotic signaling molecules in N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma in experimental rats. *Mol Cell Biochem*, 2018; 449: 27-37.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 2000; 63: 1035-1042.
- Pizzorno J. Glutathione. *Integr Med (Encinitas)*, 2014; 13: 8-12.
- Pohanka, M. Copper and copper nanoparticles toxicity and their impact on basic functions in the body. *Bratisl Lek Listy*, 2019; 120: 397-409.
- Pourahmad J, O'Brien PJ, Jokar F, Daraei B. Carcinogenic metal-induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicol in Vitro*, 2003; 17: 803-810.
- Pourahmad J, Ross SJ, O'Brien PJ. Lysosomal involvement in hepatocyte cytotoxicity induced by Cu but not Cd. *Free Radic Biol Med*, 2001; 30: 89-97.
- Presley RH, Macintire DK. Copper toxicity in dogs. *Stand Care. Emerg Critical Care Med*, 2008; 10 (1): 5-9.

- Prince PSM. A biochemical, electrocardiographic, electrophoretic, histopathological and in vitro study on the protective effects effects of (-) epicatechin in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *Eur J Pharmacol*, 2011; 671: 95-101.
- Queenthly S, John B. Diosmin exhibits anti-hyperlipidemic effects in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *Eur J Pharmacol*, 2013; 718: 213-218.
- Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 4003-4008.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats* (10th ed), Saunders Ltd. 2007.
- Ramelet AA. Pharmacologic aspects of a phlebotropic drug in CVI-associated edema. *Angiology*, 2000; 51: 19-23.
- Rana MN, Tangpong J, Rahman MM. Toxicodynamics of lead, cadmium, mercury and arsenic-induced kidney toxicity and treatment strategy: A mini review. *Toxicol Rep*, 2018; 5: 704-713.
- Rehman M, Liu L, Wang Q, Saleem MH, Bashir S, Ullah S, Peng D. Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019; 26: 18003-18016.
- Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1995; 1271: 67-74.
- Rohr U, Senger M, Selenka F, Turley R, Wilhelm M. Four years of experience with silver-copper ionization for control of legionella in a German university hospital hot water plumbing system. *Clin Infect Dis*, 1999; 29: 1507-1511.
- Román LE, Gomez ED, Solís JL, Gómez MM. Antibacterial cotton fabric functionalized with copper oxide nanoparticles. *Molecules*, 2020; 25: 5802, doi: 10.3390/molecules25245802.
- Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I. Nitration of albumin: A marker of oxidative stress in inflammatory diseases. *Amino Acids*, 2004; 26: 609-617.

- Russo R, Chandradhara D, De Tommasi N. Comparative bioavailability of two diosmin formulations after oral administration to healthy volunteers. *Molecules*, 2018; 23: 2174, doi: 10.3390/molecules23092174.
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol*, 2003; 65: 1035-1041.
- Saravu K, Jose J, Bhat MV, Jimmy B, Shastry BA. Acute ingestion of copper sulphate: A review on its clinical manifestations and management. *Indian J Crit Care Med*, 2007; 11: 74-80.
- Scibior-Bentkowska D, Cieczot H. Catalase: Structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2006; 60: 170-80
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 1968; 25: 192-205.
- Senthamizhselvan O, Manivannan J, Silambarasan T, Raja B. Diosmin pretreatment improves cardiac function and suppresses oxidative stress in rat heart after ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol*, 2014; 5: 131-137.
- Serafim C, Araruna ME, Júnior EA, Diniz M, Hiruma-Lima C, Batista L. A review of the role of flavonoids in peptic ulcer (2010-2020). *Molecules*, 2020; 25: 5431, doi: 10.3390/molecules25225431.
- Sharmila Queenthy S, Stanely Mainzen Prince P, John B. Diosmin prevents isoproterenol-induced heart mitochondrial oxidative stress in rats. *Cardiovasc Toxicol*, 2018; 18: 120-130.
- Sharp PA. The centrality of RNA. *Cell*, 2009; 136: 577-580.
- Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem*, 2007; 55: 9427-9435.
- Shu Z, Yang Y, Yang L, Jiang H, Yu X, Wang Y. Cardioprotective effects of dihydroquercetin against against ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via the PI3K/Akt pathway. *Food Funct*, 2019; 10: 203-215.

- Siemering G, David, N, Hay Worth J, Franz A. 2005. Aquatic Pesticides Monitoring Program Literature Review, San Francisco Estuary Institute, California, 10-20, 35-45.
- Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biol*, 2017; 11: 613-619.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 2000; 5: 415-418.
- Sirlak M, Akar A, Eryilmaz S, Cetinkanat EK, Ozcinar E, Kaya B, Elhan AH, Ozyurda U. Micronized purified favonoid fraction in pretreating CABG patients. *Texas Hear Inst J*, 2010; 37: 172-177.
- Sithisarn P, Michaelis M, Schubert-Zsilavecz M, Cinatl J. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. *Antiviral Res*, 2013; 97: 41-48.
- Smith D, Strupp BJ. The scientific basis for chelation: animal studies and lead chelation. *J Med Toxicol*, 2013; 9: 326-338.
- Smith PD. Neutrophil activation and mediators of inflammation in chronic venous insufficiency. *J Vasc Res*, 1999; 36 Suppl 1: 24-36.
- Sönmez F, Oduncu M, Turan M, Erdem E, Türkmen N. A study on the effects of copper accumulation in some plant tissues on copper content of plants. *Fresenius Environ Bull*, 2006; 15: 107-112.
- Speeti M, Eriksson J, Saari S, Westermarck E. Lesions of subclinical Doberman hepatitis. *Vet Pathol*, 1998; 35: 361-369.
- Srinivasan S, Pari L. Ameliorative effect of diosmin, a citrus flavonoid, against streptozotocin-nicotinamide-generated oxidative stress-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact*, 2012; 195: 43-51.
- Stern, AC. Copper and Copper Alloys, İçinde: *Mechanical Engineers' Handbook*, Volume 1: Materials and Engineering Mechanics ASM International, 2010, 117-227.
- Sternlieb I.J. Hepatic copper toxicosis. *Gastroenterol Hepatol*, 1989; 4: 175-181.
- Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, 1995; 18: 321-336.

- Struckmann J. Pharmacological and pharmacoclinical properties of Pharmacologic properties of Daflon 500 mg. *Angiology*, 1994; 45: 524-530
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 1988; 34: 497-500.
- Taboada J, Thompson LJ. Copper hepatopathy, In: Tilley LP, Smith FWK, MacMurray AC (Eds), *The 5 Minute Veterinary Consult: Canine and Feline*. Williams and Wilkins, Baltimore MD, 1997; pp. 478-479.
- Tanrikulu Y, Kismet K, Serin Kilicoglu S, et al. Diosmin ameliorates intestinal injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Bratisl Med J*, 2011; 112: 545-551.
- Tapia L, González-Agüero M, Cisternas MF, Suazo M, Cambiazo V, Uauy R, González M. Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochem J*, 2004; 378: 617-624.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*, 2003; 57: 386-398.
- Tarnacka B, Jopowicz A, Maślińska M. Copper, Iron, and Manganese Toxicity in Neuropsychiatric Conditions. *Int J Mol Sci*, 2021; 22: 7820, doi: 10.3390/ijms22157820.
- Taylor AA, Tsuji JS, Garry MR, McArdle ME, Goodfellow WL Jr, Adams WJ, Menzie CA. Critical review of exposure and effects: Implications for setting regulatory health criteria for ingested copper. *Environ Manage*, 2020; 65: 131-159.
- Tegoni M, Valensin D, Toso L, M Remelli M. Copper chelators: Chemical properties and bio-medical applications. *Curr Med Chem*, 2014; 21: 3785-3818.
- Tekeli MY, Eraslan G, Çakır Bayram L, Soyer Sarıca Z. Effect of diosmin on lipid peroxidation and organ damage against subacute deltamethrin exposure in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021; 28: 15890-15908.
- Temiz MA, Temur A, Akgeyik Y, Uyar A. Protective effect of celtis tournefortii against copper-induced toxicity in rat liver. *Acta Veterinaria Brno*, 2021; 90: 91-98.

- Thomas DD, Espey MG, Vitek MP, Miranda KM, Wink DA. Protein nitration is mediated by heme and free metals through Fenton-type chemistry: An alternative to the NO/O reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 12691-12696.
- Thomson LJ. Copper. In: Gupta R, ed. *Veterinary Toxicology Basic Clinical Principles*. 1st ed. New York: Elsevier Inc; 2007; p. 427-429.
- Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharma Exp Ther*, 1995; 272: 1011-1015.
- Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB, Kruidering-Hall M. *Pharmacology Examination & Board Review*. New York: McGraw-Hill Medical, 2010: 469-483.
- Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson BG, Jaremko M. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*, 2020; 25: 5243, doi: 10.3390/molecules25225243.
- Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med*, 2005; 26: 268-298.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 2005; 12: 1161-1208.
- Van den Berghe PV, Klomp LW. 2009. New developments in the regulation of intestinal copper absorption. *Nutr Rev*, 67: 658-672, doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00250.x.
- Vezzoli A, Mrakic-Spota S, Dellanoce C, Montorsi M, Vietti D, Ferrero ME. Chelation therapy associated with antioxidant supplementation can decrease oxidative stress and inflammation in multiple sclerosis: Preliminary results. *Antioxidants (Basel)*, 2023; 12: 1338, doi: 10.3390/antiox12071338.
- Vicente O, Boscaiu M. Flavonoids: Antioxidant compounds for plant defence... and for a healthy human diet. *Not Bot Horti Agrobo Not Bot Horti Agrobot Cluj-Na*, 2018; 46: 14-21.
- Videla LA, Fern'andez V, Tapia G, Varela P. Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: Role of kupffer cells. *BioMetals*, 2003; 16: 103-111.

- Vincent M, Hartemann P, Engels-Deutsch M. Antimicrobial applications of copper. *Int J Hyg Environ Health*, 2016; 219: 585-591.
- Wang L, Chen Q, Zhu L, Li Q, Zeng X, Lu L, Hu M, Wang X, Liu Z. Metabolic disposition of luteolin is mediated by the interplay of UDP-glucuronosyltransferases and catechol-O-methyltransferases in rats. *Drug Metab Dispos*, 2017; 45: 306-315.
- Weiskirchen S, Kim P, Weiskirchen R. Determination of copper poisoning in Wilson's disease using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Ann Transl Med*, 2019; 7: S72, doi: 10.21037/atm.2018.10.67.
- Weiss SJ, Lobuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest*, 1982; 47: 5-18.
- Wen K, Fang X, Yang J, Yao Y, Nandakumar KS, Salem ML, Cheng K. Recent Research on Flavonoids and their Biomedical Applications. *Curr Med Chem*, 2021; 28: 1042-1066.
- Willhite CC, Katz PI. Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide. *J Appl Toxicol*, 1984; 4: 155-160.
- Williams DM. Copper deficiency in humans *Semin Hematol*, 1983; 20 (2): 118-128.
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med*, 1975; 85: 337-341.
- Wuana RA, Okieimen FE. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *Int Sch Res Notices*, Vol. 2011, article ID: 402647, 20 pages, doi: 10.5402/2011/402647.
- Xue H, Xu M, Gong D, Zhang G. Mechanism of flavonoids inhibiting xanthine oxidase and alleviating hyperuricemia from structure-Activity relationship and animal experiments: A review. *Food Frontiers*, 2023; 1-23.
- Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar, C. The immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, 2018, 10, E1618, doi: 10.3390/nu10111618.
- Yoshida Y, Furuta S, Niki E. Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochim Biophys Acta*, 1993; 1210: 81-88.

- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol*, 1979; 135: 372-376.
- Yu W, Liao J, Yang F, Zhang H, Chang X, Yang Y, Bilal RM, Wei G, Liang W, Guo J, Tang Z. Chronic tribasic copper chloride exposure induces rat liver damage by disrupting the mitophagy and apoptosis pathways. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021; 212: 111968, doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.111968.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33: 337-349.
- Zeng N, Zhang G, Hu X, Pan J, Gong D. Mechanism of fisetin suppressing superoxide anion and xanthine oxidase activity. *J Funct Foods* 2019; 58, 1-10, doi: 10.1016/j.jff.2019.04.044.
- Zhang HJ, Deng AJ, Zhang ZH, Yu ZH, Liu Y, Peng S, Wu LQ, Qin HL., Wang WJ. The protective effect of epicatechin on experimental ulcerative colitis in mice is mediated by increasing antioxidation and by the inhibition of NF- κ B pathway. *Pharmacol Rep*, 2016; 68: 514-520.
- Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 2016: 4350965, doi: 10.1155/2016/4350965.
- Zhang SZ, Noordin MM, Rahman SOA, Haron MJ. Effects of copper overload on hepatic lipid peroxidation and antioxidant defense in rats. *Vet Hum Toxicol*, 2000; 42: 261-264.
- Zheng Y, Zhang R, Shi W, Li L, Liu H, Chen Z, Wu L. Metabolism and pharmacological activities of the natural health-benefiting compound diosmin. *Food Funct*, 2020; 11: 8472-8492, doi: 10.1039/d0fo01598a.



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 14.12.2016

Toplantı Sayısı: 11

Karar No:16/148

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 14.12.2016 tarihinde
Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneyel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	KATILMADI
Asiye GÖKBELN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji A.D.'dan Prof. Dr. Gökhan ERASLAN tarafından sunulan "Ratlarda Subakut Bakır Maruziyetine Karşı Diosminin Etkisinin Değerlendirilmesi." başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

RATLARDA SUBAKUT BAKIR MARUZİYETİNE KARŞI DİOSMİNİN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 16	% 1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr	% 12
İnternet Kaynağı		
2	abis-files.erciyes.edu.tr	% 1
İnternet Kaynağı		
3	www.researchgate.net	% 1
İnternet Kaynağı		
4	doczz.biz.tr	% 1
İnternet Kaynağı		
5	bitkiara.com	% 1
İnternet Kaynağı		

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

< %1

Bibliyografyayı Çıkart

Üzerinde

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Ömer Faruk KARTAL

Uyruğu : T.C.

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2015

YABANCI DİL

İngilizce