

GİRİŞ

Metabolizma için gerekli esansiyel bir eser element olan çinkonun, insan sağlığı bakımından öneminin anlaşılması ancak son yıllarda olmuştur.¹¹⁸ Çinko, 300'den fazla enzimin biyolojik fonksiyonları için gereklidir. Çinko, DNA sentezinde, normal büyümede, beyin gelişiminde, davranışsal cevapta, üremede, fetal gelişimde, membran stabilitesinde, kemik formasyonunda ve yara iyileşmesinde görevli enzimlerin katalizlenmesinde gereklidir.^{8,103}

Serbest radikallerle ilgili yapılan pek çok çalışma çinkonun antioksidan ve tedavi edici ajan olarak önemini vurgulamaktadır. Çinkonun antioksidan etkisini indirek yolla; hücre membran yapısını koruyarak, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin yapısına katılarak, metalloitiyoneinin doku konsantrasyonlarını arttırarak, tiol grubu içeren proteinlerin oksidasyonunu engelleyerek ayrıca kritik bölgelerde demir ve bakır gibi redoks reaktif metallerin yerine geçerek gerçekleştirdiği bilinmektedir.^{119,94}

Çinkonun oksidatif stres yokluğunda rolünün ne olacağı yönünde fazla çalışma bulunmamaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada çinkonun sağlam beyin hücrelerinde oksidatif stresi uyardığına yönelik kanıtlar elde edilmiştir. Bu nedenle sağlıklı ratlarda çinko ilavesinin oksidan-antioksidan sistemi nasıl etkileyeceğini araştırmayı hedefledik. Çinkonun oksidatif stres yokluğunda doza bağlı olarak farklı dokularda oksidan-antioksidan sisteme etkilerini araştırırken lipid peroksidasyon belirteci olarak MDA (Malondialdehit) düzeylerini, protein oksidasyon belirteci olarak AOPP (ileri düzey okside protein ürünleri) düzeylerini, antioksidan parametreler olarak SOD, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), aktivitelerini inceledik. Farklı dozlardaki çinkonun etkilerini de histolojik bulgularla desteklemeye çalıştık.

GENEL BİLGİLER

Bütün canlı dokularda bulunan, eksikliğinde türe göre farklılık göstermeksizin aynı bozuklukların meydana geldiği ve eksikliğinin giderilmesiyle de bu bozuklukların ortadan kalktığı elementler esansiyel element olarak tanımlanır. Doğada bulunan 96 elementten biri olan çinko da esansiyel bir elementtir.¹²⁷

Çinko, atom numarası 30, atom ağırlığı 65,409 g/mol olan bir elementtir ve yeryüzünde en sık görülen elementler içinde yirmi beşinci sırayı almaktadır. Çinko biyolojik sistemlerde yalnızca 2 değerlikli olarak bulunur. ZnO, ZnCO₂ ve ZnSiO₄ gibi bileşimler halindedir. Çinkonun ilk tanımlanması 1509 yılında Erasmus Ebener tarafından yapılmıştır. Canlıda çinkonun önemi 1869'da Raulin'in Aspergillus Niger adlı siyah ekmek mantarında büyüme için gerekli olduğunu göstermesiyle anlaşılmıştır. 1926'da daha yüksek bitkilerin ve 1934'de sıçanların gelişmesi için çinkonun gerekliliği ortaya konulmuştur. 1940 yılında Keilin ve Mann tarafından karbonik anhidrazın %0,3 çinko içeren bir çinko metalloenzimi olduğu gösterilerek ilk spesifik biyolojik fonksiyonu tanımlanmıştır. 1956'da Vallee ve ark.'ları sirozlu hastalarda çinko eksikliğini bildirmişlerdir.⁸⁴ 1943 yılında Türk hekimi Tayanç cücelik, hipogonadizm, hepatosplenomegali, kuru cilt, toprak yeme ve demir eksikliği anemisi ile karakterize bir sendrom tanımlamış, daha sonra Prasad ve ark.'ları bunun sebebinin diyetteki çinko eksikliği olabileceğini açıklamıştır.¹²⁰ 1963 yılında Mısır'da benzer bulguları taşıyan çocuklarda ilk defa kanda çinko ölçümleri yapılarak bu elementin eksik olduğu saptanmış ve sonrasında bu klinik tablo 'Prasad Sendromu' olarak literatüre geçmiştir. 1974'de Amerika'daki Ulusal Bilimsel Akademi'nin Beslenme Bölümü tarafından çinkonun esansiyel bir besin maddesi olduğu açıklanmış ve total parenteral nutrisyon sıvılarında bulunması zorunlu kılınmıştır.

2.1. Çinko ve Fonksiyonları

Bugün artık çinkonun 300’den fazla enzimatik reaksiyonda ve gen ekspresyonunda rolü olan 2000’den fazla proteinin yapısında bulunduğu bilinmektedir.¹² çinkonun metabolik olaylarda, protein, karbonhidrat, enerji, nükleik asit, lipit ve hem sentezinde, homeostaziste, gen ekspresyonunda, immün sistem maturasyonunda, doku sentezinde, embriyogenezisde, oksidatif streste, apoptoziste ve yaşılanmada önemli roller üstlendiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır.

Çinko katalitik, yapısal ve düzenleyici iyon olarak çok önemlidir. Tüm hücrelerin proliferasyonu ve diferansiyasyonu için gereklidir. Doğal olarak çok önemli proteinlerin yapısına girer, enzimlerin aktif bölgelerinde yer alır veya moleküler etkileşimlerle intrasellüler proteinler için yapısal bir destek vazifesi görür. Özellikle metabolik enzimlerin, transkripsiyon faktörlerinin ve hücrel sinyal iletim proteinlerinin yapısında bulunur. Çinkonun hücrel sinyal iletiminin tüm düzeylerinde direkt olarak sinyal iletim fonksiyonu olduğuna dair kanıtlar artmaktadır.¹² Biyolojik membranların ve iyon kanallarının stabilitesini ve bütünlüğünü korur. Nükleik asit veya diğer gen düzenleyici proteinlerde yapısal element olarak rol oynar. Redoks aktivitesinin olmaması nedeniyle bağlandığı proteini dayanıklı hale getirir. Steroid hormonların reseptörlerinin yapısında, enzimlerin katalitik bölgelerinde anahtar rol oynar (Tablo 1).

Tablo 1. Çinko İçeren Bazı Metalloenzimler ve Fonksiyonları

Metalloenzim	Fonksiyon
Karbonik Anhidraz	CO ₂ ve HCO ₃ metabolizması
Timidin Kinaz	Nükleik asit ve protein sentezi
DNA Polimeraz	Nükleik asit ve protein sentezi
RNA Polimeraz	Nükleik asit ve protein sentezi
Delta Aminolevünilik Asit Dehidrataz	Porfirin sentezi
Glutamat Dehidrogenaz	Amino asit deaminasyonu ve üre siklusu
Ornitin Transkarbomilaz	Amino asit deaminasyonu ve üre siklusu
Gliseraldehit-3-fosfat Dehidrogenaz	Glukoz ve glukoneogenez
Laktat Dehidrogenaz	Glukoz
Alkol ve Retinol Dehidrogenaz	Alkol-retinaldehit dönüşümü
Karboksipeptidaz	Protein sindirimi, folat emilimi
Aminopeptidaz	Protein sindirimi, folat emilimi
Superoksit Dismutaz	Superoksitlerin O ₂ ve H ₂ O ₂ 'e dönüşümü
Alkalen Fosfataz	İntestinal faktör

Çinko divalent bir katyondur ve D kabuğu 10 d elektronları ile tam doldurulmuştur.

Bu elektron konfigürasyonu çinkoya dört önemli özellik kazandırır:

1) D kabuğu elektronlarla tamamen dolu bir vaziyette olduğu için herhangi bir stabilizasyonu sağlayacak bir liganta gerek kalmamaktadır. Böylece çinko esnek bir metal olarak proteine bağlandığı zaman onun çeşitli geometrik şekillerine kolayca uyum sağlayabilir.

2) Çinko atomu sınırdaki asit olduğu için, bazı ligantlarla kuvvetli interaksiyona girer. Bunlar arasında; sisteinin sülfürü, histidinin nitrojeni, glutamatın oksijeni sayılabilir. Bu şekilde protein, steroid ve nükleik asit konformasyonunu biyolojik olarak stabilize halde tutar.

3) Çinko tek oksidasyon durumunda, divalent bir katyondur. Divalent çinko redoks aktivite göstermez. Yani ne potansiyel okside formu (Zn^{+3}) ne de potansiyel redükte formu fizyolojik şartlarda mevcuttur. Bu özelliği sayesinde stabiliteyi temin eder, hidroliz ve transfer söz konusu olmaz. Bakır ve demir gibi redoks aktif metaller ise RNA ve DNA'ya kilitlenerek radikal reaksiyonları başlatır ve bu reaksiyonlar nükleik asidin hasara uğramasına neden olur.

4) Çinko kinetik açıdan relatif olarak labildir ve hızlı bir şekilde ligant değiştirmeleri meydana gelir.^{5,17,62,116}

Çinko; serbest radikal oluşumunu önlemede, biyolojik yapıları zararlı etkilerden korumada ve immün fonksiyonları düzeltmekte önemli bir elementtir. Çinko, T-hücre matürasyonu ve farklılaşması için gerekli olan timülin olarak adlandırılan çinko bağımlı timik hormon yoluyla timik fonksiyonlar için esansiyeldir.¹⁰³

Çinko eksikliğinde eritrosit membranlarında osmotik fragilite, mitokondriyal ve mikrozomal mebranlarda lipid peroksidasyonu artmaktadır. Çinko eksikliği ayrıca platelet agregasyonunda bozulmaya, T-hücre sayısında azalmaya ve T-lenfositlerin mitojenlere cevabında azalmaya neden olarak homeostazisin bozulmasına sebep olur.^{82,140} Çinko eksikliğinde; büyüme geriliği, anoreksiya, seksüel matürasyonda gecikme, demir eksikliği anemisi ve tat almada değişiklik meydana gelir.⁸

2.1.1. Çinkonun Metabolizması (Emilimi, Taşınması, Doku Dağılımı ve Atılımı)

Çinko her yerde bulunan eser elementtir. Hücrelerin proliferasyonu, replikasyonu ve farklılaşması için aminoasitlere, glukoza, yağ asitlerine, vitaminlere ve minerallere ihtiyaç vardır. Çinko, tüm doku ve vücut sıvılarında demirden sonra en yaygın olarak bulunan esansiyel bir eser elementtir. Çinko vücutta depolanmaz. 70 kilogramlık (kg) bir erişkin vücudunda toplam 1,4-2,3 gram (g) oranında çinko bulunurken, term bir yenidoğanda 60 mg kadardır.²¹ En fazla kasta (~%60) olmak üzere kemikte (~%30), deri ve saçta (~%8), karaciğerde (~%5), gastrointestinal sistem ve pankreasta (~%3) bulunur. Diğer organ sistemlerinde çinko miktarı %1'den azdır. Canlı dokulardaki en yüksek konsantrasyon gözün koroid ve retina tabakaları ile prostatta bulunur. Seminal sıvıda, deri, saç ve tırnakta da yüksek orandadır.¹²⁷ İnsanlarda eser elementlerden demir çok fazla bulunmaktadır. Fakat demir, hemoglobine bağlı bulunduğundan en fazla geçici metal iyonu çinkodur.¹⁴⁷ Genel olarak günlük diyetteki çinko gereksinimi 15 mg/gün ve tolere edilebilir üst sınır 25 mg/gün'dür ¹³¹ (Tablo 2). Çok hücreli organizmalarda intrasellüler çinkonun %40'ı nükleusta, %50'si stoplazmada ve organellerde, geriye kalanı hücre membranında yer almaktadır.¹⁴⁰ Çinkonun genler üzerindeki potansiyel önemi, invitro olarak nükleusun içerisinde önemli miktarda çinko içermesi ve rat karaciğerinde büyük oranlarda çinko bulunması ile fark edilmiştir.³³ Çinko; DNA ve RNA polimeraz ile transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi yoluyla DNA replikasyonunda, RNA transkripsiyonunda ve kromatin yapısında bulunmasıyla genetik stabilitede ve gen ekspresyonunda gereklidir. Ayrıca çinko DNA tamirinde ve programlı hücre ölümünde de rol oynar.⁵³

Tablo 2. Çinko gereksinimi

Yaş	mg / gün
0 - 12 aylar	3 - 5
1 - 10 yaş	10
11 yaş üstü	15
Gebe kadın	20 - 25

Diyetle alınan çinko, 15 dakika sonra kan dolaşımına girer. En fazla ve hızlı şekilde karaciğer, pankreas, böbrek ve dalak tarafından tutulur. Bu organlarda çinkonun değişimi de hızlıdır. Kemik, deri, kas, santral sinir sistemi, eritrositler ve saçtaki çinko yavaş mobilize olan kısmı oluşturur.^{2,149}

Çinkonun emilimi ve endojen atılımı hayvanlarda direk olarak ölçülemediğinden diyetle alınan çinkonun %20-40'nın emildiği tahmin edilmektedir. Çinkonun %60'ı duodenumdan, %30'u ileumdan, %10'u da proksimal jejunumdan aktif olarak ve spesifik çinko transport ligantları tarafından kolaylaştırılarak absorbe edilir.⁷⁵ Çinko bağırsaklardan enterositlere geçerken serbest iyonlar şeklinde geçer. Absorbe edilen çinko yaklaşık 5 mg/dl.'dir. Gastrointestinal sistem (GİS) çinkonun metabolizmasında önemli rol oynar ve GİS'ten çinko atılımı çinko dengesinin sağlanmasında en önemli etkidir.⁸⁵ Ratların bağırsak mukozalarından izole edilen metallothioneinin (MT) ve düşük moleküler ağırlıklı (8,6 kDa) sisteinden zengin bir intestinal proteinin (CRIP) çinkonun gastrointestinal emiliminden sorumlu olduğu gösterilmiştir.^{5,73} Doymamış durumdaki metallothionein intestinal lümende diyetle alınan çinkoyu bağlayıp emilimini kolaylaştırmaktadır.¹⁰⁶ Çinko, intestinal mukozal hücrelerde, karaciğerde, pankreasta, böbrekte ve akciğerlerde

metallotiyonein üretimini arttırmaktadır. İnce bağırsakta metallotiyonein, çinkoya bağlanarak fazla miktarda çinkonun vücuda emilimini de engellemektedir.¹²⁵ Ratlarda besinsel çinko alımıyla çinkonun mukozal metallotiyoneine bağlanımı arasında direkt bir korelasyon gözlenmiştir. Fakir çinko diyeti (30 mg/kg) ile fazla miktarda çinko CRIP'ye (%40) az miktarda ise metallotiyoneine (%4) bağlanırken, zengin çinko diyeti (900 mg/kg) ile daha az miktarda CRIP'ye (%14) daha fazla oranda metallotiyoneine (%52) bağlanmaktadır.^{5,73}

Çinko emilimi, çinko ile beslenme durumuna, alınan çinkonun durumuna, diyetin kimyasal ve fiziksel karakteristiğine göre değişir. Bazı besinler, vitaminler ve mineraller çinko emilimini etkileyerek çinko eksikliği veya fazlalığına neden olabilirler. Fitatlar, fosfatlar, lifli besinler, kalsiyum, okzalit, bakır, kadmiyum, inorganik demir, kurşun, kalay, kobalt, folik asit, kepekli ekmek, düşük proteinli diyet, yüksek demir içeren diyet, kil ve toprak çinko emilimini azaltırken; proteinler, metiyonin, lizin, glisin, histidin, sistein, sitrik asit, pikolinik asit, askorbik asit, gıda pH'sının düşük olması, laktoz, şarap, EDTA, D vitamini, B₆ vitamini, yüksek proteinli diyet, düşük demir içeren diyet ve D-penisilamin emilimini artırır.¹²⁷

Çinkonun serbest iyonlar gibi enterositlere taşınabilmesinde lümen içi geçişin olduğu farz edilir. ZnT-1 (Zinc transporter-Çinko taşıyıcısı), -2, -3, -4 ve Divalan Katyon Taşıyıcısı-1 (DCT-1) (Nramp 2) (çinko taşıma yeteneği gösteren bir iyon taşıyıcısı) çinko taşıyıcılarıdır. ZnT-1; 507 amino asitten oluşan, şelasyon ve asidifikasyon ile ilişkili oluşumlarda rol almasında önemli olan glisin ve histidinden zengin proteindir. ZnT-1 çok çeşitli dokularda dağılım gösterir. Fakat, intestinal lamina propria ile goblet ve böbrek hücrelerinde tespit edilebilecek miktarlarda değildir. ZnT-1 proteininin düzenlenmesinde, diyetle alınan çinko miktarının etki etmediği anlaşılmıştır. ZnT-1 ekspresyonunun artması,

iskemik hücrelerden sağlam beyin bölgelerine doğru çinko geçişinin artması ile oluşan çinko ile ilişkili nöronal hasarın gecikmesi bir defans mekanizması olabilir.⁹⁹ ZnT-2 ve ZnT-3, dokuya spesifik veziküler çinko taşıyıcılarıdır. ZnT-2'nin doku dağılımı öncelikle bağırsak, böbrek ve testislerken ZnT-3'ün dağılımı beyin ve testisler ile sınırlıdır. Sinaptik sinyal iletiminde çinkonun veziküler paketlenmesi nöron fonksiyonları için çok önemlidir. ZnT-3, nörodejeneratif fonksiyonlarda ve hastalıklarda ayrıca spermatogenezde rol oynayabilir. ZnT-4 meme bezinde bol miktarda bulunmaktadır. ZnT-4'de tek nokta mutasyonu olduğunda süte sekrete olan çinko miktarında azalma meydana geldiği gösterilmiştir. DCT-1; demir Emilimi için temeldir ve up-regülasyonu, demirin düşüklüğüne cevaben meydana gelir. DCT-1, ZnT ailesinden farklıdır ve çinko taşıma yeteneğine sahiptir. Bu nedenle düşük demir alımında, çinko taşıyıcıları plazma membranı üzerine yerleşerek çinkonun intestinal Emilimini arttırmıştır. Bazı çinko taşıyıcılarının ekspresyonu fizyolojik ve beslenme durumları ile ilişkilidir.¹⁴⁰

Plazmadaki çinko konsantrasyonu 15 $\mu\text{mol/L}$ 'dir ve bunun %84'ü albümine, %15'i α_2 -makroglobuline ve %1'i transferin, haptoglobulin, seruloplazmin, Ig G, serbest amino asitler (başlıca histidin ve sistein) ve metalloenzimlere bağlı olarak taşınır. Kandaki çinkonun %80'i eritrositlerdeki karbonik anhidraz enzimi içerisinde, %3'ü lökositlerde ve az miktarda da trombositler içerisinde. Organizmada iyonik formda bulunmayan çinkonun albümine ve aminoasitlere bağlı olan kompartmanı plasentadan fetusa çinko değişimine, α_2 -makroglobuline bağlı olan kısmı ise hücre içi ya da hücre yüzeyinde çinko değişimine aracılık etmektedir.² Plazma çinko konsantrasyonu diyetle alım ile ilişkilidir ve hormonal kontrol (glukokortikoidler, glukagon, epinefrin) ve stres durumlarına duyarlıdır.¹⁴⁰ Çinko eksikliğinin fizyolojik işaretleri ve doku konsantrasyonundaki değişiklikler, plazma çinko konsantrasyonunda bir değişim olmaksızın meydana gelmez.⁸⁴

GİS, çinko homeostazisinin regülasyonunda majör bölgedir. Çinko alımı düşük olduğunda emilim, primer olarak taşıyıcı aracılıklı meydana gelir. Şiddetli çinko eksikliğinde kayıp tüm dokularda eşit değildir. Çinko konsantrasyonları; saç, deri, kalp ve iskelet kasında sabit kalırken, plazma, karaciğer, kemik, ve testis çinko konsantrasyonları önemli oranda düşüktür. Çinkonun ekstrasellüler fraksiyonu plazma albümini, salgılanan sindirim enzimleri ya da keratin gibi filamentöz yapılarla ilişkilidir. Plazma konsantrasyonlarındaki değişiklik, çinko alımındaki değişiklik ile çok yavaş meydana gelmektedir. Romatoid artiritli hastalarda hepatik metallothioneinin arttığı, çinkonun albümine affinitesinin azaldığı gözlemlenmiştir.⁴⁵ Plazma çinko değişiklikleri metallothionein sentezi üzerindeki inflamatuvar hastalıkların etkilerinden dolayı olabilir. Ayrıca iyonun intestinal transportunun azalması, albüminin kütesinin küçülmesi ve çinko bağlama kapasitesi ile ilişkili olabilir. Eritrositlerdeki çinko içeriği $\sim 1 \text{ mg}/10^6$, lökositlerdeki ise $\sim 6 \text{ mg}/10^6$ 'dır. Çinko iyonları hidrofilitiktir ve pasif diffüzyon ile hücre membranlarını geçemez. Genellikle transportu çinko konsantrasyona bağlı olarak doymuş ya da doymamış komponentler şeklinde tanımlanmıştır. Hücrelerin çinko alımının iki mekanizması vardır:

- 1) Transsitotik veziküllerde doyurulabilir reseptör aracılıklı çinko-albümin kotransportu,
- 2) Hücreler arası bağlantılar yoluyla doyurulamayan ligant (çoğunlukla albümin ve histidin) aracılıklı kotransportu.¹⁴³

Çinkonun atılımı esas olarak feçes (%70) ile olmaktadır. GİS'ten atılımı 2,5-5,5 mg/gün olarak hesaplanmıştır.¹⁴⁰ Pankreas ve safra sekresyonları ile bağırsağa gelen çinko yeniden emilime uğrar. Diyetle alınan emilmemiş çinko, ekzokrin pankreas sekresyonlarındaki endojen çinko, safra, ölü hücreler, mukus ve mukozal çinko

sekresyonları fekal çinkonun kaynağını oluşturur.¹⁴¹ Fekal çinko atılımı emilen çinko miktarına bağlıdır.¹²⁰ Çinko ihtiyacının arttığı laktasyon döneminde bu ilişki değişme eğilimindedir.⁵⁸ Alım azaldığı zaman fekal çinko atılımı da azalır. Fazla alım sırasında da emilimi azalır ve atılımı artar. Çinkonun atılımı metallothionein gibi endojen ligandların bağlanmasına ihtiyaç duyar.⁹³ Renal atılım ise tubuler sekresyon ile sabit miktarda olup; 300-700 µg/gün'dür.⁸⁶ Yenidoğanda renal atılım erişkindekenden 5 kat daha fazladır. Alkolizm, obezite, böbrek hastalıkları, porfiriya, travma, yanıklar, orak hücreli anemi, talasemi, siroz, hiperkatabolik durum ve bazı ilaçların kullanımı sırasında idrarla çinko atılımı artar. Böbrekten kayıp insulin ile inhibe olup, glukagon ile artmaktadır.¹⁴⁰ Çinko emilimi, hem aktif hem de pasif mekanizma ile gerçekleşmektedir.

Taylor ve ark.'nın çalışmasında diyetteki çinko alımı 15 gün süre ile günde 85 mmol'den 12 mmol'e düşürüldüğünde idrarla ve dışkı ile çinko atılımının da azaldığı, intestinal çinko emiliminin de %38'den %93'e çıktığını göstermişlerdir.¹⁴¹ Bu durum 6 aydan uzun sürdüğünde çinko homeostazının korunması mümkün değildir. İntestinal mukoza hücrelerinin tamiri bozulmakta ve etkili emilim oluşmamaktadır.

Metabolizmasında başlıca karaciğer rol oynar. Emilim sonrası ilk olarak karaciğere taşınan çinko buradan tüm vücuda yayılır.¹⁰² Vücuttaki çinkonun yaklaşık %10'u metabolik olarak aktiftir ve karaciğer aktif havuzda majör role sahiptir. Glukokortikoid hormonlar, bakteriyel endotoksinler ve interlökinler plazma çinko düzeyini azaltırlar. Çinko karaciğerde yeniden düzenlenir.⁴⁹ Sisteinden zengin, bir akut faz proteini olan metallothionein çinkoya bağlanır. Kültürdeki hepatositlerde kortikosteroidler ve interlökinlere karşı çinko birikiminin arttığı gösterilmiştir.¹³⁹ Karaciğer hızlı değişen ve yavaş değişen olmak üzere iki çinko havuzu içermektedir. Karaciğer çinko düzeyindeki azalma karaciğer hücrelerinin hem iyileşmesini hem de rejenerasyonunu engeller.¹⁴²

2.1.2. Çinko ve Metallotiyoneinler

Metallotiyoneinler (MT), düşük moleküler ağırlıkta, aromatik amino asitleri içermeyip sisteinden zengin olan 61 aminoasitten meydana gelen, hücre içi metal bağlayan protein ailesindendir ve tüm yaşayan organizmalarda bulunur. Metallotiyoneinler metallerle ilişkili hücre homeostazisinde anahtar rol oynar. Çünkü metallotiyoneinlerin özellikle çinko ve bakıra yüksek affinitesi vardır.^{18,103,137} İnsan metallotiyoneinleri 16. kromozom üzerine yerleşmiş olan multigen ailesi tarafından kodlanır.¹⁵⁰

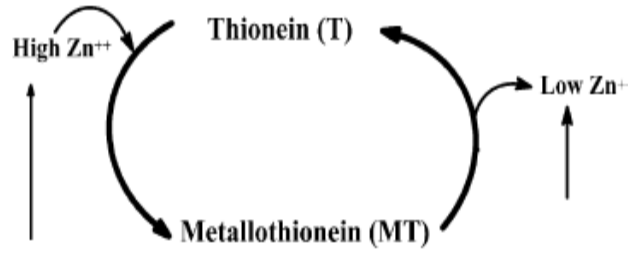
Metallotiyoneinleri Cd, Hg, Co, Au, Bi gibi toksik metaller ya da Zn ve Cu gibi esansiyel elementler, oksidatif stres, IL-1, interferon, iyonize radyasyon, hormonlar (glukokortikoidler), sitotoksik ve inflamatuvar ajanlar, stres durumları, organik çözücüler (etanol, hekzan) ve antikanser ajanlar gibi uyarılarla ekspresyonları artar. Çinko başlıca fizyolojik uyaranıdır.³⁵ Metallotiyoneinlerin çinko alımında, dağılımında, depolanmasında, ve salınmasında düzenleyici olarak önemli rolleri vardır.²⁰ Metallotiyoneinler, çok çeşitli taşıyıcı proteinler ile yarışarak çinkonun emiliminde rol oynayabilir.¹⁴⁷

MT-I, MT-II, MT-III ve MT-IV olmak üzere dört fonksiyonel metallotiyonein bulunmaktadır. İnsanlarda 12 izoformu tespit edilmiştir. MT-I ve MT-II hemen hemen her dokuda eksprese olurlar. Potansiyel homeostatik mekanizmalarının; ağır metallerin detoksifikasyonu, çinko ve bakır homeostazisinin düzenlenmesi, immün sistem regülasyonu ve oksidatif hasarın sınırlandırılması olduğu düşünülmektedir.¹⁰⁹ Metallotiyoneinlerin en önemli rolünün toksik non-esansiyel metallere örneğin kadmiyuma karşı dokuları korumak olduğu rapor edilmiştir. Metallotiyoneinler özellikle indirgenmiş oksijene karşı hücresel defans mekanizmalarının komponenti gibi rol oynarlar. MT-III, sadece beyinde eksprese edilen, glutaminerjik nöronlarda bulunan ve nörolojik hastalıklarda gösterilen bir izoformudur. MT-III, nöron proliferasyonunu ve nörotropik

aktiviteyi inhibe eder bu nedenle büyümei önleyici faktör (GIF) olarak adlandırılır. Yapısında 3 çinko ve 4 bakır içermektedir. Ancak nonspesifik olarak tüm hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğı düşünölmektedir. MT-III eksikliğı olan farelerin, kainik asit ile uyarılmış inmeye ve postsinaptik nöron hasarına duyarlılıkları yüksekken, fazla MT-III genine sahip fareler inmelere ve postsinaptik nöron hasarına dirençlidir. MT-IV çok katlı yassı epitelin diferansiyasyonunu indükleyen bir proteindir. Spesifik olarak dil, oral mukoza, özafagus, midenin üst tarafı ve deri gibi epitelyal hücrelerde eksprese edilir.^{107,129}

Bazal karaciğer metallothionein düzeyi 700 µg/g'dir. Düzeyleri, yaşa ve doku tipine göre değişmekte olup, nutrisyonel ve fizyolojik faktörlerden etkilenmektedir. Metallothioneinler kanda ve hücre düzeyinde başlıca stoplazmada, daha az olarak nükleus ve lizozomlarda bulunur. İnsanlarda nükleer metallothioneinler fetal karaciğerde bulunup yetişkin karaciğerinde bulunmamaktadır. Parsiyel hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonunda metallothioneinler stoplazmadan nükleusa yer değiştirir.¹⁴⁴ Nükleer yerleşimli metallothioneinler, çinko ihtiyacı ve hücre siklusu sırasındaki nükleer oluşumlar ile ilişkilidir.²⁷ Stres durumlarında karaciğerdeki metallothionein genlerinin ekspresyonu IL-1 ile ilişkilidir.¹³⁰ Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar karaciğerde metallothionein düzeylerini arttırır, çinkonun dokulara dağılımını değiştirir.¹³⁸

Metallothionein/thionein (apo-MT) (MT/T) sistemi çinko ile korunur ve hızlı ulaşılabilir çinko konsantrasyonunu kontrol altına almakta rol oynar. MT/T sisteminin iki fonksiyonu vardır; çinkoyu muhafaza etmek ve ihtiyaç duyulduğunda salmaktır ¹⁴⁸ (Şekil 1). Metallothionein küme yapılarının biyolojik önemi, bağılı olan çinkonun salınımı ile birlikte olan, indirgenen ve yükseltgenen sistemin sülfür bağları ile ilişkili olabilir. ⁹⁶



Şekil 1. Metallothionein ile çinko ilişkisi ¹⁴⁰

Metallotiyoneinler çinkoyu diğer çinko proteinlerinden daha sıkı bağlar ve metallotiyoneinlere bağlı bulunan çinko, insan hepatositlerindeki total çinkonun % 5-10'unu oluşturur.⁹⁷ Bakır ya da çinkoya bağlı metallotiyonein farklı oranlarda bulunur. Metallotiyoneinlerin indirgenme oranı, proteine bağlı metal atomlarının belirlenmesiyle ve metallerin yarı ömrü ile tespit edilir. Böylece çinko proteinden hızlıca ayrılır ve hücre fonksiyonlara katılır, metallotiyonein sentezini uyarır. Ancak çinkonun koruyucu etkileri metallotiyoneinlerden bağımsızdır.³⁵

Metallotiyoneinler sadece metal bağlayan protein değildirler. Metallotiyoneinler trimerkaptid bağlarıyla şekillenen kadmiyum, civa, bakır ve çinko içeren ağır metal temizleyicisidirler. Kimyasal uyarılar tarafından uyarılan metallotiyoneinlerin, reaktif oksijen türlerini ve zararlı ağır metalleri detoksifiye ettiği gösterilmiştir.⁸⁸ Metallotiyoneinlerin, başlıca reaktif oksijen türlerinin toksisitesinden sorumlu hidroksil radikalini yakalama özelliği gösterilmiştir. Bu özelliği sitozolde fazla miktarda bulunan, antioksidan etkili glutatyondan 300 kat daha fazladır.¹²⁸ Böylece metallotiyoneinler oksidatif hasardan DNA'yı ve biyolojik yapıları korumaktadır. Çinko hızlıca hücre içi ve hücreler arası değişime uğradığında, metallotiyoneinin doku konsantrasyonları korunmaktadır.^{34,42,89} Uzun dönem çinko eksikliği olduğunda organizma, oksidatif stresin

uyardığı hasara daha duyarlı hale gelmektedir.¹⁴⁰ Bu duruma önemli bir kanıt, Alzheimer hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda çinko metabolizmasının değişmesidir.⁶ Alzheimer hastalığı beyin dokuları ekstrakte edildiğinde MT-III eksikliği bulunmuştur. Farelerde MT-III gen yokluğunda hipokampusda çinko konsantrasyonları düşük bulunmaktadır.⁴⁷ Metalloitiyoneinler, nörotransmisyonu düzenledikleri gibi nöronları da oksidatif strese koruyabilir.^{35,137}

Metalloitiyoneinler, toksik metaller, radikallere maruziyet, enfeksiyon, inflamasyon ve düşük çinko ile beslenme gibi stres durumlarına karşı koruyucudurlar.⁷⁹ Timülin'den daha yüksek affinite ile çinkoyu bağlarlar.¹⁰⁴ Metalloitiyoneinler, çinkonun immün sistem üzerine etkilerinden dolayı anahtar rol oynamaktadır. Metalloitiyoneinler yaşlanmada artar ve ileri yaşlarda çinkoya bağlanmayı, genç yaşlarda bakıra bağlanmayı tercih eder.^{69,103} Yüksek metalloitiyonein düzeyleri, Trizomi 16 farelerinin beyinlerinde, H₂O₂ maruziyetinden sonra antioksidan cevapları engellemiştir.¹³² Down Sendromu'ndaki oksidatif hasar ve immün cevaplardaki bozukluk çinko verilmesi ile düzeltilmiştir.^{29,52} Bu nedenle metalloitiyoneinlerin yaşlanma sırasındaki ve yaşlanma ile ilişkili hastalıklardaki antioksidatif ve immün yanıtlarda önemli rolleri vardır.¹⁰³

Transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalar, çinko metabolizmasında MT-I ve MT-II izoformlarının rol aldığını göstermiştir. 1 mol metalloitiyonein 7 tane çinko atomu bağlamaktadır. Bu sonuçlar, Zn₇-MT üretiminin hücreyi yüksek çinko düzeylerinden koruduğunu göstermektedir.¹⁴⁰

Inflamasyon sırasında, karaciğerde Zn-MT üretimi uyarılmaktadır.^{18,89} Karaciğer çinkonun regülasyonunda önemlidir. Ayrıca ince bağırsak^{36,37} ve pankreasta da^{43,124} MT sentezi uyarılır. İnce bağırsak çinkonun atılımında majör rol oynadığı için çinkonun kaybını önler.³⁵

Kalıtsal olarak bakır birikimi ve toksisitesinin olduğu Wilson Hastalığı olan hastaların uzun dönem tedavilerinde, metallothionein üretimi için diyetle çinko asetat eklenmesi (25-50 mg, günde üç defa) önerilmiştir.^{19,76} Çinko intestinal metallothioneini uyarır ve mukozal hücrelerdeki bakırın ayrılıp sirkülasyona geçişini önler. İntestinal hücreler 6 günde bir değişime uğrar. Böylelikle dışkıda bakıra bağlı olan metallothionein kalmaktadır. Toksik olmayan bakıra bağlı metallothioneinden dolayı hepatik metallothionein geçici olarak artmaktadır. Fakat normal karaciğer fonksiyonları varlığında, uzun dönem (18 aydan daha fazla) çinko tedavisi alındığında hepatik bakır konsantrasyonları aynı düzeyde veya tedavi öncesi düzeyinden daha düşük seviyelerdedir.³⁵ Oral çinko alımı sırasında intestinal metallothionein içeriği 2 hafta sonra 5 kat artmış ve çinko alımından sonra 5 haftada normal seviyesine ulaşmıştır.¹²¹

2.1.3. Çinkonun Antioksidan Özellikleri

Serbest radikal, bir veya daha fazla çift olmayan (eşleşmemiş) elektron içeren moleküldür.

Serbest radikal oluşumu ve oksidatif strese koruyucu rolü bulunan çinkonun, oksidatif hasarın neden olduğu alkole bağlı karaciğer sirozu, kardiyovasküler hastalıklar, kütanöz ve romatolojik inflamatuvar hastalıklar gibi pek çok hastalığın patogeneğinde rol aldığı bilinmektedir.⁵

Oksidan türlerle direkt olarak temas geçip, bir serbest radikal reaksiyonunu engelleyen bileşikler antioksidan olarak tanımlanmaktadır.¹⁶ Bu tanıma uymayan çinko; serbest radikal reaksiyonuna direkt olarak engel olmaz ve antioksidan etkilerini indirekt olarak;

- ✓ Hücre membran yapısını koruyarak, stabilize ederek,^{17,126}
- ✓ Süperoksit dismutaz enziminin yapısına katılarak,⁴¹
- ✓ Serbest radikallerden koruyan, sülfidrilten zengin proteinler olan metallotioneinlerin yeterli doku konsantrasyonunu koruyarak ve sentezini indükleyerek,¹⁵⁶
- ✓ Sülfidril içeren proteinlerin oksidasyonunu engelleyerek,^{31,57,74,83,87}
- ✓ Redoks stabil özelliği ile kritik ekstrasellüler bölgelerde demir ve bakır gibi redoks reaktif metallerin yerine geçerek,^{17,32}
- ✓ Tioller için koruyucu ajan olarak,
- ✓ Serbest radikalleri oluşturan demir ile kimyasal gruplar arasındaki ilişkiyi önleyerek gerçekleştirmektedir.

Genel olarak antioksidan mekanizma akut ve kronik etkiler olarak ayrılmaktadır. Kronik etkiler organizmanın uzun dönem çinkoya maruziyeti sonucu metallotionein gibi bazı maddelerin uyarılması sonucu oluşmaktadır. Kronik çinko eksikliği bazı oksidatif streslere duyarlılığı arttırmakla sonuçlanır. Fakat bunun mekanizması halen açık değildir. Birçok çalışmada kronik çinko alımının karaciğer, böbrek, bağırsak gibi çeşitli organlarda metallotioneinleri uyardığı gösterilmiştir. Metallotioneinlerin antioksidan etkiler göstermesi, hücrel redoks durumu ile hücrel çinko arasında bağlantı sağlaması ile açıklanmıştır. Çinkonun akut antioksidan etkileri, kısa dönemde çinko düzeylerinin artması sonucunda oluşmaktadır. İki temel mekanizma ile açıklanmaktadır.

1) Protein sülfidrillerinin korunması

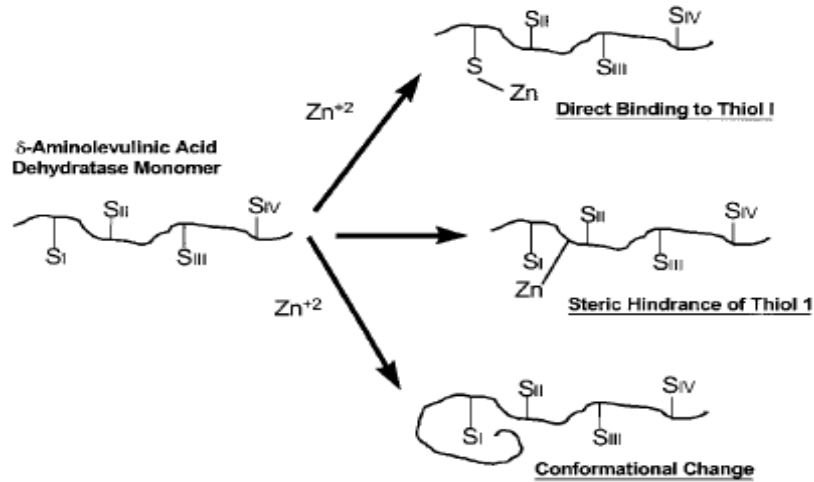
2) Redoks reaktif geçiş metallerinin antagonizması aracılığı ile süperoksiti ve H_2O_2 'den $\cdot OH$ oluşumunu indirgemesi.

Çinko koruyucu etkisini, azalmış sülfidril reaktivitesine sekonder olarak sülfidril gruplarını koruyarak göstermektedir. Çinko tarafından korunan sülfidril içeren proteinlere; Dihidroorataz, çinko parmaklar (DNA çinko-bağlayan proteinler), tübülün, alanil t RNA sentetaz, E. coli DNA topoizomeraz I, protein farsenil transferaz, Clas I tRNA sentetaz örnek verilebilir.¹⁴⁰

Sülfidril gruplarının stabilizasyonu;

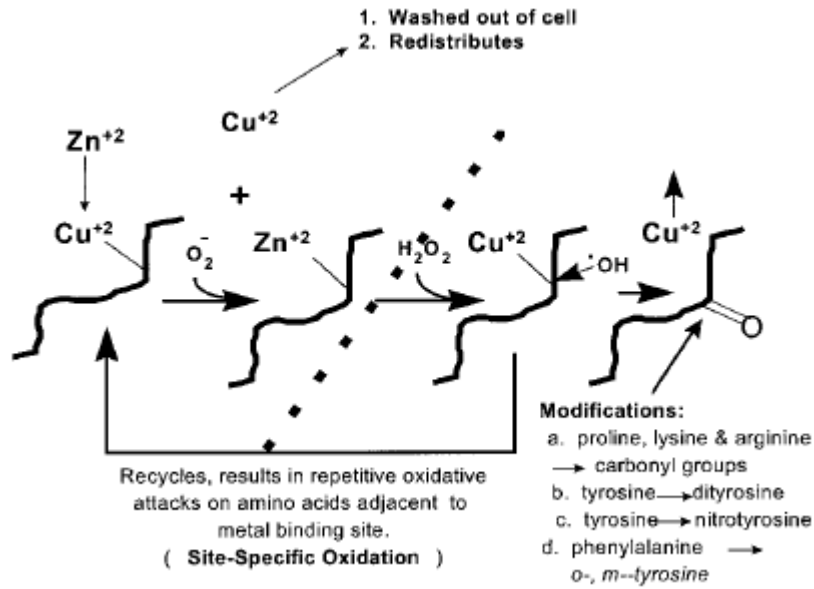
- 1) Sülfidril grubuna direk olarak çinkonun bağlanması,
- 2) Sülfidril grubuna yakın protein üzerindeki bölgelere bağlanması,
- 3) Protein yapısında konformasyonel değişiklik meydana getirmesi ile

sağlanabilmektedir (Şekil 2). δ -aminolevülinat dehidrataz, sülfidril bağımlıdır ve enzim aktivasyonu ile tiol oksidasyon durumu arasında sağlam bir ilişki vardır. Çinko, δ -aminolevülinat dehidrataz'ı oksijen aracılı inaktivasyondan korur. Böylelikle enzimin tiol oksidasyonunu ve disülfid formasyonunu önlemektedir. Çinkonun ortadan kalkmasıyla sülfidril reaktivasyonu artar ve enzim aktivitesinin kaybı ile sonuçlanır.⁵⁹ Çinko, tiol bağımlı enzimleri ve tiol grupları içeren proteinleri korumaktadır.¹¹⁶



Şekil 2. Çinko tarafından δ -aminolevülinat dehidrataz sülfidrillerinin korunma mekanizması¹¹⁶

Çinko, Fenton reaksiyonu aracılığı ile süperoksit ve H_2O_2 'den $\cdot OH$ oluşumunu sağlayan redoks aktif metallerden demir ve bakırın katalitik özelliklerini antagonize eden sistemlerde gösterilmiştir (Şekil 3). Hücre içinde serbest demir; nükleotidler, sitrat, glisin ve glukoz gibi düşük moleküler ağırlıklı ligandlarla birleşme eğilimindeyken, bakır; DNA, karbonhidratlar, enzimler ve proteinler gibi makromoleküler yapılarla kompleks oluşturma eğilimindedir.



Şekil 3. Çinkonun bölge spesifik protein oksidasyonunu inhibe etme mekanizması ¹¹⁶

Süperoksitlerin metal aracılı katalizlenmiş oluşumları destrüktif işlemleri başlatabilir. Bakır ve demir, lipid peroksidasyonunun başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynar. Çinko, redoks aktif metaller olan bakır ve demirin spesifik bağlanma bölgeleri için yarışarak, fenton reaksiyonları yoluyla radikal oluşturmalarını engeller (Tablo 3).

Tablo 3. Çinko tarafından serbest radikal oluşumunun antagonize edilme mekanizmaları:

✓	Cu ve Fe / askorbat ile uyarılan DNA kırıklarını azaltması
✓	Eritrositlerde Fe^{+++} -askorbatın uyardığı methemoglobin oluşumunu azaltması
✓	$\cdot O_2$, $\cdot OH$ ve hipoklorit oluşumunu sağlayan sistemleri antagonize etmesi
✓	Ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz yoluyla üretilen $\cdot O_2$ ve $\cdot OH$ oluşumunu azaltması
✓	Forbol-12-miristat-13-asetat tarafından stimüle edilen lökositlerde $\cdot O_2$ üretimini azaltması
✓	PC-12 hücrelerinden forbol ester tarafından uyarılan laktat dehidrogenaz salınımını azaltması
✓	Eritrosit membranlarında ksantin oksidaz aracılı çapraz bağlanma oluşumunu azaltması
✓	Cu^{++} aracılı kemilüminesansı, benzoat hidroksilasyonu ve askorbat oksidasyonu azaltması ¹⁴⁰

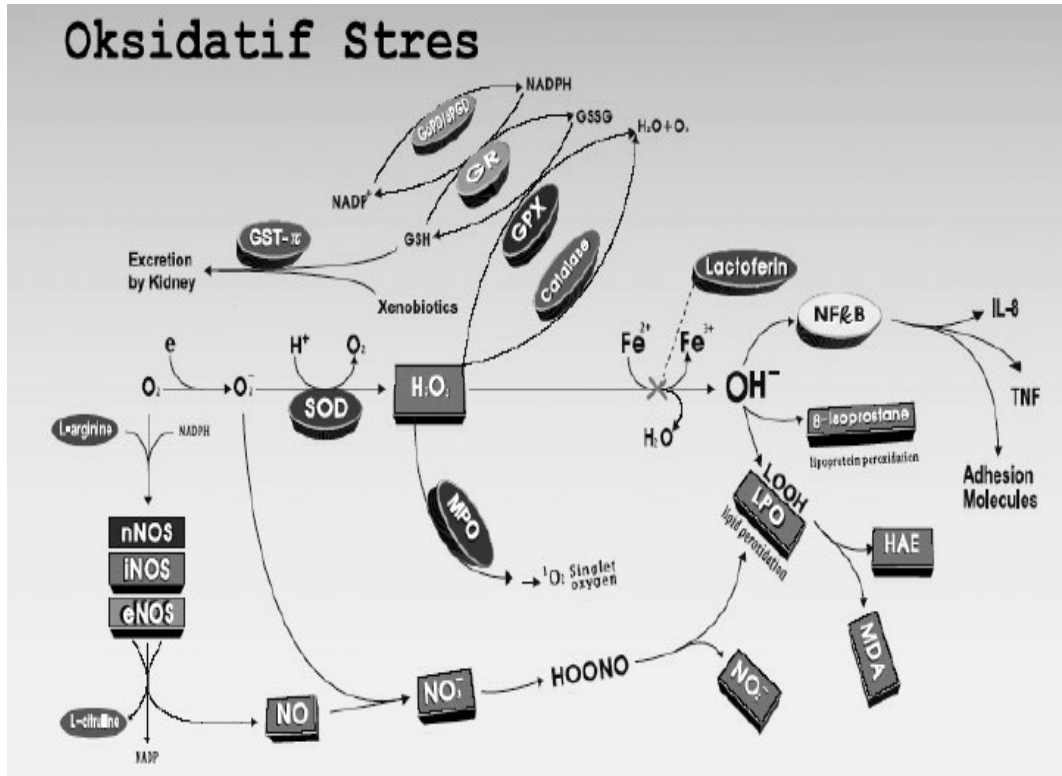
Çinko DNA'nın stabilizasyonu için de önemlidir ve diğer hücre kompartmanlarına göre nükleusta daha uzun süre kalmaktadır. Buna göre, hücre içi çinko düzeyi yükseldiğinde fazla demir nükleoproteinlerden yer değiştirecek ve $\cdot OH$ türevleri aracılığı ile olan DNA hasarında azalmaya neden olacak.

Çinko isoproterenolün uyardığı oksidatif kardiyak hasar üzerine inhibitör etkilidir. Çinkonun μM konsantrasyonlarda iskemik hasarı düzeltmesi, redoks aktif metaller ile ilişkili oksidatif hasarın inhibisyonu ile ilişkilidir. Çinko, kalpten bakırın atılımını artırır.

2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Oksidatif stres, pro-oksidan (reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri) ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin, prooksidan ve oksidan maddelerin lehine kayması olarak tanımlanmaktadır.¹³⁵ Oksidatif stresin birçok hastalığın patolojisinin başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Oksidatif stres doğal bir süreçtir, oksijene ihtiyaç duyan tüm canlı sistemlerde, çeşitli basamaklarda oluşmaktadır. Biyolojik sistemler, bu stresi kontrol altında tutan, spesifik mekanizmalar içermektedir. Kontrol mekanizmalarının yetersiz olduğu durumlarda oksidatif hasar meydana gelmektedir⁵⁵ (Şekil 4).



Şekil 4. Oksidatif Stres (www.woongbee.com)

Serbest radikal, orbitalinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya atom gruplarıdır.⁹⁵ Bu eşleşmemiş elektron, serbest radikali kararsız bir konuma getirir. Serbest radikalın kararlı, stabil bir yapıyı tekrar kazanması amacıyla elektronunu bir başka elektronla eşleştirmesi gerektiğinden bu durum serbest radikale kimyasal olarak büyük bir aktivite kazandırır.⁶³

Birçok sistem ve metabolizma üzerine etkili olan serbest radikaller, normal metabolik olaylar sırasında ortaya çıkabildikleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler.^{54,80} Ekzojen kaynaklar; hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüsler.^{68,114} Endojen kaynaklar ise mitokondrial elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelial hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, monoamin oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır.

³ Organizmanın yapısında bulunan proteinler, serbest amino asitler, DNA, lipidler ve nükleik asitler gibi makro moleküller, bu sistemler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin etkilerine maruz kaldıklarında hasara uğramaktadırlar.¹⁰ Oksidatif hasar oluşturan türler (reaktif oksijen türleri, nitrojen ve klorin türleri); metabolizma ürünleri, fizyolojik mediyatörler ve sinyal molekülleri olarak ortaya çıkarlar.

Aerobik organizmalar için O₂ esansiyel bir moleküldür. Aynı zamanda O₂ oksidan bir ajandır. Normal koşullar altında moleküler oksijenin çoğu sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemler içinde tetravalan redüksiyona uğramaktadır. Bununla birlikte %1-2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda univalan redüksiyonu sonucu serbest oksijen

radikalleri olarak adlandırılan bir çok reaktif ürün ortaya çıkar. Aerobik organizmalarda radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde bulunmaktadır.⁹

Fizyolojik koşullarda O_2 'nin %98'i mitokondride bulunan sitokrom oksidaz tarafından indirgenmekte ve 4 elektron alarak suya dönüşmektedir.

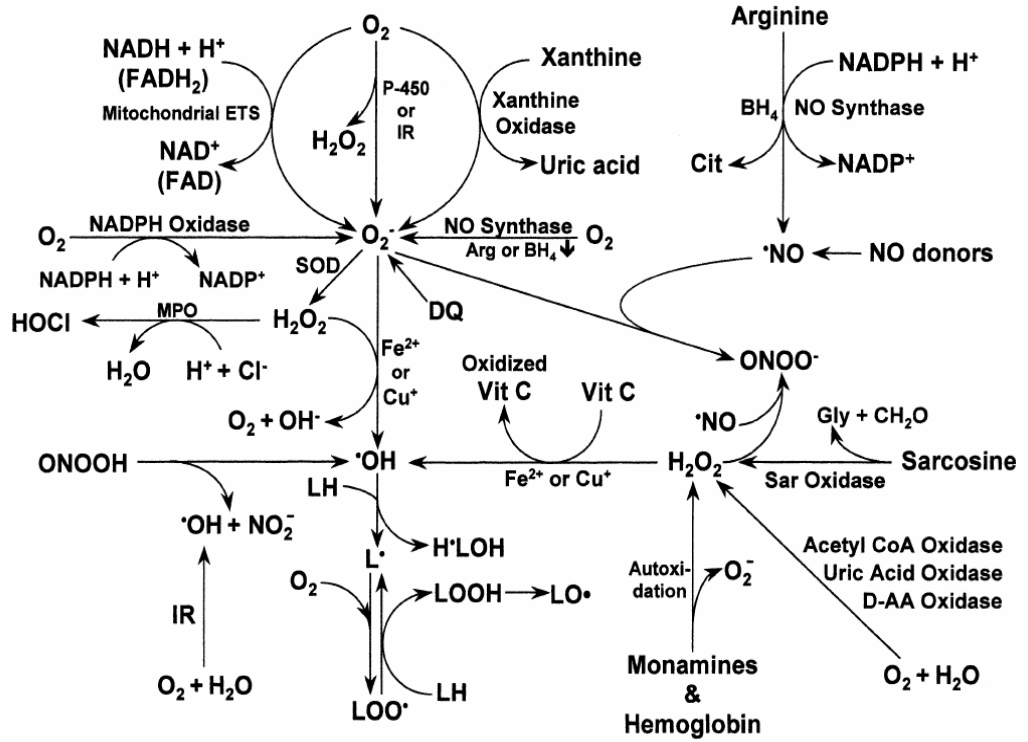


Serbest oksijen radikallerinin oluşum basamaklarında öncelikle tek elektron transferi ile moleküler oksijen süperoksit radikaline dönüşmektedir. Süperokside iki elektronun eklenmesi ile hidrojen peroksit oluşmaktadır. Hidrojen peroksit radikal olmamasına karşın elektron almasıyla son derece toksik olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Hidroksil radikali de univalan redüksiyon ile suya dönüşmektedir.

2.2.1. Serbest Radikal Türevleri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumu için oksijen gereklidir. Serbest oksijen radikallerine süperoksit: $O_2^{\cdot}$, hidroksil radikali: $OH^{\cdot}$, alkoksil radikali: $RO^{\cdot}$, peroksil radikali: $ROO^{\cdot}$ ve hidroperoksil radikali: $OOH^{\cdot}$ örnek verilebilir.

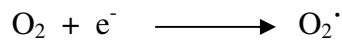
Nitrik oksit: $NO^{\cdot}$, nitrojen dioksit: $NO_2^{\cdot}$ radikalleri de RNS' yi oluşturur. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit: H_2O_2 , peroksinitrit: $ONOO^-$, hipoklorik asit: $HOCl$, hipobromöz asit: $HOBr$, gibi diğer reaktiflere dönüşebilir (Şekil 5).



Şekil 5. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi (İR: İyonize radyasyon, Sit: Sitrüllin, D-AA: D-Amino asit, BH₄: Tetrahydrobiopterin, Gly: Glisin, L': Lipit radikali, SOD: Süperoksit dismutaz, MPO: Myeloperoxidaz) ⁵⁴

Süperoksit Radikali (O₂^{•-}) :

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit radikal anyonu meydana gelir.



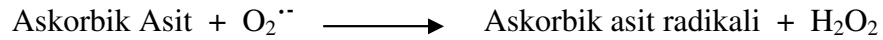
Mitokondriyal elektron transport zinciri sırasında O₂'nin otooksidasyonu sonucu oluşur. Süperoksit radikali O₂ varlığında ksantin oksidaz'ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH'nin NADPH oksidaz ile oksidasyonu, mitokondriyal elektron transport sistemi ile NADH₂ ve FADH₂'nin NAD ve FAD'ye dönüşümü sırasında, O₂'nin

iyonize radyasyonla, sit p450 ile ve arginin veya tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle oluşur.^{60,56} Makrofajlar ve polimorf nüveli lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoz sırasında O₂ tüketimi artar ve bu durumda plazma membranında bulunan NADPH oksidaz tarafından O₂^{••} oluşumunu tetikler.



O₂^{••} dioksijen redüksiyonunun, biyotik ve abiyotik sistemde en sık rastlanan ara üründür. O₂^{••} 'nin fazla üretimi ya da enzimatik korumanın azalması, büyümenin yavaşlaması, mutagenез ve hücre ölümü ile sonuçlanır.

O₂^{••} 'nin kimyasal davranışı nerede çözüldüğüne göre değişmektedir. Suda çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak, okside edici ajan olarak davranabilir. Örneğin askorbik asidi okside etmektedir.⁶⁸



Organik solventlerde daha reaktif ve tehlikelidir. Biyolojik membranlarda oluştuğunda oldukça fazla hasar meydana getirmektedir.

O₂^{••} çeşitli organik ya da inorganik bileşiklerle de reaksiyona girebilir. Nitrik oksit ile reaksiyona girebilir. Nitrik asit ile reaksiyona girip peroksinitriti oluşturması önemlidir.

112

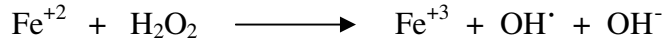
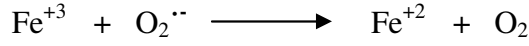
Hidroksil Radikali (OH[•]) :

Yarılma ömrü kısa ve oldukça güçlü bir serbest radikal olan hidroksil radikali kuvvetli hasar oluşturur. Tüm biyolojik substratlarla reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir. Oluşan hasar üç şekilde meydana gelir: 1) Protein ve lipidler arası çapraz bağlar oluşturarak, 2) Proton çıkararak, 3) Elektron transferi yaparak.

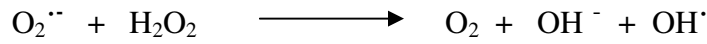
Toksik OH[•] oluşumunda demir, bakır gibi bazı metal iyonları da rol oynar. Asıl olarak Fe⁺² molekülünün de katıldığı Fenton reaksiyonu ile oluşur.¹ Fe⁺³'ün O₂^{••} ile

indirgenmesi ile oluşan Fe^{+2} , H_2O_2 ile reaksiyona girerek $\text{OH}^\cdot$ radikalini meydana getirir.

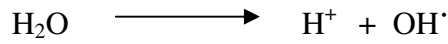
Bu reaksiyon 'Fenton Reaksiyonu' olarak adlandırılır.



Ayrıca demirin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla da $\text{OH}^\cdot$ oluşur.²⁶

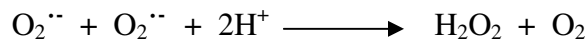
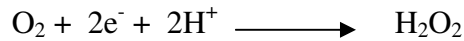


İyonize radyasyon etkisi ile de $\text{OH}^\cdot$ oluşur.⁵⁴



Hidrojen Peroksit (H_2O_2) :

Oksijen molekülünün iki elektron alarak indirgenmesi veya yapıya iki hidrojen atomunun eklenmesiyle oluşur.²⁵ Süperoksit radikalinin yapısına bir elektron katılmasıyla da meydana gelmektedir. Biyolojik sistemlerde daha sık olarak iki süperoksit molekülü, iki protonla birleşerek hidrojen peroksit ve oksijen oluşturur.



H_2O_2 bir serbest radikal olmamasına karşın yüksüz bir molekül olduğundan hücre içerisine kolaylıkla girebilir.

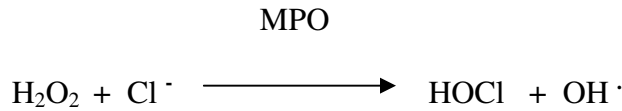
H_2O_2 , O_2 den iki elektronun sit p450, yağ-açıl KoA oksidaz, asetil KoA oksidaz, ürik asit oksidaz, α -hidroksiasit oksidaz veya D-amino asit oksidaz ile redüksiyonu, monoaminler (dopamin, epinefrin, norepinefrin), hemoglobinin otooksidasyonu ve glisin sentezinde de oluşur.⁵⁰ Fe^{+2} veya Cu^+ varlığında güçlü bir radikal olan $\text{OH}^\cdot$ 'e indirgenir.⁵⁴

Peroksizomlar fazla miktarda oksidaz içerdiklerinden hücresel H_2O_2 için potansiyel kaynaktır.

H_2O_2 özellikle Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla yıkılır. Bu yıkım sonucu en reaktif radikal olan $OH^\cdot$ oluşur.

Hipoklorik Asit (HOCl) :

Nötrofiller, stoplazmada bulunan myeloperoksidaz (MPO) enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü oksidatif bir yapı olan hipokloridi oluşturur.⁷²

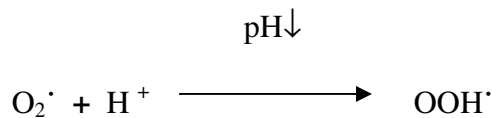


Singlet oksijen (1O_2) :

Yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmaması sebebiyle serbest oksijen radikali olmayıp reaktif oksijen türleri grubunda yer alan bir moleküldür. Singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. 1O_2 , oksijen elektronlarının dışardan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün ters yönündeki farklı bir yörüngeye geçmesi ile oluşabileceği gibi, $O_2^\cdot$ radikalinin dismutasyonu ve MPO'nun katalizlediği H_2O_2 'nin HOCl ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir.⁶⁴ DNA, proteinler ve lipitlerle reaksiyona girebilir.⁴

Perhidroksil radikali ($OOH^\cdot$) :

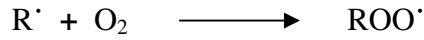
$O_2^\cdot$ radikali asidik ortamda daha reaktif olup protonlanarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan $OOH^\cdot$ radikalini oluşturur.²⁵



Peroksil radikali (ROO[•]) :

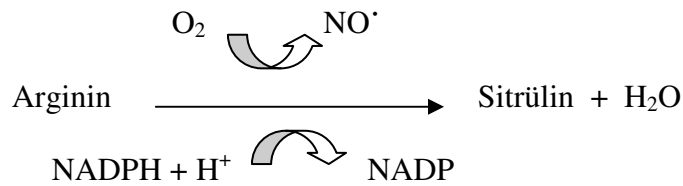
R[•] radikalleri hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek ROO[•]'yi oluştururlar.²⁵

ROO[•], lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup çok uzun ömürlüdür.



Nitrik Oksit (NO[•]) :

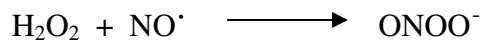
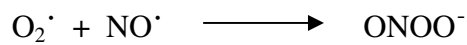
Memeli hücrelerinde NO başlıca NOS'un (NO-Sentaz) aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS, oksijeni kullanarak L-arjinin amino asitinden sitrülün ve NO[•]'yu oluşturur. Bu olay, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), flavin mononükleotit (FMN), flavin adenin dinükleotit (FAD), tetrahidrobiopterin (BH₄) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar.⁹⁸



Eşleşmemiş elektronu nedeniyle bir serbest radikal türü olarak bazı memeli hücre tiplerince üretilen NO; damar tonüsünün kontrolünde, platelet agregasyonunda, lökosit adezyonunda, hücre aracılı immün sitotoksitesinde, sinaptik geçirgenlikte sinyal molekülü olarak önem taşımaktadır.⁹⁸

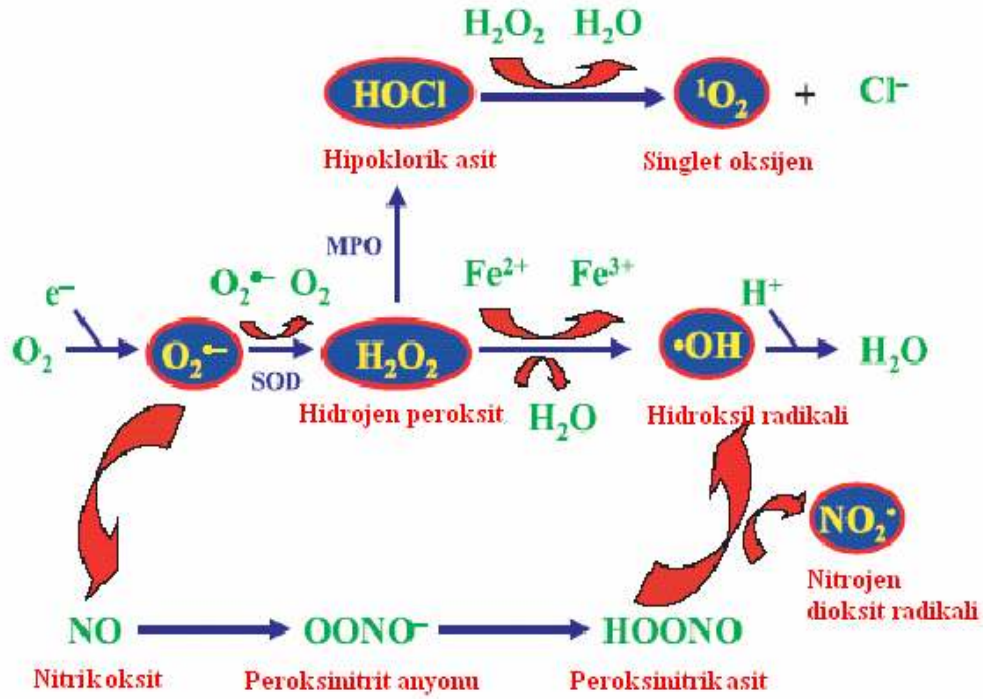
Peroksinitrit (ONOO⁻) :

Süperoksit radikali veya hidrojen peroksitin NO[•] ile reaksiyona girmesi ile oluşur.¹¹



Oluşan peroksinitrit radikalinin oksidatif potansiyeli $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 'ye göre daha yüksektir.⁵⁴

Oksidatif stresle analog olmak üzere NO'nun ve NO'dan türeyen reaktif nitrojen türlerinin artan miktarları organizmada nitrozatif stresi meydana getirir.⁷⁰ Nitrozatif stres ile inflamasyon olayları, nörotoksisite ve iskemi gibi patolojik olaylarla bağlantılı bulunmuştur.⁷⁸ Her iki stresi ortaya çıkaran reaktif türler birbirleriyle etkileşim halindedir⁶⁶ (Şekil 6).



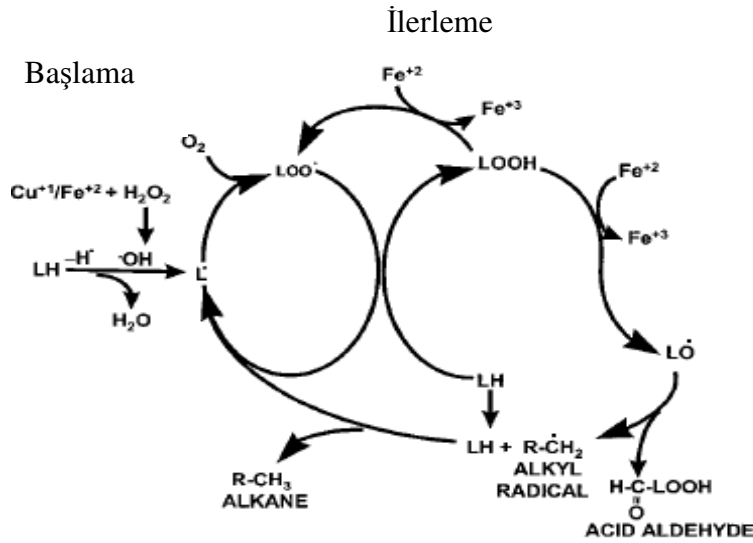
Şekil 6. ROS ve RNS'nin birbirleriyle etkileşimi⁶⁶

2.2.2. Serbest Radikallerle Oluşan Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikallerin biyolojik etkilerini genellemek, organizmanın yaşam sürecinde karşılaştığı radikal türlerin çeşitli olması nedeniyle zordur. Oluşan serbest radikaller, ortamdan uzaklaştırılamadığı takdirde pek çok yolla konsantrasyonlarına bağlı olarak,

metabolik bozukluklara, hücre hasarına ve hatta ölüme yol açarlar.¹⁶ Serbest radikaller, kimyasal modifikasyonlarla protein, lipit, karbonhidrat ve DNA'da hasar oluştururlar.

Lipitler; biyolojik moleküler içinde reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan moleküllerdir. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden oldukça zengindir. Bu yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olur (Şekil 7). Membran akışkanlığı, membran lipitlerinin yan zincirlerinde bulunan doymamış yağ asitleri ile sağlanır. Doymamış yağ asitlerinin hasarı, membran akışkanlığını azaltıcı etki gösterir.

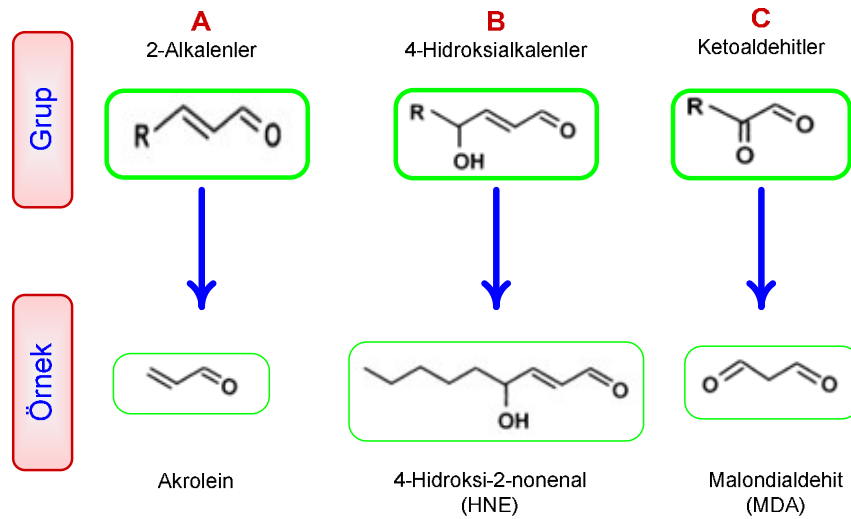


Şekil 7. Metallerin katalizlediği lipit peroksidasyonu¹¹⁶

Lipit peroksidasyonu, reaktivitesi oksijen serbest radikalleri tarafından tetiklenen oksidatif stresin en önemli organik göstergelerinden birisidir. Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan MDA (Malondialdehit), biyolojik örneklerde kolaylıkla ölçülebilen ve peroksidatif hasarı gösteren nispeten dayanıklı bir üründür.⁴⁴ Biyolojik sistemlerdeki

oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metod MDA ölçümüdür. MDA, proteinlerin lizin rezidüleriyle ve fosfolipitlerin amin gruplarıyla reaksiyona girer.¹⁴⁶ MDA, kolaylıkla difüze olabildiğinden, DNA bazlarıyla da reaksiyona girerek hasara neden olabilir.

Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehyitler serbest radikallere göre daha stabildirler ve hücre içinde veya hücreden dışarıya çıkarak daha uzaktaki bölgelerdeki proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipitler ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilir. Bunun sonucunda molekül içi ve moleküller arası 1-amino-3-imino propen (AIP) köprüleri kurabilir ve biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlar oluşturabilir (Şekil 8).



Şekil 8. Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehyitler¹⁴⁶

Üç karbonlu bir ketoaldehyit olan MDA, normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO₂'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipit peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir.¹⁴⁵

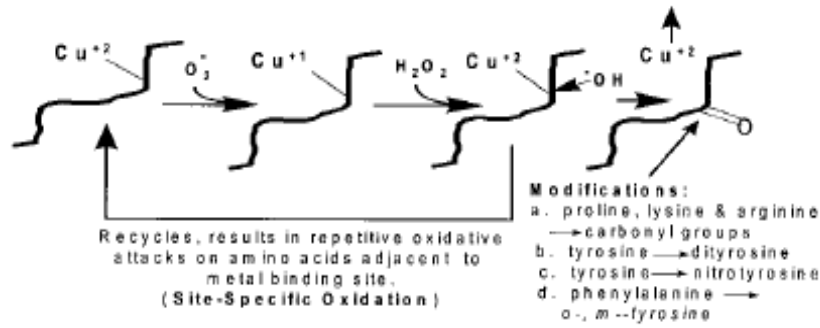
MDA ölçümünün en yaygın metodu; 2-tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik ölçümüdür.¹³ Fakat TBA, biyolojik numunelerde bulunabilecek diğer bileşiklerle reaksiyona girebildiğinden, bu metodla ölçüm sonrası MDA ifade edilirken MDA ifadesi yerine tiyobarbitürik asit reaktif bileşikleri (TBARS) olarak ifade edilmektedir.⁴⁸ MDA'nın ölçümünde spesifitenin artırılması için yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin (HPLC) kullanılması yaygındır.²⁸ HPLC analizleri, diğer yöntemlerde interferans veren bileşiklerin ölçümünü ortadan kaldırır. Spesifik olmaları yanında, hassas ve daha basit olmaları nedeniyle MDA-TBA komplekslerinin HPLC ile analizine yönelik yöntemler daha güvenilirdir.²³ UV veya florometrik dedektörlü, HPLC kullanımı bu metodun seçiciliğini geliştirmiş ve hassasiyetini arttırmıştır.¹

MDA tayini için, diğer bir metod, aldehitler ve ketonların düşük pH'da 2,4-dinitrofenilhidrazinle (DNPH) reaksiyonuna dayanır ve DNPH derivelerinden oluşur ki bu deriveler 300-380nm olan bölgede güçlü bir absorbands verirler. Bu metod plazmadaki, idrardaki ve diğer biyolojik örneklerdeki MDA ve diğer aldehitler ve ketonların ölçümü için kullanılmıştır.¹¹³

2.2.3. Serbest Radikallerle Oluşan Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu; hem ROS ile direkt hem de oksidatif stresin sekonder ara ürünlerinin reaksiyonlarıyla indüklenen proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücrel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücrel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir.¹²²

Protein oksidasyonu, bir çok mekanizmayla gerçekleşebildiği ve amino asit yan zincirlerinin hepsi oksidatif olarak modifiye olabildiği için çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonları vardır.¹³³ Oksidatif protein modifikasyonlarının biyokimyasal sonuçları; yan zincir gruplarının oksidasyonu, omurganın fragmentasyonu, çapraz bağlanmalar, yanlış katlanmalar, konformasyon ve hidrofobik yapıda değişiklikler ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı olarak sıralanabilir⁷¹ (Şekil 9).



Şekil 9. Metallerin katalizlediği bölge spesifik protein oksidasyonu¹¹⁶

ROS'un proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin, ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonilleri (PCO) ürünleri meydana gelir. Protein oksidasyonunun en yaygın olarak ölçülen ürünü protein karbonilleridir. PCO düzeylerinin saptanması, oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olmasına rağmen belirli bir aminoasit için spesifik değildir.⁵¹

Son yıllarda, yeni bir protein oksidasyon belirteci olan AOPP (ileri düzey okside protein ürünleri) tespit edilmiştir. AOPP, ditrozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanır ve protein hasarının saptanmasında güvenilir bir belirteç olduğu düşünülmektedir.^{4,38}

AOPP ilk defa 1996'da Witko-Sarsat ve ark. tarafından üremik hastalarda tanımlanmıştır.¹⁵⁴ Oksidatif stres sırasında, aktive fagositik hücrelerde MPO tarafından oluşturulan hipoklorik asit (HOCl) ve kloramin gibi kloronize oksidanlar ile konakçı savunması sağlanır. Oluşan bu potent sitotoksin (HOCl) bakteri, virüs ve tümör hücrelerine karşı konakçı savunmasında önemli rol oynarken normal dokularda hasara ve proteinlerin oksidasyonuna neden olur.^{39,151} AOPP vücutta oluşan kloronize oksidanların proteinlerle aktivasyonu ile oluşmaktadır.

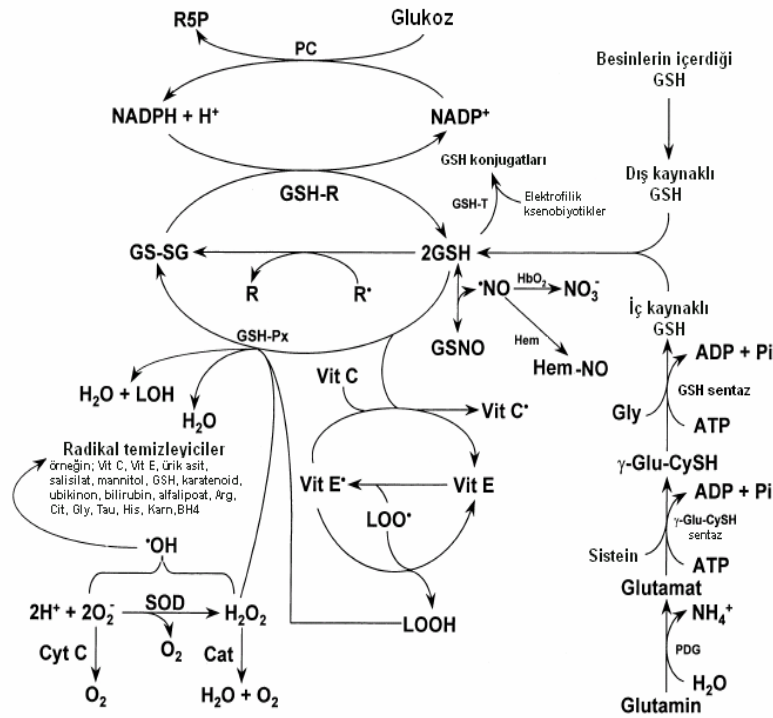
HOCl en sık amin gruplarıyla reaksiyona girer ve oluşan kloronize ürün de reaktif bir oksidandır. Proteinlerin tirozin rezidüleriyle reaksiyona girerek stabil yapıdaki 3-klorotirozin ve 3-5 diklorotirozin oluşumuna, proteinler arası çapraz bağlara ve parçalanmaya neden olur. Yüksek HOCl düzeyleri 3-klorotirozinin 3-5 diklorotirozine dönüşümünü artırır. Kloronize α -aminoasitler kendiliğinden aldehitlere yıkılarak, amonyak ve CO₂ olarak atılır.¹⁵¹

AOPP oluşumunda kloronize oksidanların kritik önemi vardır. MPO enzimine sahip fagositik hücreler kloronize oksidan oluşturabilme kapasitesine sahiptir.¹⁵³ Aktive fagositler, konakçı savunmasında temel rol oynar ve reaktif oksidanların esas kaynağını oluştururlar.²² Aktive polimorfonükleer nötrofiller (PMN) reaktif oksijen türlerini NADPH oksidaz kompleksi ile oluştururlar. Bununla birlikte aktive monositlerin, PMN'lere göre daha az oranda olmakla birlikte bu radikalleri serbestleştirmesi potent pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-1, TNF- α , IL-6) üretimine neden olur.¹⁵³

AOPP'nin oksidanların zararlı aktiviteleri konusunda yeni bir moleküler temel oluşturduğu ve oksidatif strese proinflamatuar etkili bir medyatör gibi davrandığı ve immundisregülasyona katkısı olduğu düşünülmektedir.^{152,154}

2.3. Antioksidan Sistem

Antioksidan moleküller; endojen (organizma tarafından sentezlenen) veya eksojen (dışarıdan besinlerle alınan) kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin hücreye hasar vermesini engellemektedirler. Hücre dışında ve hücrede farklı organelde yerleşerek savunma mekanizmasında rol alan biyomoleküller enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler.⁷⁷ Hücre dışı savunma; albümin, bilirubin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir⁶⁷ (Şekil 10).



Şekil 10. Memeli hücrelerinde antioksidan sistem⁵⁴

Organizmada, oksidan ve prooksidan yapılar arasında denge söz konusudur. Bu dengenin oksidanların lehine kayması, değişik düzeylerde hücrel hasarlara neden olmaktadır.

Antioksidanlar, oksidatif şu prensipler doğrultusunda koruma sağlarlar:¹³⁶

- ✓ Enzim aktivitesi üzerinden veya doğrudan kimyasal reaksiyonlar yoluyla,
- ✓ Oksijenden türeyen moleküllerin oluşumunu en az düzeye indirerek,
- ✓ Radikallerle doğrudan kimyasal yolla temasa geçerek,
- ✓ Reaktif metabolitlerin temizlenmesini veya bu radikallerin daha az aktif ve toksik olmayan ürünlere dönüşümünü sağlayarak,
- ✓ Zayıf reaktif türlerin daha zararlı türlere dönüşümü için gereksinim duyulan metal iyonlarını bağlayarak,
- ✓ Hedef molekülde oluşan hasarı onarma yoluyla,
- ✓ Hasarın çok büyük olduğunda, hasara uğramış molekülü uzaklaştırarak.

Antioksidan ajanlar, oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla göstermektedirler: ¹⁶

1) Süpürücü etki gösterenler: Oluşturdukları etki ile yeni radikal oluşumunu engeller ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, ferritin, serüloplazmin ve metallothionein gibi metal bağlayıcı proteinler bu tür etkiye örnektir.

2) Giderici etki gösterenler: Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe eden bileşiklerdir. β -karoten, vitamin C ve vitamin E bu tür etkiye örnektir.

3) Zincir kırıcı etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak, bazı vitaminler, mineraller, hemoglobin, ürik asit, bilirubin ve albümin verilebilir.

4) Onarıcı etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz örnek gösterilmektedir.

2.3.1. Nonenzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar:

Ekzogen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar: β -karoten, vitamin C ve vitamin E

Endojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar: Hemoglobin, ferritin, miyoglobin, ürik asit, bilirubin, laktoferrin, transferrin, melatonin, askorbik asit, albümin ve glutatyon

2.3.1.1. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (γ -glutamilsisteinilglisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresel fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır.¹⁰⁰ GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırır. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GSH birçok enzimin kofaktörüdür (örneğin HMGCoA redüktaz). Tiroid hormon sentezinde rol oynar. Bunun dışında proteinlerdeki –SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Demirin Fe^{+2} halde tutulmasını sağlar. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller hatta rejenere olmalarını sağlar. Karaciğer vücut GSH içeriğinin en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur.

GSH, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutatyon sentetaz, glisin ve γ -glutamil-sisteinden glutatyonu oluşturur. GSH negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nın hidrolizi gerekir.³⁰

2.3.2. Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar:

2.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

SOD, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismute eden bir metalloenzimdir.



Bu reaksiyon, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olduğundan oksidatif strese karşı 'ilk savunma' olarak değerlendirilir.

Memelilerde üç çeşit SOD bulunmaktadır⁹⁰:

1) Sitolik SOD (Cu-ZnSOD, SOD1): Genellikle sitozolde ve lizozomal fraksiyonlarda yer alır, fakat mitokondriyal boşlukta da bulunmaktadır. İki alt birimden oluşmaktadır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden çinko sorumludur.

2) Mitokondrial SOD (Mn-SOD, SOD2): Mitokondride bulunur ve tetramerik yapıdadır. Kofaktörü mangandır.

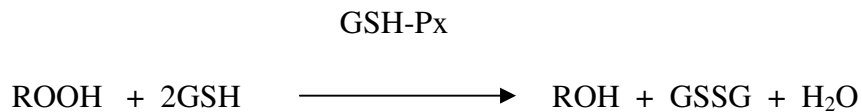
3) Ekstrasellüler SOD (EC-SOD, SOD3): Tetramerik yapıdadır ve ekstrasellüler bölümlere salgılanır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Ayrıca bazı bakterilerde Fe-SOD da saptanmıştır.

SOD tiplerini poliakrilamid jel elektroforezi ile tanımlamak mümkündür.

SOD tayini için direk ve indirek yöntemler bulunmaktadır. Direk ölçüm yöntemleri; pulse radiolizis ve stopped flow olup mevcut tekniklerin en iyisi olarak kabul edilmektedir. Ancak bu metodlar için donanım her zaman bulunmamaktadır. İndirek ölçüm yöntemlerinde kullanılan yaygın yaklaşım SOD varlığında süperoksit üreten bir sistem kullanılmasıdır (örneğin ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu). Bu yaklaşım sitokrom c veya nitrotetrazolium (NBT) gibi optikçe hassas bir bileşiğin indirgenmesinin ölçümüdür. Diğer yöntemler ise sülfid veya epinefrin kullanan otooksidasyon teknikleridir.¹¹⁷

2.3.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px; EC.1.11.1.9) ve Glutasyon Redüktaz (GR; EC.1.6.4.2)

GSH-Px, lipid peroksidlerini daha az toksik yağ asitlerine indirger. Kofaktör olarak glutasyonu (GSH) kullanmaktadır.



GSH-Px, hücrede H₂O₂'nin temizlenmesinden sorumlu iki enzimden biri olup diğer enzim ise katalazdır. Glutasyon-GSH-Px sistemi H₂O₂'nin H₂O'ya indirgenmesini katalizlerken organik hidroperoksidleri de parçalamaktadır.⁹

Genel olarak GSH-Px'ın H₂O₂'e karşı en belirgin savunma sistemi olduğu düşünülmektedir. Tetramerik yapıda olan enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak

bulunmaktadır. Kalp, akciğer ve beyinde orta kasta ise düşük aktivitede bulunur. %60-75'i stoplazmada, %25-40'ı mitokondride yer alır.

Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GSH-Px (Se-GSH-Px) sitozol ve mitokondride bulunmaktadır ve hem H₂O₂ hem de lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Selenyumdan bağımsız olan GSH-Px (non-Se GSH-Px) ise sadece lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipid peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir.¹⁰¹

GR; hücrel GSH redox siklusundan sorumlu olup endojen peroksitlerin detoksifikasyonu için önemlidir.⁴⁶

GSH-Px peroksitleri temizlemek için hidrojen donörü olarak GSH'a ihtiyaç duymaktadır. Okside formu olan GSSG, glutatyon redüktaz ile yeniden glutatyon dönüşmektedir. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan sağlanmaktadır.⁶⁸

2.3.2.3. Glutatyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.8)

Glutatyon-S-transferazlar, hücrel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt birimden oluşan multifonksiyonel protein ailesidir. Genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılır. GST ailesi hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir.¹³⁴ Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler, selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler.



GST'ler, glutatyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlamaktadır.⁹¹

Antioksidan aktivitelerine ilaveten çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup hem, bilirubin ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddeleri reversibl olarak bağlayarak bunların hücre içinde transportunda görev alırlar. Bazı güçlü alkilleyici ajanlara doğrudan kovalent bağlanarak, hücresel proteinler ve makromolekülleri bu ajanların etkisinden korurlar. GST'ler LTB₄ ve prostaglandin sentezinde de rol oynarlar.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda ve Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (GÜDAM) gerçekleştirilmiştir. GÜDAM'da hayvan deneyi çalışması ve MDA ölçümü yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1 Deney Grupları

Deney hayvanları Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanmıştır. Araştırma için, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır. Çalışmada toplam 39 adet Wistar cinsi dişi rat (ortalama 150 gr) kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan aletler

- ✓ Homojenizatör (Virtis-Virtisheur)
- ✓ Vorteks (Heidolf Reax 200)
- ✓ Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)
- ✓ pH metre (Jenway)
- ✓ Santrifüj (Hermle Z 380K)
- ✓ Soğutmalı santrifüj (Damon IEC, B-20A soğutmalı, Hermle Z 323 K)
- ✓ Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)
- ✓ HPLC (Agilent HP 1100 serisi)
- ✓ 0,20 µm'lik filtreler

Ayrıca araştırma laboratuvarında biyokimyasal analizler için gerekli olan malzemeler kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

EDTA, nitrobluetetrazolium (NBT), 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP), 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), bovine serum albumin (BSA), folin ciocalteu's fenol, okside glutatyon (GSSG), redükte glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz, tris-HCl, NADPH (Sigma), ksantin oksidaz (XO), sodyum karbonat (Na_2CO_3), kloroform, etanol, metanol, amonyum sülfat, trikloroasetikasit (TCA), bakır klorür (CuCl_2), sodyum hidroksit (NaOH) sodyum tetra borat, dipotasyum fosfat (K_2HPO_4), monopotasyum fosfat (KH_2PO_4), sodyum potasyum tartarat (Na-K tartarat), bakır sülfat (CuSO_4), etil asetat, tiobarbitürik asit (TBA), asetik asit, sodyum azid (NaN_3), n-bütanol, metanol (HPLC grade), asetonitril (HPLC grade), perklorik asit, potasyum iyodür (KI), kloramin T (Merck), çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Pancreac) kullanılmıştır.

Alfamine (Ketamin Hidroklorür, %10, Egevet İlaç), Alfazyne (Xylazin HCl, %2, Egevet İlaç) kullanılmıştır.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Kontrol grubu: Ratlara 13 gün boyunca standart rat diyeti verilmiştir.

Grup I- Düşük Doz Grup: Ratlara 13 gün boyunca günde bir kez (sabah 09:00-09:30) oral yolla 3 mg/kg vücut ağırlığı oranında elementel çinko olacak şekilde 0,2 ml distile su içerisinde hazırlanan çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) verilmiştir.

Grup II- Orta Doz Grup: Ratlara 13 gün boyunca günde bir kez (sabah 09:00-09:30) oral yolla 12 mg/kg vücut ağırlığı oranında elementel çinko olacak şekilde 0,2 ml distile su içerisinde hazırlanan çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) verilmiştir.

Grup III- Yüksek Doz Grup: Ratlara 13 gün boyunca günde bir kez (sabah 09:00-09:30) oral yolla 25 mg/kg vücut ağırlığı oranında elementel çinko olacak şekilde 0,2 ml distile su içerisinde hazırlanan çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) verilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Oral çinko sülfat uygulaması

Som uygulamadan 24 saat sonra yüksek doz anestezi (40 mg/kg, Alfamin ve 2,5 mg/kg Alfazyne karıştırılarak, intramüsküler uygulanmıştır) ile hayvanlar feda edildi. Batın ve kafatası açılarak hızla karaciğer, böbrek ve beyin dokuları çıkarıldı (Şekil 12). Dokular %0,9'luk NaCl ile yıkandı ve biyokimyasal inceleme için alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta dondurularak analiz süresine kadar -80°C 'de saklandı.

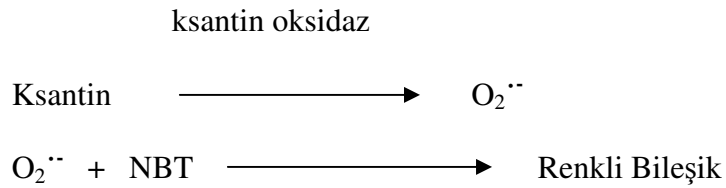


Şekil 12. Rat dokularının çıkartılması

3.2.2. Yöntemlerin Uygulanması

3.2.2.1. Rat Dokularında SOD Aktivitesinin Ölçümü

Doku SOD aktivitesi, Yi-Sun'un tanımladığı, ksantin ksantin oksidaz ile $O_2^{\bullet -}$ 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 $O_2^{\bullet -}$ 'yi ortadan kaldıracağı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır.¹⁵⁵



Reaktifler:

- ✓ PBS (fosfat tampon solüsyonu, pH:7,4)
- ✓ Stok ksantin: 3 mmol/L
- ✓ NBT: 150 μ mol/L
- ✓ Na_2CO_3 : 400 mmol/L

✓ BSA: 1g/L

✓ CuCl₂: 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)

Reaktif karışımı: 40 ml 10 kat dilüe edilmiş stok ksantin çözeltisi + 20 ml NBT + 12 ml Na₂CO₃ + 6 ml BSA karıştırılır.

Deneyin Yapılışı:

100 mg doku 1/10 oranında (w/v) PBS tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon metal uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. 5000 x g'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırıldı. 5000 x g'de +4°C'de 2 saat santrifüj edildi. Enzim aktivitesi tayini ve protein tayini bu süpernatandan yapıldı. Protein miktarları Lowry metodu ile ölçüldü.

	Kör	Numune
Reaktif Karışımı	2,9 ml	2,9 ml
Numune	--	50µl
Distile su	50µl	--
<u>XO çözeltisi</u>	<u>50µl</u>	<u>50µl</u>

25 °C'de 20 dakika inkübasyondan sonra tüplere 0,8 mM CuCl₂'den 1 ml eklenip ve 560 nm'de distile suya karşı okundu.

Hesaplama:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Kör abs} - \text{Numune abs})}{\text{Kör abs}} \times 100$$

Kör abs

% 50 inhibisyonu 1 Ü aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapıldı. SOD enzim tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek Ü/mg protein olarak verildi.

3.2.2.2. Rat Dokularında MDA Düzeyinin Ölçümü

Doku MDA düzeyleri; Pilz ve ark.'nın, numunenin oda sıcaklığında 2,4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile türevlendirmesi ile oluşturulan MDA hidrazonunun, HPLC'de kromatografik olarak ayrıştırılması metodunun bir modifikasyonu ile tayin edilmiştir.¹¹³

Reaktifler:

- ✓ 0,25 M Tris-HCl, pH:7,4
- ✓ 6 M NaOH
- ✓ 5 mM DNPH
- ✓ %35 Perklorik asit
- ✓ %1 Sülfirik asit

1 mM Stok standart: 25 µl 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

0,2 g rat dokusu 0,25 M Tris-HCl (w/v) ile buz banyosunda homojenize edildi. 10000 x g'de +4°C'de 30 dk santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Standart olarak ise stok standarttan 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM TEP hazırlandı.

Numunenin hidrolizi için; ependorf tüpü içerisinde, 250 µl süpernatant 50 µl NaOH eklenerek vortekslendi ve ağzı sıkıca kapatıldı. 60°C' de 30 dk inkübe edildi. Hidroliz olmuş numunelere, eşit hacimde perklorik asit eklenerek vortekslendi ve proteinler

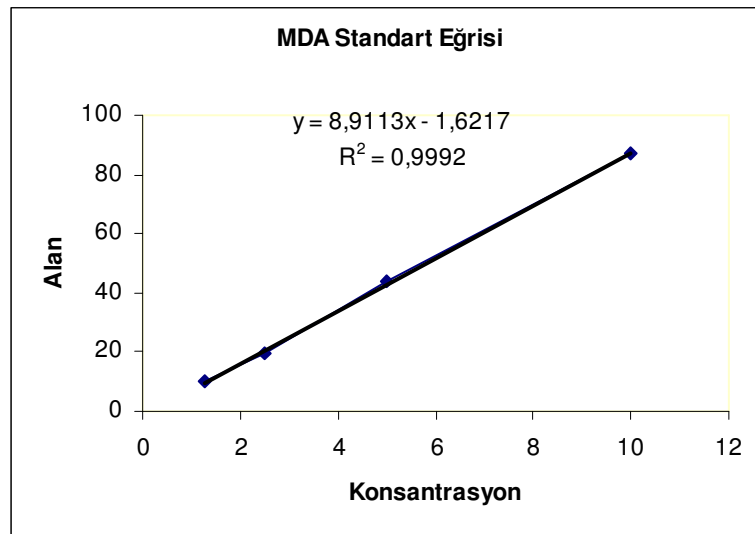
çöktürüldü. 2800 x g'de +4°C'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Ependorf tüpün üst kısmındaki berrak süpernatandan 250 µl alınarak yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. Numunelerin üzerine 25 µl DNPH eklenerek 30 dk oda ısısında karanlıkta türevlendirildi. Türevlendirilen numuneler 0,20 µm'lik filtreden geçirilerek 50 µl'lik kısım HPLC'ye enjekte edildi.

HPLC Analiz Şartları:

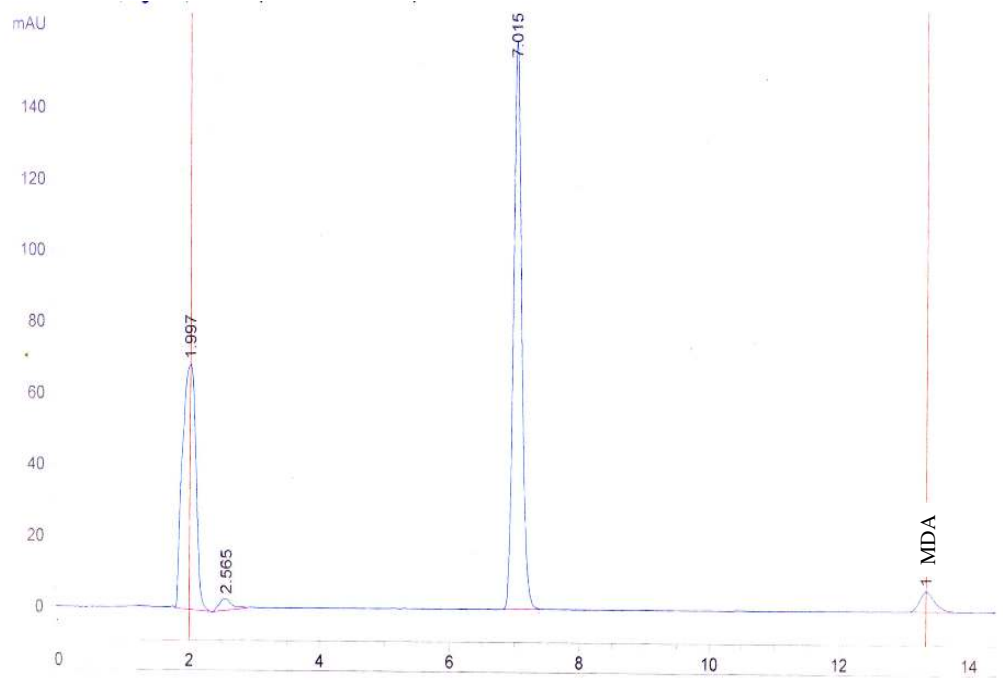
- ✓ Mobil faz: (38:62, v/v) Asetonitril/Asetik asit
- ✓ Kolon: Hypersil ODS C₁₈, reverz faz kolon, 5 µM, 125 x 4 mm
- ✓ Dedektör: 310 nm, UV dedektör
- ✓ Akış Hızı: 1 ml/dakika
- ✓ Kolon ısı: 37°

Hesaplama:

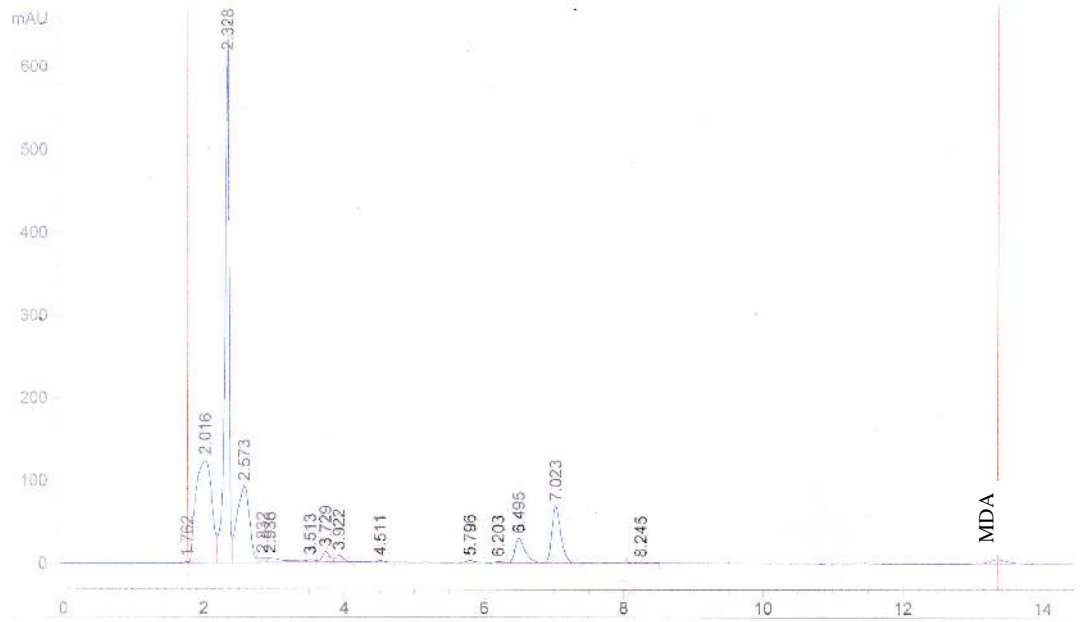
Numunelerdeki MDA değerleri standart eğri üzerinden hesaplanarak Lowry protein miktarlarına bölünerek nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi (Şekil 13, 14, 15).



Şekil 13. MDA standart eğrisi



Şekil 14. 10 mM'lık MDA standartına ait kromatogram



Şekil 15. Çinko uygulanan gruptaki bir numuneye ait kromatogram

3.2.2.3. Doku Protein Tayini

Doku protein düzeyleri Lowry yöntemi ile çalışılmıştır.⁹²

Reaktifler:

- ✓ %2'lik Na_2CO_3 içinde 0,1 N'lik NaOH (A)
- ✓ %1'lik CuSO_4 (B_2)
- ✓ %2'lik Na-K tartarat (B_1)
- ✓ Folin ciocalteu's fenol

Standart olarak 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) kullanıldı.

C solüsyonu: 0,5 ml B_1 + 0,5 ml B_2 + 16,5 ml A

Folin çekolte (F.c): 1 hacim F.c. + 1 hacim distile su

Deneyin Yapılışı:

	BSA	Numune	Distile su	C solüsyonu
Kör	-	-	100 μl	2 ml
Standart 1	20 μl	-	80 μl	2 ml
Standart 2	40 μl	-	60 μl	2 ml
Standart 3	80 μl	-	20 μl	2 ml
Numune	-	20 μl	80 μl	2 ml

Deney tüpleri vortekslendikten sonra, 15 dakika bekletilir. Daha sonra deney tüplerine 200 μl folin çekolte eklenerek iyice vortekslenir ve 1 saat karanlıkta bekletilir. Tüpler 750 nm'de köre karşı okunur.

Hesaplama:

Protein miktarı : $\frac{\text{Numune Abs}}{\text{Standart Abs}} \times \text{standart konsantrasyonu}$

Sonuçlar mg/ml olarak verilir.

3.2.2.4. Rat Dokularında AOPP Düzeyinin Ölçümü:

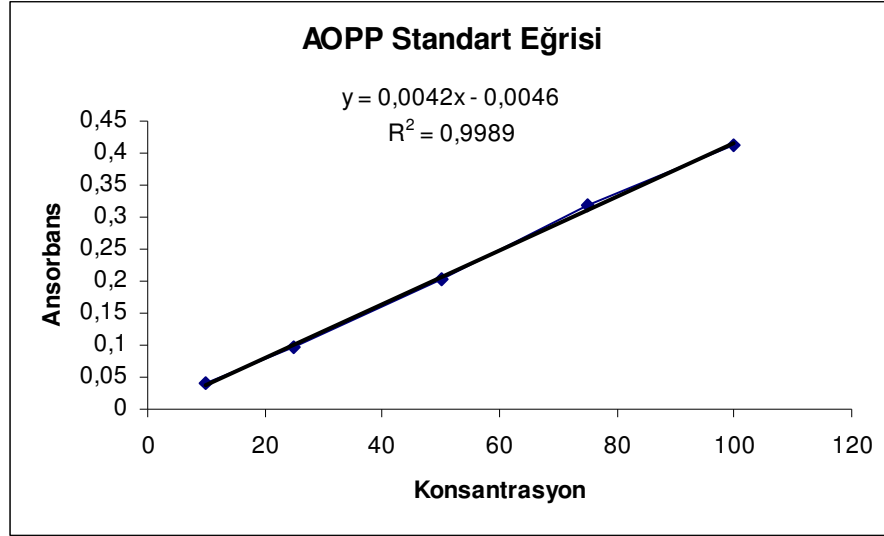
Doku AOPP düzeyleri Witko-Sarsat ve ark. ile Çakatay U. ve ark.'nın tanımladığı spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür.^{38,154}

Reaktifler:

- ✓ PBS (fosfat tampon solüsyonu, pH:7,4)
- ✓ 1,16 M KI (Potasyum iyodür)
- ✓ Asetik asit %100
- ✓ Kloramin T (0-100 µM arasındaki konsantrasyonlarda standart olarak hazırlandı.)
- ✓ Tris-HCl, 20 mM, pH:7,4

Deneyin Yapılışı:

100 mg doku, 1/10 oranında (w/v) 20 mM, pH:7,4 Tris-HCl tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4 °C'de 5000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatandan AOPP ölçümü yapıldı. 200 µl süpernatant 1:5 oranında fosfat tampon solüsyonu ile dilüe edildi. Üzerine 10 µl KI ve 20 µl asetik asit eklenerek numuneler vortekslendi ve 340 nm absorbansta PBS'e karşı spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. 0-100 µM Kloramin T standartları numune gibi çalışıldı. Sonuçlar standart eğriden hesaplanarak, mmol/mg protein olacak şekilde ifade edildi (Şekil 16).



Şekil 16. AOPP standart eğrisi

3.2.2.5. Rat Dokularında Glutatyon-Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü:

Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve Valentina'nın çift enzim metodunun bir modifikasyonu ile tayin edildi. Bu metotda GSSG oluşum hızı 340 nm dalga boyunda, NADPH'ın NADP'ye dönmesi sonucu karışımın optik dansitesinde azalma ile tayin edilmektedir.¹⁰⁸

Reaktifler:

- ✓ 50 mM KPO₄ tamponu, pH:7,0
- ✓ 0,3 mM NADPH
- ✓ 3,6 mM NaN₃
- ✓ 0,25 mM H₂O₂
- ✓ 5 mM GSH
- ✓ Glutatyon Redüktaz (200 Ü/mg protein)

Deneyin Yapılışı:

100 mg doku, 1/10 oranında (w/v) 20 mM, pH:7,4 Tris-HCl tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat + 4°C'de 5000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatandan GPx aktivitesi ölçüldü.

3,6 mM NaN₃, 5 mM GSH ve 0,3 mM NADPH 50 mM KPO₄ tamponu içinde çözülerek reaktif karışımı hazırlandı. 1 ml reaktif karışımı içine 1/5 dilüe numune, 10 ml glutatyon redüktaz eklenerek 5 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi. Karışıma 25 µl H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 5 dakika boyunca 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

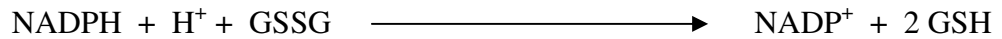
NADPH için molar absorpsiyon katsayısı $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak $\Delta A = a_m \cdot \Delta C \cdot l$ formülüne göre dakika başına okside olan nmol NADPH hesaplandı.

Süpernatandan da Lowry metodu ile protein tayini yapılarak glutatyon peroksidaz aktivitesi nmol okside olan NADPH/dakika/mg protein olarak verildi.

3.2.2.6. Rat Dokularında Glutatyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçümü

Glutatyon redüktaz aktivitesi, Riley ve ark.'larının NADPH'ın 340 nm'de oksidasyonunun izlenmesine bağlı spektrofotometrik yöntemle çalışıldı.¹²³

Glutatyon Redüktaz



Reaktifler:

- ✓ 2 mM EDTA içeren 0,2 M KPO₄ tamponu, (pH:7,0)
- ✓ 10 mM Tris-HCl içerisinde 2 mM NADPH
- ✓ 20 mM GSSG

Deneyin Yapılışı:

100 mg doku, 1/10 oranında (w/v) 20 mM, pH:7,4 Tris-HCl tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat + 4°C'de 5000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatandan GR aktivitesi ölçüldü.

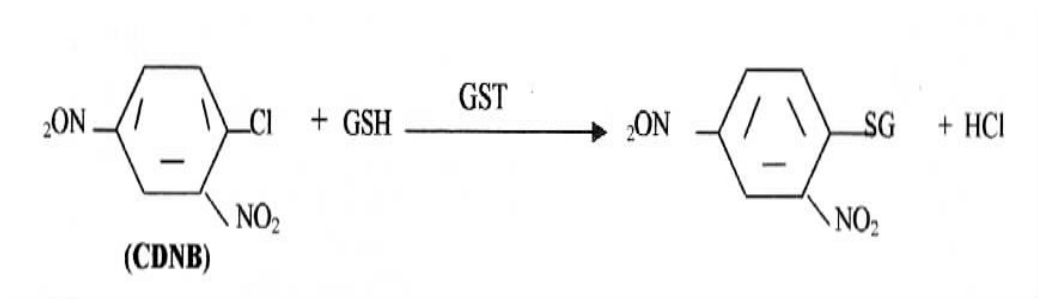
2 mM EDTA içeren 0,2 M KPO₄ tamponu, (pH:7,0) üzerine 50 µl NADPH, 50 µl GSSG, 10 µl numune eklenerek reaksiyon başlatıldı ve 30°C'de 340 nm'de absorbans düşüşü 5 dakika izlendi.

NADPH için molar absorpsiyon katsayısı $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak $\Delta A = a_m \cdot \Delta C \cdot l$ formülüne göre dakika başına okside olan µmol NADPH hesaplandı.

1 Ünite glutatyon redüktaz aktivitesi dakikada 1 µmol NADPH'ı NADP'ye oksitleyen enzim miktarı olarak tanımlandı. Süpernatandan Lowry metodu ile protein tayini yapılarak glutatyon redüktaz aktivitesi mÜ/mg protein olarak verildi.

3.2.2.7. Rat Dokularında Glutatyon-S-Transferaz Aktivitesinin Ölçümü

Glutatyon-S-transferaz aktivitesi, Habig ve arkadaşlarının, GSH ile 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'nin 340 nm'de absorbans artışı ile izlenebilen bir konjugasyonla tioeter bağı oluşturmaya dayanan metot ile çalışıldı.⁶⁵



Reaktifler:

- ✓ Tris-HCl Tamponu (homojenizasyon tamponu): 0,1 M, pH:7,2
- ✓ 1 mM CDNB: 202,6 g/mol
- ✓ 1 mM GSH: 335,4 g/mol
- ✓ 0,1M KPO₄, pH:6,5

Deneyin Yapılışı:

Dokular tartılarak 1/10 oranında (w/v) 0,1 M Tris-HCl (pH:7,2) tamponunda buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4°C’de 5000 rpm’de 20 dakika santrifüjlendi. Süpernatandan GST aktivitesi çalışıldı. 20 µl süpernatant üzerine, 2 ml 1 mM CDNB ve 1 mM GSH içeren 0,1 M KPO₄ tamponu ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Absorbans artışı köre karşı 25°C’de 3 dakika boyunca 18 saniye aralıklarla ölçüldü. CDNB için molar absorpsiyon katsayısı olan $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesap yapıldı.

1 Ünite GST aktivitesi 25°C’de ve pH:6,5’de dakikada 1 µmol ürün oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı. Süpernatanda Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldı. Sonuçlar Ünite/mg protein olarak verildi.

3.2.2.8. Histolojik inceleme

Bütün dokular elektron mikroskopik takip yöntemine göre, 1 mm³’lük parçalara ayrıldıktan sonra %2,5’luk glutaraldehit ön tesbit solüsyonunda 72 saat bekletildi. Daha sonra 1/1 oranında fosfat tamponu ve OSO₄ içinde 1 saat bekletilerek ikinci kez tesbit edildi ve boyandı. Örnekler, fosfat tamponunda yıkandıktan sonra sırasıyla dereceleri artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Bu dokular %80’lik etil alkol içinde uranil asetat solüsyonunda 30 dakika bekletildi. 10 dakika propilen oksitte bekletildi. 2 saat

Araldit CY212+dodesil süksinik anhidrat (DDSA) ve benzil dimetil amin (BDMA) karışımı gömme materyaline gömüldü. Elde edilen bloklar 24 saat 90°C’de ve 48 saat 60°C’lik etüvde polimerize edildi. Alınan kalın kesitler toluidin mavi ile boyanarak, Olympus BH₂ foto mikroskopta değerlendirildi.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme:

İstatistiksel hesaplamalar ve grafiklerin çizimi, istatistik paket programı SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program, for windows 10.01) ile Microsoft Excel (for windows XP) programları ile yapılmıştır. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi ve gruplar arasındaki farklılığı tespit etmek için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Tüm gruplara ait karaciğer, böbrek ve beyin AOPP ve MDA düzeyleri ile SOD, GSH-Px, GR ve GST enzim aktivitelerinin istatistiksel sonuçları tablo 4-9 sunulmuştur. Histolojik bulgular şekil 17-25 arasında verilmiştir.

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Tablo 4. Karaciğer dokusu AOPP ve MDA düzeyleri (ortalama±standart hata)

Biyokimyasal Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	Grup I	Grup II	Grup III
AOPP (mmol/mg pro)	0,122±0,007	0,050±0,003 ^a	0,063±0,009 ^a	0,041±0,002 ^{a,b,c}
MDA (nmol/mg pro)	42,88±6,29	114±10,11 ^a	51±3,75 ^b	64,4±4,31 ^{a,b,c}

Tablo 5. Karaciğer dokusu SOD, GSH-Px, GR, GST aktiviteleri (ortalama±standart hata)

Biyokimyasal Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	Grup I	Grup II	Grup III
SOD (Ü/mg pro)	32,97±0,89	35,75±0,7 ^a	49,51±0,86 ^{a,b}	47,27±0,58 ^{a,b,c}
GSH-Px (nmol oks. NADPH/dk/mg pro)	1,23±2,15	4,0±1,06 ^a	4,67±1,49 ^{a,b}	6,02±1,48 ^{a,b,c}
GR (mÜ/mg pro)	5,89±1,55	5,72±2,36	6,56±1,46 ^{a,b}	6,26±1,13 ^b
GST (Ü/mg pro)	0,199±0,004	0,188±0,002 ^a	0,175±0,004 ^{a,b}	0,154±0,002 ^{a,b,c}

a: p<0,05 Kontrol grubu ile kıyaslandığında

b: p<0,05 Grup I ile kıyaslandığında

c: p<0,05 Grup II ile kıyaslandığında

Tablo 6. Böbrek dokusu AOPP ve MDA düzeyleri (ortalama±standart hata)

Biyokimyasal Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	Grup I	Grup II	Grup III
AOPP (mmol/mg pro)	0,023±0,001	0,017±0,001 ^a	0,028±0,003 ^b	0,032±0,002 ^{a,b}
MDA (nmol/mg pro)	130,45±16,88	121,43±9,29	123,95±16,08	136,61±13,04

Tablo 7. Böbrek dokusu SOD, GSH-Px, GR, GST aktiviteleri (ortalama±standart hata)

Biyokimyasal Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	Grup I	Grup II	Grup III
SOD (Ü/mg pro)	28,05±0,69	26,63±0,72	24,15±0,75 ^{a,b}	22,45±0,70 ^{a,b}
GSH-Px (nmol oks. NADPH/dk/mg pro)	7,05±2,72	6,41±2,37	4,97±1,71	5,05±1,7
GR (mÜ/mg pro)	0,12±2,74	0,13±1,65 ^a	0,14±1,41 ^a	0,14±2,80 ^a
GST (Ü/mg pro)	0,041±0,001	0,038±0,001	0,038±0,001	0,039±0,001

a: p<0,05 Kontrol grubu ile kıyaslandığında

b: p<0,05 Grup I ile kıyaslandığında

c: p<0,05 Grup II ile kıyaslandığında

Tablo 8. Beyin dokusu AOPP ve MDA düzeyleri (ortalama±standart hata)

Biyokimyasal Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	Grup I	Grup II	Grup III
AOPP (mmol/mg pro)	0,100±0,009	0,070±0,006 ^a	0,069±0,006 ^a	0,059±0,002 ^a
MDA (nmol/mg pro)	221,07±38,9	190,67±15,2	144,45±15,8	147,28±23,4

Tablo 9. Beyin dokusu SOD, GSH-Px, GR, GST aktiviteleri (ortalama±standart hata)

Biyokimyasal Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	Grup I	Grup II	Grup III
SOD (Ü/mg pro)	69,4±2,08	66,8±4,23	80,08±3,17 ^{a,b}	76,8±3,59
GSH-Px (nmol oks. NADPH/dk/mg pro)	2,76±1,68	1,83±1,06 ^a	1,23±1,01 ^{a,b}	1,22±1,03 ^{a,b}
GR (mÜ/mg pro)	4,02±1,16	3,24±2,52 ^a	2,93±2,38 ^{a,b}	2,84±2,35 ^{a,b}
GST (Ü/mg pro)	0,104±0,002	0,093±0,004 ^a	0,099±0,005	0,104±0,002 ^b

a: p<0,05 Kontrol grubu ile kıyaslandığında

b: p<0,05 Grup I ile kıyaslandığında

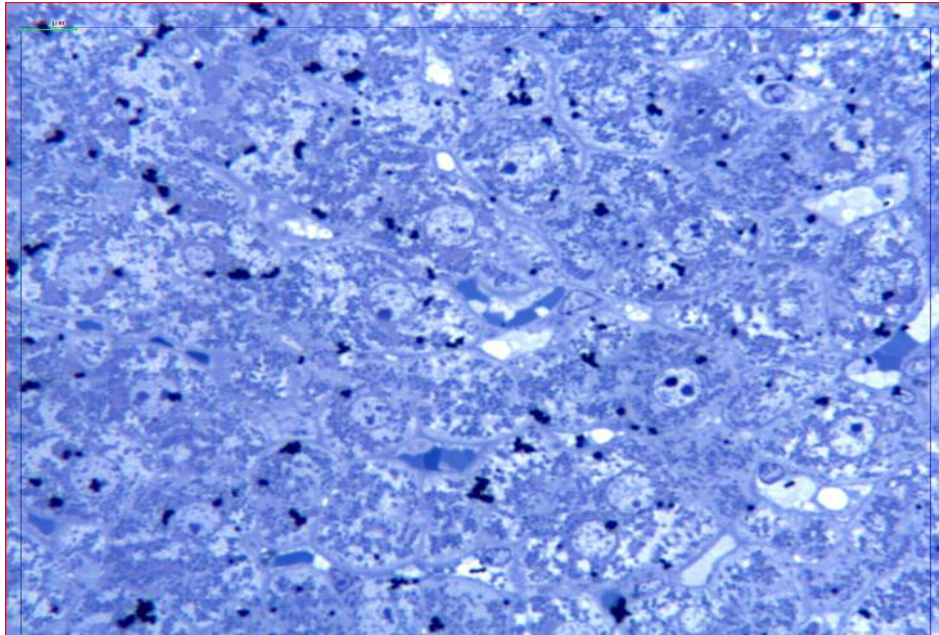
c: p<0,05 Grup II ile kıyaslandığında

4.2. Histolojik Bulgular

4.2.1. Karaciğer Dokusu

Grup I

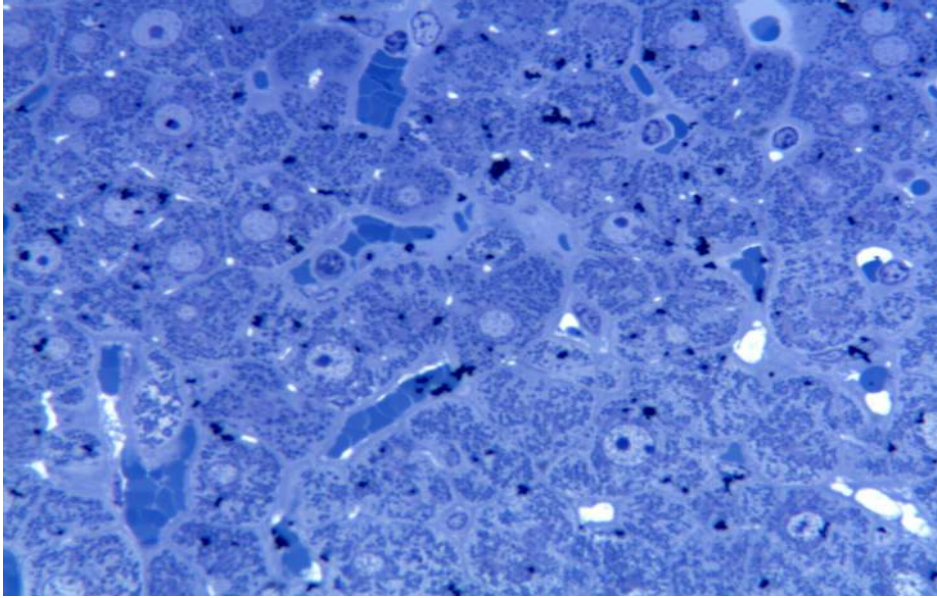
Düşük doz çinko uygulaması yapılan gruba ait karaciğer yarı ince kesitlerinde, hepatositler normal çekirdek ve çekirdekcikleriyle ve sitoplazmik içerikleriyle ayırt edildi. Bazı hücrelerde, yer yer vakuollerin şekillendiği belirlendi. Sinüzoidlerin yer yer normal yapıda oldukları yer yer dilate oldukları gözlemlendi. Sinüzoid damar endotel hücreleri, normal yapıda gözlemlendi. Hepatosit çevresinde minimal düzeyde fibrozis görüldü (Şekil 17).



Şekil 17. Düşük doz çinko uygulanan gruba ait karaciğer doku kesiti

Grup II

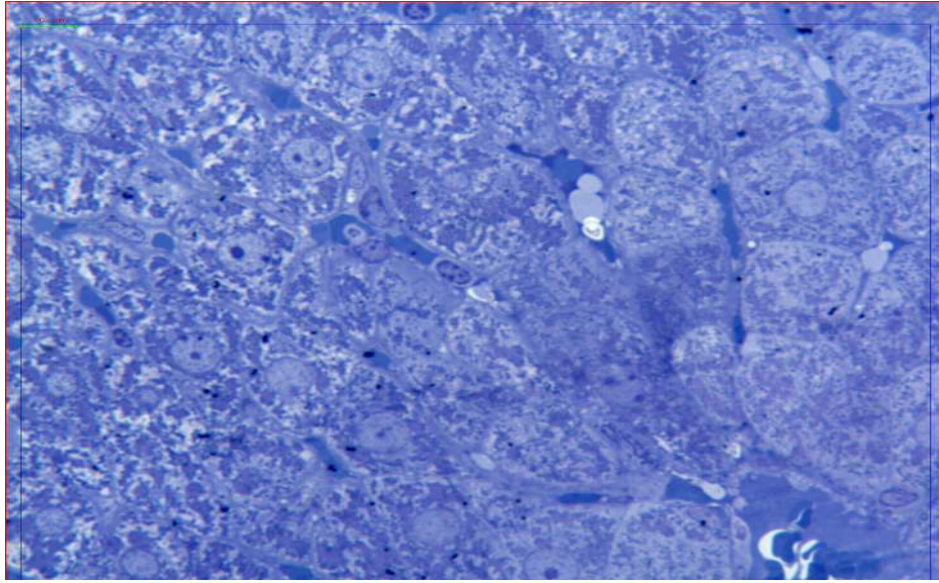
Orta doz çinko uygulaması yapılan gruba ait yarı ince kesitlerde, hepatosit yapısı normal olarak izlenirken en belirgin değişikliğin, endotel hücrelerindeki elektron yoğun görünüm olduğu belirlendi. Sinüzoidlerde çok belirgin dilatasyon saptandı. Ayrıca dilate sinüzoidlerde hiyalinizasyon belirgindi. Safra kanalının bir grubunda çok yaygın dilatasyon saptandı. Bu grupta koyu renk sitoplazma, piknotik çekirdek ve çekirdek invaginasyonlarına sahip ileri derecede dejenerasyon gösteren hücreler olduğu da saptandı. Yer yer fibrotik alanlar belirlendi. Bu alanlarda safra kanaliküllerindeki dilatasyon da belirgindi (Şekil 18).



Şekil 18. Orta doz çinko uygulanan gruba ait karaciğer doku kesiti

Grup III

Yüksek doz çinko uygulaması yapılan grup, orta doz çinko uygulaması yapılan gruba benzerlik göstermekle birlikte, hepatositlerin sitoplazmada yoğun glikojen birikimine bağlı olarak çok daha açık renk boyanmaları dikkati çekti. Endotel hücrelerinin sitoplazmalarında yer yer intrasitoplazmik ödem belirlendi. Bir grup endotel hücresinin ise hipertrofik olduğu dikkati çekti. Kapillerlerde ise hiyalinizasyon gözlemlendi (Şekil 19).



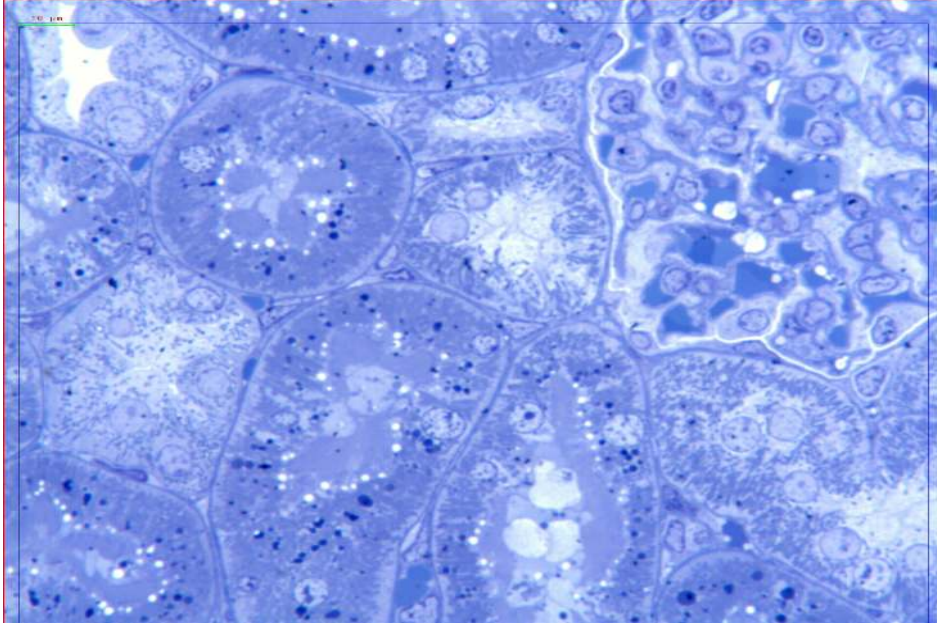
Şekil 19. Yüksek doz çinko uygulanan gruba ait karaciğer doku kesiti

4.2.2. Böbrek Dokusu

Grup I

Düşük doz çinko uygulaması yapılan grupta, böbreğe ait yarı ince kesitlerde, bazı glomerüllerde yer yer idrar boşluğunun dilate olduğu saptandı. Glomerüler kapillerlerde dilatasyon izlendi. Bazı glomerüllerin ise normal yapıda olduğu gözlemlendi. Özellikle proksimal tübül epitel hücrelerinde lizozomların son derece arttığı ve apikal sitoplazmada

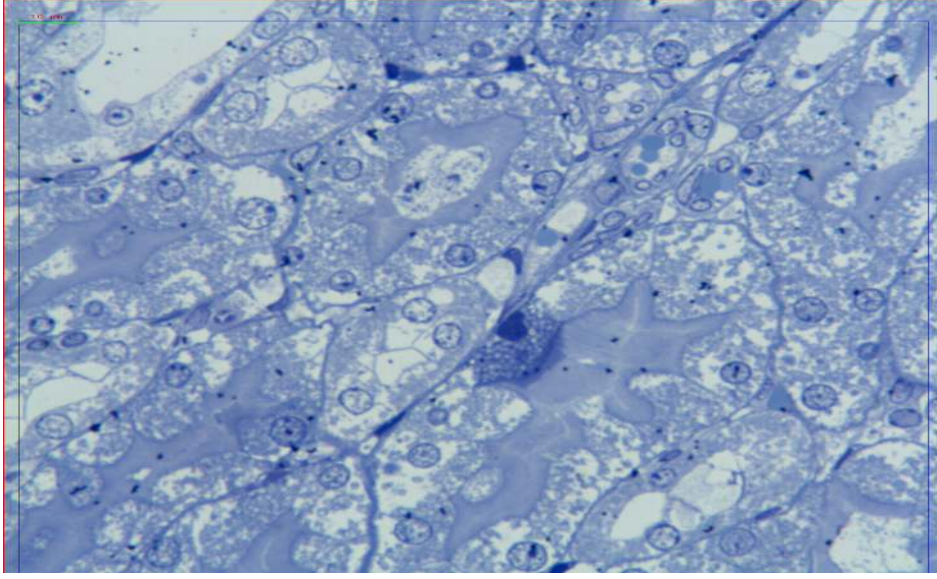
belirgin vakualizasyon olduğu dikkati çekti. Peritübüler kapillerler normal yapıdaydı. Distal tübüllerde ise yapısal bozukluk izlenmedi (Şekil 20).



Şekil 20. Düşük doz çinko uygulanan gruba ait böbrek doku kesiti

Grup II

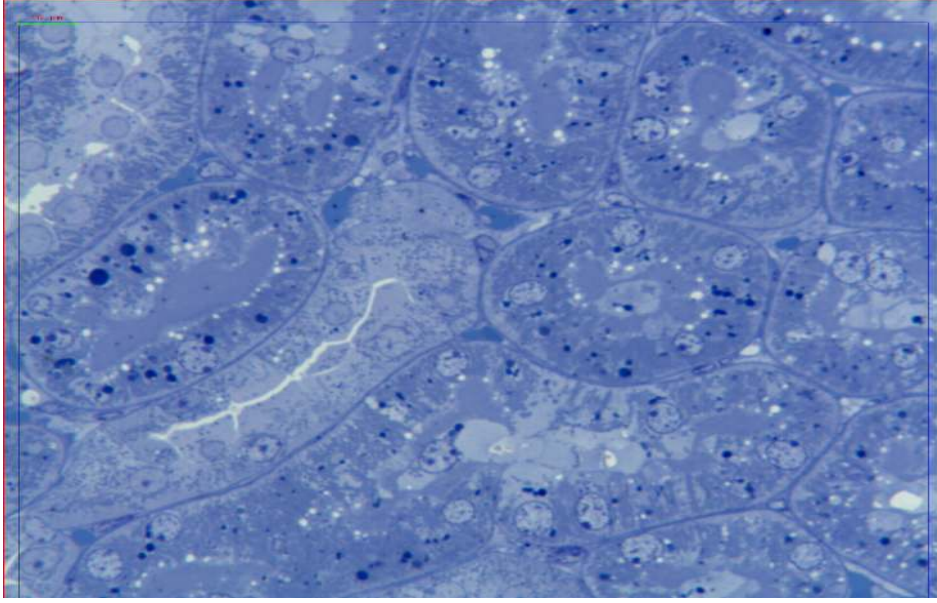
Orta doz çinko uygulaması yapılan gruba ait yarı ince kesitlerde, bazı glomerüllerde sklerotik değişiklikler buna bağlı idrar boşluğunda çok yoğun dilatasyon ve hiyalinizasyon ilgiyi çekti. Özellikle proksimal tübül epitel hücrelerinde, çok belirgin vakualizasyon dikkati çekti. Yer yer, bu tübüllere ait epitel hücrelerinin apikal sitoplazmasında kopmalar belirlendi. Bazı proksimal tübüllerde lizozomlar belirgindi ve bu alanlarda peritübüller dilatasyon ilgiyi çekti. Distal tübüller incelendiğinde, çoğu tübülün özellikle bazal çizgilenmesinde bozulmalar, sitoplazmalarında yer yer açılmalar ve bazı tübül lümenlerinde hiyalinizasyon saptandı. Bazı proksimal tübüllerde fırçamsı kenar mikrovilluslarının lümeni tamamen doldurduğu, buna karşı tübülde tek tek hücre ölümlerinin belirgin olduğu saptandı (Şekil 21).



Şekil 21. Orta doz çinko uygulanan gruba ait böbrek doku kesiti

Grup III

Yüksek doz çinko uygulaması yapılan grupta glomerüllerdeki dejenerasyon, orta doz uygulaması yapılan gruptakine özdeşti. Glomerüler skleroz ve genişlemiş idrar boşluğunda hyalinizasyon dikkati çekti. Bu grupta tüm tübüllerde tübül epitel hücrelerinin hepsinin parçalandığı gözlemlendi. Bu yıkımın distal tübülde olduğu, proksimal tübülün, vakuoler değişim gösteren hücreler içermekle birlikte dejenerasyonun daha az olması ilgi çekti. Normal görünümdeki proksimal tübüllerde çok iri lizozomlar ve apikal sitoplazmada belirgin vakuoller saptandı (Şekil 22).

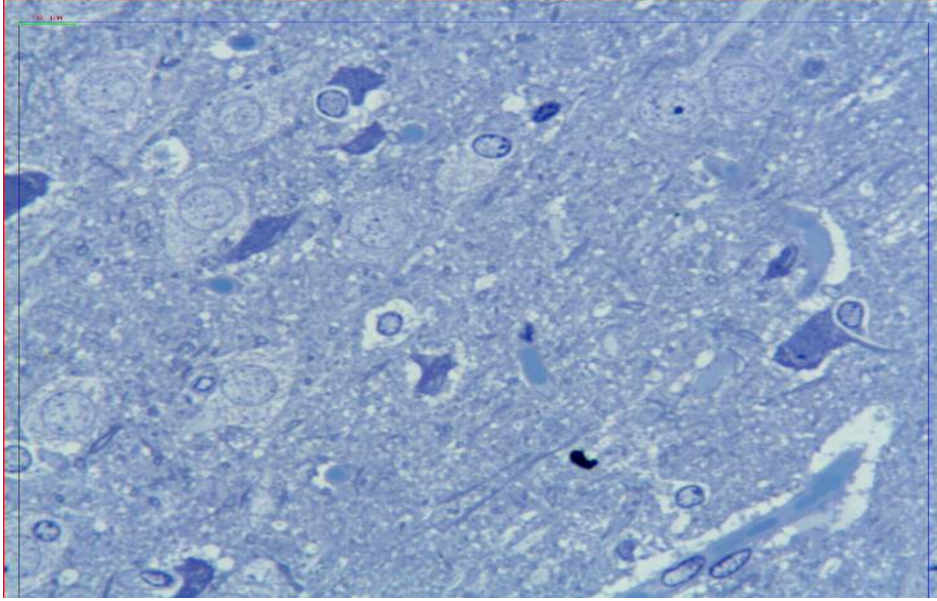


Şekil 22. Yüksek doz çinko uygulanan gruba ait böbrek doku kesiti

4.2.3. Beyin Dokusu

Grup I

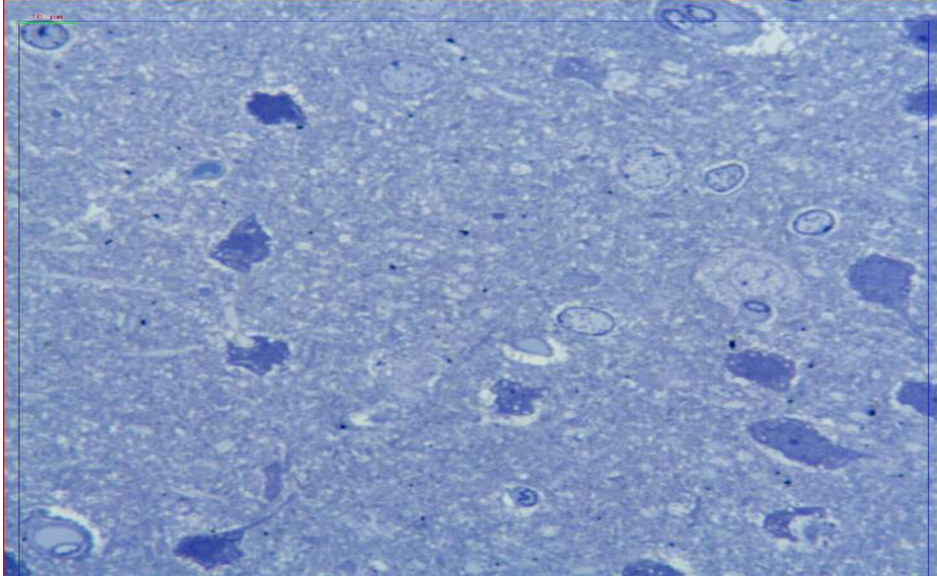
Düşük doz çinko uygulaması yapılan grupta, beyin yarı ince kesitlerinde açık ve koyu renk sitoplazmaya sahip nöronlar izlendi. Yoğun boyanan nöronların çekirdek ve çekirdek içerikleri tamamen izlenemedi ve bu hücrelerin minimum düzeyde ekstrasellüler ödeme sahip olduğu belirlendi. Bu bilgiler ışığında koyu renk hücrelerin apoptoza gittikleri kanısına varıldı. Açık renk sitoplazma ve normal çekirdek yapısıyla izlenen hücrelerin de bir grubunda sitoplazmik vakuollerin şekillendiği dikkati çekti. Genel olarak tüm nöronlarda, çok az sayıda Nissl cisimciği gözlemlendi. Kapillerlerde de perikapiller ödem belirgindi. Aksonlarda da genel olarak intrasitoplazmik ödem dikkati çekti (Şekil 23).



Şekil 23. Düşük doz çinko uygulanan gruba ait beyin doku kesiti

Grup II

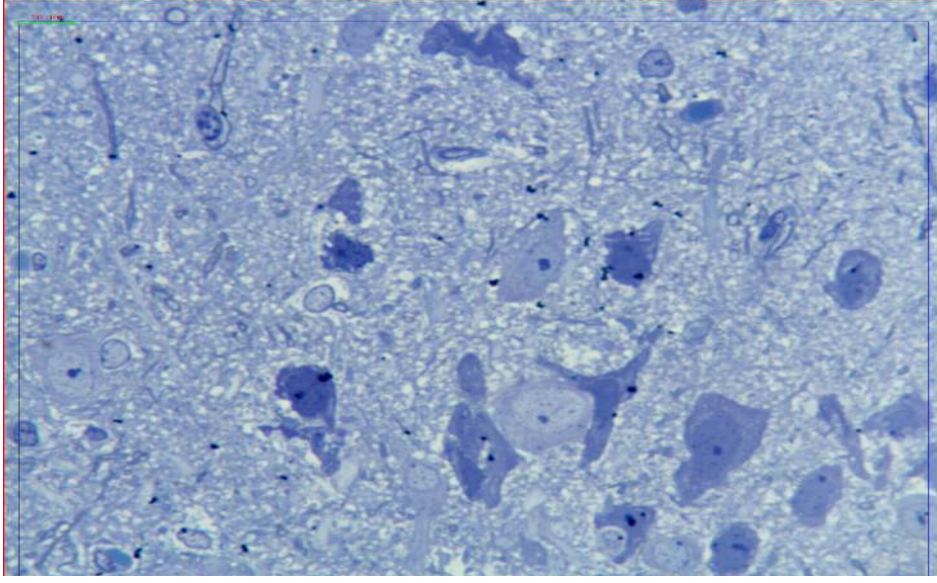
Orta doz çinko uygulaması yapılan grupta, Nissl cisimciklerinin yokluğuna bağlı olarak açık renk gözlenen nöronların sayısı oldukça azdı. Çok sayıda bazofilik nöronlar, değişik büyüklüklerde izlendi. Bazofilik boyanan nöronlarda sitoplazmada az sayıda vakuoller gözlemlendi. Diğer gruplarda gözlenen ekstrasellüler ödem, bu grupta da gözlemlendi. Perikapiller ödemin bazı kapillerlerde olmadığı, bazı kapillerlerde ise diğer gruptan daha yoğun olduğu dikkati çekti. Diğer grupla benzer olarak bu grupta da çekirdek invaginasyonları ve hücre büzülmesiyle karakterize apoptotik nöronlar dikkati çekti. Nöronlara komşu astrositler, normal çekirdek ve sitoplazmalarıyla izlenirken, daha uzak lokalizasyondaki astrositlerde intrasitoplazmik ödem belirgindi (Şekil 24).



Şekil 24. Orta doz çinko uygulanan gruba ait beyin doku kesiti

Grup III

Yüksek doz çinko uygulaması yapılan grupta, çekirdek invaginasyonları olan ve heterokromatik görüntüleriyle çok sayıda nöron dikkati çekti. Bazı hücrelerin çekirdeklerini tamamen yitirdikleri ve desidual hücre haline dönüştükleri belirlendi. Apoptozisin son evrelerinde olan hücrelerin ekstrasellüler ödemleri dikkat çekiciydi. Bir grup nöronun sitoplazmasında ise oldukça iri ve çok sayıda vakuoller ilgiyi çekti. Bu grupta perikapiller ödemin çok belirgin ve yaygın olduğu dikkati çekti. Astrositlerin bir grubu normal yapıda izlenirken, büyük bir grubunda çok belirgin intrasellüler ödem dikkati çekti. Az sayıdaki gliya hücrelerinde de apoptozis belirgindi. Bu grupta Nissl cisimciklerinden yoksun açık renk boyanan nöronların diğer gruplara göre daha az sayıda olduğu izlendi (Şekil 25).



Şekil 25. Yüksek doz çinko uygulanan gruba ait beyin doku kesiti

TARTIŞMA ve SONUÇ

Metabolizma için gerekli esansiyel bir eser element olan çinkonun, insan sağlığı bakımından öneminin anlaşılması ancak son yıllarda olmuştur.¹¹⁸ Çinko, 300'den fazla enzimin biyolojik fonksiyonları için gereklidir. Çinko, DNA sentezinde, normal büyümede, beyin gelişiminde, davranışsal cevapta, üremede, fetal gelişimde, membran stabilitesinde, kemik formasyonunda ve yara iyileşmesinde görevli enzimlerin katalizlenmesinde gereklidir.^{8,103}

Oksidatif stres; serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin artması ile oluşur ve biyolojik makromoleküllerde şiddetli hasar oluşturarak metabolizma ve fizyolojide bozukluklar meydana getirir. Oksidatif stres, ateroskleroz ve ilişkili vasküler hastalıklar, kanser, nörodejenerasyon, immünolojik hastalıklar, yaşlanma süreci gibi birçok kronik durumlara eşlik eden önemli bir faktördür. ROS olarak bilinen $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$ aerobik şartlarda sürekli üretilir. ROS'un en önemli kaynakları; mitokondrial solunum zinciri enzimleri, mikrozomal sitokrom p450 enzimleri, peroksizomal yağ asit metabolizmasıdır.²⁴

Oksidatif stresin modülasyonunda çinkonun rolü son yıllarda kabul görmüştür. Çinko, NADPH Oksidaz'ın inhibitörü olup SOD'un yapısında bulunur. $OH^{\cdot}$ 'i iyi temizleyen ve sisteinden zengin olan metallothioneinin sentezini uyarır. Hücre membranına bağlanmada demir ve bakır iyonları ile yarışarak $OH^{\cdot}$ üretimini azaltır.¹¹⁹ Proteinlerin sülfidril gruplarını oksidatif hasardan korur, mebran yapılarını stabilize eder. Vitamin E tüketimine ve apoptozise karşı hücreyi korur, hücre proliferasyonunu uyarır.⁹⁴ Birçok çalışmada oksidatif stresin tedavisinde antioksidan olarak çinkonun kullanımı araştırılmıştır.

Çinko eksikliği; kanser, siroz, koroner arter hastalığı, diyabet ve bazı deri hastalıkları gibi oksidatif hasar ile ilişkili birçok hastalıkla da ilişkilidir. Çinko eksikliğinin

oksidatif stresin indüklediği hasarı, lipid peroksidasyonunu artırarak gerçekleştirdiği pek çok çalışmada rapor edilmiştir. Çinko eksikliğinin oksidatif stresi uyarmasının kısa ve uzun dönem mekanizmaları vardır. Kısa dönemde, çinko eksikliği meydana gelen hücrede NADPH oksidaz içeriyor olmasına rağmen hücresel ROS'un hızlı bir şekilde artmasının nedeni bilinmemektedir. Uzun dönemde ise; 1) Fizyolojik antioksidan olarak çinkoya ihtiyaç duyulması 2) ROS oluşumundan dolayı değişen mitokondriyal fonksiyonlar, özellikle solunum zinciri bileşenlerinin ekspresyonunun bozulması 3) ROS/RNS metabolizmasını içeren enzimlerin aktivitelerinin ve ekspresyonunun değişimi sonucu oksidatif stresi uyarmaktadır. Çinkonun antioksidan sistemde yer alarak hücreleri oksidatif stresten koruduğu pek çok in vitro ve in vivo deney modelinde önemle vurgulanmıştır.^{7,105}

Son yıllarda sağlıklı bireyler arasında da çinko preparatlarının kullanımı yaygınlaşmıştır. Ancak aşırı çinko kullanımı bazı kişilerde bakır eksikliği gibi önemli yan etkiler oluşturmuştur. Çinkonun sağlıklı bireylerde toksik dozunun belirlenmesine yönelik literatürde fikir birliği bulunmamaktadır. Çinkonun çeşitli dokularda oksidan hasar sonrasında meydana gelen değişiklikleri iyileştirdiği yönünde çalışmalar ne kadar fazla olsa da yakın zamanda yapılan bir çalışmada çinkonun sağlam beyin hücrelerinde oksidatif stresi uyardığına yönelik kanıtlar elde edilmiştir.¹⁴ Çinkonun oksidatif stres yokluğunda rolünün ne olacağı yönünde de fazla çalışma bulunmamaktadır. Çinkonun oksidatif stres yokluğunda uygun dozunun belirlenmesine ve oksidan-antioksidan sisteme etkilerinin nasıl olduğuna yönelik çalışmamızda, sağlıklı ratlara 13 gün boyunca üç farklı dozda çinko uyguladık. Çinkonun farklı dozlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokuları üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, lipid peroksidasyon belirteci olarak MDA düzeylerini, protein oksidasyon belirteci olarak AOPP düzeylerini, antioksidan parametreler olarak SOD, GSH-Px, GR, GST aktivitelerini inceledik. İncelediğimiz

dokularda, farklı dozlardaki çinkonun etkilerini histolojik bulgularla desteklemeyi amaçladık.

Çalışmamızda antioksidan sistemler üzerine karaciğer dokusunda farklı dozlarda çinkonun genel olarak antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı görülmektedir. Çalışmamızda karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre çinko uygulanan tüm gruplarda anlamlı olarak artan SOD aktiviteleri izlenmiştir. Bu artış orta doz çinko uygulanan ratlarda en yüksek düzeydedir. Diyetteki çinko seviyesinin artması ile karaciğer SOD enzim aktivitesinin artması, bu enzimin kofaktörü olmasından dolayı diyetten etkilendiğini göstermektedir. Çalışmamızda sağlıklı ratlarda çinko uygulamasının güçlü bir antioksidan enzim olan SOD'un aktivitesini arttırdığını görmekteyiz.

Karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre çinko uygulanan tüm gruplarda anlamlı olarak artan GSH-Px aktivitesi görülmektedir. Antioksidan enzim aktivitesindeki bu artış uygulanan çinko dozu ile paralellik göstermektedir. GR aktivitesi çinko uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artış göstermektedir. Bu artış orta doz çinko uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlıdır. GSH-Px, GSH'a ihtiyaç duymaktadır. Okside formu olan GSSG, GR ile yeniden GSH'a dönüşmektedir. Bizim çalışmamızda da çinko uygulanan gruplarda GSH-Px ile GR aktivite artışları paralellik göstermektedir. Çinkonun antioksidan etkisini, GSH-Px ve GR enzimlerinin aktivitesini arttırarak gösterdiğini düşünmekteyiz. Fakat çinko alımının artması ile GST aktivitesinde anlamlı olarak azalma meydana gelmiştir. GST aktivitesinin çinko dozu arttıkça azalması, çinkonun bu enzimi direkt inhibe edebileceğini düşündürmektedir. Bunun sonucunda da enzimin substratı olan GSH birikecek ve başlıca antioksidan enzim olan GSH-Px tarafından kullanılarak, GSH'ın hücrel antioksidan savunmada daha etkin olabileceğini düşünmekteyiz.

Pathak ve ark.'nın çalışmasında sağlıklı ratlara 2, 4 ve 8 hafta süreyle içme suyuna 222 mg/L çinko sülfat uygulandığında SOD ve GPx aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.¹¹⁰ Goel ve ark.'nın çalışmasında da 8 hafta süreyle içme suyuna 227 mg/L çinko sülfat uygulandığında karaciğer dokusunda GSH düzeylerinde, SOD, GR, GST ve GPx aktivitelerinde ve histolojik olarak kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.⁶¹ Bu çalışmalarla sonuçlarımız karşılaştırıldığında doz ve süreye bağlı olarak çinkonun farklı etkilerde bulunabileceğini söyleyebiliriz.

Yeni bir protein oksidasyon belirteci olan AOPP ile ilgili çalışmalar son yıllarda artmıştır. Fakat çinko alımı ile AOPP düzeyleri arasındaki ilişkiyi bildiren herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda karaciğer dokusunda, çinko uygulanan tüm gruplarda AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Bu azalma yüksek doz çinko uygulanan grupta daha belirgin olmaktadır. Çinko akut antioksidan etkisini, sülfidril içeren proteinlerin oksidasyonunu engelleyerek göstermesinden dolayı AOPP düzeylerinde düşüklüğe neden olmaktadır. Çalışmamızda çinkonun, karaciğer dokusunda protein oksidasyonunu karşı koruyucu etki gösterdiğini görmekteyiz. Ancak artan antioksidan enzim aktiviteleri ve azalan protein oksidasyonuna rağmen karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre çinko uygulanan tüm gruplarda MDA düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu artış düşük ve yüksek doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmaktadır. Çalışma sonuçlarımız sağlıklı ratlarda kısa zamanda uygulanan çinkonun, lipid peroksidasyonunu arttırarak oksidatif stresi arttırıcı yönde davrandığını göstermektedir. Çinko belirtilen dozlarda peroksidasyona karşı koruma sağlayamamıştır. Histolojik olarak karaciğer endotel hücrelerinin hipertrofik olması ve

sitoplazmalarında intrasitoplazmik ödem bulgularımızın da biyokimyasal olarak MDA artışını desteklediğini görmekteyiz..

Çinkonun antioksidan rolünün araştırıldığı çalışmalarda lipozomlarda fosfolipitlerin negativitesini değiştiren demir ve bakırın bağlanmasını önleyerek lipidlerin oksidasyonunu inhibe edebileceği söylenmektedir. Ancak Piao ve ark.'nın yaptığı çalışmada da gösterildiği gibi, sağlıklı ratlara uygulanan 8 mg/kg dozda çinko asetatın hemapoetik sistemi, endokrin sistemi içeren çeşitli doku ve organlar üzerine toksik etkilerinin olduğu biyokimyasal ve sitogenetik verilerle rapor edilmiştir.¹¹¹ Biz de karaciğer dokusunda verdiğimiz dozlarda çinkonun lipid peroksidasyonunu arttırarak toksik olabileceğini söyleyebiliriz. Yapılan bir çalışmada da çinkonun sağlam astrositlerde hücre içi ROS üretimine, oksidatif strese ve hücre ölümüne yol açtığı kanıtlanmıştır. Çinko ile uyarılmış ROS üretiminin, çinko ile ilgili genel antioksidan etkilerin tam zıttı olarak birkaç potansiyel kaynağı belirtilmiştir. Bunlar;

- 1) Hücre membranları üzerindeki sülfidril gruplarının otooksidasyonu,
- 2) Mitokondriyal membran potansiyelinin disregülasyonu,
- 3) Tioredoksin redüktazın ve tiyol oksidoredüktazın inhibisyonu,
- 4) NADPH oksidaz aktivitesinin artması.¹⁴

Bizim çalışmamızda da çinkonun karaciğerde lipid peroksidasyonunu arttırmasının belki de artan ROS üretimi sonucunda meydana geldiğini söyleyebiliriz.

Literatürde sağlıklı ratlara çinko uygulamasının böbrek dokusu üzerindeki etkilerine yönelik çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda böbrek dokusunda MDA düzeylerinde tüm gruplarda kontrole kıyaslandığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Çalışmamızda böbrek dokusunda düşük doz çinko uygulanan grubun AOPP düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır. Orta doz çinko uygulanan grupta

AOPP düzeyi kontrol grubu seviyesine çıkmıştır. Yüksek doz çinko uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı artış vardır. Bu sonuçlar çinkonun böbrek dokusunda lipitler üzerine etkide bulunmayıp proteinler üzerinde farklı etkiler göstermesinin doz bağımlı olduğunu göstermektedir. Çinkonun proteinler üzerindeki oksidan etkisini histolojik olarak da tübül epitel hücrelerinde lizozomların artışı ve hatta hücre ölümleri ile görmekteyiz.

Çalışmamızda böbrek dokusunda SOD aktivitesinin kontrol ile kıyaslandığında orta ve yüksek doz gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir. Çinko SOD enziminin yapısal kompanenti olmakla beraber doz arttıkça enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Okside glutatyonun redüksiyonunda görevli GR aktivitesinde tüm gruplarda kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak artış görülmektedir. Böbrek dokusunda artan çinko dozu ile artmış protein oksidasyonu düşünüldüğünde, bir tripeptid olan glutatyonun da oksidasyonunun artabileceği, bunun da artan GR aktivitesi ile kompanse edilmeye çalışılabileceğini söyleyebiliriz. Böbrek dokusunda lipit peroksidasyonu farklı dozlarda çinko uygulayımı ile değişmez iken özellikle lipit peroksitlerin detoksifikasyonunda görevli GSH-Px ile GST aktivitelerinde de kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Çinko beyinde özellikle hipokampus bölgesinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Ekstrasellüler sıvıda çinkonun fazlalığı nörotoksik etkiler ortaya çıkarabilir. Brocardo ve ark., sağlıklı ratlarda beyin dokusunda çinkonun akut etkilerini incelemek için bir gün 5 mg/kg intraperitoneal olarak tek doz çinko klorid uygulamışlardır.¹⁵ Bunun sonucunda çinko uygulamasının; hipokampus bölgesinde TBARS düzeylerinin artmasına, serebral kortekste GR ve GST aktivitelerinin azalmasına sebep olduğu görülmüştür. Serebral kortekste GPx ve G6PDH aktiviteleri, hipokampus bölgesinde GR, GST, GPx ve G6PDH aktiviteleri çinko uygulamasından

etkilenmemişlerdir. Bu durum çinkonun bilinmeyen bir mekanizma ile serbest radikallerin üretimini arttırması ile ilişkilendirilmiştir. Çinkonun beyin bölgelerinin duyarlılıklarına göre farklı etkiler gösterdiği ve sonuçta hipokampus bölgesinde pro-oksidatif etkilerinin olduğu belirtilmiştir.¹⁵

Bizim çalışmamızda beyin rat dokusunda MDA düzeylerinde çinko uygulamasıyla azalma meydana geldiği fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. Çinko lipitler üzerine antiperoksidatif etkisini, demir ve bakır gibi redoks aktif metalleri antagonize ederek membran yapılarını stabilize etmesiyle göstermektedir. Bizim çalışmamızda lipitler yönünden çok zengin olan beyinde koruyucu etki gösterse de bu sonuçlar anlamlı değildir. Ancak çinko dozu arttıkça AOPP düzeylerindeki kontrol grubuna göre anlamlı olan azalma çinkonun beyin dokusunda protein oksidasyonu üzerine koruyucu etkisini göstermektedir. Bu etkisini proteinlerin sülfidril gruplarını stabilize ederek göstermektedir. Beyin dokusunda çinko verilen gruplarla kontrol grubu kıyaslandığında orta doz çinko uygulaması SOD aktivitesini arttırmıştır. Bu da çinkonun SOD'un stabilitesini arttırarak antioksidan savunmayı arttırdığını düşündürmektedir.

Çinkonun, beyin homojenatlarında GSH metabolizması ile ilişkili enzimlerin aktivitesini özellikle de GR'yi inhibe ettiği daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bishop ve ark.'nın yaptığı çalışmada sağlam astrositlerde hem çinkonun hem de GR inhibitörü olan Karmustin'in GR aktivitesini inhibe ettiği, ama sadece çinkonun hücrelere toksik olduğu, toksisitesinden inhibisyonun sorumlu olduğu ve oksidatif stresi uyardığı gösterilmiştir.¹⁴ Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olarak beyin dokusunda kontrol ile kıyaslandığında çinko uygulanan gruplarda GR aktivitesinde anlamlı bir düşme görülmektedir. GR inhibisyonu, çinkonun etkisiyle meydana gelmekte ve sonucunda GSH azalmasına GSSG birikimine sebep olmaktadır. GR aktivitesindeki azalmaya paralel

olarak, çinko dozu arttıkça azalan GSH-Px aktivite değişikliği meydana gelmiştir. Çalışmamızda GST aktivitesindeki azalma düşük doz uygulanan çinko grubunda kontrol grubuyla kıyaslandığında görülmektedir. Sonuçta GST için substrat görevi gören GSH, GR inhibisyonundan dolayı ortamda yeterli miktarda bulunmadığından enzim aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Mahboob M. ve ark.'nın yaptığı çalışma sonucunda, beyin, böbrek ve akciğer dokularındaki GST inhibisyonu ile GSH azalması arasında pozitif korelasyon bulunmuş ve GSH azalmasından dolayı GST inhibisyonunun meydana geldiği belirtilmiştir.⁹⁴

Sonuç olarak, çalışmamızın biyokimyasal ve histolojik bulguları çinkonun oksidatif stres yokluğunda karaciğer, böbrek ve beyin dokuları üzerine farklı etkilerde bulunduğunu göstermektedir. Çinko uyguladığımız dozlarda karaciğer dokusunda daha çok lipidler üzerinden etki ederek peroksidasyonu arttırmıştır. Beklide peroksidasyon sonucunda antioksidan enzim aktivitelerini artmış olarak görmekteyiz. Böbrek dokusunda da proteinler üzerinden etki göstererek oksidasyonu arttırmıştır. Beyin dokusunda ise ne lipidler ne de proteinler üzerinden etkide bulunmakta, daha çok antioksidan enzim aktivitelerini değiştirerek etki göstermektedir. Bu farklı etkiler çinkonun uygulama dozundan ve doku dağılımından kaynaklanıyor olabilir. Sonuçta bizim çalışmamız sağlıklı ratlar üzerinde gerçekleştirilmiş olup daha kesin sonuçlar için sağlıklı insan çalışmalarına ihtiyaç vardır. Sonuçlarımıza göre kısa sürede çinko uygulamasının hem antioksidan hem de oksidan etkileri nedeniyle ve bu etkilerin dokudan dokuya değişebilmesinden dolayı çinko preparatlarının sağlıklı insanlarda daha dikkatli kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Bugün artık çinkonun 300'den fazla enzimatik reaksiyonda ve gen ekspresyonunda rolü olan 2000'den fazla proteinin yapısında bulunduğu bilinmektedir. Çinkonun metabolik olaylarda, protein, karbonhidrat, enerji, nükleik asit, lipid ve hem sentezinde, homeostaziste, gen ekspresyonunda, immün sistem maturasyonunda, doku sentezinde, embriyogenezisde, oksidatif strese, apoptoziste ve yaşlanmada önemli roller üstlendiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır.

Oksidatif stresin modulasyonunda çinkonun rolü son yıllarda kabul görmüştür. Çinko, NADPH Oksidaz'ın inhibitörü olup SOD'un yapısında bulunur. OH[•]'i iyi temizleyen ve sisteinden zengin olan metallothioneinin sentezini uyarır. Hücre membranına bağlanmada demir ve bakır iyonları ile yarışarak OH[•] üretimini azaltır. Proteinlerin sülfidril gruplarını oksidatif hasardan korur, mebmran yapılarını stabilize eder. Vitamin E tüketimine ve apoptozise karşı hücreyi korur, hücre proliferasyonunu uyarır.

Çalışmamızda çinkonun oksidatif stres yokluğunda doza bağlı olarak rat karaciğer, böbrek ve beyin dokularında oksidan-antioksidan sistem üzerine etkilerini ve histolojik bulguları inceledik.

Karaciğer dokusunda kontrolle karşılaştırıldığında düşük ve yüksek doz çinko uygulamasında MDA düzeyi artmış, çinko uygulanan tüm gruplarda AOPP düzeyi azalmış, SOD ile GSH-Px aktiviteleri artmış, GST aktivitesi azalmış ve orta doz çinko uygulamasında GR aktivitesi artmış olarak bulunmuştur ($p<0,05$).

Böbrek dokusunda kontrolle karşılaştırıldığında düşük çinko uygulamasında AOPP düzeyi azalmış, yüksek doz çinko uygulamasında artmış, orta ve yüksek doz çinko uygulamasında SOD aktivitesi azalmış, çinko uygulanan tüm gruplarda GR aktivitesi

artmış olarak bulunmuştur ($p<0,05$). MDA düzeyi ile GSH-Px ve GST aktiviteleri çinko uygulanan tüm gruplarda kontrole göre anlamlı değişiklik göstermemiştir.

Beyin dokusunda kontrole karşılaştırıldığında çinko uygulanan tüm gruplarda AOPP düzeyi ile GSH-Px ve GR aktiviteleri azalmış, orta doz çinko uygulamasında SOD aktivitesi artmış, düşük doz çinko uygulamasında GST azalmış olarak bulunmuştur ($p<0,05$). MDA düzeyi çinko uygulanan tüm gruplarda kontrole göre anlamlı değişiklik göstermemiştir.

Çinko uygulaması sonucu karaciğer dokusunda endotel hücrelerinde intrasitoplazmik ödem olduğu, endotel hücrelerinin hipertrofik olduğu, sinüzoidlerde çok belirgin dilatasyon ve hiyalinizasyon olduğu yer yer fibrotik alanların olduğu saptanmıştır. Böbrek dokusunda bazı glomerüllerde sklerotik değişiklikler, buna bağlı idrar boşluğunda çok yoğun dilatasyon ve hiyalinizasyon, distal tübüllerde tübül epitel hücrelerinin parçalandığı görülmüştür. Beyin dokusunda tüm nöronlarda Nissl cisimciği, kapillerlerde perikapiller ödem, aksonlarda intrasitoplazmik ödem ve apoptotik nöronlar saptanmıştır.

Çalışmamızın biyokimyasal ve histolojik bulgularına göre çinko; oksidatif stres yokluğunda karaciğer, böbrek ve beyin dokuları üzerine farklı etkilerde bulunmaktadır. Bunun nedeni çinkonun uygulama dozundan ve doku dağılımından kaynaklanıyor olabilir. Bizim sonuçlarımıza göre, kısa sürede çinko uygulamasının hem antioksidan hem de oksidan etkileri nedeniyle ve bu etkilerin dokudan dokuya değişebilmesinden dolayı çinko preparatlarının sağlıklı insanlarda daha dikkatli kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Agarwal R., Chase S.D., Rapid fluorimetric-liquid chromatographic determination of malonaldehyde in biological samples, *J. Chromatogr. B.*, 775:121-126, 2002.
2. Agget P.J., Aspects of neonatal metabolism of trace elements, *Acta Pediatr Suppl.*, 402:75-82, 1994.
3. Akkus I., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 13-19, 1995.
4. Alderman C., Shan S., Foreman J.C., Chain B.M., Katz D.R., The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function, *Free Radic. Biol. Med.*, 32:377-385, 2002.
5. Arcasoy A., Çinko ve Çinko Eksikliği, 2. Baskı, Ankara Talasemi Derneği Yayınları, İstanbul, 1-23, 2002.
6. Aschner M., The functional significance of brain, metallothionein, *FASEB J.*, 10:1129-1136, 1996.
7. Baltacı A.K., Sunar F., Mogulkoc R., Oztekin E., Effect of zinc deficiency and supplementation on lipid peroxidation of renal tissue in ovariectomized rats, *Biol. Trace Elem. Res.*, 101:231-239, 2004.
8. Barceloux D.G., Zinc, *Clin. Toxicol.*, 37:279-292, 1999.
9. Basaga H.S., Biochemical aspects of free radicals, *Biochem. Cell Biol.*, 68:989-998, 1990.
10. Beckman K.B., Ames B.N., The free radical theory of aging matures, *Physiol. Rev.*, 78:547-581, 1998.
11. Berlett B.S., Stadtman E.R., Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, 272:213-216, 1997.

12. Beyersmann D., Homeostasis and cellular functions of zinc, *Matt Wiss U. Werkstofftech*, 33:764-769, 2002.
13. Bird R.P., Draper H.H., Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination, *Methods Enzymol.*, 105:299-305, 1994.
14. Bishop G.M., Dringen R., Robinson S.R., Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes, *Free Radic. Biol. Med.*, 42:1222-1230, 2007
15. Bocardo P.S., Pandolfo P., Takahashi R.N., Rodriges A.L.S., Dafre A.L., Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride, *Toxicology*, 207:283-291, 2005.
16. Boyunağa H., Çelik C., Serbest radikaller ve hücresel denge, *Bilim Teknik Dergisi*, 347:98-100, 1996.
17. Bray T.M., Bettger W.J., The physiological role of zinc as an antioxidant, *Free Radic. Biol. Med.*, 8:281-291, 1990
18. Bremmer I., Beattie J.H., Metallothionein and trace minerals, *Annu. Rev. Nutr.*, 10:63-70, 1990
19. Brewer G.J., Yuzasiyan-Gurkan V., Lee D.-Y., Appleman H., Treatment of Wilson's disease with zinc, VI. Initial treatment studies, *J. Lab. Clin. Med.*, 114:633-638, 1989.
20. Cabre M., Folch J., Gimenez A., Matas C., Pares A., Caballeria J., Paternain J.L., Rodes J., Joven J., Camps J., Influence of zinc intake on hepatic lipid peroxidation and metallothioneins in alcoholic rats: Relationship to collagen synthesis, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 65:45-50, 1995.

21. Calesnick B., Dinan A.M., Zinc deficiency and zinc toxicity, *Am. Fam., Physician*, 37:267-270, 1988.
22. Capeillere-Blandin C., Gausson V., Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V., Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidation protein products, *Bioc. Bio. Acta.*, 1689:91-102, 2004.
23. Carbonneau M.A., Peuchant E., Sess D., Canioni P., Clerc M., Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma, *Clin. Chem.*, 37:1423-1429, 1991.
24. Castro, L., Freeman, B.A., Reactive oxygen species in human health and disease, *Nutrition*, 17:161-165, 2001.
25. Cheeseman K.H., Slater T.F., An introduction to free radical biochemistry, *Brit. Med. Bulletin*, 149:481-493, 1993.
26. Chen S., Schopfer P., Hydroxyl-radical production in physiological reactions a novel function of peroxidase, *Eur. J. Biochem.*, 260:726-735, 1999.
27. Cherian M.G., Nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver during development and tumor cells, *Birkhäuser Verlag*, 175-187, 1993.
28. Chirico S., High Performance liquid chromatography based thiobarbituric acid tests, *Methods Enzymol.*, 234:314-318, 1994.
29. Chiricolo M., Musa A.R., Monti D., Zannotti M., Franceschi C., Enhanced DNA repair in lymphocytes of Down's Syndrome patients: The influence of zinc nutritional supplementation, *Mutat. Res.*, 295:105-111, 1993.
30. Cochrane C.G., Cellular injury by oxidants, *Am. J. Med.*, 23-30, 1991.

31. Conte D., Narindrasorasak S., Sarkar B., In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage, *J. Biol. Chem.*, 271:5125-5130, 1996.
32. Cousins J.R., Absorbtion, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: Speacial reference to metallothionein and ceruloplasmin, *Phys. Rev.*, 65:238-309, 1985.
33. Cousins R.J., A role for zinc in the regulation of gene expression, *Proc. Nutr. Soc.*, 57:307-311, 1998.
34. Cousins R.J., Zinc, In: Ziegler E.E., Filer Jr. L.J., Present knowledge in nutrition, Washington DC ILSI Press, 293-306, 1996.
35. Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M., Metallothionein: The multipurpose protein, *Cell Mol. Life Sci.*, 59:627-647, 2002.
36. Coyle P., Philcox J.C., Rofe A.M., Metallothionein-null mice absorb less Zn from an egg-white diet, but a similar amount from solutions, although with altered intertissue Zn distribution, *J. Nutr.*, 129:372-379, 1999.
37. Coyle P., Philcox J.C., Rofe A.M., Zn-depleted mice absorb more of an intragastric Zn solution by a metallothionein-enhanced process than do Zn-replete mice, *J. Nutr.*, 130:835-842, 2000.
38. Çakatay U., Telci A., Kayalı R., Tekeli F., Akcay T., Sivas A., Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle, *Clin. Biochem.*, 36:51-55, 2003.
39. Daugherty A., Dunn J.L., Rateri D.L., Heinecke J.W., Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions, *J. Clin. Invest.*, 94:437-444, 1994.

40. Davies M.J., Singlet oxygen mediated damage to proteins and its consequences, *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, 305:761-770, 2003.
41. Davis C.D., Klevay L.M., Milne D.B., Nielsen F.H., Extracellular superoxide dismutase activity: A promising indicator of zinc status in humans, *FASEB J.*, 12:346, 1998.
42. Davis S.R., McMahon R.J., Cousins R.J., Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression, *J. Nutr.*, 128:825-831, 1998.
43. De Lisle R.C., Sarras M.P.Jr., Hidalgo J., Andrews G.K., Metallothionein is a component of exocrine pancreas secretion: Implications for zinc homeostasis, *Am. J. Physiol.*, 271:1103-1110, 1996.
44. De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E., Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radical Biology and Medicine*, 26:202-226, 1999.
45. Done-Duffy P., Peterson M., Catalanotto F., Zinc profiles in rheumatoid arthritis, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 8:541-546, 1990.
46. Dringen R., Pawlowski P.G., Hirrlinger J., Peroxide detoxification by brain cells, *J. Neurosci. Res.*, 79:157-165, 2005.
47. Erickson J.C., Hollopeter G., Thomas S.A., Froelick G.J., Palmiter R.D., Disruption of metallothionein-III gene in mice: Analysis of brain zinc, behavior and neuron vulnerability to metals, aging and seizures, *J. Neurosci.*, 17:1271-1281, 1997.
48. Esterbauer H., Cheeseman K.H., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde in biological samples, *J. Chromatogr. B.*, 775:121-126, 2002.

49. Etzel K.R., Shapiro S.G., Cousins R.J., Regulation of liver metallothionein and plasma zinc by the glucocorticoid dexamethasone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89:1120-1126, 1979.
50. Evans P., Halliwell B., Micronutrients: Oxidant/antioxidant status, *Br. J. Nutr.*, 85:67, 2001.
51. Evans P., Lyras L., Halliwell B., Measurement of protein carbonyls in human brain tissue, *Methods Enzymol.*, 300:145-156, 1999.
52. Fabris N., Mocchegiani E., Albertini G., *Psychoendocrine-immune interactions in Down's syndrome: Role of zinc*, Wiley, New York, 203-218, 1993.
53. Falchuk K., The molecular basis for the role of zinc in developmental biology, *Mol. Cell Biochem.*, 188:41-48, 1998.
54. Fang Y.Z., Yang S., Wu G., Free radicals, antioxidants and nutrition, *Nutrition*, 18:872-879, 2002.
55. Floyd R.A., DNA damage and repair in "Oxidative Damage and Repair", Davies K.J.A. Ed., Pergamon Press., 175-180, 1992.
56. Freidovich I., Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen?, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 893:13, 1999.
57. Fu H.W., Moomaw J.F., Moomaw C.R., Casey P.J., Identification of cysteine residue essential for activity of protein farnesyl transferase, Cys 299 is exposed only upon removal of zinc from the enzyme, *J. Biol. Chem.*, 271:2841-2848, 1996.
58. Fung E.B., Ritchie L.D., Woodhouse L.R., Zinc absorption in women during pregnancy and lactation: A longitudinal study, *Am. J. Clin. Nutr.*, 66:80-88, 1997.

59. Gibbs P.N.B., Gore M.G., Jordan P.M., Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in humans: Aminolevulinate dehydratase, *Biochem. J.*, 225:573-580, 1985.
60. Gilbert D.L., Fifty years of radical ideas, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 899:1, 2000.
61. Goel A., Dani V., Dhawan D.K., Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity, *Chemico-Biological Interactions*, 156:131-140, 2005.
62. Grüngreiff K., Zinc in liver disease, *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 15:67-78, 2002.
63. Gutteridge J.M., Halliwell B., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 1-276, 1991.
64. Gutteridge J.M., Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin. Chem.*, 41:1819-1828, 1995.
65. Habig W. H., Pabst M.J., Jakoby W.B., Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.*, 249:130-139, 1974.
66. Haddad J.J., Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316:969-977, 2004.
67. Halliwell B., Antioxidant characterization: Methodology and mechanism, *Biochemical Pharmacology*, 49:1341-1348, 1995.
68. Halliwell B., Gutteridge J.M., *Free Radical in Biology and Medicine*, Third ed., Oxford University Press, Oxford, 160-165, 2000.
69. Hamer D.H., Metallothionein review, *Annu. Rev. Biochem.*, 55:913-951, 1986.
70. Hausladen A., Stamler J.S., Nitrosative stress, *Methods in Enzymology*, 300:389-395, 1999.

71. Hawkins C.L., Davies M.J., Generation and propagation of radical reactions on proteins, *Biochem. Biophys. Acta*, 1504:196-219, 2001.
72. Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J., Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins, *Amino Acids*, 25:259-274, 2003.
73. Hempe J.M., Cousins R.J., Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: An inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats, *J. Nutr.*, 122:89-95, 1992.
74. Hesketh J.E., Zinc binding to tubulin, *Int. J. Biochem.*, 15:743-746, 1983.
75. Jacob R.A., Trace Elements in Textbook of Clinical Chemistry, (Tietz N. W. ed.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, 975-981, 1986.
76. Jankowski-Hennig M.A., Clegg M.S., Daston G.P., Rogers J.M., Keen C.L., Zinc-deficient rat embryos have increased caspase 3-like activity and apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271:250-256, 2000.
77. Jerry P., Liu L., Zeng M., Stamler J.S., An apoptotic model for nitrosative stress, *Biochemistry*, 39:1040-1047, 2000.
78. Jong M.K., Adham N.F., Heng M.C.Y., Costea N.V., Heng M.K., Trace element metabolic alterations of zinc and prostoglandins in both human and animal colonic tumor cells, *J. Am. Coll. Nutr.*, 14:473-479, 1995.
79. Kagi J.H.R., Evolution, structure and chemical activitiy of class I metallothioneins: An overview, *Metallothioneins III*, Birkhauser Verlag, Basel, 29-56, 1993.
80. Kaneda H., Taguchi J., Ogasawara K., Aizawa T., Ohno M., Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease, *Atherosclerosis*, 162:221-225, 2002.

81. Karbownik M., Lewinski A., Melatonin reduces fenton reaction-induced lipid peroxidation in porcine thyroid tissue, *Journal of Cellular Biochemistry*, 90:806-811, 2003.
82. Keen C.L., Gerswin M.E., Zinc deficiency and immune fuction, *Annu. Rev. Nutr.*, 10:415-431, 1990.
83. Kelly R.E., Mally M.I., Evans D.R., The dihydroorotase domain of the multifunctional protein CAD, *J. Biol. Chem.*, 261:673-683, 1986.
84. King J.C., Shames D.M., Lowe N.M., Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men, *Am. J. Clin. Res.*, 74:116-124, 2001.
85. King J.C., Shames D.M., Woodhouse L.R., Zinc homeostasis in humans, *J. Nutr.*, 130:1360-1366, 2000.
86. Kirchgessner M., Weigand E., Zinc absorption and excretion in relation to nutrition, *Metal Ions Biol. Syst.*, 15:319-61, 1983.
87. Klug A., Rhodes D., Zinc fingers: A novel protein motif for nucleic acid recognition, *TIBS*, 7:464-473, 1998.
88. Kondoh M., Imada N., Kamada K., Tsukahara R., Higashimoto M., Takiguchi M., Watanabe Y., Sato M., Property of metallothionein as a Zn pool differs depending on the induced condition of metallothionein, *Toxicol. Lett.*, 142:11-18, 2003
89. Kondoh M., Kamada K., Kuronaga M., Higashimoto M., Takiguchi M., Watanabe Y., Sato M., Antioksidant property of metallothionein in fasted mice, *Toxicol. Lett.*, 142,11-18, 2003.
90. Lai C.C., Huang W., Askari A., Wang Y., Differential regulation of superoxide dismutase in copper deficient rat organs, *Free Radic. Biol. Med.*, 16:613-620, 1994.

91. Liebert J., Matlawska I., Bylka W., Murias M., Protective effect of *aquilegia vulgaris* on APAP induced oxidative stress in rats, *J. Ethnopharm.*, 97:351-358, 2005.
92. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurements with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
93. Lönnerdal B., Zinc in Human Biology, Springer-Verlag, London, 33-55, 1989.
94. Mahbooba M., Siddiqui M.K.J., Long-term effects of a novel phosphorothionate (RPR-II) on detoxifying enzymes in brain, lung and kidney rats, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53:355–360, 2002.
95. Maher P., Schubert D., Signaling by reactive oxygen species in the nervous system, *Cell. Mol. Life Sci.*, 57:1287-1305, 2000.
96. Maret W. Valle B., Thiolate ligands in metallothionein confer redox-activity of zinc clusters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:3478-3482, 1998.
97. Maret W., The function of zinc metallothionein: A link between cellular and redox state, *J. Nutr.*, 130:1455-1458, 2000.
98. Mayer B., Hemmens B., Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells, *TIBS*, 22:477-481, 1997.
99. McMahon R.J., Cousins R.J., Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4841-4846, 1998.
100. Meister A., Glutathione, ascorbate and cellular protection, *Cancer Res. Suppl.*, 954:1969-1975, 1994.
101. Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J., Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, 17:235-248, 1994.

102. Miller L.V., Hanbrige K.M., Naake V.L., Hong Z., Wescott J.L., Fennesey P.V., Size of the zinc pools that exchange rapidly with plasma zinc in humans: Alternative technologies for measuring and relation to dietary zinc intake, *J. Nutr.*, 124:268-276, 1994.
103. Mocchegiani E., Muzzioli M., Giacconi R., Zinc and immunoresistance to infections in aging: New biological tools, *Trends. Pharmacol. Sci.*, 21:205-208, 2000.
104. Mocchegiani E., Santarelli L., Tibaldi A., Muzzioli M., Bulian D., Cipriano K., Olivieri F., Fabris N., Presence of links between zinc and melatonin during the circadian cycle in old mice: Effects on thymic endocrine activity and on the survival, *J. Neuroimmunol.*, 86:111-122, 1998.
105. Nair N., Bedwal S., Prasad S., Saini M.R., Bedwal R.S., Short term zinc deficiency in diet induces increased oxidative stress in testes and epididymes of rats, *Indian J. Exp. Biol.*, 43:786-794, 2005.
106. Oberlas D., Mechanism of zinc homeostasis, *J. Inorg. Biochem.*, 62:231-41, 1996.
107. Onosaka S., Tetsuchikawahara N., Min K., Paradigm shift in zinc: Metal pathology, *Tohoku J. Exp. Med.*, 196:1-7, 2002.
108. Paglia D.E., Valentina W.N., Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, 70:158-169, 1967.
109. Palmiter R.D., The elusive functions of metallothioneins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8230-8248, 1998.
110. Pathak M., Mahmood A., Pathak R., Dhawan D., Effect of zinc on hepatic lipid peroxidation and antioxidative enzymes in ethanol-fed rats, *J. Appl. Toxicol.*, 22:207-210, 2002.

111. Piao F., Yokovama K., Ma N., Yamauchi T., Subacute toxic effects of zinc on various tissues and organs of rats, *Toxicol. Lett.*, 145:28-35, 2003.
112. Pieper G.M., Siebeneich W., More-Hilton M., Roza A.M., Reversal by L-Arginin of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic rat, *Diabetologia*, 40:910-915, 1997.
113. Pilz J., Meineke I., Gleiter C.H., Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4 dinitrophenylhydrazine derivative, *J. Chromatogr. B.*, 742:315-325, 2000.
114. Pouda M., Traber M.G., Weber C., Yan L.J., Pakcer L., UV-irradiation deplets antioxidants and causes, damage in a model human skin, *Free Radic. Biol. Med.*, 92:5259-5265, 1998.
115. Powell S.R., Gurzenda E.M., Wingertzohan M.A., Wapnir R.A., Promotion of copper excretion from the isolated perfused rat heart attenuates post ischemic cardiac oxidative injury, *Am. J. Physiol.*, 277:956-962, 1999.
116. Powell S.R., The antioxidant properties of zinc, *J. Nutr.*, 130:1447-1454, 2000.
117. Powers S.K., Leeuwenburgh C., Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity, *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 31:987-997, 1999.
118. Prasad A.S., Bao B., Beck F.W., Kucuk O., Sarkar F.H., Antioxidant effect of zinc in humans, *Free Radical Biology and Medicine*, 37:1182-1190, 2004.
119. Prasad A.S., Zinc in human health: An update, *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 11:63-87, 1998.
120. Prasad A.S., Zinc: An Overview, *Nutrition*, 11:93-99, 1995.
121. Reeves P.G., Adaptation responses in rat to long-term feeding of high zinc diet: emphasis on intestinal metallothionein, *J. Nutr. Biochem.*, 6:48-54, 1995.

122. Reznick A.Z., Packer L., Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol.*, 233:357-363, 1994.
123. Riley M.V., A role for glutathione and glutathione reductase in control of corneal hydration, *Exp. Eye Res.*, 39:751-758, 1984.
124. Rofo A.M., Winters N., Hinskens B., Philcox J.C., Coyle P., The role of the pancreas in intestinal zinc secretion in metallothionein-null mice, *Pancreas*, 19:69-75, 1999.
125. Rojas L.X., McDowell L.R., Cousins R.J., Martin F.G., Wilkinson N.S., Johnson A.B., Velazquez J.B., Relative bioavailability of two organic and two inorganic zinc fed to shepp, *J. Anim. Sci.*, 73:1202-1207, 1995.
126. Rostan E. F., Debuys H.V., Madey D.L., Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin, *Int. J. Dermatol.*, 4:606-611, 2002.
127. Saner G., Mikroelementler (Çinko), *Pediatrici (Neyzi O., Ertuğrul T)*, 1. cilt, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2002.
128. Sato M., Biological antioxidant defence system and metallothionein, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 38:228-239, 1992.
129. Sato M., Kondoh M., Recent studies on metallothionein: Protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals, *Tohoku J. Exp. Med.*, 96:9-22, 2002.
130. Sato M., Sasaki M., Hojo H., Induction of metallothionein synthesis by oxidative stress and possible role in acute phase response, *Birkhäuser Verlag*, 125-140, 1993.
131. SCF, Opinion of the scientific committee on food on the tolerable upper intake level of zinc, *European Commission*, 2003.
132. Scortegagna M., Galdzicki Z., Rapoport S.I., Hanbauer I., In cortical cultures of trisomy 16 mouse brain the up-regulated metallothionein-I/II fails to respond to H₂O₂ exposure or glutamate receptor stimulation, *Brain Res.*, 787:292-298, 1998.

133. Shacter E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, *Drug Met. Rev.*, 32:307-326, 2000.
134. Shidhu P., Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats, *Chemico-Biological Interactions*, 150:199-209, 2004.
135. Sies H., Oxidative stress: from basic research to clinical application, *Am. J. Med.*, 91:31-38, 1991.
136. Splettstoesser W.D., Werner S.P., Oxidative stress in phagocytes 'The Enemy Within', *Microscopy Research And Technique*, 57:441-455, 2002.
137. Stefanidou M., Maravelias C., Metallothioneins in toxicology, *Curr. Top. Toxicol.*, 2005.
138. Summer K.H., Klein D., De Ruiter N., Abel J., Metallothionein induction by nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Biol. Trace Elem. Res.*, 21:165-169, 1989.
139. Svhröder J.J., Cousins R.J., Interleukin-6 regulates metallothionein gene expression and zinc in hepatocyte monolayer cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3137-3141, 1990.
140. Tapiero H, Tew K.D., Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins, *Biomed. Pharmacother.*, 57:399-411, 2003.
141. Taylor C.M., Bazon J.R., Agget P.J., Homeostatic regulation of zinc absorption and endogenous losses in zinc-deprived men, *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:755-763, 1991.
142. Taylor J.A., Simons T.J.B., The Mechanism of zinc uptake by cultured rat liver cells, *J. Physiol.*, 474:55-64, 1994.
143. Tibaduiza E.C., Bobilya D.J., Zinc transport across and endothelium includes vesicular cotransport with albumin, *J. Cell Physiol.*, 167:539-547, 1996.

144. Tsujikawa K., Suzuki N., Sagawa K., Induction and subcellular localization of metallothionein in regenerating rat liver, *Eur. J. Cell Biol.*, 63:240-246, 1994.
145. Uchida K., 4-Hydroxy-2-Nonenal: A product and mediator of oxidative stress, *Progr. Lip. Res.*, 569:1-26, 2003.
146. Uchida K., Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases, *Free Radical Biology and Medicine*, 28:1685-1696, 2000.
147. Vasak M., Hasler D.W., Metallothioneins: New functional and structural insights, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:177-183, 2000.
148. Vasak M., Kagi J.H.R., Metallothioneins, Vol.4, New York, Wiley, 2229-2241, 1994.
149. Wastney M.E., Amodt R.L., Rumble W.F., Henkin R.I., Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans, *Am. J. Physiol.*, 251:398-408, 1986.
150. West A.K., Stallings R., Hildebrand C.E., Chiu R., Karin M., Richards R.I., Human metallothionein genes; structure of the functional locus at 16q13, *Genomics*, 8:513-518, 1990.
151. Winterbourn C.C., Kettle A.J., Biomarkers of myeloperoxidase derived hypochlorous acid, *Free Radical Biology and Medicine*, 29:403-409, 2000.
152. Witko-Sarsat V., Descamps-Latscha B., Advanced oxidation protein products: novel uraemic toxins and pro-inflammatory mediators in chronic renal failure?, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 12:1310-1312, 1997.
153. Witko-Sarsat V., Gausson V., Descamps-Latscha B., Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins, *Kidney Int.*, 63:11-14, 2003.

154. Witko-Sarsat V., Nguyen-Khoa T., Jungers P., Drueke T., Descamps-Latscha B.,
Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in
uremia, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 14:76-78, 1999.
155. Yi-Sun S., Oberly L.W., Li Y., A simple method for clinical assay of superoxide
dismutase, *Clin. Chem.*, 34:497-500, 1988.
156. Zhou Z., Sun X., Lambert J.S., Saari J.T., Kang J.Y., Metallothionein-independent
zinc protection from alcoholic liver injury, *Am. J. Pathol.*, 160:2267-2274, 2002.