

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

NİKEL VE OKSİDATİF STRES

111879

111879

UZMANLIK TEZİ

DR. SAKİNE CANDAN

TEZ YÖNETİCİSİ

YRD.DOÇ.DR. BANU SANCAK

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA 2002

TEŞEKKÜR

İhtisasım ve tezimin hazırlaması süresince her konuda çok büyük yardım ve desteğini aldığım tez yöneticim ve değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Banu Sancak'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tezimin deney aşamasında bilgisini esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr.Ayşe Bilgihan'a ve uzmanlık eğitimim sırasında emeği geçen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Nedret Kılıç ve Öğretim Üyelerine saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca deney aşamasında emeğini esirgemeyen Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'nda görevli Uzm.Dr. Billur Demiroğulları'na, her türlü desteği, anlayışı, hoşgörüyü gösteren sevgili arkadaşım Biyolog Adem Ünal'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca çok değerli anneme ve babama çalışmam süresince gösterdikleri anlayış ve destek için teşekkürlerimi bildirmeyi bir borç bilirim.

Dr. Sakine Candan

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ	3
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1.Serbest Radikaller	5
2.1.1. Hücrelerde serbest radikal üretimi	11
2.1.2. Serbest radikallerin hasar verici reaksiyonları	15
2.2. Antioksidan Sistemler	18
2.2.1. Enzimatik antioksidanlar	20
2.2.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	25
2.3. NİKEL.....	27
3. GEREÇVE YÖNTEM.....	35
3.1. Kullanılan gereçler.....	35
3.1.1. Deney hayvanları	35
3.1.2.Kullanılan aletler.....	35
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	36
3.2. Uygulanan yöntemler.....	36

3.2.1. Deney hayvanlarının hazırlanması.....	36
3.2.2. Metodların uygulanması	37
3.2.3. Sonuçların analizi	44
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
6. ÖZET	59
7. KAYNAKLAR.....	60

1. GİRİŞ

Serbest radikaller organizmanın normal fonksiyonu sırasında açığa çıkabildiği gibi ısı, ışık, iyonize radyasyon, alışkanlık yapan maddeler, çevresel ajanlar ile organik yapıların hasar görmesiyle de ortaya çıkabilmektedir (3,11).

Serbest radikaller savunma sisteminin kapasitesini aştığında hücrelerin lipit, protein, DNA, karbohidrat, enzim ve tüm önemli bileşiklerine etki eder. En çok etkilenen bileşikler lipitlerdir. Hücre membranları okside edici radikaller tarafından kolayca ' etkilenen poliansature yağ asitlerinden zengindir. Lipit peroksidasyonu olarak bilinen poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı oldukça hasar vericidir. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen hasar geri dönüşümsüzdür (3,11,17). DNA da okside edici ajanlar tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir.

Serbest radikallerin pek çok hastalığın etyopatogenezinde rol aldığı bilinmektedir. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriasis, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi bir çok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (3,30).

Nikel, çevremizdeki havada, suda ve diyetimizde mevcuttur. Nikel ürünleri (paslanmaz çelik, nikel alaşımı ve nikel-dökme demir) para, elektrikli eşyalar, tamir aletleri, makineler, silahlar ve ev eşyalarında kullanılmaktadır. Nikelin mücevver yapımında yaygın kullanımı; nikel duyarlı kişilerde kontakt dermatite neden olmaktadır (10,42).

Çözünen nikel tuzlarıyla 0.5-2.0 mg/m³ dozunda karşılaşıldığında akciğer, larinks gibi nasal kavite kanserlerine karşı artmış bir risk söz konusudur (7, 21, 63, 69). Divalent nikel bileşikleri nükleik asit ve proteinleri içeren çeşitli makromoleküller üzerindeki sülfidril, azo ve amino gruplarına bağlanır. Nikelin, demir ve bakırın intrasellüler bağlanma yerlerine bağlanıp onların yerlerini alarak Fe⁺²/Fe⁺³ veya Cu⁺¹/Cu⁺² redoks çiftleri tarafından katalize edilen Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve yine nikel aracılıklı hücre savunma sistemini oluşturan antioksidanların tüketildiği ya da inhibe edildiği düşünülmektedir (14, 22, 34, 35, 36).

Bu çalışma nikelin lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan Malondialdehit ve hücre savunma sistemini oluşturan Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon ve Süperoksit Dismutaz üzerine etkisini göstermek amacıyla ratlara nikel klorit ve nikel şelatörü olan cyclam verilerek yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 SERBEST RADİKALLER

Normal kimyasal bağ; zıt spin gösteren tek moleküler orbitali paylaşan bir çift elektrondan oluşur ve kararlı bir yapı gösterir. Bu kararlı yapı çiftleşmemiş elektron bulundurduklarında bozulur. Son yörüngelerinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron bulunduran molekül ya da molekül parçalarına serbest radikal denir (3, 11, 17, 32). Bu çiftleşmemiş olan elektron, serbest radikale kimyasal olarak reaktivite kazandırır. Bu radikaller vücudumuzdaki hücrelerde ve dokularda çeşitli reaksiyonlar süresince üretildiği gibi ısı, ışık, iyonize radyasyon, alışkanlık yapan maddeler (alkol ve uyuşturucular), çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar) ile organik yapıların hasar görmesi ile de meydana gelmektedir (3, 11).

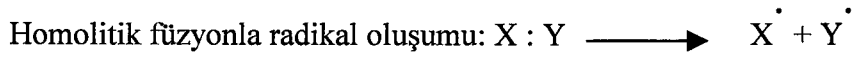
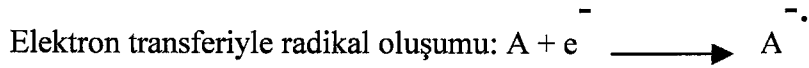
Serbest radikaller üç yolla oluşur.

1. Normal bir molekülün kovalent bağının ortaklanmamış elektron kalacak şekilde homolitik parçalanması
2. Normal bir molekülün tek bir elektronu kaybetmesi
3. Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi

Elektron transferi; biyolojik sistemlerde yüksek sıcaklık, ultraviyole ışık veya iyonize radyasyondan elde edilecek yüksek enerji seviyelerine ihtiyaç duyan homolitik füzyondan çok daha yaygındır. Heterolitik füzyon gibi elektronların kovalent olarak ikiye ayrılmış ve ana molekülün kısımlarının sadece birinde kaldığı reaksiyonlarda, serbest radikaller oluşmamakta,

iyonlar oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler (17).

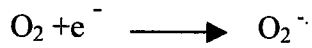
Serbest radikaller ve iyonların oluşturduğu reaksiyonlar şöyledir.



Eğer iki radikal reaksiyona girerse, her iki radikal de ortadan kaldırılır. Eğer bir radikal, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona girerse, başka bir serbest radikali oluşturur. Serbest radikallerin bu özellikleri onların zincir reaksiyonu oluşturmalarına olanak sağlar. Doymamış yağ asitlerinin moleküler oksidasyonla peroksidasyonu, serbest radikal oluşumunu başlatabilir. Radikaller ayrıca hem oksidan hem de redüktan olarak rol oynayabilmektedirler (17, 29, 46).

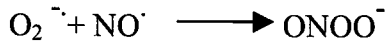
Serbest radikal kimyasındaki en önemli moleküllerden biri olan oksijenin elektron dağılımında, elektronlardan ikisi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen “diradikal” olarak düşünülür. Oksijenin bu diradikal yapısı diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, genelde radikal olmayan türlerle nispeten daha yavaş reaksiyona girer (17).

Biyolojik sistemlerde oksijenin bir elektron alarak redüklenmesi sonucunda, süperoksit serbest radikal anyonu ($O_2^{\cdot -}$) meydana gelir. Her ne kadar serbest bir radikal ise de özellikle hasar oluşturuca bir tür değildir. Bunun nedeni yarı ömrünün uzun olmasına karşın bulunduğu yerden uzaklaşma yeteneğinin az olmasıdır. Süperoksitin asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının redükleyicisi olmasıdır (3, 17).



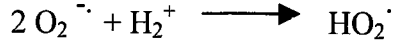
Süperoksit anyonu, hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c, kinonlar ve nitroblue tetrazolyumu redüklerken, askorbik asit, katekolaminler, hemoproteinler, tiyoller ve redüklenmiş geçiş metallerini oksitler (3, 29).

Süperoksitin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksitle birleşmesi reaktif bir oksijen türü olan peroksinitriti meydana getirir.

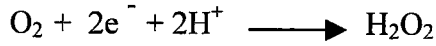


Böylece nitrik oksitin normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi başka toksik ürünlere dönüşürler.

$O_2^{\cdot -}$ radikaline direkt olarak bir proton verilerek perhidroksil radikali ($HO_2^{\cdot}$) oluşturulabilir. Düşük pH'da süperoksit radikali perhidroksil radikali oluşturmak üzere protonlanır, bu ürün daha reaktif ve oksidandır. Fakat fizyolojik pH'daki protonlanmış formu %1 den daha azdır (3,17).



Oksijenin iki elektronla redüklenmesi ve ya $\text{O}_2^{\cdot -}$ radikaline bir elektron ilave edilmesiyle hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur.



H_2O_2 biyolojik sistemlerde sıklıkla süperoksit radikalının üretimiyle oluşturulmaktadır. İki süperoksit radikali hidrojen peroksit ve oksijen oluşturmak için birbiriyle reaksiyona girebilir.

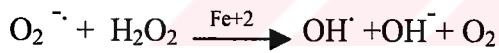


Süperoksit radikali radikal olmayan ürünler oluşturduğu için bu reaksiyon dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir. Bu işlem spontan olarak ya da süperoksit dismutaz enziminin (SOD) katalizlediği reaksiyonla gerçekleşebilir (17). SOD enzimi yokluğunda reaksiyon nonenzimatik olarak gerçekleşir. Fakat hızı enzimatik olandan daha yavaştır (29, 32). Hidrojen peroksit serbest radikal değildir. Ancak reaktif oksijen türleri kategorisine dahil edilmektedir. Reaktif oksijen türleri sadece oksijen serbest radikallerini içermeyip, oksijen radikal üretiminde görev alan radikal olmayan oksijen türevlerini de içermektedir.

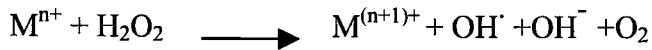
Hidrojen peroksite bir elektron eklenirse hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$) ve hidroksil anyonu (OH^-) oluşur (87).



Hidrojen peroksit metal iyonları (Fe, Cu) varlığında çok reaktif hidroksil radikali oluşturabildiği için önemlidir. Fe^{+3} iyonunun $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikali tarafından indirgenmesiyle oluşan Fe^{+2} hidrojen peroksitle reaksiyona girerek $\text{OH}^\cdot$ radikalini meydana getirir. Bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak bilinir. $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalinin hidrojen peroksitle Fe^{+2} katalizli reaksiyonu da Haber Weiss reaksiyonu olarak adlandırılmıştır. Bu reaksiyonda hidroksil radikali oluşur (11,17).



Genelde canlı organizmada hidroksil radikalinin iyonize radyasyona maruz kalma dışında, hidrojen peroksitin metal bağımlı yıkımından meydana geldiği düşünülmüştür.



Buradaki M^{+n} bir metal iyonudur ve titanyum, demir, kobalt, krom, vanadyum veya nikel olabilmektedir (32).

Hidroksil radikali kolaylıkla difüze olabilen ve bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen diğer radikaller içinde en kuvvetli oksidan radikaldır. Çok kısa ömürlüdür. Küçük miktarlarda bile üretildiği yerde aşırı hasar yapabilecek kapasiteye sahiptir (17).

Singlet oksijen; reaktif oksijen türleriyle, özellikle oksijen serbest radikalleriyle sıkça birlikte anılan bir diğer nonradikaldır. Eşlenmemiş elektron taşımamaktadır (17). Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana gelebildiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olmaktadır (3). Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Delta ve sigma olmak üzere 2 tipi vardır. Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük seviyelerine inmesiyle ışık yayar. Bazı hastalıklar fazla singlet oksijen oluşumuna neden olmaktadır. Porfirin metabolizmasındaki defektlere bağlı oluşan porfirialar buna bir örnektir. Tetrasiklinler, nonsteroid antiinflamatuvarlar, birtakım kozmetik ürünleri singlet oksijen oluşumuna yol açarak fotosensitizasyon reaksiyonlarıyla cilt hasarlarına neden olmaktadır.

Singlet oksijen süperoksit radikalinin dismutasyonu ve nötrofillerin respiratuvar burst aktivitesi sırasında oluşturulur (32).

Singlet oksijenin kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelmesi ve bunun ölçülmesiyle reaktif oksijen türlerinin direkt tayini yapılabilmektedir (3, 32).

Karbon merkezli radikaller lipid, nükleik asit, karbohidrat veya protein gibi biyolojik moleküllerle okside edici $\text{OH}^\cdot$ radikalın reaksiyonuyla oluşur. Bunlar çok hızlı bir şekilde oksijenle birleşerek peroksil radikalini ($\text{ROO}^\cdot$) oluşturur. Peroksil radikali lipid

peroksidasyonunu başlatır. Bu peroksil radikallerinden alkoksil ($\text{RO}\cdot$) radikalleri de oluşabilir. Sülfür atomu serbest radikalın merkezinde olursa til radikali ($\text{RS}\cdot$) olarak adlandırılır (17).

2.1.1 Hücrelerde serbest radikal üretimi

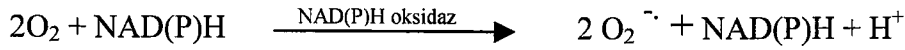
İyonize radyasyonun etkisi gibi nadir durumlar dışında serbest radikaller hücrelerde genellikle elektron transfer reaksiyonları tarafından üretilir. Bu reaksiyonlar ya enzimlerin etkisiyle ya da geçiş metal iyonlarının redoks kimyası yoluyla nonenzimatik olarak gerçekleşir.

Normal şartlar altında hücrelerdeki esas serbest radikal kaynağı elektron transport zincirinden elektron sızmasıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.

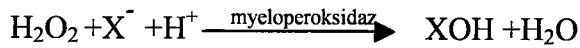
Bir çok enzimin katalitik siklusları sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidaz olup normalde NAD bağımlı dehidrojenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine neden olmaz. Fakat invivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrojenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalının üretimine sebep olur (87).

Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğu aynı olup, süperoksit radikali oluşturur. Benzer şekilde dihidrooratat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, aminoasit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de radikal oluşmasına sebep olur (3).

Aktive olmuş fagositler, bakterisidal rollerinin sonucu olarak plazma membranlarındaki NAD(P)H oksidaz ile süperoksit üretirler. Fagositik hücrelerin uyarılması sonucu oluşan yabancı partikülleri tanıma ve reaksiyon serisi respiratuvar burst olarak adlandırılır (11, 72). Respiratuvar burst hedef hücrelerin yıkımı için hücreye okside edici ajanlar sağlar. NAD(P)H oksidaz enzimi aktive olduğunda plazma membranı veya dış yüzeyde oksijen elektronları alır ve süperoksit radikali oluşturur.



Respiratuvar burst sırasında tüketilen oksijenin çoğu süperoksit ara ürünü üzerinden fagositler tarafından bakterisidal bir ajan olarak kullanılan hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Nötrofil ve monositler primer lizozomal granüllerinde bir hem enzimi olan myeloperoksidaz içerirler. Hidrojen peroksitin myeloperoksidaz ve bir halit iyonu (klorür, iyodür ve bromür) ile kombinasyonu güçlü antimikrobiyal etki gösteren hipohalöz asitleri (XOH) oluşturur. Hipohalöz asitler ve serbest radikaller mikroorganizmalara karşı toksiktir (13, 87).

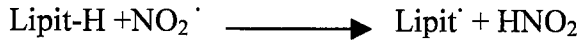


Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynaklarıdır. Bu organeldeki D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz, L- hidroksil asit oksidaz ve yağ açıl KoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine sebep olurlar. Ancak peroksizomlarda katalaz aktivitesi de çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar hidrojen peroksit geçtiği bilinmemektedir.

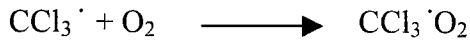
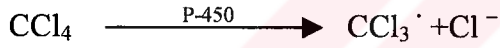
Hayvan hücrelerindeki süperoksitin başka bir kaynağı da, askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonudur (3, 17, 26).

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda artırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretir ya da antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler 4 grupta toplanırlar.

- 1- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azotdioksit gazı ($\text{NO}_2^\cdot$) buna bir örnektir. Bu radikal iyi bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.



- 2- Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Mesala bir toksik madde olan karbontetraklorür karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüştürülür.



Böylece reaktif serbest radikal üretimi, karaciğerde antioksidan savunmaları aşar. Bu da hücrel membranların oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.

- 3- Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun tipik bir örneği paraquat'tır. Özellikle karaciğerde biriken paraquat, bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol miktarda süperoksit üretilmiş olur. Diyabetik bir ajan olan alloksan da paraquat gibi etki eder.

Yine antikanserojen bir madde olan doxorubicin, DNA replikasyonunu inhibe ederken önemli miktarda süperoksit ve hidroksil radikali üretimine de sebep olur.

- 4- Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Mesela parasetamolun karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolizması sonucu glutatyonla reaksiyona giren ve glutatyonun miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

Bir hem proteini olan sitokrom P-450, bir çok endojen bileşiğin ve ksenobiyotiğin hidroksilasyonunu katalize eder. Bu reaksiyonlarda oksijen kaynağı olarak moleküler oksijeni kullandığı gibi peroksitleri (ROOH) de kullanabilir. Böylece bir peroksidaz gibi etki eder. Ancak alkol ve asetonla indüksiyonunda olduğu gibi bazı hallerde, sitokrom P-450 aşırı miktarda süperoksit üreten bir izoenzime dönüşür.

Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asitin salınımına yol açar. Araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelir.

Serbest radikallerle prostaglandin mekanizması birbiriyle yakın ilişkilidir. Gerçekten reaktif oksijen metabolitleri fosfolipaz aktivasyonu yoluyla prostaglandin $E_2(PGE_2)$, F_2 , 6-keto $PGF_{1\alpha}$ ve Tromboksan sentezini sağlarlar. PGE_2 ve Prostasiklin (PGI_2) adenilat siklazı aktive ederek cAMP sentezini artırır. Süperoksit de aynı etkiyi gösterir. Bu da reaktif oksijen metabolitleri prostaglandin sentezi yoluyla cAMP'ı da artırdıklarını göstermektedir (3).

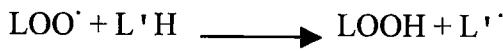
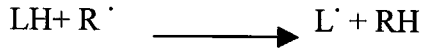
2.1.2 Serbest radikallerin hasar verici reaksiyonları

Serbest radikaller, hücrelerin lipit, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır (3, 27).

Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken α -1 antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini inaktive ederler.

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomolekül sınıfının hemen tamamı serbest radikallerce etkilenir. Ancak belki de en kolay etkilenen bileşikler lipitlerdir. Hücre membranları okside edici radikaller tarafından kolayca etkilenen poliansature yağ asitlerinden (PUFAs) zengindir. Lipit peroksidasyonu olarak bilinen PUFAs'nin oksidatif yıkımı oldukça hasar vericidir. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu (başlatıcı oksitleyici radikal $R^{\cdot}$) membran yapısında bulunan poliansature yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırması ile başlar. Bunun sonucu olarak yağ asidi zinciri bir lipit radikali ($L^{\cdot}$) niteliğini kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir. Bu lipit radikale moleküler oksijen eklenince yağ asit peroksil radikali oluşur. Peroksil radikalleri zincir reaksiyonlarının taşıyıcılarıdır. Membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini okside edebilir ve yeni zincirler başlatabilirler. Kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit

hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder (3, 11, 17).



Lipit hidroperoksit yıkımı geçiş metal iyonları katalizini içerir, bunlar lipit hidroperoksil ve lipit alkoksil radikalini açığa çıkarır. Aldehitler lipit hidroperoksitlerin yıkılmasıyla oluşur ve çoğu özellikle de hidroksialkenler biyolojik olarak aktiftir. Bu grubun en iyi bilinen üyesi hidroksialkenaldır. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup, hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbitürik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu metod lipit peroksidasyonlarının ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asiti oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Fakat lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir.

Lipitlerden araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipit peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna ise “non enzimatik lipit peroksidasyonu” adı verilir. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran geçirgenliği ve akışkanlığı ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da

deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, malondialdehitin niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (3, 17, 53).

Proteinler ise serbest radikal saldırılarına doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlıdır. Radikallerin proteinlere saldırıları çok yoğun olmadıkça, fazla hasar oluşturmaz. Çünkü bunlarda hasar oluşturunca zincir reaksiyonlarının oluşma ihtimali çok azdır. Serbest radikaller proteinlerdeki hasar oluşturunca etkilerini, proteinlerde radikal birikimi yapıp hücrenin canlılığını büyük ölçüde etkileyerek ve proteinlerin spesifik bölgelerinde birikerek gösterirler. Protein geçiş metal iyonunu özel bir bölgeden bağlarsa, geçiş metal iyonu hidrojen peroksitle reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Hidroksil radikali de hasar verici etkisini metal bağlanma bölgesinde veya ona yakın bölgelerde gösterir. Bakırın histidin kalıntısına bağlanması buna en iyi örnektir ve bu durum yere spesifik hasar olarak bilinmektedir (17). Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immünoglobülin G ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler.

Serbest radikallerin yaşlanma ve tümör oluşumunda rol aldığı son çalışmalarda gösterilmiştir. Çok basamaklı bir seyir olan karsinogenezisin onkojenik teorisinde serbest radikal reaksiyonlarının önemli etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. İnsan vertebra hücre DNA'sında normal olarak inaktif ve transkripsiyonları kısıtlı olan onkojenler mevcuttur. Onkojenik aktivatörler serbest radikal mekanizmasıyla DNA zincirinde kırıklar ve baz

mutasyonları oluşturarak, başlatıcı ve ilerletici reaksiyonları meydana getirirler (11). Karsinogenezis oluşumunda yer alan karsinogenik maddelerin oluşturduğu etki mekanizmalarının serbest radikal aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (11, 17).

DNA okside edici radikaller tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (17). Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre membranına ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedeftir (3, 17).

Serbest radikallerin bu anlatılan etkileri nedeniyle pek çok hastalığın etyopatogenezinde rol aldığı bilinmektedir. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriasis, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hastalıkların çoğunda serbest radikallerin hastalığın sebebi mi yoksa sonucu olarak mı meydana geldiği tam olarak bilinmemektedir (3, 31).

2.2 ANTİOKSİDAN SİSTEMLER

Hücrelerde serbest radikal üretiminin kaçınılmaz olması ve hasar verici etkilerinin bulunması serbest radikallerin bu sağlığa zararlı etkilerine karşı savunma mekanizmalarının gelişmesine neden olmuştur (17).

Serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı yani oksidatif denge sağlandığı sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık savunma azalır veya zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulur ve serbest radikaller ile prooksidan ajanlara bağlı olarak oksidatif stres ortaya çıkar (6, 65, 71).

Antioksidanlar etkilerini birkaç yolla gösterirler. Bunlar ;

1. O_2 'i uzaklaştırarak veya lokal O_2 konsantrasyonunu azaltarak
2. Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak
3. $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 gibi reaktif türlerini ortadan kaldırarak
4. $HO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$ ve $ROO^{\cdot}$ gibi başlatıcı türevleri temizleyerek
5. Başlangıç zincir reaksiyonlarını kırarak
6. Singlet oksijeni temizleyerek (27).

Etkilerini yukarıdaki mekanizmalarla ortaya koyan antioksidanlar antioksidan savunma sistemini oluşturur. Hücrelerin hem aköz hem membran bölümlerinde veya hücre dışında bulunabilen enzim veya enzim dışı yapılar olabilir. Antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin üretimini engelleyenler ve üretilmiş olanları tüketenler olarak ikiye ayrılır (17).

Antioksidanlar aşağıdaki şekilde gruplandırılabilirler (Tablo I) (3).

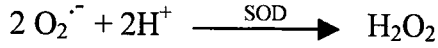
Tablo I: Antioksidanların gruplandırılması

Ekzojen Antioksidanlar	Endojen Antioksidanlar
<i>Yiyeceklerdeki doğal antioksidanlar</i> Vitamin A β-karoten Vitamin C Vitamin E	<i>Enzimler</i> Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi Süperoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz Glutasyon-S-transferaz Hidroperoksidaz
<i>Antioksidan yiyecek aditifleri</i> BHT (Bütile Hidroksitolüen) BHA (Bütile Hidroksianizol) Etoksikin Sodyum benzoat Propil galat Fe-süperoksit dismutaz (bakteriyel)	<i>Enzim olmayanlar</i> a. Lipit fazda bulunanlar α-tokoferol, β-karoten b. Sıvı fazda (hücre sitozolü veya kan plazmasında) bulunanlar Askorbik asit laktoferrin melatonin miyogloblin ürat hemoglobin sistein ferritin seruloplazmin metionin transferrin bilirubin albumin glutasyon

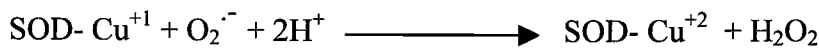
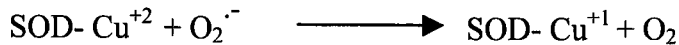
2.2.1 Enzimatik Antioksidanlar:

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1): Serbest radikallere karşı ilk savunma süperoksit dismutaz enzimiyle sağlanır. Süperoksidin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden metallo enzimdir. Hücrelerin sitozollerinde, mitokondrilerinde ve plazmada bulunur. Bakır-çinko, mangan ve demir içeren 3 tipi vardır. İnsanda Cu-Zn SOD ve Mn-SOD

izomerleri bulunur. Demir içeren SOD ökaryotik hücrelerde bulunmaz. Bu enzimler aşağıdaki reaksiyonu katalizler (31, 47).

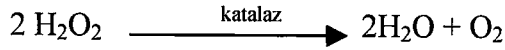


Cu-Zn SOD dimeriktir ve sitozolde bulunur. Mn-SOD tetramerik ve mitokondride bulunan SOD'tur. Her iki SOD'ın katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD enziminin ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. Süperoksit dismutazın süperoksit anyonuna olan etkisi şu şekildedir. Süperoksit anyonu, Cu⁺² ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron Cu⁺²'a transfer olurken Cu⁺¹ ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu⁺¹'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksiti oluştururken, enzim tekrar Cu⁺² formuna dönmüş olur (3).



Katalaz (H₂O₂: H₂O₂ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6): 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalar. Peroksidaz aktivitesine sahip

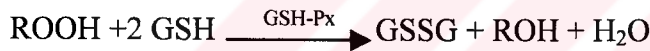
oluşuna ek olarak, bu enzim bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Peroksizomlarda lokalizedir.



Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (3, 26, 87).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px, glutasyon: H₂O₂ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9):

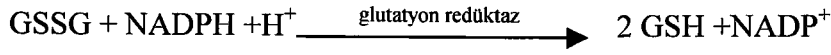
Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Molekül ağırlığı 85000 daltondur. Tetramerik, 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Aşağıdaki reaksiyonu katalizler (3, 26, 87).



Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunur. %25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (12, 48, 51).

Fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz da (PLGSH-Px) molekül ağırlığı 20000 dalton olan, monomerik, selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirger. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğu zaman fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.

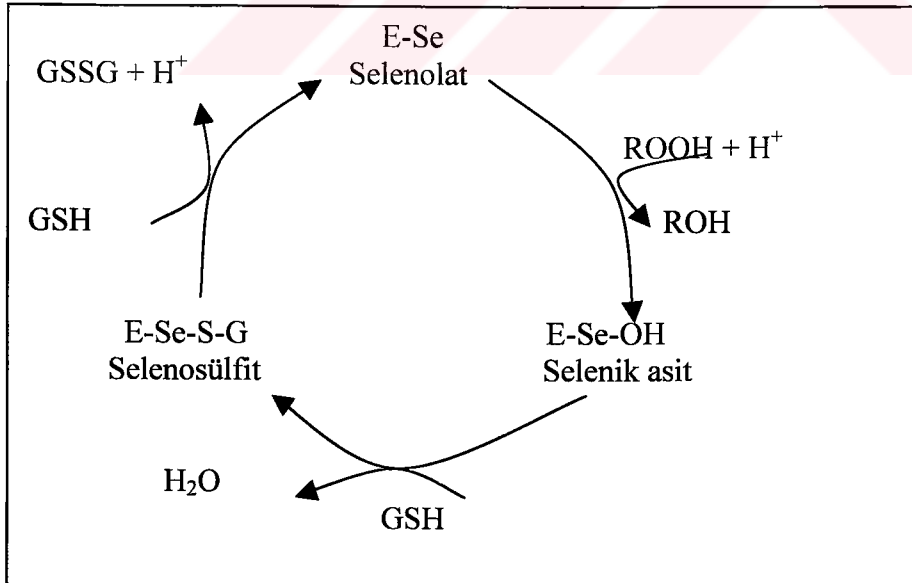
Glutasyon peroksidaz peroksitleri detoksifiye etmek için redükte glutatyona (GSH) ihtiyaç duyar. Okside formu olan GSSG, glutasyon redüktaz ile yeniden redükte glutatyona dönüşür (51, 68).



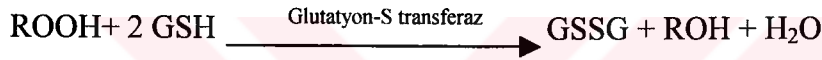
Glutasyon redüktaz aktif bölgesinde FAD bulunduran dimerik bir enzimdir. GSSG'ı redüklemek için NADPH kullanır. NADPH da heksoz monofosfat şantından Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ile katalizlenen reaksiyonla sağlanır (51).

GSH-Px'nin selenolat formu (E-Se-) peroksit substratını alkole indirgerken kendisi okside selenik aside dönüşür (E-Se-OH). Glutasyon bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfiti (E-Se-S-G) oluşturur. İkinci bir glutasyonun selenosülfite bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat formuna dönerken glutasyon okside hale döner (Şekil I) (3).

Şekil I: Glutasyon peroksidazın katalitik mekanizması



Glutasyon S-Transferaz: Glutasyon S- Transferazlar (GST) E.C 2.5.1.18 kodlu herbiri iki alt birimden oluşmuş, dimerik bir enzim ailesidir. GST'lar geleneksel olarak üç sitozolik bir de mikrozomal olarak dört ana gruba ayrılırlar. Sitozolik olanlarsa izoelektrik noktaları ve poliakrilamid jel elektroforezindeki molekül ağırlıklarına göre α (bazik), π (asidik), μ (nötral) olarak isimlendirilirler (3, 33). Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlerine karşı glutasyon-S transferazlar selenyum bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluştururlar (3).



En çok karaciğerde bulunur. Hem detoksifikasyon hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri vardır (3, 43). Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyondaki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize edilebilir. GSH'dan glutamat ve glisin koparılmasından sonra sistenin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür. Ksenobiotiklerin klasik atılım ürünleri olan bu merkaptürik asitler, yani N-asetil sistenin S-alkile olmuş türevleri daha sonra safra ile atılırlar.

Bu yol GST'ların kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içinde detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir. Pek çok pigment (bilüribin, hematin,

bromsülfalein, indosiyanin green gibi), kolik asitler, steroid hormonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar bu proteinler tarafından bağlanıp taşınabilmektedir (3, 43).

Bu iki temel foksiyona ilaveten GST'lar çok sayıda başka görevlere de sahiptirler. Lökotrien C4'ün sentezi, lökotrien C sentaz aracılığıyla lökotrien A4'ün glutatyon ile bağlanması sonucu olur. Bu reaksiyon GST'lar tarafından katalizlenebilmektedir (3).

2.2.2 Enzimatik olmayan antioksidanlar:

Glutatyon: Karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenen tripeptittir. Glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden meydana gelmiştir (3). Biyolojik sistemlerde, protein sentezi, DNA sentezi, transport, enzim aktivitesi, metabolizma ve hücrelerin korunması gibi direkt ve indirekt fonksiyonları vardır. Bunlara ek olarak çeşitli reaksiyonlarda koenzim görevi vardır. Glutatyon multifonksiyonel amaçlar için kullanılır. İlaç metabolizması, radyasyon, kanser, oksijen toksitesi, yaşlanma gibi olaylarda etkili olup östrojen, prostaglandinler, lökotrienler gibi pek çok endojen bileşiğin metabolizmasında da rol oynar (2, 49, 50, 68).

Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Proteinlerdeki sülfidril gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve aminoasitlerin membrandan transportunu sağlar. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini önlemede rol oynar.

Redükte glutatyon (GSH), reaksiyon sonucu oksitlenerek okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Okside glutatyonun tekrar redükte hale gelmesi NADPH'ın kullanılması ile mümkündür. Glutatyon, eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada önemlidir. Eritrosit zarını hidrojen peroksitten, lökositleri fagositozda kullanılan oksidan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasardan korur (3).

Ürik asit: Fizyolojik konsantrasyonlarda güçlü antioksidan etki gösterir. Hidroksil, süperoksit, peroksil radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Fakat lipit radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca C vitamininin oksidasyonunu engelleyici etkiside bulunmaktadır (3).

Bilürubin: Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (3).

Askorbik asit: Biyolojik ortamların çoğunda askorbat olarak bulunan C vitamini hücre dışı sıvıların en önemli antioksidanıdır. Etkili olarak hidrojen peroksit, hipoklorit, süperoksit, peroksil radikallerini ve singlet oksijeni tutar. Askorbat sıvı fazdaki tüm peroksil radikallerini plazma lipitlerine diffüze olmadan önce yakalar. Bu şekilde sıvı peroksil radikalleri ile oluşan lipit peroksidasyonunun başlamasını engelleyerek biyomembranları peroksidatif hasardan korur (3, 17).

α -tokoferol: Zincir kırıcı ve çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipitlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksil radikallerini indirger. Glutatyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin sentezini engeller (3, 17, 29).

Seruloplazmin: Süperoksit dismutaz enzimine benzer mekanizma ile etki gösterir. Ferro demiri (Fe^{+2}) ferri demire (Fe^{+3}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece serbest radikal oluşumunu inhibe eder.

Transferrin ve Laktoferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar.

Ferritin: Dokulardaki serbest demiri bağlar.

Desferroksamin: Serbest Fe^{+3} 'i bağlar.

2.3. NİKEL

Kobalt ve demirle birlikte periyodik tablonun 1. sıra geçiş elementleri VIII b arasındadır. 28. elementtir. Nikel madeni yoktur. Bakır elde edilirken yan ürün olarak elde edilmektedir. +2, +3, +4 şeklinde bulunabilmektedir. Ancak doğada yaygın olanı +2 yani divalent nikel formudur. Suda çözünebilen ve çözünemeyen olarak ikiye ayrılabilir. Nikel klorit, nikel nitrat ve nikel sülfat suda çözünebilen nikel tuzlarıyken, aksine metalik nikel, nikel sülfidler ve nikel oksitler suda zayıf çözünürlükleri olan bileşiklerdir. Nikel karbonat ve nikel hidroksitler ise suda orta derecede çözünebilmektedirler. Nikel bileşikleri ısıtıldıklarında ortama iritan buharlar vermektedirler. Nikel karbonil oda ısısında ortama karbon monoksit veren uçucu bir sıvıdır. Nikel subsülfid ısıtıldığında ortama sülfür oksitleri salmaktadır. Yüksek termal ve elektriksel iletkenliğe sahiptir. Bununla birlikte iletkenlik ve manyetik özelliği sırasıyla gümüş ve demirden daha azdır. Nikelin siderofilik özellikleri nikel demir alaşımı oluşumunu kolaylaştırmaktadır (10).

Nikel ürünleri (paslanmaz çelik, nikel alaşımı ve nikel-dökme demir) para, elektrikli eşyalar, tamir aletleri, makineler, silahlar ve ev eşyalarında kullanılır. Nikelin mücevver

yapımında yaygın kullanımı; nikel sensitif kişilerde kontakt dermatite neden olmaktadır (42). Nikel beyaz altının ve Alman gümüşünün %10-15'ini oluşturmaktadır. Yine nikel, kadmiyum alkalın bataryalarda, katalistlerde bulunmaktadır (10).

Nikel çevremizdeki havada, suda, toprakta ve diyetimizde mevcuttur. Havada miktarı düşük olup (yaklaşık 6-20 ng/m³) yüksek ısılara kadar metalleri ısıtma, çöp ya da lağımaların yakılması ile ortaya çıkmaktadır (10). Benzin yanıkları havanın belirgin olarak nikel sülfatla kirlenmesine neden olur. Bu kaynakların bulunduğu yerdeki hava daha az olarak nikel oksitler, kompleks metal (demir) oksitler, metalik nikeli ve nikel subsülfid içermektedir. Sıvı kaynaklarda divalent form baskındır. Kontamine olmamış taze su ve deniz suyu genellikle 0,3 µg Ni/L içerir. Suyun yüzeyindeki ve çevresindeki kayaların ve toprağın yıkımından elde edilir. Nikel dünya kabuğunda en sık bulunan 24. elementtir. Ortalama 50 ppmlik düzeyi ile nikel dünya kompozisyonunun %3'ünü oluşturmaktadır. Toprakta yaklaşık olarak 5-500 ppm bulunmaktadır. Ancak bu miktar metal rafinerilerine yakın bölgelerdeki toprakta 24000-53000 ppm'e varmaktadır. Günlük diyetimizde nikel mevcuttur. Bulaşım mutfak aletlerinden ve su borularındandır. Nikel konsantrasyonu 1 ppm'i aşan besinler: yulaf unu, kurubaklagiller, fındık, çikolata, soya fasulyesi veya soya ürünleridir. Kakao Atomik Absorbsiyon Spektrometre ile ölçülen 8.2-12 mg/kg olarak en yüksek nikel miktarına sahiptir (61).

Yapılan bir çalışmada orta derecede renal yetmezliği olan, paslanmaz çelikten yapılmış kalça protezi kullanan bir hastada kan nikel düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir. Ancak bu durumda nikel bağı toksisiteye rastlanmaksızın kontakt dermatit gelişmiştir (15).

Nikelin hücre içine alınması 3 yolla olmaktadır (79).

- 1) Nikel bileşikleri veya alaşımlarının endositoz ile alınması
- 2) Kalsiyum kanalları aracılığıyla nikel iyonlarının transportu
- 3) Nikel karbonil gibi lipofilik bileşiklerin membran aracılığıyla difüzyonudur.

Nikel içeren bileşiklerin endositozla alımı partikül büyüklüğü, yüzey özellikleri ve kimyasal bileşimine bağlıdır (1, 20). Çok yüksek miktarda kanserojen olan nikel subsülfid fibroblastlar tarafından fagosite edilir ve yavaşça lizozomal vezikül içinde çözülerek nikel iyonlarını ortama salar. Özellikle çözünebilen bazı nikel bileşikleri perinükleer zona lokalize görülür. Ya iyonize (muhtemelen Ni^{+2}) ya da partikül olarak nükleus içine giren nikel özellikle heterokromatin olmak üzere nükleoproteinlere bağlanır (24, 67).

Nikel ince barsakda demirle aynı bölgeden emilmektedir (81). Nikel bileşiklerinin emilimi nikelin çözünürlüğüne bağlıdır. Genellikle emilim şu sırayı izler;

Nikel karbonil >Çözünebilen nikel bileşikleri >Çözünemeyen nikel bileşikleri.

İnhalasyonu takiben nikel bileşiklerinin akciğerden temizlenmesi yavaştır, bu nedenle nikel akciğerde toplanır. Bu durumda nikelin kan konsantrasyonu düşüktür. İnsanlar tarafından nikel absorpsiyonu diğer metallerle karşılaştırıldığında kısmen daha yüksektir. Çözünebilen nikel bileşiklerinin absorpsiyonu hızlıdır. Bir iki saat içindedir. Biyoyararlanımı %1-5 arasındadır. Açlık emilim miktarını artırmaktadır (75).

Deriden absorpsiyonu inhalasyon ve sindirimle karşılaştırıldığında minimaldir. İyonize olan nikel bileşikleri sağlam deriye penetre olmaz. Deri absorpsiyonu öncelikle kontakt dermatit gelişimi için önemlidir (86).

Kanda ana transport proteini albumindir. Ancak nikel içeren ve α_2 -makroglobulin olarak da adlandırılan nikeloplazmin de taşıyıcı protein olarak görev yapmaktadır. Eritrosit ve serum arasındaki nikel dağılımı tam olarak bilinmemektedir. Serum nikel seviyesi çözünebilen nikel bileşiklerini yansıtmaktadır. Emilimi takiben nikelin dokularda dağılımı alınma yoluna bağlıdır. Nikel karbonil inhalasyonunu takiben en yüksek konsantrasyon akciğer, beyin, böbrek, karaciğer ve adrenalde izlenir. Parantral verildiğinde ise en yüksek konsantrasyon böbrektedir (10).

Kümülatif bir toksin değildir. Üriner atılımı hızlıdır. Emilimi takiben primer atılım yeri böbrektir. Sıcak bölgelerde daha belirgin olmak üzere ter ve tükürkle de atılım olmaktadır. Yarı ömrü 20-60 saat arasında olup çözünmeyen bileşiklerin yarı ömrü daha da uzundur (77). Nikelin normal serum veya plazma değeri 0.6-7.5 $\mu\text{g/L}$, 24 saatlik idrarda 0.1-10 $\mu\text{g/gün}$ 'dür (81).

Plasentadan geçer ve fetüsteki nikel konsantrasyonu yetişkin seviyesi kadardır. Miyadında doğan bebekte kord kanında nikel tespit edilir. Laktasyondaki annelerin sütlerindeki nikel konsantrasyonları bu annelerin serumlarındaki nikel seviyesini aşmaktadır. Postpartum bir hafta içinde elde edilen süt örneğinde ortalama nikel seviyesi $17 \pm 2 \mu\text{g Ni/kg}$ 'dır. Sıkça anne sütüyle beslenen bebek 5-15 $\mu\text{g Ni/gün}$ almaktadır (25).

Pek çok hayvan türünde esansiyel bir elementtir ve bu hayvanlarda nikel lipid metabolizmasındaki özellikle dokulardaki lipid içeriğinin regülasyonu ve fosfolipitlerin sentezi için gereklidir (56, 74, 85). Eksikliğinde triaçilgliserol, kolesterol, fosfolipitler, fosfolipitlerdeki yağ asitlerinin konsantrasyonu ve karaciğerdeki pek çok lipojenik enzimin aktiviteleri ve lipoproteinlerin serumdaki konsantrasyonu etkilenmektedir (74). Nikel

eksikliğinde tavuklarda karaciğer yağ içeriğinin arttığı ve plazma kolesterol düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (60). Yapılan bir diğer çalışmada; nikel eksikliğinde karaciğer kolesterol düzeyi düşük bulunurken plazma lipit konsantrasyonu yüksek bulunmuştur (59).

Karaciğer trigliserit birikiminin nedeni olarak lipojenik enzimlerin aktivitelerinin artmasına bağlı karaciğerde artmış yağ asidi sentezi olabileceği düşünülmektedir. Bu görüşü test etmek amaçlı nikel eksikliği olan ratlarda lipojenik enzim aktivitelerini ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar karaciğerdeki lipojenik enzim aktivitesinin nikel eksikliği olan ratlarda önemli oranda düşük olduğunu göstermiştir. Karaciğerde triaçilgliserolün yanısıra esansiyel yağ asitleri de birikmektedir. Bu birikimin nedeni olarak sadece sentezin değil, karaciğerden kana lipit salınımının bozulmuş olabileceği düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak düşük serum lipit seviyesi oluşmaktadır. Bununla birlikte nikel eksikliği olan ratlarda VLDL'deki triaçilgliserol ve LDL'deki kolesterol konsantrasyonları nikel eksikliği olmayan ratlarınkinden önemli oranda yüksektir (74). Nikel eksikliği olan ratlarda perinatal mortalitenin arttığı, karaciğer gelişiminde bozukluklar olduğu gösterilmiştir (54). Ancak gebelikte organ gelişimi süresince yüksek doz nikel tuzlarına ve nikel karbonil bileşiğine maruz kalma fetal malformasyonlara neden olmaktadır (45).

Hayvan çalışmaları temel alındığında biotin, folat ve vitamin B₁₂'nin etkisi için de nikel gereklidir (58, 84). Nikel hematopoez için gerekli olan bir eser elementtir. Nikelin demir metabolizmasında önemli bir yeri vardır (57). Azalmış hematokrit ve hemoglobin değeri, azalmış eritrosit sayısı nikel eksikliğinin bir işaretidir. Nikel eksikliğinde barsaktan demir Emilimi bozulur (54, 55) Demir eksikliğinde barsaktan nikel Emilimi artmaktadır. Nikele bağlı kontakt dermatitte bu özellik önem kazanmaktadır (80). Hematopoezi stimule eden vitamin B₁₂ ile nikelin sinerjik rol oynadığı düşünülmektedir (58, 84).

Nikelin lipid peroksidasyonuna neden olması konusunda pek çok hipotez öne sürülmüştür. Birinci hipotez indirek bir mekanizmadır. Nikel, demir ve bakırın intrasellüler bağlanma yerlerine bağlanarak onların yerlerini alır. Böylece nikel Fe^{+2}/Fe^{+3} veya Cu^{+1}/Cu^{+2} redoks çiftleri tarafından katalize edilen Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarına girer ve lipid peroksidasyonuna neden olur. İkinci hipotez Ni^{+2}/Ni^{+3} redoks çiftinin direkt olarak bir elektron transfer reaksiyonu ile serbest radikal oluşumuna neden olmasıdır (14, 34, 35, 36). Üçüncü hipotez nikelin karaciğerde demir ve bakır miktarını artırmasına bağlı olarak Fe^{+2}/Fe^{+3} veya Cu^{+1}/Cu^{+2} redoks çiftleri tarafından katalize edilen Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla lipid peroksidasyonuna neden olmasıdır (8, 18, 19). Dördüncü hipotez süperoksit, hidroksil radikali ve singlet oksijenin hidrojen peroksitle reaksiyona giren nikel-glisilglisil-L-histidin kompleksinden oluştuğudur (34, 38, 70, 88). Beşinci hipotez nikelin lipid $O^{\cdot}$ radikallerin oluşumunu sağlayan lipid hidroperoksitlerin yıkılmasını hızlandırması ve böylece otokatalitik peroksidatif reaksiyonların yayılmasını sağlamasıdır. Altıncı hipotez bir indirek mekanizma olup nikel aracılığıyla peroksidasyona karşı hücre savunma sistemini oluşturan antioksidanların tüketilmesi veya inhibe edilmesidir (9, 22).

Nikelle karşılaşmış kişilerde akciğer, larinks gibi nasal kavite kanserlerine karşı artmış bir risk söz konusudur (7, 21, 63, 69, 78). Divalent nikel bileşikler nükleik asit ve proteinleri içeren çeşitli makromoleküller üzerindeki sülfidril, azo ve amino gruplarına bağlanır. Hayvan çalışmaları; nikel bileşiklerinin karsinogenik potansiyellerinin farklı olduğunu göstermiştir. Bu farklılığın nedeni, nikel türlerinin farklı mekanizmalarla karsinogeneze yol açmasıdır.

Mekanizmalar (4):

- 1) Genetik/epigenetik mekanizmalar (nikel subsülfid)

- 2) Tümör indüksiyonu için başlangıç etki (yüksek ısı, nikel oksitler, serbest radikaller)
- 3) Karsinogenezisin ilerlemesidir (nikel sülfat, serbest radikaller).

Yapılan çalışmalarda yüksek değerlikli nikel bileşikleri (+3, +4), çözünen nikel divalent bileşikleriyle (klorit, sülfat, amonyum sülfat) karşılaştırıldığında daha karsinogenik bulunmuştur. Nikel subsülfitin en karsinogenik nikel bileşiği olduğu gösterilmiştir. Nikel subsülfid, lokal etkiyle pulmoner alveolar makrofaj fonksiyonunu inhibe eder ve Naturel Killer (NK) aracılıklı hedef hücre ölümünü artırır. Böylece nikel subsülfid etkisine karşı immün mekanizma savunmasız kalır (28). Nikel bileşiklerinin karsinogenik potansiyelindeki farklar nikel iyonlarının hücre içine girişine ve kritik bölgelere bağlanma yeteneğindeki çeşitliliklerden kaynaklanmaktadır.

Nikel karbonil uçucu bir karsinojendir. Kolayca hücre membranlarından geçer. Bu bileşiğin hücre içi oksidasyonu sonucu nikel salgılanır ve salgılanan bu nikel nükleik asitlere bağlanır (40). Nikel karsinogenezi birkaç basamakta etkiler. Bu basamaklar kromozomal hasar, Z-DNA oluşumu (left handed double helical form), DNA tamirinin inhibisyonu, mutagenesis ve tümör ilerlemesidir (79, 82). Hayvan çalışmalarında Manganez ve Magnezyumun nikel subsülfitin etkilerini antagonize ettiği gösterilmiştir (37, 76, 79).

Nikel toksisiteye neden olmaktadır. Tıp literatüründe akut inorganik nikel toksisitesi tanısı alan birkaç hasta vardır. 2 yaşındaki kız çocuğunda içirilen 10 gramın üstündeki nikel klorit ile eritem, midriasis, taşikardi, rijidite bulgularının eşlik ettiği pulmoner konjesyon, koma ve kardiyak arrestle ölüm tablosu gelişmiştir.

Nikel karbonil toksisitesi: 2 basamakta görülmektedir.

- 1) Acil
- 2) Gecikmiş

Öncelikle başlangıç bulguları nonspesifiktir ve solunum sisteminin irritasyonu şeklindedir. En sık rastlanan bulgular; baş dönmesi, frontal baş ağrısı, iştahsızlık, bulantı, kusma, takiben göğüste sıkışma hissi, dispne ve nonproduktif öksürüktür. Orta dereceli zehirlenmelerde bu bulgular minimaldir ve 1-2 gün içinde geçer. Ağır zehirlenmelerde 12-120 saat içinde gelişen gastrointestinal sistem bulguları ve pulmoner ödem, akut pnömoni gibi yoğun pulmoner bulgulara rastlanır. Diğer bulgular; miyalji, yorgunluk, derin halsizlik, delirium ve konvulsiyonlardır. Ateş bu tabloda genellikle yoktur. Zehirlenmenin komplikasyonları; hepatorenal disfonksiyon, adrenal yetersizlik ve hiperglisemidir. Ağır ve akut toksisiteli hastaların ölümünün en sık nedeni diffüz intersitisyel pnömoni, serebral ödem ve hemorajidir. Yaşayan hastalarda pulmoner fibrozis gelişir. Fakat pulmoner fonksiyon testleriyle ölçülen pulmoner bir anormallik yoktur.

Kronik olarak nikellemeye temasla ilişkili olarak astma, kronik hipertrofik rinit ve sinüzit, nazal polip ve nazal septum perforasyonu gelişebilir.

Kontakt dermatitin en sık nedeni nikelidir. Kullandıkları mücevher çeşitliliği nedeniyle kadınlar erkeklerden daha fazla etkilenir. Nikelin mesleki bulaşımıyla da kontakt dermatit gelişir. Bunlar kuaför, sekreter, ev temizlikçileri ve metal işçileridir (10).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen DHE-00-19 kod nolu projedir ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiş olup biyokimyasal analizler Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1 KULLANILAN GEREÇLER

3.1.1 Deney hayvanları

Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları yetiştirme bölümünden sağlanan ağırlıkları 200-250 g arasında değişen 28 erkek rat kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan aletler

Santrifuj (Hermle Z 323 K soğutmalı BHG Hermle Z 380, Germany)

Homojenizatör (Virtis- Virtishear, The Virtis Company, INC. USA)

Terazi (Schimadzu, Japan)

Spektrofotometre (Milton Roy Spectronic 3000 Array, USA)

pH-metre (Nel Elektronik)

Vortex (Heidolph Reax 2000)

Benmari (Heto Maxi-Shake)

Derin dondurucu (Sanyo CFC Free Japan)

Atomik Absorbsiyon Spektrometre (Unicam 939 AAS ve Unicam GF 90 Furnace Sistem, United Kingdom)

Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan ve biyokimyasal analiz için gerekli olan diğer malzemeler kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan kimyasal maddeler

Tiyobarbitürik asit (TBA), bovin serum albumin (BSA), Folin Ciocalteu's Fenol, Tetraetoksipropan, Nitroblue tetrazolium, NADPH, GSSG Redüktaz, Glutasyon, 5,5' ditiyonitrobenzen (DTNB), potasyum bikarbonat (Sigma)

Ksantin oksidaz, sodyum karbonat, kloroform, etanol, amonyum sülfat, trikarboksilik asit (TCA), bakır klorür, hidrojen peroksit, metafosforik asit, sodyum hidroksit, sodyum fosfat, potasyum fosfat, EDTA, potasyum klorür (Merk)

n-Butanol Carlo (Erba)

Nikel standartı olarak nitrik asitte hazırlanmış Fisher kimyasallarının standartı kullanıldı.

Argon gazı BOS tarafından sağlandı.

3.2 UYGULANAN YÖNTEMLER

3.2.1 Deney Hayvanlarının Hazırlanması

1. Ni verilen grup: 150 $\mu\text{mol Ni/kg}$ 5ml SF/kg içinde intraperitoneal verildi.

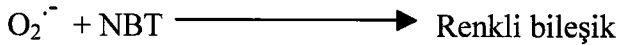
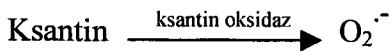
2. Cyclam (1,4,8,11 tetra azocyclotetradecane) verilen grup: 300 µmol cyclam/kg/5ml SF/kg içinde intraperitoneal verildi.
3. Ni+Cyclam verilen grup: 150 µmol Ni/kg/5ml SF/kg içinde nikel uygulamasından 1 saat önce 300 µmol cyclam/kg/5ml SF/kg içinde intraperitoneal verildi.
4. Kontrol grubu: 5 ml SF/kg'a verildi.

Bütün hayvanlar uygulamadan 24 saat sonra 50 mg/kg dozda ketalar ile anestezi uygulanarak feda edildi. Çıkarılan karaciğer serum fizyolojikle yıkandıktan sonra alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta donduruldu. Biyokimyasal analizlerin yapılacağı güne kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.2 Metodların Uygulanması

Doku SOD Tayini:

Doku SOD aktivitesi ksantin, ksantin oksidaz ile $O_2^{\cdot-}$ oluşturması ve bunun da NBT ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise o kadar $O_2^{\cdot-}$ i ortadan kaldıracağı için oluşan rengin şiddeti de o kadar az olacaktır.



Reaktifler:

Stok ksantin: 3 mmol/L

NBT: 150µmol/L

Na_2CO_3 : 400mmol/L

BSA: 1g/L

CuCl_2 : 0.8 mmol/L

Ksantin Oksidaz (XO) enzim çözeltisi: 1/100 (v/v) 2 M'lık amonyum sülfat çözeltisi ile dilüe edilir.

Kloroform/Etanol : 3/5 (v/v)

Reaksiyon karışımı: 40 ml 10 kat sulandırılmış ksantin stok çözeltisi, 20 ml EDTA, 20 ml NBT, 12 ml Na_2CO_3 ve 6 ml BSA 250 ml'lik erleninde karıştırılır.

Deneyin yapılışı:

Karaciğer dokusu distile suyla 1/2 oranında homojenize edilip 5000 g 30 dakika santrifüj edilip ve alınan süpernatant kloroform/etanol (3/5 v/v) karışımıyla 1/1 karıştırıldı. Elde edilen yeni karışım 5000 g'de 2 saat santrifüj edildi ve süpernatandan SOD aktivitesi çalışıldı. Bunun içinde 2,9 cc reaktif karışımı 50 µl süpernatant ve 50 µl XO çözeltisi karıştırılıp 25 °C de 20 dakika inkübe edildi. Kör içinse numune yerine aynı miktarda distile su koyarak inkübasyon sağlandı. İnkübasyondan sonra 1 ml CuCl_2 eklenerek 560 nm'de distile suya karşı okuma yapıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Kör Abs.} - \text{Numune Abs}}{\text{Kör Absorbansı}}$$

% 50 inhibisyonu 1Ü aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapıldı. Süpernatanda protein de çalışılarak sonuçlar Ü/mg protein üzerinden verildi (89).

Doku MDA Tayini :

Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) düzeyi, 1,1,3,3-tetraethoksiopropanın standart olarak kullanıldığı tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile belirlendi. TBA testi, “TBA reaktif substance” olarak nitelendirilen lipit peroksitlerinin (MDA) TBA ile girdiği reaksiyon sonucunda oluşan pembe renkli maddenin konsantrasyonunun kalorimetrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır (83).

Reaktifler:

KCl: %1.15

Tiyobarbitürik asit: %0.6

Fosforik asit: %1

n- butanol

Standart: 1,1,3,3-tetraethoksiopropan

Deneyin yapılışı:

Karaciğer dokusu tartılarak 1:9 (ağırlık:volüm) oranında %1.15 soğuk KCl ile homojenize edildi.

0.5 ml homojenat, 3 ml fosforik asit ve 1 ml TBA solusyonu ile karıştırıldıktan sonra, 45 dakika kaynayan su banyosunda bekletildi.

Tüpler hızla soğutulduktan sonra, 4 ml n-butanol eklendi ve 3500 rpm de 10 dakika santrifuj edilerek n-butanol fazı ayrıldı.

Spektrofotometrede 535 ve 520 nm dalga boyunda supernatanın absorbansı ölçüldü.

Standart olarak 0.5 ml 0.5 nmol tetraethoksiopropan numune gibi çalışıldı.

İki absorbans değeri arasındaki fark nmol/g biriminde doku malondialdehit (MDA) olarak belirlendi.

Doku Glutasyon Tayini:

Doku glutasyon tayini Ellman'ın tanımladığı doku sülfidril miktarı tayinine göre yapıldı (23). Alkali ortamda p-nitrofenil disülfitin alifatik tiyol bileşikleri ile reaksiyonu sonucunda her mol tiyol başına oluşan p-nitrofenil anyonunun miktarını ölçme esasına dayanır.

Reaktifler:

1 M potasyum fosfat tamponu (pH:8)

0.5 M metafosforik asit

Ellman Reaktifi: 160 μ M DTNB+319 μ M KHCO₃ (KOH ile pH:8'e ayarlanır)

Deneyin Yapılışı:

Karaciğer dokusu 5:1 (volüm:ağırlık) oranında 0.5 oranında 0.5 M metafosforik asitle dilüe edilip homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra 3500 rpm'de 10 dakika santrifuj edilip elde edilen supernatanda glutasyon tayini yapıldı.

2,4 ml Ellman reaktifine 0,2 ml supernatan, 0,3 ml fosfat tamponu, 0,1 ml distile su eklenerek 410 nm'de köre karşı absorbans değişimi ölçüldü.

DTNB için molar absorbsiyon katsayısı olan $\epsilon=13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak,

$C_0=A/\epsilon \times D$ formülüne göre hesaplamalar yapıldı (A=Absorbans, D=dilüsyon faktörü).

Supernatanda Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldı. Glutasyon miktarı nmol GSH/mg protein olarak verildi.

Doku Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini:

Glutasyon peroksidaz düzeyleri Paglia ve Valentina'nın çift enzim metodunun bir modifikasyonu ile tayin edildi (41, 64). Bu metotda GSSG oluşum hızı 340 nm dalga boyunda, NADPH'ın NADP'ye dönmesi sonucu karışımın optik dansitesinde azalma ile tayin edilmektedir.

Reaktifler:

Homojenat Tamponu: 0.5 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu pH:7.4

Reaksiyon Karışımı: 50 mM potasyum fosfat tampon pH:7.0 içinde 3.6mM NaN₃, 5 mM GSH, 0.3 mM NADPH

Glutasyon Redüktaz 200 Ü/mg protein

0.25 mM H₂O₂

Deneyin Yapılışı:

0.5 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tampon pH:7.4 ile 1:9 oranında (ağırlık/volüm) homojenize edilen doku 2000 g'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edilip süpernatant alındı.

0.2 ml süpernatant, 2 ml reaksiyon karışımı, 0.02 ml glutasyon redüktaz ile karıştırılıp 5 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi.

Karışıma 0.02 ml H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı.

5 dakika boyunca spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

NADPH için molar absorpsiyon katsayısı (am) $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak

$\Delta A = am \cdot \Delta C \cdot l$ formülüne göre dakika başına okside olan NADPH/dakika/mg protein olarak verildi.

Protein Tayini:

Bovine serum albumininin (BSA) standart olarak kullanıldığı Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldı (44).

Reaktifler:

Alkalın reaktifi: 0.1 N NaOH içinde 32 kısım %2 Na_2CO_3 , 1 kısım % 2 Na-K tartarat, 1 kısım %1 CuSO_4 karışımı

Folin Ciaocalteu's Fenol: Distile su ile 1:1 oranında dilüe edildi.

Standart: 1 mg/ml BSA

Deneyin Yapılışı:

Numuneler belli oranda distile su ile dilüe edildi.

2 ml alkalın reaktif eklenerek karıştırıldı ve oda ısısında 1 saat bekletildi.

Spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

Standart olarak 1mg/ml BSA numune gibi çalışıldı.

Hesaplanması:

$\frac{\text{numunenin optik dansitesi}}{\text{standartın optik dansitesi}} \times \text{standart konsantrasyonu} = \text{mg protein/ml}$

Serumda Nikel Tayini:

Serum nikel düzeyi ratlardan kan örnekleri alınıp serumları ayrılarak Atomik Absorbsiyon Spektrometre (Unicam 939 AAS ve Unicam GF 90 Furnace Sistem) ile tespit edildi.

Öncelikle nitrik asitte hazırlanmış olan Fisher kimyasallarının nikel standart solusyonu ile dilüsyonlarla 20, 40, 60, 80,100 ng/ml’lik standartlar hazırlandı.

Cihaz açılıp dalga boyu 232 nm, lamba akımı %75 olarak ayarlanıp, kalibrasyon değerleri 20, 40, 60, 80,100 ng/ml olarak 5 adet ve aşağıdaki fırın değerleri girildi (Tablo II).

Tablo II: Fırın Değerleri

Isı 0°C	Zaman (sn)	Ramp 0°C/sn	Gaz Tipi	Gaz akımı	Komutlar
40	20	10	3	2	-----
40	20	10	3	2	-----
40	20	10	3	2	-----
1000	20	50	3	2	standby’a dön
2500	3	0	3	0	Isıyı kontrol et
2550	3	0	3	2	-----

Nikel lambası açıldıktan sonra 15 dakika beklenip ısınması sağlandı. Setup optik yapıldı. Deuterium lambası açıldı. Auto zero yapılarak lamba akımları eşitlendi. Autosamplerden 10 mikrolitre olmak üzere numune volümü belirlendi. Autosampler’a blank,

yıkama suyu ve numuler yerleştirildikten sonra Argon gazı ve su açıldı. Yıkama ve küvet temizliği yapıldıktan sonra analize geçildi.

Elde edilen absorbans değerleri absorbans/konsantrasyon eğrisi üzerinden ng/ml biriminde Nikel konsantrasyon değeri olarak verildi.

3.2.3 Sonuçların Analizi:

Verilerin istatistiki bilgileri Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 10.0 for Windows programı ile elde edilmiştir. Gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis Varyans analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. İkili grup karşılaştırılmasında Mann-Whitney U analizi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada intraperitoneal nikel ve intaperitoneal cynam verilen ratlarda karaciğer MDA düzeyi, SOD aktivitesi, GSH-Px aktivitesi, glutatyon düzeyi ve serumda nikel düzeyi incelendi. Grupların GSH-Px aktiviteleri nmol okside olan NADPH/dk/mg protein olarak Tablo III'de, istatistiksel değerlendirme ise Tablo IV'de gösterilmiştir. Yapılan ölçümlerde nikel verilen grup 1'in GSH-Px aktiviteleri; cynam verilen (grup 2), nikel-cynam verilen (grup 3) ve serum fizyolojik verilen kontrol grubu (grup 4) GSH-Px aktivitelerinden anlamlı olarak düşüktür ($p<0.05$). Grup 2, 3 ve 4'ün GSH-Px aktiviteleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Ancak gruplar kendi aralarında GSH-Px aktivitesi açısından $4<2<3$ şeklinde sıralanmaktadır.

Grupların glutatyon değerleri nmol GSH/mg protein olarak Tablo V'te, istatistiksel değerlendirmesi ise Tablo VI'da verilmiştir. Yapılan ölçümlerde grup 1'in GSH düzeyi; grup 2, 3 ve 4'ün GSH düzeylerinden anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 2, 3 ve 4 arasında ise anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$). Ancak gruplar kendi aralarında $3<4<2$ şeklinde sıralanmaktadır.

Grupların Malondialdehit değerleri nmol/g olarak Tablo VII'de, istatistiksel değerlendirme ise Tablo VIII'de verilmiştir. Yapılan ölçümlerde grup 1'in MDA düzeyi; grup 2, 3 ve 4'ün MDA düzeylerinden anlamlı olarak yüksektir ($p<0.001$). Grup 2, 3 ve 4'ün MDA düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$). Gruplar kendi aralarında $3>2>4$ olarak sıralanmaktadır.

Grupların süperoksit dismutaz aktivitesi U/mg protein olarak Tablo IX, istatistiksel değerlendirme ise Tablo X'da verilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Ancak gruplar kendi aralarında $2<3<1<4$ olarak sıralanmaktadır.

Grupların nikel seviyeleri ng/ml olarak Tablo XI’de, istatistiksel değerlendirme ise tablo XII’de verilmiştir. Grup 1’in Ni seviyesi; grup 2, 3 ve 4’ün Ni seviyelerinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak grup 2, 3 ve 4’ün Ni seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Gruplar kendi aralarında $3>4>2$ olarak sıralanmaktadır.



Tablo III: Glutasyon peroksidaz aktiviteleri (nmol okside olan NADPH/dk/mg protein)

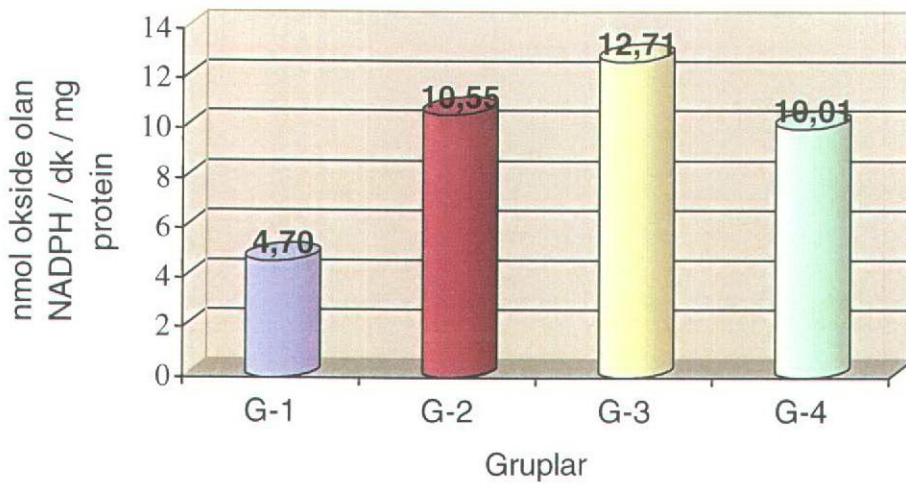
Sıra no	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
1	6.60	13.00	8.80	8.20
2	7.60	7.20	15.40	15.00
3	6.10	9.30	15.63	10.00
4	2.60	7.80	12.00	10.60
5	1.20	16.00	9.00	11.00
6	4.10	10.00	15.40	8.75
7	--	--	--	9.12
8	--	--	--	7.44
Ort±SD	4.70±2.49	10.55±3.36	12.71±3.24	10.01±2.34
Median	5.10	9.65	13.70	9.56

Tablo IV: Glutasyon peroksidaz aktiviteleri istatistiksel değeri

Grup	GPX (Ort ±SD) nmol okside olan NADPH/dk/mg protein	n	P değeri			
			Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Grup 1	4.70 ± 2.49	6	--	.004 *	.002 *	.001 *
Grup 2	10.55 ± 3.36	6	.004 *	--	.485	.950
Grup 3	12.71 ± 3.24	6	.002 *	.485	--	.108
Grup 4	10.01 ± 2.34	8	.001 *	.950	.108	--

* : İstatistiksel olarak farklı

GSH-Px



Şekil 2 : Glutasyon peroksidaz aktiviteleri

Tablo V: Glutasyon değerleri (nmol GSH/mg protein)

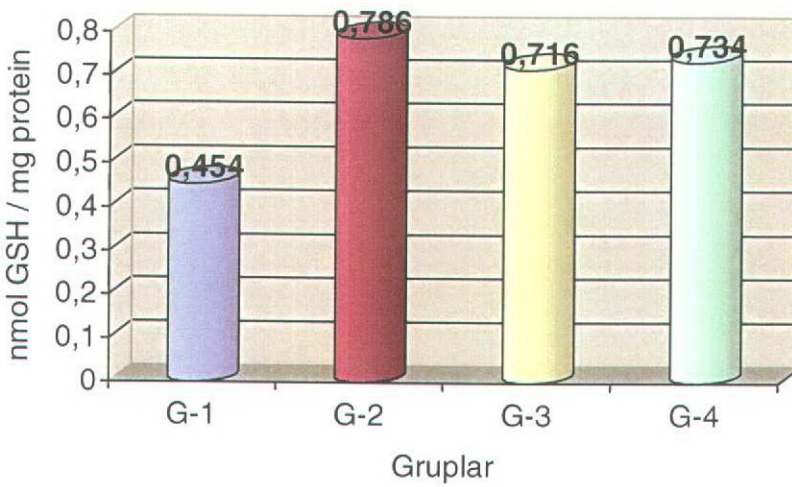
<i>Sıra no</i>	<i>Grup 1</i>	<i>Grup 2</i>	<i>Grup 3</i>	<i>Grup 4</i>
1	.276	.734	.671	.781
2	.258	.696	.696	.942
3	.561	.739	.596	.809
4	.505	.858	.637	.650
5	.561	.847	.595	.558
6	.551	.776	.804	.767
7	.464	.850	1.013	.634
Ort±SD	.454±.132	.786±.066	.716±.149	.734±.129
Median	.505	.776	.671	.767

Tablo VI: Glutasyon deęerlerinin istatistiksel değerlendirmesi

<i>Grup</i>	<i>GSH (Ort±SD) nmol GSH/mg protein</i>	<i>n</i>	<i>p değeri</i>			
			<i>Grup 1</i>	<i>Grup 2</i>	<i>Grup 3</i>	<i>Grup 4</i>
Grup 1	.454±.132	7	--	.001 *	.001 *	.002 *
Grup 2	.786±.066	7	.001 *	--	.097	.456
Grup3	.716±.149	7	.001 *	.097	--	.805
Grup 4	.734±.129	7	.002 *	.456	.805	--

* : İstatistiksel olarak farklı

GSH



Şekil 3 : Glutasyon değerleri

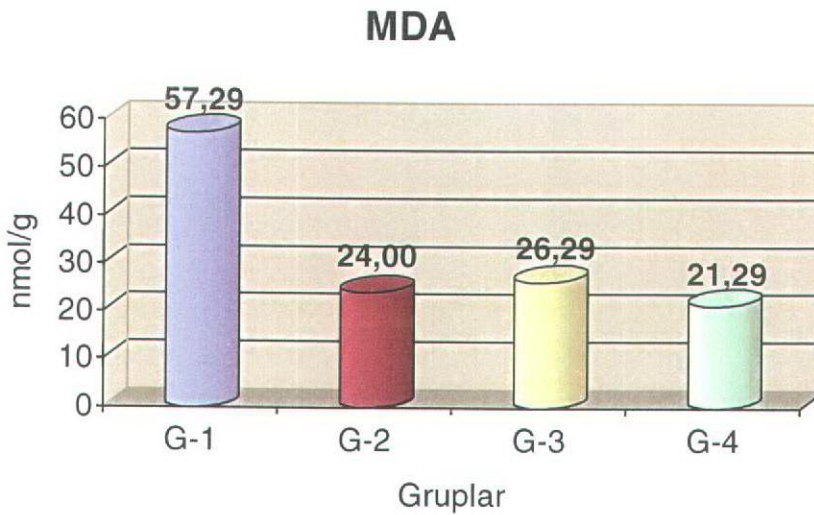
Tablo VII : Malondialdehit değerleri (nmol/g)

<i>Sıra no</i>	<i>Grup 1</i>	<i>Grup 2</i>	<i>Grup 3</i>	<i>Grup 4</i>
1	38	14	16	21
2	57	18	24	23
3	68	15	12	13
4	75	24	32	24
5	55	31	24	21
6	56	31	36	23
7	52	35	40	24
Ort±SD	57.29±11.80	24.00±8.52	26.29±10.29	21.29±3.86
Median	56.00	24.00	24.00	23.00

Tablo VIII: Malondialdehit deęerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

<i>Grup</i>	<i>MDA (Ort±SD) nmol/g</i>	<i>n</i>	<i>P değeri</i>			
			<i>Grup 1</i>	<i>Grup 2</i>	<i>Grup 3</i>	<i>Grup 4</i>
Grup 1	57.29±11.80	7	--	.001 *	.001 *	.001 *
Grup 2	24.00±8.52	7	.001 *	--	.620	.535
Grup 3	26.29±10.29	7	.001 *	.620	--	.259
Grup 4	21.29±3.86	7	.001 *	.535	.259	--

* : İstatistiksel olarak farklı



Şekil 4: Malondialdehit değerleri

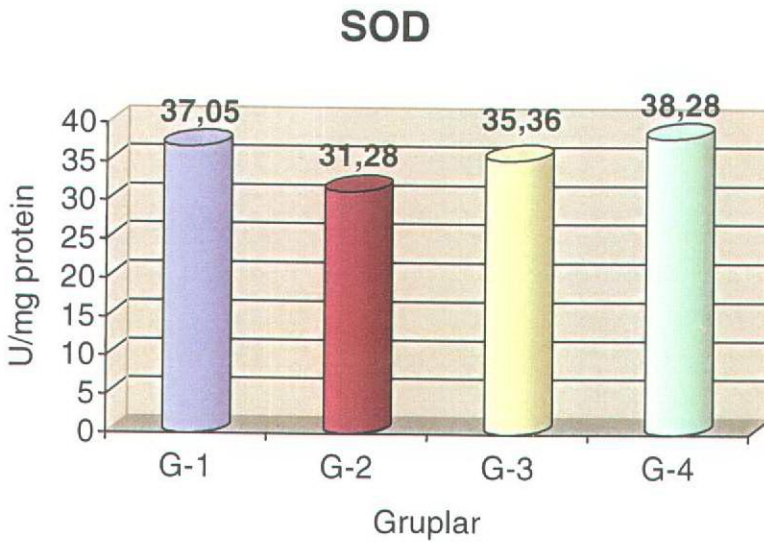
Tablo IX: Süperoksit dismutaz aktiviteleri (U/mg protein)

<i>Sıra no</i>	<i>Grup 1</i>	<i>Grup 2</i>	<i>Grup 3</i>	<i>Grup 4</i>
1	36.33	24.03	34.07	45.37
2	28.41	23.27	34.22	33.17
3	36.28	30.76	33.98	38.88
4	38.79	34.01	33.79	39.04
5	40.41	39.46	34.45	33.88
6	38.72	36.72	36.37	41.77
7	40.52	30.70	40.63	35.86
Ort±SD	37.05±4.18	31.28±6.07	35.36±2.48	38.28±4.37
Median	38.72	30.76	34.22	38.88

Tablo X: Süperoksit dismutaz aktivitelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

<i>Grup</i>	<i>SOD (Ort±SD) U/mg protein</i>	<i>n</i>	<i>p değeri *</i>			
			<i>Grup 1</i>	<i>Grup 2</i>	<i>Grup 3</i>	<i>Grup 4</i>
Grup 1	37.05±4.18	7	--	.097	.259	.805
Grup 2	31.28±6.07	7	.097	--	.209	.073
Grup 3	35.36±2.48	7	.259	.209	--	.383
Grup 4	38.28 ± 4.37	7	.805	.073	.383	--

* : İstatistiksel olarak fark yoktur.



Şekil 5 : Süperoksit dismutaz aktiviteleri

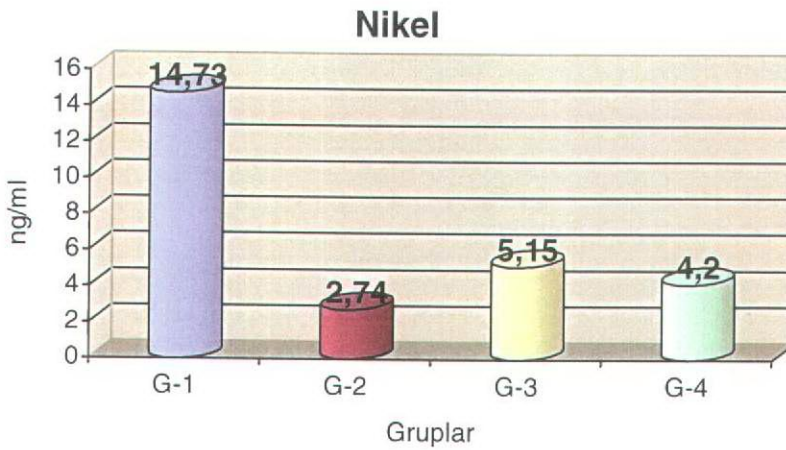
Tablo XI: Nikel seviyeleri (ng/ml)

<i>Sıra no</i>	<i>Grup 1</i>	<i>Grup 2</i>	<i>Grup 3</i>	<i>Grup 4</i>
1	16.84	3.4	4.69	2.86
2	8.71	.86	3.03	1.13
3	18.15	4.44	5.43	4.58
4	25.31	.59	4.97	3.47
5	21.59	1.18	4.13	7.17
6	5.87	5.97	7.42	5.97
7	6.65	--	6.41	--
Ort±SD	14.73±7.69	2.74±2.20	5.15±1.44	4.20±2.18
Median	16.84	2.29	4.97	4.02

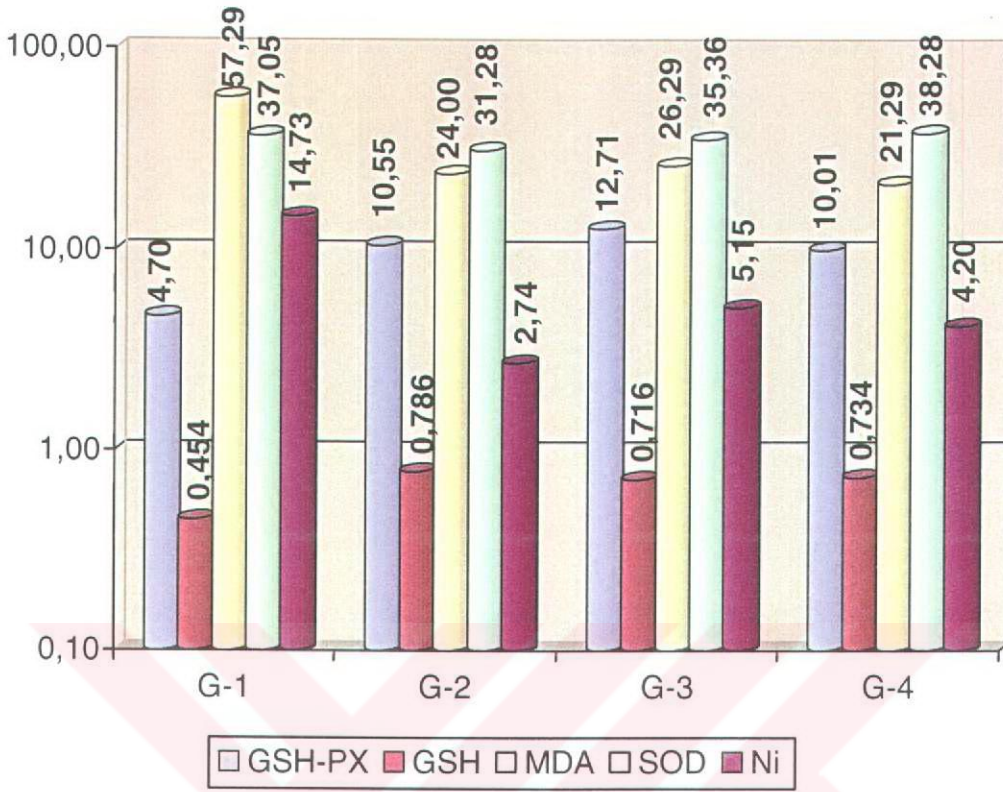
Tablo XII: Nikel seviyelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

<i>Grup</i>	<i>Ni (Ort±SD) ng/ml</i>	<i>n</i>	<i>p değeri</i>			
			<i>Grup 1</i>	<i>Grup 2</i>	<i>Grup 3</i>	<i>Grup 4</i>
Grup 1	14.73±7.69	7	--	.002 *	.004 *	.008 *
Grup2	2.74±2.20	6	.002 *	--	.073	.240
Grup 3	5.15±1.44	7	.004 *	.073	--	.366
Grup 4	4.20±2.18	6	.008 *	.240	.366	--

* : İstatistiksel olarak farklı



Şekil 6 : Nikel seviyeleri



Şekil 7: Grupların çalışılan parametrelere göre karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çevremizdeki havada, suda, toprakda ve diyetimizde bulunan nikel kullandığımız eşyalarda ve mücevherlerde de yer almaktadır (10). Pek çok hayvanda esansiyel bir elementtir ve bu hayvanlarda nikel lipit metabolizmasındaki özellikle dokulardaki lipit içeriğinin regülasyonu ve fosfolipitlerin sentezi için gereklidir (56, 74, 85). Eksikliğinde tavuk karaciğerinin yağ içeriği artmaktadır (60). Hayvan çalışmaları temel alındığında biotin, folat ve vitamin B₁₂'nin etkisi için de nikel gereklidir (58, 84). Nikel hematopoez için gerekli olan bir eser elementtir. Nikelin demir metabolizmasında önemli bir yeri vardır (57). Azalmış hematokrit ve hemoglobin değeri, azalmış eritrosit sayısı nikel eksikliğinin bir işaretidir. Nikel eksikliğinde barsaktan demir Emilimi bozulur (54, 55). Demir eksikliğinde barsaktan nikel Emilimi artmaktadır. Nikele bağlı kontakt dermatitde bu özellik önem kazanmaktadır (80). Hematopoezi stimule eden vitamin B₁₂ ile nikelin sinerjik rol oynadığı düşünülmektedir (58, 84).

Buna karşın nikelle karşılaşmış kişilerde akciğer, larinks gibi nazal kavite kanserlerine karşı artmış risk söz konusudur (7, 21, 63, 69). Bunun pek çok nedeninin olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenlerden bir tanesi divalent nikel bileşiklerinin nükleik asit ve proteinleri içeren çeşitli makromoleküller üzerindeki sülfidril, azo ve amino gruplarına bağlanmasıdır. Diğer ve önemli bir diğer neden olarak; nikel ile bağlı serbest radikal oluşumu nedeniyle lipit peroksidasyonunun gerçekleştiği düşünülmektedir (22). Bu çalışmada; nikelin oksidatif stresle ilişkisini araştırmak amacıyla lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak Malondialdehit, antioksidan savunma sistemlerinden Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon, Süperoksit Dismutaz incelenmiştir. Bu amaçla ratlara nikel ve nikel şelatörü olan Cyclam

verilmiştir. Nikelin yarılanma ömrü 20-60 saat arasında değişmektedir. Bu nedenle uygulamadan 24 saat sonra ise ratlar feda edilmiştir.

Athar ve arkadaşları (8) yaptıkları çalışmada nikel verdikleri ratlarda karaciğerde lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyini kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Eş zamanlı olarak karaciğer demir içeriğinin artmış olması onlara nikelin, demiri artırmasına bağlı olarak Haber-Weis ve Fenton reaksiyonlarıyla serbest radikal oluşturduğunu düşündürmüştür. Aynı ratlara demir şelatörü olarak etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) verildiğinde MDA düzeyinin azalmasıyla bu görüş desteklenmiştir. Aynı çalışmada bu etkinin verilen nikel dozuna bağlı olarak arttığı gösterilmiştir.

Srivastava ve arkadaşları (73) farelere nikel vermiş ve doza bağlı olarak karaciğerde lipit peroksidasyonunun arttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada bir diğer grup fareye nikel şelatörü olan cyclam verildiğinde lipit peroksidasyonunun artan cyclam dozuyla azaldığını göstermişlerdir.

Rodriguez ve arkadaşları (66) nikelin oksidatif stres üzerindeki etkisini farklı ırktaki fare grubunda araştırmışlar ve türler arasında farklılık olmakla birlikte karaciğerde en yüksek lipid peroksidasyonunun 24. saatte olduğunu tespit etmişlerdir.

Misra ve arkadaşları (52) ratlara nikel klorid vererek değişik dokulardaki lipit peroksidasyonu ve nikel ilişkisini incelemişlerdir. Lipit peroksidasyonunun karaciğerde kontrole göre %30 oranında artırdığını göstermişlerdir. Gerçek nedeninin tam olarak ne olduğu bilinmese de çalışmalarında karaciğer demir içeriğinin arttığını ve bu yüksekliğin lipit peroksidasyonunu hızlandırıldığını düşünmüşlerdir. İlk 24 saatte karaciğerde yüksek lipit peroksidasyonu seviyesi, etkilenmiş dokudaki artmış hidrojen peroksit konsantrasyonu ile ilgilidir. Karaciğerde artmış lipit peroksidasyonu nikel tarafından inhibe edildiği bilinen geçici olarak düşmüş antioksidan enzim düzeyleri ile birlikte. Bu iki etkinin birlikteliği oksidatif

hücre hasarını artırır. Zaman geçtikçe nikelin vücutta azalmasıyla birlikte antioksidan enzimlerin aktivitesi yeniden düzenlenir ve lipid peroksidasyonu azalır.

Andersen ve arkadaşları (5) ise değişik yaş gruplarındaki fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 8-12 haftalık farelerde lipid peroksidasyonunun en yüksek olduğunu göstermişlerdir.

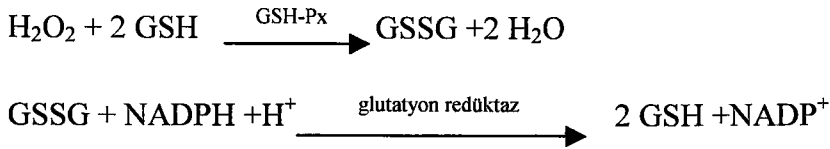
Shi ve arkadaşları (70) nikelin tek başına serbest radikal oluşturma yeteneğinde olmadığını glutatyon (γ -L-glutamilsisteinglisin), karnosin (β -alanil-L-histidin), homokarnosin (γ -aminobutiril-L-histidin) ve anserin (β -alanil-3metil-L-histidin) gibi oligopeptidlerle reaksiyona girerek oluşturduğu kompleksin hidrojen peroksitle reaksiyona girerek serbest radikal ve böylece lipid peroksidasyonu oluşturduğunu göstermişlerdir.

Chakrabarti ve arkadaşları (16) rat böbrek korteksini dilimlere ayırıp %100 oksijen basıncı altında 37°C'de 1-3 saat süreyle içinde nikel klorid bulunan bir ortama maruz bırakmışlardır. Lipid peroksidasyonun 3 saat sonra başladığını artan MDA düzeyi ile göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda yapılan ölçümlerde nikel verilen grubun MDA düzeyi diğer 3 grubun MDA düzeylerinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Grup 2, 3 ve 4'ün MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir ($p>0.05$).

Athar ve arkadaşları (8) yaptıkları çalışmada değişen dozlarda ve değişen sürelerde ratlara nikel verdiklerinde karaciğer glutatyon düzeyinin nikel dozunun artışı ile birlikte kontrole göre arttığını tespit etmişlerdir. Karaciğer glutatyonunun 16. saatte en yüksek düzeye ulaştığını söylemişlerdir. Yüksek glutatyon düzeyine rağmen karaciğer lipid peroksidasyonu da yüksek tespit edilmiştir. Aslında beklenen glutatyon yükseldiğinde antioksidan etkisi nedeniyle lipid peroksidasyonunun düşük olmasıdır. Burada paradoksal bir davranış söz konusudur. Araştırmacıların savunduğu glutatyonun serbest radikallerden koruyucu etkisi

yerine indirekt olarak +3 değerlikli demiri +2 değerlikli demire indirgeyerek serbest radikal oluşumuna yardımcı olduğudur. Bu çalışmada nikel verilen grupta glutatyon redüktazın arttığı ve glutatyon kullanan; glutatyon peroksidaz ile γ -glutamil transpeptidaz gibi enzimlerin aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Böylece glutatyon turnover'ının artışıyla glutatyon miktarının arttığı gösterilmiştir (9).



Rodriguez ve arkadaşları (66) değişik fare ırklarındaki yaptıkları çalışmada türler arasında farklılık olmakla birlikte bütün fare türlerinde karaciğerde glutatyon düzeyini kontrole göre düşük tespit etmişlerdir.

Misra ve arkadaşları (52) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada nikel verdikleri grupta karaciğer glutatyon düzeyini kontrole göre %33 azalmış olarak tespit etmişlerdir.

Andersen ve arkadaşları (5) değişik yaş grubundaki fareler üzerinde yaptıkları çalışmada nikel verilen 8-12 haftalık farelerde glutatyon düzeyini en düşük tespit etmişlerdir. Bu grup farelerde lipit peroksidasyonu da en yüksektir.

Shi ve arkadaşları (70), Kawanishi ve arkadaşları (38) nikelin tek başına serbest radikal oluşturma yeteneğinde olmadığını glisil-glisil-histidin ile oluşturduğu kompleksin hidrojen peroksitle reaksiyona girerek serbest radikal ve böylece lipit peroksidasyonu oluşturduğunu göstermişlerdir. Glutatyon; glutamik asit, glisin, sisteinden oluşan bir tripeptittir. Nikel glutatyondaki glisinle reaksiyona girerek glutatyonun tüketilmesine neden olabilir.

Bizim çalışmamızda bu sonuçları destekler şekilde nikel verilen grubun GSH düzeyi diğer grupların GSH düzeylerinden anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Gruplar arasında ise anlamlı bir fark ($p>0.05$) tespit edilememiştir.

Athar ve arkadaşları (9) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada artan nikel dozuyla birlikte karaciğer glutatyon peroksidaz aktivitesinde azalma tespit etmişlerdir. 24. saatte karaciğer glutatyon peroksidaz aktivitesi en düşük tespit edilmiştir. Glutatyon peroksidaz aktivitesindeki bu azalma aynı zamanda hidrojen peroksit konsantrasyonundaki artışla beraber olduğu için lipid peroksidasyonu artmaktadır.

Misra ve arkadaşları (52) nikel asetat verdikleri ratları 1, 3, 24, 48, 72 saatte feda etmişlerdir. Karaciğer GSH-Px aktivitesini 3. saatte %15 azalmış, 24. saatte ise kontrolden farklı olmadığını ve 48. saatte ise GSH-Px değerinin kontrole göre %129 arttığını bulmuşlardır. Araştırmacılar nikel verildikten sonra ilk 24 saatte karaciğer ve böbrek lipid peroksit düzeyinin artışına; artmış hidrojen peroksitin neden olduğunu söylemişlerdir. Özellikle karaciğerde artmış hidrojen peroksit konsantrasyonu katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitesini azalttığını düşünmüşlerdir. Bu iki etkinin bir arada olması oksidatif hücre hasarını hızlandırır (66).

Bizim yaptığımız çalışmada nikel verilen grupta GSH-Px aktivitesi diğer 3 gruptan anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grupların birbiri arasında GSH-Px aktiviteleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Bu sonucun artan lipid peroksitlerin glutatyon peroksidaz enzimini ihibe etmesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Misra ve arkadaşları (52) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada karaciğer SOD aktivitesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmamışlardır.

Kestenbaum ve arkadaşları (39) ise yaptıkları çalışmada nikelin karaciğer SOD aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Novelli ve arkadaşları (62) nikel klorit verdikleri ratların pankreasında SOD aktivitesinde belirgin bir artış tespit etmişlerdir. Nikelin SOD üzerindeki etkisinin dokuya spesifik olduğunu düşünmektedirler.

Bizim çalışmamızda yaptığımız ölçümler sonucunda SOD aktivitesi bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) bir fark bulunamamıştır. Karaciğer dokusunda süperoksit dismutaz aktivitesinin nikel tarafından etkilenmediği düşünülmektedir.

Bu çalışma nikelin oksidatif streste rolünü göstermek amaçlı yapılmıştır. 24. saatte nikelin halen antioksidatif enzimler üzerine etkisinin devam ettiği izlenmiştir. Bu çalışmayı 24 saatden uzun zaman aralığında örneğin 48-72 saat ve 1 hafta gibi sürelerde yapmak ve nikelin serbest radikal oluşturma mekanizması araştırılırken karaciğer demir düzeyine bakmak yararlı olabilir.

6.ÖZET

Bu çalışma nikelin antioksidan sistem üzerindeki etkisi göstermek amacıyla yapılmıştır. Ratlara nikel ve şelatörü olan cyclam verilmiştir. 24 saat sonra feda edilen ratların karaciğerinde antioksidan enzim aktivitesi ve lipit peroksidasyonu araştırılmıştır. Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit ve antioksidan enzimler olan glutatyon peroksidaz ile süperoksit dismutaz aktivitesine ve glutatyon düzeyine bakılmıştır.

Nikel verilen grupta malondialdehitteki istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0.001$) nikelin lipit peroksidasyonu üzerinde önemli etkisi olduğunu, serbest radikal ortaya çıkardığını düşündürmüştür. Serbest radikalleri ortadan kaldıran antioksidan enzim aktiviteleri çalışıldığında; glutatyon düzeyinin ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin azaldığı ($p<0.05$) süperoksit enzim aktivitesinin etkilenmediği gösterilmiştir. Bu sonuç nikelin lipit peroksidasyonuna neden olduğu görüşünü desteklemiştir. Ancak yapılan çalışma 24 saatle sınırlandırılmıştır. Sürenin uzatılarak nikelin etkisinin zamanla azaldığını ve antioksidan enzimler üzerindeki inhibitör etkisinin ortadan kalktığını göstermek uygun olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Abbracchio MP, Heck JD, Costa M: The phagocytosis and transforming activity of crystalline metal sulfide particles is related to their negative surface charge. *Carcinogenesis* 3: 175-180, 1982
2. Adams JD, Lauterburg BH, Mitchell JR: Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat. Regulation and response to oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 227: 749- 754, 1983
3. Akkuş İ: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları,s:1-68, 1995
4. Aller AR, Costa M, Oberdorster G: Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 143: 152-166, 1997
5. Andersen HR, Andersen O: Effect of nickel chloride on hepatic lipid peroxidation and glutathione concentration in mice. *Biol Trace Elem Res* 21: 255-261, 1989
6. Andreoli SP: Reaktive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. *Pediatric Nephrol* 5: 733-742, 1991
7. Anttila A, Pukkala E, Aitio A, Rantanen T, Karjalainen S: Update of cancer incidence among workers at a copper/nickel smelter and nickel refinery. *Int Arch Occup Environ Health* 71: 245- 250, 1998
8. Athar M, Hasan SK, Srivastava RC: Evidence for the involvement of hydroxyl radicals in nickel mediated enhancement of lipid peroxidation: implications for nickel carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 147(3): 1276-1281, 1987

9. Athar M, Hasan SK, Srivastava RC: Role of glutathione metabolizing enzymes in nickel mediated induction of hepatic glutathione. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 57: 421-424, 1987
10. Barceloux DG: Nickel . *Clin Toxic* 37 (2): 239- 258, 1999
11. Basağa HS: Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 68: 989-998, 1990
12. Belogue O, Cederbaum AI: Prevention of microsomal production of hydroxyl radicals, but not lipid peroxidation, by the glutathione peroxidase system. *Biochem Pharmacol* 35: 2663-2669, 1986
13. Bingöl F, Aydın S, Açıkgöz Ş: Serbest radikaller. *Ankara Hastanesi Tıp Dergisi* 28 (Supl): 2, 1993
14. Bossue FP, Paniago EB, Margerum DW, Kirskey Jr. ST, Kurtz JL: Trivalent nickel catalysis of autooxidation of nickel-(II) tetraglycine. *Inorg Chem* 17: 1034-1042, 1978
15. Burrows D, Creswell S, Merrett JD: Nickel, hands and his protheses. *Br J Dermatol* 105: 437-443, 1981
16. Chakrabarti SK, Bai C: Role of oxidative stress in nickel chloride-induced cell injury in rat renal cortical slices. *Bichem Pharmacol.* 58: 1501-1510, 1999
17. Cheeseman KH, Slatter TF: An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 149: 481-493, 1993
18. Chen CY, Huang YL, Lin TH: Effects of vitamin A pretreatment on nickel-induced lipid peroxidation and concentration of essential metals in liver, kidney and lung of mice. *Arch Toxicol* 64(6): 381-6, 1998

19. Chen CY, Huang YL, Lin TH: Lipid peroxidation in liver of mice administered with nickel chloride: with special reference to trace elements and antioxidants. *Biol Trace Elem Res* 64(3): 193-205, 1998
20. Costa M, Mollenhauer HH: Carcinogenic activity of particulate nickel compounds is proportional to their cellular uptake. *Science* 209: 515-517, 1980
21. Doll R, Mathews JD, Morgan LG: Cancers of the lung and nasal sinuses in nickel workers: a reassessment of period of risk. *Br J Ind Med* 34: 102- 105, 1977
22. Donskoy E, Donskoy M, Forouhar F, Gillies CG, Marzouk AB, Reid MC, Zaharia O, Sunderman FW: Hepatic toxicity of nickel chloride in rats. *Ann Clin Lab sci* 16: 108-17, 1986
23. Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77, 1959
24. Evans RM, Davies PJA, Costa M: Video time-lapse microscopy of phagocytosis and intracellular fate of crystalline nickel sulfide particles in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 42: 2729-2735, 1982
25. Feeley RM, Eitenmiller RR, Jones JB Jr, Barnhart H: Manganese, cobalt, nickel, silicon and aluminium in human milk during early lactation. *Fed Proc* 42: 931, 1983
26. Freeman BA, Crapo JD: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-425, 1982
27. Gutteridge JMC: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41(12):1819-1828, 1995
28. Halley PJ, Bice D, Mugggenburg BA, Hahn FF, Benjamin SA: Immunopathologic effects of nickel subsulfide on primate pulmonary immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 88: 1- 12, 1987

29. Halliwell B: Free radical, reactive oxygen species and human disease: A critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Path* 70: 737-757, 1989
30. Halliwell B, Borish ET: Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 107: 526-545, 1987
31. Halliwell B, Gutteridge JMC : Oxygen free radicals and irons in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246: 501-514, 1986
32. Halliwell B, Gutteridge JMC : Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in enzymology*. 186: 1-17, 1990
33. Howie AF, Bell D, Hayes PC, Hayes JD, Beckett GJ: Glutathione S-Transferase isoenzymes in human bronchoalveolar lavage: a possible early marker for the detection of lung cancer. *Carcinogenesis* 11:195-300, 1990
34. Inoue S, Kawanishi S: ESR evidence for superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel (II) complex of glycylglycyl-L-histidine. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 445-451, 1989
35. Kasprzak KS, Bare RM: In vitro polymerization of histones by carcinogenic nickel compounds. *Carcinogenesis* 10: 621-624, 1989
36. Kasprzak KS, Hernandez L: Enhancement of hydroxylation and deglycosylation of 2'-deoxyguanosine by carcinogenic nickel compounds. *Cancer Res* 49: 5964-5968, 1989
37. Kasprzak KS, Quander RV, Poirier LA: Effects of calcium and magnesium salts on nickel subsulfide carcinogenicity in Fisher rats. *Carcinogenesis* 6: 1611- 1616, 1985
38. Kawanishi S, Inoue S, Yamamoto K: Site-specific DNA damage by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide. *Carcinogenesis* 10: 2231-2235, 1989

39. Kestenbaum RS, Caruso C, Berlyne GM: Effect of nickel on oxygen free radical metabolism: Inhibition of superoxide Dismutase and enhancement of hydroxydopamine autoxidation. Biol Trace Elem Research 28: 213-221, 1991
40. Lau TJ, Hackett RL, Sunderman FW: The carcinogenicity of intravenous nickel carbonyl in rats. Cancer Res 32: 2253- 2258, 1972
41. Lawrence RA: Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. Biochem Biophys Res Com 71(4): 952-958, 1976
42. Liden C: Nickel in jewelry and associated products. Contact Dermatitis 26: 73-75, 1992
43. Listowsky I, Abramovitz M, Hamma H, Niitsu Y: Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by GST. Drug Metab Rev 19: 305-318, 1988
44. Lowry OH: Protein measurement with the folin reagent. J Biol Chem 193: 265-275, 1951
45. Mas A, Holt D, Webb M: The acute toxicity and teratogenicity of nickel pregnant rats. Toxicology 35: 45- 57, 1985
46. Mc Cord JM : Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. The New Eng J Med 17: 159- 163, 1985
47. Mc Cord JM, Fridovich I: The biology and pathology of oxygen radicals. Annals of Internal Medicine 89: 122-127,1978
48. McCay PB, Gibson DD, Fong KL, Hornbrook KR: Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. Biochim Biophys Acta 431: 459- 468, 1976

49. Meister A, Anderson ME: Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52: 711- 760, 1983
50. Meister A: Methods for selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione transport. *Methods in Enzymology* 113: 571- 585, 1985
51. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J: Importance of Se- glutathione peroxidase, catalase and Cu / Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17: 235-248, 1994
52. Misra M, Rodriguez RE, Kasprzak KS: Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology* 64: 1-17, 1990
53. Misra M, Rodriguez RE, North SL, Kasprzak KS: Nickel-induced renal lipid peroxidation in different strains of mice: concurrence with nickel effect on antioxidant defence systems *Toxicol Let* 58: 121-133, 1991
54. Nielsen FH, Myron DR, Givand SH, Zimmerman TJ, Ollerich DA: Nickel deficiency in rats. *J Nutr* 126(9): 2377S- 2385S,1996
55. Nielsen FH, Myron DR, Givand SH, Zimmerman TJ, Ollerich DA: Nickel deficiency and nickel- rhodium interaction in chicks. *J Nutr* 105: 1607- 1619, 1975
56. Nielsen FH, Sandstead HH: Are nickel, vanadium, silicon, fluorine and tin essential for man? A review. *Am J Clin Nutr* 27: 515-520, 1974
57. Nielsen FH, Schuler TR, McLeod TG, Zimmerman TJ: Nickel influences iron metabolism through psysiologic, pharmacologic and toxicologic mechanisms in the rat. *J Nutr* 114(7):1280-8, 1984

58. Nielsen FH, Zimmerman TJ, Shuler TR, Brossart B, Uthus EO: Evidence for a Cooperative metabolic relationship between nickel and vitamin B12 in rats. *J Trace Elem in Exper Med* 2: 21- 29, 1989
59. Nielsen FH: Essentiality and function of nickel. *Trace Element Metabolism in Animals-2* 381- 385, 1974
60. Nielsen FH: Studies on the essentiality of nickel. *Newer Trace Elem in Nutr* 215- 253, 1971
61. Nielsen GD, Flyvholm M: Risks of high nickel intake with diet. *IARC Sci Publ* 53: 333-338, 1984
62. Novelli ELB, Rodriguez NL: Effect of nickel chloride on streptozotocin- induced diabetes in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 66: 663-, 1988
63. Oller AR, Costa M, Oberdorster G: Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 143: 152- 166. 1997
64. Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169, 1967
65. Poli G: Liver damage due to free radicals. *British Med Bulletin* 49: 604- 620, 1993
66. Rodriguez RE, Misra M, North SL, Kasprzak KS: Nickel-induced lipid peroxidation in the liver of different strains of mice and its relation to nickel effects on antioxidant systems. *Toxicol Let* 57: 269-281, 1991
67. Sen P, Costa M: Pathway of nickel uptake influences its interaction with heterochromatic DNA. *Toxicol Appl Pharmacol* 84: 278-285, 1986

68. Shan X, Aw TY, Jones DP: Glutathione- dependent protection against oxidative injury. *Pharmac Ther* 47: 61- 71, 1990
69. Shannon H S, Julian J A, Roberts R S: A mortality study of 11500 nickel workers. *J Natl Cancer Inst* 73: 1251- 1258, 1984
70. Shi X, Dalal NS, Kasprzak KS: Generation of free radicals in reactions of Ni(II)- thiol complexes with molecular oxygen and model lipid hydroperoxides. *J Inorg Biochem* 15: 211-225, 1993
71. Sies H: Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69: 965-968, 1991
72. Southorn PA, Powis G: Free radicals in medicine II: Involvement in human disease. *Mayo Clin Prac* 63: 390-408, 1998
73. Srivastava RC, Kumar A, Srivastava SK, Gupta S, Hasan SK, Athar M: Nickel-mediated inhibition in the glutathione- dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem Inter* 20(3): 495-501, 1990
74. Stangl GI, Kirchgessner M : Nickel deficiency alters liver lipid metabolism in rats. *J Nutr* 126: 2466- 2473, 1996
75. Sunderman FW Jr, Hopfer SM, Sweeney KR: Nickel absorption and kinetics in human volunteers. *Proc Soc Exp Biol Med* 191:5-11,1989
76. Sunderman FW, McCully KS: Effects of manganese compounds on carcinogenicity of nickel subsulfide in rats. *Carcinogenesis* 4: 461- 465, 1983
77. Sunderman FW: A pilgrimage into the archives of nickel toxicology. *Ann Clin Lab Sci* 19: 1-16, 1989

78. Sunderman FW: Carcinogenic effects of metals. *Fed Proc* 37:40-46, 1978
79. Sunderman FW: Mechanisms of nickel carcinogenesis. *Scand J Work Environ Health* 15:1-12, 1989
80. Talkvist J, Tjalve H: Effect of dietary iron deficiency on the disposition of nickel in rats. *Toxicol Lett* 92(2): 131- 138, 1997
81. Burtis CA, ER Ashwood: Nickel. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry Second Edition*, 1994
82. Tkeshelashvili LK, Reid TM, McBride TJ, Loeb LA: Nickel induced a signature mutation for oxygen free radical damage. *Cancer Research* 53: 4172- 4174, 1993
83. Uchiama M, Mihara M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 279-286, 1978
84. Uthus EO, Poellot RA: Dietary folate affects the response of rats to nickel deprivation. *Biol Trace Elem Research* 52: 23- 35, 1996
85. Uthus EO, Seaborn CD: Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigm for dietary recommendations of the other trace elements. *J Nutr* 126: 2452S-2459S, 1996
86. Wahlberg JE: Immunoglobulin E, atopy and nickel allergy. *Cutis* 18:715-720, 1976
87. Weiss S J : Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 548: 9-37, 1986
88. Xiaoyan W, Isao Y, Jiankang L, Akitane M: Cobalt(II) and nickel(II) ions as promoters of free radicals in vivo: detected directly using elektron spin resonance spectrometry in circulating blood in rats. *Arch Biochem Biophys* 306(2): 402-406, 1993

89. Yi-Sun, Oberley L W, Li Y: A simple method for clinical assay of süperoxide dismutase. Clin Chem 34(3): 497- 500, 1988