T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS)

DİYET İLE ALINAN ÇİNKONUN METALLOTHIONEIN SEVİYESİNE ETKİSİ

NURAL PASTACI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. DERVİŞ ÖZÇELİK

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

27 / 07 /2010

Prof.Dr.Tamer Demiralp
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Biyofizik Programı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans (*) Doktora ( )
Anabilim Dalı : Biyofizik Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Nural Pastacı
Tez Başlığı : Diyet ile Alınan Çinkonun Metallothionein Seviyesine Etkisi
Sınav Yeri : İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 13.05.2010

Tez Sınav Jürisi

1. Prof. Dr. Şefik Dursun, İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., Biyofizik ABD.
2. Prof. Dr. Selmin Toplan, İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., Biyofizik ABD.
3. Prof. Dr. Bora Barutçu, İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., Biyofizik ABD.
4. Doç. Dr. Işıl Albeniz, İstanbul Üniv., İstanbul Tıp Fak., Biyofizik ABD.
5. Doç. Dr. Derviş Özçelik, İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., Biyofizik ABD (Danışman).

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nural Pastacı



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başlangıcından itibaren yaptığım deneysel ve teorik çalışmalarımda bana yön veren ve her zaman deneyimleri ile beni bilgilendiren Sayın Hocam Doç. Dr. Derviş ÖZÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni destekleyen başta Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Şefik DURSUN'a, öğretim üyeleri ve yardımcıları ile tüm çalışanlarına;

Deney çalışmalarımda bilgi ve deneyimleriyle yardımcı olan Sayın Dr. Matem TUNÇDEMİR ve Dr. Mustafa ASLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Destekleriyle bana her zaman güç veren aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3325

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER V
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... İX
ÖZET X
ABSTRACT ..... Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Çinko 4
2.1.1. Doğada ve Organizmada Çinko 4
2.1.2. Çinko Absorbsiyonu ve Homeostazı 5
2.1.3. Çinkonun Biyolojik Önemi 9
2.2. Metallothionein 12
2.2.1. Metallothionein Proteininin Özellikleri ve Yapısı 12
2.2.2. Metallothionein Ekspresyonunu ve Regülasyonu 14
2.2.3. Metaller ve Metallothionein Etkileşimi 17
2.2.4. Metallothionein'in Biyolojik Önemi 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24
3.1. Kit ve Kimyasallar 24
3.2. Cihazlar 24
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması 25
3.4. Örneklerin Alınması 25
3.5. Örneklerin Deney için Hazırlanması 25
3.5.1. Doku homojenizasyonu 25
3.5.2. Doku yaş yakma 26
3.6. Yapılan Analizler 26
3.6.1. Dokulardaki Zn-MT ve MT miktarlarının belirlenmesi 26

3.6.2. Dokulardaki Zn miktarlarının belirlenmesi.....27
3.7. İstatiksel Analiz 27
4. BULGULAR.....28
4.1. Dokulardaki Zn konsantrasyonları.....28
4.2. Dokulardaki MT konsantrasyonları 32
4.3. Dokulardaki Zn-MT konsantrasyonları 36
5. TARTIŞMA 40
KAYNAKLAR 45
ETİK KURUL KARARI 52
ÖZGEÇMİŞ 53

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Kontrol ve deney gruplarının serumlarında ölçülen Zn konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD). 29
Tablo 4-2: Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokularında ölçülen Zn konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)..... 30
Tablo 4-3: Kontrol ve deney gruplarının böbrek dokularında ölçülen Zn konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)..... 31
Tablo 4-4: Kontrol ve deney gruplarının serumlarında ölçülen MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD). 33
Tablo 4-5: Kontrol ve deney grubunun karaciğer dokularında ölçülen MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)..... 34
Tablo 4-6: Kontrol ve deney gruplarının böbrek dokularında ölçülen MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)..... 35
Tablo 4-7: Kontrol ve deney gruplarının serumlarında ölçülen Zn-MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)..... 37
Tablo 4-8: Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokularında ölçülen Zn-MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)..... 38
Tablo 4-9: Kontrol ve deney gruplarının böbrek dokularında ölçülen Zn-MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)..... 39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Memeli hücrelerinde Zn homeostazı (32). 8
Şekil 2-2: Zn bağlı metallothionein proteini (40). 13
Şekil 2-3: MT gen regülasyonu (2). 15
Şekil 2-4: Zn homeostatik mekanizmasında Apo-MT/MT çifti (8). 18
Şekil 2-5: MT'in antioksidan etkisinin oluşum şeması (18). 22
Şekil 4-1: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun serumlarındaki Zn konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. 29
Şekil 4-2: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun karaciğer dokularındaki Zn konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. 30
Şekil 4-3: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun böbrek dokularındaki Zn konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. 31
Şekil 4-4: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun serum MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. 33
Şekil 4-5: Zn katkılı içme suyu verilen II. grup ile kontrol grubunun ortalama karaciğer MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. 34
Şekil 4-6: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun böbrek MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. 35
Şekil 4-7: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun serum Zn-MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. 37
Şekil 4-8: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun karaciğer Zn-MT konsantrasyonlarının konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. 38
Şekil 4-9: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun böbrek Zn-MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. 39

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ELISA: Enzim İlintili İmmün Test (Enzyme-linked immunosorbent assay)

MT: Metallothionein (Metallotiyonin)

Apo-MT: Metal bağlanmamış metallothionein

Zn-MT: Çinko bağlanmış metallothionein

MTF-1:Metal transkripsiyon faktör 1

DMT1: İki değerlikli metak taşıyıcısı

ZnT: Zn taşıyıcı protein

ZIP: Taşıyıcı protein (Zinc-Iron releated transporter Protein)

SOD: Superoksit dismutaz

ROS: Reaktif oksijen partikülleri

GSSH: Okside glutatyon

GSH: İndirgenmiş Glutatyon

MRE: Metal response element

ARE: Antioxidant response element

STAT: Signal transducers and activasors of trascription

GRE: Glucocorticoid response element

EDTA: Etilenediamintetra asetik asit

NMR: Nükleer manyetik rezonans

ÖZET

Pastacı N. Diyet ile Alınan Çinkonun Metallothionein Seviyesine Etkisi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. İstanbul 2010.

Çinko (Zn) organizma için temel bir elementtir. Yüzlerce enzimin ve çok sayıda proteinin temel yapısında bulunur. Bu sebeple Zn organizmaların gelişme ve büyümesinde, genetik mesajların taşınmasında kritik öneme sahiptir. Metallothionein (MT) ağır metallerin detoksifikasyonunda, oksidatif hasara karşı hücrenin korunmasında, membran stabilizasyonunda ve Zn ile Cu'ın homeostatik metabolizmasında önem taşımaktadır. Farklı izoformları bulunan MT, Zn'nun dokularda depolanması ve homeostazını sürdürmesinde önemli etkiye sahip olan bir proteindir. Hücresel MT'in dönüşüm hızı ve akümülasyonu, intrasellüler ortamdaki Zn ile ilişkilidir. Bu çalışmada, Zn'ya maruz bırakılan sıçanların dokularında biriken Zn konsantrasyonu ve buna bağlı olarak dokularında oluşan MT ve Zn-MT seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamız biri kontrol, ikisi deney grubu (I ve II) olmak üzere yetişkin erkek Wistar-Albino sıçanlardan (n=24) oluşturulan gruplarda yürütüldü. Deney süresince bütün gruplar standart yem ile beslenirken içme suyu olarak kontrol gurubuna deiyonize su, I. ve II. gruplara içerisinde sırasıyla 100 mg/l ve 200 mg/l Zn bulunan su verildi. Deney süresi sonunda sıçanlardan alınan serum, karaciğer ve böbrek örneklerinde Zn konsantrasyonu atomik absorbsiyon spektrofotometresiyle, MT ve Zn-MT konsantrasyonları ELISA yöntemiyle ölçüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmelere göre; deney gruplarının serum Zn, MT ve Zn-MT değerlerindeki artış anlamlı ($p<0.05$) görüldü. I. grubun karaciğer ve böbrek dokusu Zn, MT ve Zn-MT değerlerinde kontrollere göre anlamlı bir artış olmamasına rağmen II. grup karaciğer ve böbrek dokularının Zn konsantrasyonlarında ($p<0.05$), MT değerlerinde (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.05$) ve Zn-MT için (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$) anlamlı artış bulundu. Araştırmamızın sonuçlarına göre belirli bir seviyede alınan Zn'nun dokuların MT ve Zn-MT düzeyinde anlamlı olarak etkili olabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Çinko, Metallothionein, Sıçan, Karaciğer, Böbrek

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. **Proje No: 3325**

ABSTRACT

Pastaci N. The Effect of Dietary Zinc to Metallothionein Level. İstanbul University, Institute of Health Science, Cerrahpasa Medikal Faculty, Department of Biophysics, Master Thesis. Istanbul 2010.

Zinc (Zn) is the basic element for all organisms. Zinc is present in hundreds of enzymes and thousands of protein domains. So zinc is essential for growth and development organism, transporting of genetic messages. Metallothionein (MT) is important for detoxification of heavy metals, protection from oxidative stress agents, stabilization of membran, homeostatic mechanism of Cu and Zn. MT has an important role to storage and provide zinc homeostasis. MT level is related to intracellular Zn. We aimed to investigate the relation between accumulated Zn, MT and Zn-MT levels in rat tissues which are exposed to Zn.

We seperated Wistar Albino rats in to three groups. One of them was control and the others are experimental (I and II). The controls drank distilated water but the experimental groups' drinks required 100 mg/l and 200 mg/l Zn respectively. At the end of the experiment we took tissue samples from rats.Zn concentrations measured with atomic absorbtion spectrometer, MT and Zn-MT measured by ELISA. According to statistical evaluated results increments of the serum's Zn, MT and Zn-MT levels seen significantly ($p<0.05$). Although there aren't any significant increments between I. and control groups' Zn, MT Zn-MT levels at liver and kidney tissues, at II. group's liver and kidney tissues the significant increments for Zn ($p<0.05$), for MT (respectively $p<0.01$, $p<0.05$) and for Zn-MT (respectively $p<0.05$, $p<0.01$) are found. As a result of our investigation it is seen that taking certain levels of Zn could effect MT and Zn-MT levels significantly at different tissues.

Key Words: Zinc, Metallothionein, Rat, Liver, Kidney

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. **3325**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çinko organizma için temel bir elementtir. Çok sayıda enzim ve proteinin temel yapısında olup, bunların katalitik ve düzenleyici fonksiyonları için gereklidir (1,2). Bundan dolayı çinko organizmaların gelişme ve büyümesinde, genetik mesajların taşınmasında kritik öneme sahip olan esansiyel bir elementtir. Bu elementin eksikliği insanlarda ve laboratuar hayvanlarında embriyonik ve fetal gelişme (3), immun sistem (4), görme, tat alma ve diğer beyin fonksiyonları (5, 6,7) gibi pek çok temel biyolojik işlemleri olumsuz etkilediği bilinmektedir. Zn eksikliğinin bu farklı etkileri bu metalin pek çok sayıda proteinlerin fonksiyonu ve yapısı için önemli olduğunu gösterir. Ayrıca çinkonun superoksit dismutaz (SOD)'ın esansiyel komponenti olması, tioller için koruyucu ajan olması ve kimyasal grupların demir ile birleşerek serbest radikal oluşumuna engel olması ile koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir (8). Bütün organizmalar, çinkonun emilimini, atılımını ve depolanmasını regüle etmek için uygun mekanizmalara sahiptir ve birçok memelide bu işlemleri sürdüren genler ve proteinler tanımlanmıştır (9,10,11).

Metallothionein (MT) Zn bağlayan bir protein olup, alınan Zn'nun dağılımı, depolanması ve salınımında önemli regülatör göreve sahiptir (12,13,14). MT'lerin fizyolojik rolleri tam olarak anlaşılmamakla birlikte, ağır metallerin detoksifikasyonunda, oksidatif hasara karşı hücrenin korunmasında, membran stabilizasyonunda ve Zn ile Cu'ın absorbsiyon ve homeostatik metabolizmasında önemli olduğu ileri sürülmektedir. MT yüksek sistein içeriği ile karakterize Zn, Cd ve Cu gibi metal iyonlarına ilgisi olan düşük mol ağırlıklı bir proteindir. Her bir MT molekülü yedi çinko atomu bağlayabilen, 60-68 aminoasit içeren intraselüler proteindir. Memeli dokuları MT-1'den MT-4'e kadar MT'in dört major fraksiyonunu içerirler. Bunlardan MT-1 ve MT-2 izoformları en çok eksprese edilen form olmakla birlikte metaller, ilaçlar ve inflamatuvar ajanlar tarafından özellikle karaciğerde olmak üzere dokularda üretimi arttırılmaktadır. MT-1 ve MT-2 izoformları Zn homeostazının sürdürülmesinde önem taşımaktadır. MT bir yandan ortamdaki çinkoyu bağlayarak Zn-MT oluşturup hücreyi yüksek çinko seviyesinden korur, diğer yandan da çinko

eksikliğinde bağlı bulunan çinkoyu serbestleştirerek apo-MT (thionein) haline dönüşür (2,8,13,14).

MT indüksiyonu Cd, Hg, Co gibi toksik metallerle, Zn, Cu gibi esansiyel elementlerle, hormonlarla, sitotoksik ve inflamatuvar ajanlarla, kimyasal ve fiziksel stres ortamlarında geçekleşmektedir. Bazal MT seviyesi yaş, doku tipi, beslenme ve fizyolojik faktörlere göre değişiklik gösterir. Fetüs ve yeni doğanda MT daha çok çekirdekte lokalize olurken, yetişkin hücrelerinde sitoplazmada bulunmaktadır. Non-steroidal inflamasyon ilaçları karaciğerde MT seviyesini arttırır. Ayrıca MT'in insan derisini ultraviyole ışınların oluşturduğu hasara karşı koruduğu gözlemlenmiştir (8,13).

Multifonksiyonel özellikleri olan MT Zn bakımından en az iki fonksiyona sahiptir; birincisi çinkoyu bağlama, ikinci olarak gerekliliğinde çinkoyu serbestleştirmesi özelliğidir. Serbest Zn seviyesi arttığı zamanda hücre MT'in sentezini artırarak cevap verir. İki taraflı olarak eğer Zn seviyesi azalırsa MT sentezi ve MT kararlı dengesi bozulur (15,16,83). Ayrıca, MT gen ekspresyonu metal transkripsiyon faktör (MTF-I) ile regüle edilir. Zn'ya maruz kalan hücrelerde rölatif olarak bol miktarda MT birikir (17).

Metaller ile MT biyosentezinin regülasyonu, esansiyel ve non-esansiyel serbest metal iyonlarının homeostatik konsantrasyonlarını sürdürmek için bir biyolojik araç gibi düşünülmektedir. Bu yüzden hücresel MT'in dönüşüm hızı ve akümülasyonu intrasellüler ortamdan Zn'nun elde edilmesi ile bağlantılıdır (8).

Gen baskılanması ve aktivasyonunun düzensizliği yüksek oranda memeli hastalıklarıyla ilişkilidir ve birçok transkripsiyon faktörü çinko parmak (zinc-finger) protein ailesinin bir parçasıdır (13,14). MT, oksidatif hasara karşı etkili savunma sistemlerinden birinin anahtar proteinidir. MT'in antioksidan etkisi çok yönlüdür ve hücresel lokalizasyon, metal içeriği, oluşan reaktif oksijenin türü ya da oksidatif stresin kaynağı (sitokin, metal, ilaç) gibi faktörlere bağlıdır (18).

Nörodejeneratif ve yaşlılık gibi patolojik bozuklukta metal metabolizmasının bozulduğu ve radikaller oluştuğu için MT ekspresyonunun beyin hasarına karşı koruyuculuk özellikleri ile savunma sisteminin bir parçası olduğu belirtilmektedir. Ayrıca proteinin reaktif oksijen moleküllerinden koruma, radyasyon hasarına karşı koruyucu etkisi ve antiapoptotik etkileri ile kanser araştırmalarında da yer bulduğu

söylenmektedir (13,14). MT'in bu tür koruyucu etkisi bizzat kendisi ya da onun modüle ettiği diğer hücresel faktörler aracılığı ile gerçekleşebilmektedir (19).

MT'in oluşumu ve önemi üzerindeki çalışmalar, MT'i indüklediği bilinen kimyasallara ya da metallere maruz bırakılan hayvanlar üzerinde yürütülmektedir. Tez çalışmamızda, farklı dozlarda Zn'ya maruz bırakılan sıçanların dokularındaki Zn konsantrasyonu ve alınan Zn miktarı ile total MT ve Zn-MT konsantrasyonları arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çinko

Çinko insan vücudunda en çok bulunan ve biyolojik fonksiyonlarda önemli olan bir eser elementtir. Yüzlerce enzimin ve binlerce proteinin bileşiminde Zn tespit edilmiştir. Zn'nun biyolojik önemi; bu protein ve enzimlerin moleküler yapısında, fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve yıkımında önemli rol oynamasındandır. Zn, protein sentezi, nükleik asit metabolizması ve hücrenin büyüme, proliferasyon, farklılaşma ve ölümüne katkısı ile hücresel bütünlük içinde kritik bir rol oynamaktadır. Böylece, Zn bağımlı biyolojik işlevlerin ve etkileşimlerin bu elementin diyetsel alımı ile de ilişkili olacağı açıktır.

2.1.1. Doğada ve Organizmada Çinko

Çinko yer kabuğunda en çok bulunan elementler arasındadır. Çinkonun atom numarası 30 ve atomik ağırlığı 65,4 g/mol'dür. Doğada ve maden yataklarında genellikle klor, oksijen ve kükürt ile birleşerek $ZnCl_2$, ZnO, ZnS, $ZnSO_4$ gibi çinko bileşikleri halinde bulunur. Metalik çinko iyi bir indirgeyici ajandır ve bileşiklerinde +2 değerlik alır.

İnorganik element olarak çinko belli bir çevrimin içinde doğada yer alır. Bu çevrim en basit şekliyle, toprak-su-bitkiler-canlılar şeklinde ifade edilebilir (20,21).

Çinkonun biyolojik mekanizmalardaki önemi, 1869 senesinde Pasteur'un öğrencisi Raulin'in mikroorganizmaların gelişiminde Zn'nun gerekli olduğunun farkına varmasıyla anlaşılmıştır. 1919'da Birckner yumurtada, insan ve inek sütünde bulunan çinkonun beslenmede büyük bir öneme sahip olduğunu belirtmiştir. Çinkonun mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar için esansiyel olduğu yıllarca bilinmekle birlikte Zn eksikliği ancak 1961 yılında Prasad tarafından ilk kez belirtilmiştir. Prasad 1958 yılında cücelik, hipogonadizm, hepatosplenomegali, kuru cilt, jeofaji ve demir eksikliği anemisi ile gelen 21 yaşında İranlı bir hastada Zn eksikliğini tanımlamıştır (20).

Organizmaya Zn alımı genellikle yiyecek ve içecekler yoluyla olmaktadır. Çeşitli faktörler Zn emilimini anlamlı şekilde değiştirmektedir. Bunlar; diyetteki Zn

konsantrasyonu, diyetteki emilimi arttıran veya azaltan maddeler, emzirme ve erken gebelik faktörlerdir. Alınan gıdalar Zn bakımından farklı konsantrasyonlara sahiplerdir. Genel olarak, dünya çapında tahıl ve bakliyat ürünleri çoğu insan için temel Zn kaynağı sayılmaktadır (22).

Diyet ile alınan Zn'nun yaklaşık %50'si etlerden, %20'si süt ürünlerinden, %30'u da tahıl ve bakliyat ürünlerinden sağlanmaktadır. Kırmızı et Zn bakımından en zengin besindir, fakat tavuk ve balık etleri daha az miktarda Zn içermektedir. Bu sebeple kırmızı etten yoksun bir beslenme Zn ve demir (Fe) eksikliğine sebep olmaktadır (1,21,16,23). Deniz hayvanları da çinko açısından oldukça yüksek konsantrasyonlara sahiplerdir, istiridye bunların içinde en yüksek konsantrasyona sahip olanıdır (20,21).

Günlük Zn alımı çeşitli ülkelere göre 5.2 ile 16.2 mg arasında değişmektedir. Vücut için gerekli günlük Zn miktarı cinsiyet, yaş ve metabolik ihtiyaca göre değişiklik göstermektedir. Sağlıklı yetişkin bir bireyde idrar, gaita ve ter yoluyla olan kayıplar göz önüne alındığında tavsiye edilen günlük miktar bayanlar için 8mg/gün iken erkeklerde 11mg/gün olarak tespit edilmiştir. 7 aylıktan 3 yaşa kadar 3mg/gün, 3-8 yaş arası 8mg/gün hamilelikte, 13mg/gün değerine çıkarken, laktasyon süresince günlük ihtiyaç 12-14mg/gün seviyesine çıkmaktadır. Vejetaryenlerde bu değer %50 artmaktadır. Zn biyolojik yarı ömrü ortalama 280 gündür. Yetişkinlerde tolere edilebilir maksimun alım 40mg/gün kadardır (1,16, 21).

2.1.2. Çinko Absorbsiyonu ve Homeostazı

İnsan vücudunda Zn homeostazını sürdürmenin birincil yolu gastrointestinal sistemden emilim ve sekresyonunun düzenlenmesidir. Zn homeostazı öncelikle gastrointestinal sistem mukozasını kapsayan epitel hücreleri tarafından düzenlenir. Zn'nun hücresel alımı ve intraselüler sıvıda dağılımı hassas bir süreçtir (8, 16, 24). Diyet ile alınan Zn'nun ancak % 15-30 kadarı absorbe edilir (25, 26). Zn absorbsiyonu, onikiparmak barsağı başta olmak üzere tüm ince barsakta olmaktadır. Diyetteki Zn, afinitesi farklı olan nükleotid ve peptidleri de içeren çeşitli moleküllere bağlı olarak barsak hücrelerinde bulunur. İntralüminal geçiş Zn'nun serbest iyonlar olarak barsak hücreleri arasından taşınması şeklindedir (8,10).

Çinkonun biyoyararlılığına sadece diyette bulunan Zn miktarı değil aynı zamanda diyetle alınan Zn bağlayıcı ajanların da etkili oldukları belirtilmiştir (8,16,25). Bazı besinsel takviyeler dokularda Zn absorbsiyonunu arttırmaktadır. Çözünebilir düşük moleküler ağırlıklı organik maddeler Zn emilimini kolaylaştırırlar. Emilimi kolaylaştıranlar arasında histidin, methionin gibi aminoasitler de vardır. Sitrat ve EDTA gibi bileşiklerin de Zn'nun absorbsiyon promotörleri olarak düşünülmektedir. (27).

Zn ile kararlı bileşik oluşturan organik maddeler ise absorbsiyonunu engellerler. Mısır, tahıl, pirinç ve baklagillerde bulunan fitat (inositol fosfat) gibi sindirilemeyen ligandların çinkonun biyoyararlılığını inhibe ettiği belirtilmektedir. Çinko iyonları, çözünemeyen kompleks bileşikleri ile atılır (27,28).

Genel olarak besinlerdeki protein miktarı ve Zn biyoyararlanımı pozitif korelasyon gösterir. Fakat sütte bulunan kazein ve soya proteini Zn absorbsiyonunu baskılayıcı etki gösterdiği rapor edilmiştir (29).

Gastrointestinal yoldan Zn emilimi aynı zamanda yiyeceklerdeki diğer elementler ile de etkilenebilmektedir. Diyetteki Fe miktarının artması Zn emilimini anlamlı bir şekilde azaltmaktadır. Zn ile Fe arasında böyle bir antogonizmin moleküler mekanizması barsaktaki iki değerlikli metal taşıyıcısına (DMT1) yarışmalı tek bir bölgeye sahip olması ile açıklanmaktadır. (30).

Çinko ile benzer fizikokimyasal etkiler gösteren kadmiyumunda (Cd) Zn absorbsiyonunu etkilediği bilinmektedir. Ayrıca bir esansiyel element olan bakırın (Cu) Zn absorbsiyonu üzerinde düşük dozlarda bir etkisi olmamasına rağmen yüksek dozlarda Zn'nun Cu absorbsiyonu ile etkileşim gösterdiği bilinmektedir. (16).

Diyet ile alınan kalsiyumun (Ca) Zn absorbsiyonu üzerine etkisi tartışmalı olup bir kısım araştırmalar Zn absorbsiyonunda Ca'un inhibitor etkisi olduğunu, bir diğer araştırmalar ise pozitif etki gösterdiğini ileri sürmektedirler (29,31).

Bunların dışında D vitamini, B6 vitamini, prostoglandin ve D-penisilamin Zn emilimini artırırken; kalay, oksalat, fosfatlar ve toprak emilimini engelleyebilir (1,8,16,25,26).

Plazmada bulunan total Zn'nun yaklaşık %60'ı albümine ve %10'u transferrine düşük afinite ile %30'u ise α_2-makroglobulin'e sıkı bir şekilde bağlıdır. Plazmada albümin ve Zn düzeyleri arasında bir uyum vardır. Albümin düzeyi düştüğünde Zn düzeyinde de azalma olur (Şekil 2-1). Zn, sistein ve histidinle de bağlanabilmektedir, transferinin de plazmada Zn taşıdığı bilinmektedir (8,16).

Öte yandan Zn homeostazında karaciğer de kritik öneme sahiptir ve Zn'nun metabolizmada etkili birçok enzimin yapısına katılmasını sağlar (16) ve Zn'nun dokulara ulaşması ile dokular normal fonksiyonlarını gerçekleştirebilir (8).

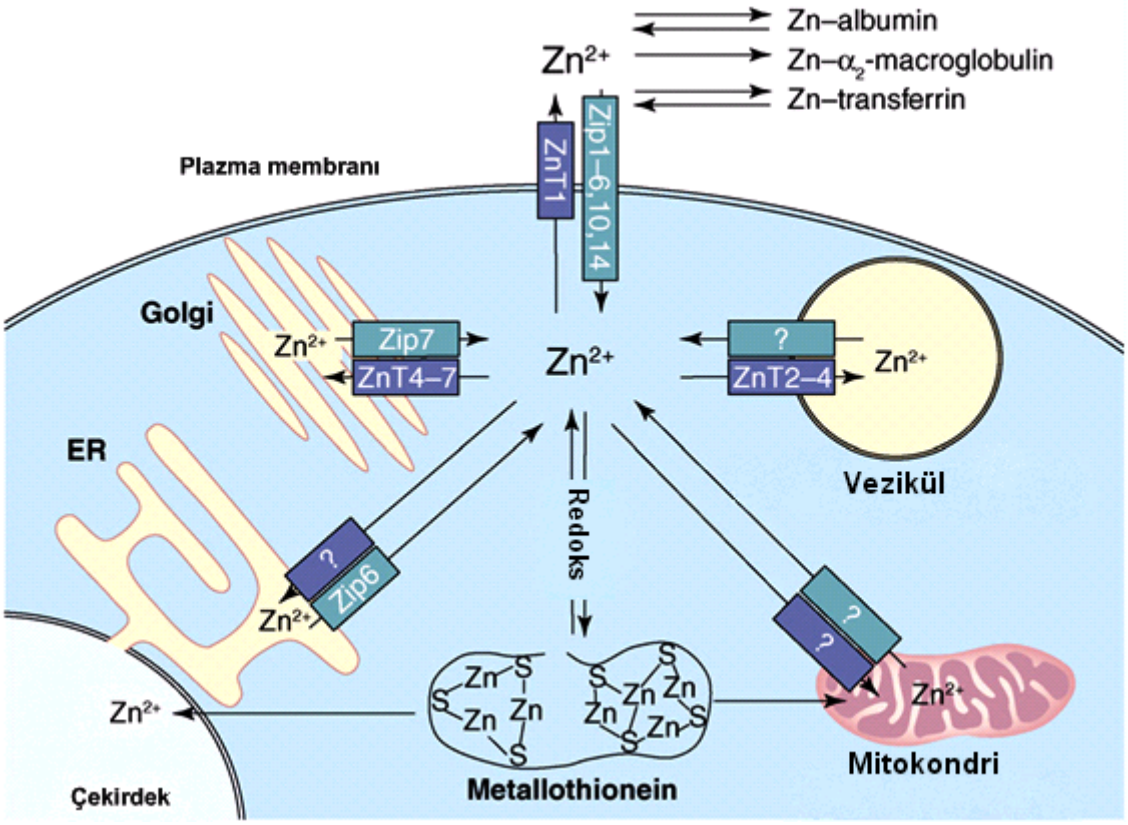
Memelilerde Zn hücrelerin içine veya dışına bir seri taşıyıcı protein aracılığıyla taşınmaktadır. Bu taşınım, Zn taşıyıcı proteinler (ZnT) ailesi ve transmembran proteinler (ZIP, Zinc-Iron related transporter Protein) tarafından yapılmaktadır. Zn taşımasında ZnT'lar ve ZIP'ler birbirlerine göre zıt göreve sahiplerdir. ZIP membran proteinleri sitoplazmaya Zn alımını ve veziküllerden Zn transportunu sağlar, ZnT'ler Zn'nun hücre dışına çıkışını ve de veziküllere Zn taşınmasını sağlar (Şekil 2-1). Gastrointestinal sistemden Zn absorbsiyonu farklı ZIP proteinleri ile sağlanır. ZIP-4 proteini intestinal lümenden enterositlere Zn taşıyan en önemli proteindir. Yapılan çalışmalarda Zn katkısı ile ZIP-4 ekspresyonunu değiştiği belirtilmektedir. Zn eksikliği ZIP-4 ekspresyonunu arttırmaktadır (10,16,32,33).

ZnT proteinleri intestinal mukoza epitelinde bulunurlar ve özellikle ince barsak hücrelerinde sentezlenerek Zn absorbsiyonunda kilit rol oynarlar. ZnT-1 ilk klonlanmış Zn taşıyıcısıdır ve ince barsak hücrelerinde eksprese edilir. ZnT-1 kemirgenlerde geniş bir dağılım sağlar. Fakat intestinal tabakada ve böbrek hücrelerinde kayda değer derecede ZnT-1 ekspresyonu yoktur. Nöronal hasarlarda Zn'nun dışarıya salınmasıyla ZnT-1 savunma sisteminin bir parçası olabilmektedir (8,16). ZnT-2'nin dokulardaki dağılımı öncelikle barsak, böbrek ve testistedir. Fakat ZnT-3'ün dağılımı beyin ve testis ile sınırlıdır. Sinaptik iletide Zn'nun vesiküler kesecik oluşturması nöronal fonksiyonlar için çok önemlidir (8,33). ZnT-3'ün nörodejeneratif fonksiyon/hastalıklar ve spermatogenesisde rolü olabilir. Barsaklardan düşük Fe emiliminde (varlığında) Zn absorbsiyonu gelişir (8).

Plazma membranında bulunan bu taşıyıcılar diyetsel yetmezlikte Zn metabolizmasını etkiler. Bazı Zn taşıyıcıları fizyolojik ve beslenme ile regüle edilir. Fe 'den farklı olarak Zn'nun depolanması ve homeostazı hakkında oldukça az bilgi vardır (8).

Zn'nun hücre içerisindeki hareketi sıkıca regüle edilmektedir ve intraselüler sıvıda serbest Zn seviyesi oldukça düşük değerlerdedir. İntrasellüler Zn iyonunun homeostazı için üç major mekanizma tanımlanmıştır. Zn, ekstrasellüler sıvıdan ZIP tarafından hücre içine alınır. Hücre içinde artan Zn iyonları hem hücre dışına ve hücre içi organellere ZnT taşıyıcıları ile taşınır. Ayrıca artan hücre içi serbest Zn iyonlarının

metal transkripsiyon faktörünü (MTF-1) aktive etmesi ile sentezlenen metallothionein (MT) proteininin Zn bağlaması ile hücre içi Zn homeostazı sağlanır (Şekil 2-1) (33).



Şekil 2-1: Memeli hücrelerinde Zn homeostazı (32).

Zn hücre içinde; gen regülasyon molekülleri, taşıyıcı veya depolayıcı moleküller ve metalloenzimler içeren metelloproteinlere bağlı olarak depo bulunur. MT hücre içinde Zn bağlayan başlıca proteindir. MT sitoplazmada Zn konsantrasyonunu dengeler ve Zn havuzunu kontrol eder. Bundan dolayı diyet ile alınan Zn miktarı ile ilişkilidir (8,16,32,33).

Hücresel Zn konsantrasyonunun artması ve serbest Zn iyonun birikimi toksik etki yaratabilir. Hücre biriken serbest Zn iyonlarının, pompalanarak hücre dışına atılması ve de hücre içi veziküller içerinde depolanması ile ya da hücre içi MT'e bağlanarak toksisitesinden korunabilmektedir (34).

Hücrelerde MT'in koruyucu etkisi glutatyona eşdeğer olarak bilinmektedir. MT, Zn iyonlarını depolama dışında, oksitlenmiş glutatyon (GSSH) tarafından oksitlenerek Zn'nun serbestleştmesi ile gerekli olan Zn'yu sağlayabilmektedir (16,32).

Zn konsantrasyonu saç, deri, kalp ve iskelet kasında sabit iken plazma, akciğer, testisler ve kemikteki konsantrasyonu diyetsel Zn miktarına bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir. Vücutta bulunan total Zn'nun %85'i kas ve kemiklerde bulunmaktadır. Geri kalan %11 deri ve karaciğerde ,%2-3'ü ise diğer dokularda bulunmaktadır. Yetişkin plazması 3,5 mg Zn içermektedir. Plazma konsantrasyonu alınan Zn miktarı ile oldukça yavaş değişmektedir (8,24,35).

Plazma ve serum Zn seviyeleri total vücut Zn seviyesinin belirlenmesinde en belirgin belirteçlerdir. Bu değerler diyet ile alınan Zn miktarına, yaş ve cinsiyete göre değişiklik gösterir. Plazma için sabahları açlık seviyesi alt limiti 11,5 μmol/L (750 mg/L) (1,8).

Diyet ile alınan Zn'nun %70'i dışkı ile atılır. Gastrointestinal sistemden günlük Zn atılımı yaklaşık 2,5-5,5mg/gün olarak hesaplanmıştır. Bu kayıplar intestinal mukoza ve tükrük bezlerinin epitel hücrelerinin apoptozu, pankreas, safra ve barsak hücrelerinin salgısıyla geçekleşmektedir. İdrar ve ter yoluyla da bir miktar kayıp vardır. Günlük renal ve gastrointestinal bölümlerin kayıpları karşılaştırılsa renal bölümün kaybı daha azdır ve diyetsel Zn değişimlerine karşı Zn miktarının sabit kalmasını sağlar. Vücuttan Zn atılımı direkt olarak total absorblanan Zn ile ilişkilidir. Eğer az absorblanırsa az atılır. Feçes ile günlük Zn atılımı Zn eksik diyette 1mg/gün iken Zn zengin diyette 5mg/gün değerine çıkmaktadır. Laktasyon sırasında bu ilişki değişir. Zn eksikliği oluşumunda dokular arasında Zn kaybı benzer değildir (8,16,24,26).

2.1.3. Çinkonun Biyolojik Önemi

Canlılarda hücrelerin proliferasyon, replikasyon ve farklılaşması için aminoasitler, glukoz, yağ asitleri ve vitaminler yanında minerallere de ihtiyaç vardır. Zn hücre fonksiyonları ve metabolizması için esansiyel bir mineraldir. Optimal sağlık için her gün belirli bir miktar alınması gereken biyolojik bir eser element olarak çinko, tüm organlar, dokular ve vücut sıvılarında yer alır. Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, bağışıklıkta ve serbest radikallere karşı korumada etkin fonksiyona sahiptir. Zn metalloproteinazlar ve metalloenzimler gibi bazı önemli proteinlerin yapısında kilit rol

oynar. 300'den fazla enzimatik reaksiyonda görev alır. İntraselüler bir düzenleyici olup, moleküler etkileşimlerde proteinler için yapısal destek sağlar. Çinko Zn-parmak motifini oluşturarak DNA ile etkileşir. Nükleik asit veya diğer gen düzenleyici proteinlerde, karbonhidrat ve hem sentezinde yapısal element olarak rol oynar. Demirin hemoglobine bağlanmasında da Zn metali dönüştürücü etkiye sahiptir. Zn, biyolojik membranların bütünlüğünü korur dolayısıyla iyon kanallarının stabilitesini sağlar. Zn redoks reaksiyonlarına katılmaz ve bu özelliğiyle organizmada kararlı halde bulunur. Zn'nun organizmaya alınması, taşınması, depolanması ve salınması birçok protein tarafından regüle edilir. Böylece membran onarımında, hücresel homeostazın sağlanmasında, serbest radikallere karşı hücrenin korunmasında, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, apoptozun engellenmesinde ve hücre çoğalmasında görev alırlar (1,13,16,26,32,33).

Zn biyolojik fonksiyonları göz önüne alındığında karaciğerin bazı fonksiyonları için Zn'nun gerekliliği anlaşılmaktadır ve Zn eksikliği birçok karaciğer hastalığının patojeneziyle ilişkilendirilmektedir. Çeşitli çalışmalarda karaciğer sirozu, kanda ve karaciğerdeki Zn konsantrasyonunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bazı karaciğer hastalıklarına bağlı olarak hepatositlerin ölmesi, Zn'nun karaciğer hücreleri vasıtasıyla enzimlerim yapısına katılımını düşürür. Bu enzimler sadece karaciğerde değil tüm organizmada çeşitli fonksiyonlara sahip oldukları için hepatositlerle Zn arasındaki ilişki tüm vücudu etkilemektedir. Bu bağlamda karaciğer hastalıkları Zn eksikliği oluşturabilir ve karaciğerin antioksidan etkinliğini düşürebilir (16).

Zn'nun biyolojik yapıları serbest radikal hasarından koruması birkaç faktöre bağlıdır; yeterli miktarda MT ile tutunur, SOD' un esansiyel komponentidir, tioller için koruyucu ajandır ve kimyasal grupların demir ile birleşerek serbest radikal oluşumuna engel olur (8).

Organizmada çeşitli faktörlere bağlı olarak Zn eksikliği görülmektedir. Yoksulluk, sınırlı yemek ve yiyecek içeriği gibi faktörler Zn eksikliği oluşturmaktadır. Yaygın Zn eksikliği sağlık ve verimlilik açısından ciddi sonuçlar doğurmaktadır (1). Zn eksikliği intestinal sistemden emilimin azalmasıyla veya intestinal kaybın artmasıyla da meydana gelir. Zn eksikliğinin organizmada spesifik ve nonspesifik işaretleri vardır. Çocuklarda ve adolesanlarda yetersiz büyüme ve gelişim geriliği Zn eksikliğinin belirtilerini yansıtmaktadır. Hücre aracılı immünitenin baskılanması da Zn eksikliğinin erken belirtisidir. Ayrıca yaraların geç iyileşmesi, saçların kolay kırılması, dökülmesi ve

renginin değişmesi de Zn eksikliğinden kaynaklanabilir. Zn sinir sisteminde etkilidir ve eksikliğinde sinir iletiminde azalma, ataksi, şaşkınlık ve nöropsikolojik performansta azalma gözlenir. Zn eksikliği görme, tat alma ve koku alma duyularını da olumsuz yönde etkilemektedir. Doğal olarak bu belirtiler Zn eksikliğinin kesin belirtileri olmamakla birlikte eksiklik tespit edildikten sonra bu belirtilerle bağdaştırılır (1,26).

Çinko eksikliği, büyümenin hızlı olduğu dönemler, hamilelik ve yaşlılık gibi fizyolojik nedenlerle olabildiği gibi karaciğer hastalıkları ve uzun süre parenteral beslenme gibi patolojik nedenlerle de olabilir. Zn eksikliği büyüme hormonlarını da etkilemektedir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda Zn eksikliğinin hipofiz bezinden büyüme hormonu salgısını azalttığı belirtilmiştir (26,33).

Organizmanın savunma mekanizması Zn homeostazıyla yakından ilişkilidir. Çeşitli nedenlerle görülen Zn eksikliği antikor oluşumunu azaltarak bağışıklık sisteminin yetersizliğine neden olmaktadır. Bu rahatsızlıklar genelde enterositlerden Zn alınmasını sağlayan ZIP-4 taşıyıcısının üretimindeki hasarlardan oluşmaktadır (32).

Organizmada Zn eksikliği sebebiyle ikincil hastalıklar oluşturur. Bunlar; acrodermatitis enteropathica, diğer barsak malabsorbsiyon sendromları, Crohn hastalığı gibi inflamatuar barsak hastalıkları, orak hücre anemisi ve talasemi gibi hemolitik anemiler, çeşitli barsak parazitlerinden dolayı kronik kanamalar, menoraji, idrarla kronik Zn kaybından dolayı çeşitli böbrek hastalıkları, karaciğer sirozu, alkolizm, katabolizma ve kronik iltihaplı hastalıklar nedeniyle interlökin-1'in artmasıdır (1).

Acrodermatitis enteropathica hastalığında hastaların yeterli Zn'ya sahip olabilmeleri için ve Wilson hastalığında dokularda Cu birikimini önlemek için farmakolojik dozlarda Zn verilmektedir. Zn'nun redoks metabolizmasındaki etkisi ve oksidatif stres ile ilişkisi sebebiyle diyabetik hastalarda da önem taşımaktadır. Diyabetik retinopatide Zn oksidatif strese karşı koruyucu etki sağlamaktadır (1).

Zn element halinde zehirli değildir. Başlıca toksisitesi çözünebilir tuzlardan kaynaklanır. Özellikle asitler ve asitli maddelerin varlığında çözünebilir Zn tuzlarının oluşması, Zn galvanizli kaplar ile benzeri eşyaların zehirlenme kaynağı oluşturması açısından önem taşır. Metalik Zn organik asitlerde kolayca çözünebilir. Bu yüzden belirli bir süre Zn ve galvanizli kaplarda tutulan özellikle süt ürünleri Zn'nun çözünmesini sağlayarak akut zehirlenmelere neden olur. Kontamine olmuş yiyecek ve içeceklerle akut toksisite olgu olarak pek bildirilmemişse de çeşitli sebeple akut olarak yüksek dozda Zn'ya maruz kalan bireylerde bulantı, kusma, kramp, tenesmus, kanlı

veya kansız diare gözlenmektedir. Uzun dönemde yüksek dozda Zn alındığında, anemi ve plazma Cu düzeyinde azalma gözlenmiştir. Organizmada Cu eksikliğine bağlı olarak bazı olumsuz etkiler gözlenmektedir. SOD, seroplazmin, sitokrom c oksidaz gibi Cu bağımlı enzimlerde azalma ve immünolojik parametrelerde, kolestereol ve onun lipoprotein dağılımında değişiklikler gözlenmektedir. Sonuç olarak diyet ve takviye olarak organizmaya alınan maddelerde Zn ve Cu orantılı olmalıdır (1,25,33).

2.2. Metallothionein

2.2.1. Metallothionein Proteininin Özellikleri ve Yapısı

1957 yılında at böbrek dokusunda Cd'a bağlı bir makromolekül tespit edilmiştir. Ancak 1960'ta bu protein metallothionein (MT) olarak adlandırılmıştır. MT yüksek metal bağlama kapasitesine sahip bir proteindir (36,37).

MT ile ilgili bilimsel araştırmalar 1950'lerde başlamış ve özellikle biyokimya, çevresel hijyen, ilaç, toksikoloji, patoloji ve beslenme alanlarında yoğunlaşmıştır. MT ile ilgili yapılan araştırmalar zamanla artarak ilki 1978 yılında Zürih'te olmak üzere MT ile ilgili uluslararası sempozyumlar düzenlenmiştir (36,38).

MT üzerinde yürütülen çalışmalar dört farklı model sistem üzerinde yoğunlaşmıştır:

1) MT'i indüklediği bilinen kimyasallarla,

2) Yüksek konsantrasyonlardaki toksinlere karşı direnç kazandırılan hücrelerle,

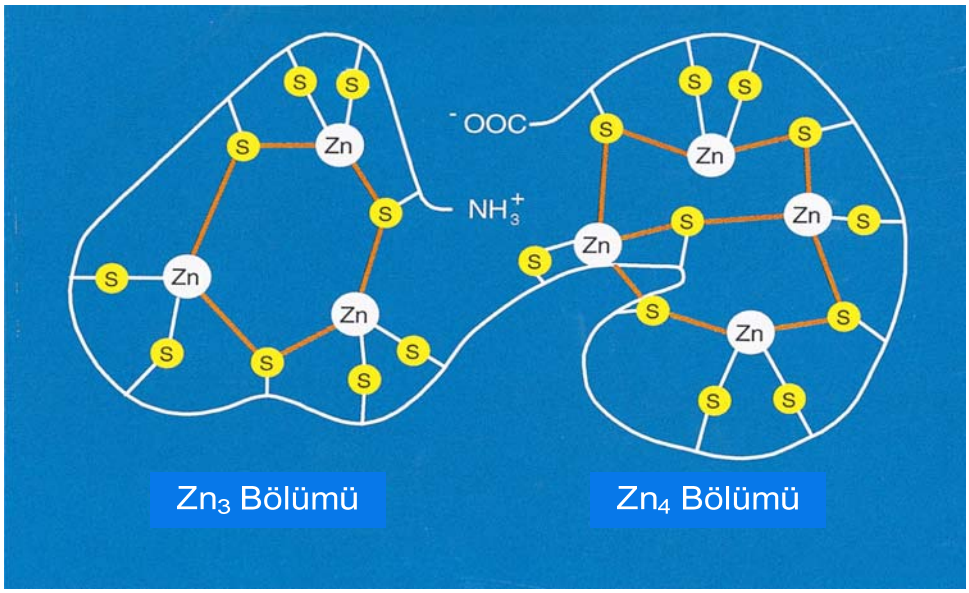
3) MT geni ile transfekte edilen hücrelerle,

4) MT geni aktive (MT-transgenik) ya da inhibe (MT-null) edilen hayvanlarla çalışmalar yürütülmektedir (2,37).

MT tüm hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda ve ökaryotik mikroorganizma ve bazı prokaryotlarda bulunur (11,36,37). Yapılan araştırmalar ile bazal MT seviyesi insan, köpek, kedi ve domuzda yüksek seviyelerde bulunurken, maymun ve koyunlarda daha az olduğu gösterilmiştir. Bu seviyeler yaş, doku tipi, beslenme ve fizyolojik faktörlere göre değişiklik göstermiştir (8).

MT düşük molekül ağırlıklı ve sülfür tabanlı bir metalloproteindir (13). MT üzerinde yapılan çalışmalarda molekül ağırlığının 6-7 kD, yüksek metal içerikli ve yapısını oluşturan aminoasitlerin yaklaşık üçte biri sistein olan bir protein olduğu tespit edilmiştir (2,8,36,37).

Memeli türlerinden elde edilen MT'lerin aminoasit kompozisyonları yüksek derecede benzer olduğu ve 60-68 aminoasit içerdiği saptanmıştır. Yapısında bulunan sistein aminoasitleri metallerin MT'e bağlanmasına katkıda bulunur. Proteinin yapısında bulunan sistein aminoasitlerinin koordinasyonu sayesinde Zn ve Cd MT'e yüksek afinite ile bağlanır. (8,37). MT'in üç boyutlu yapısı ilk olarak NMR ve X-ray kristalografi metoduyla tespit edilmiştir (Şekil 2-2) (8,13,37,39).



Şekil 2-2: Zn bağlı metallothionein proteini (40).

Her bir MT molekülü yedi tane metal atomu bağlayabilmektedir. MT dört ve üç metal bağlayabilen sırasıyla α ve β olarak nitelendirilen iki dizinin birleşmesiyle üçüncül yapısını meydana getirmektedir. α dizisi proteinin C-terminalini oluştururken β dizisi N-terminalini oluşturmaktadır (36,37,39,38, 40). β-bölümü 9 sistein tiyolat bağı içerir ($M_3^{II}Csy_9$) ve siklohekSan benzeri altıgen bir yapı gösterir. α-bölümü ise 11 sistein-tiyolat bağı içerir ($M_4^{II}Csy_{11}$) ve bisiklo [3:1:3]yapısı gösterir. Metallerin MT'e bağlanması ve serbestleşmesi kooperatiftir, ilk metalin bağlanması diğer metalin bağlanmasını kolaylaştırır. Metal bağlamada öncelik α-bölümündedir. Ancak bu bölüme metal bağlandıktan sonra β-bölümüne metal bağlanabilir. Proteinden metal salınması ise ilk olarak β-bölümünden, sonra α-bölümünden olur. Bu durum metallerin α-bölümüne daha sıkı bağlandığının ifadesidir. MT'ler metal-tiol gruplarının yapılarına göre farklı fonksiyonlara sahiptir (2,13,37,39,41).

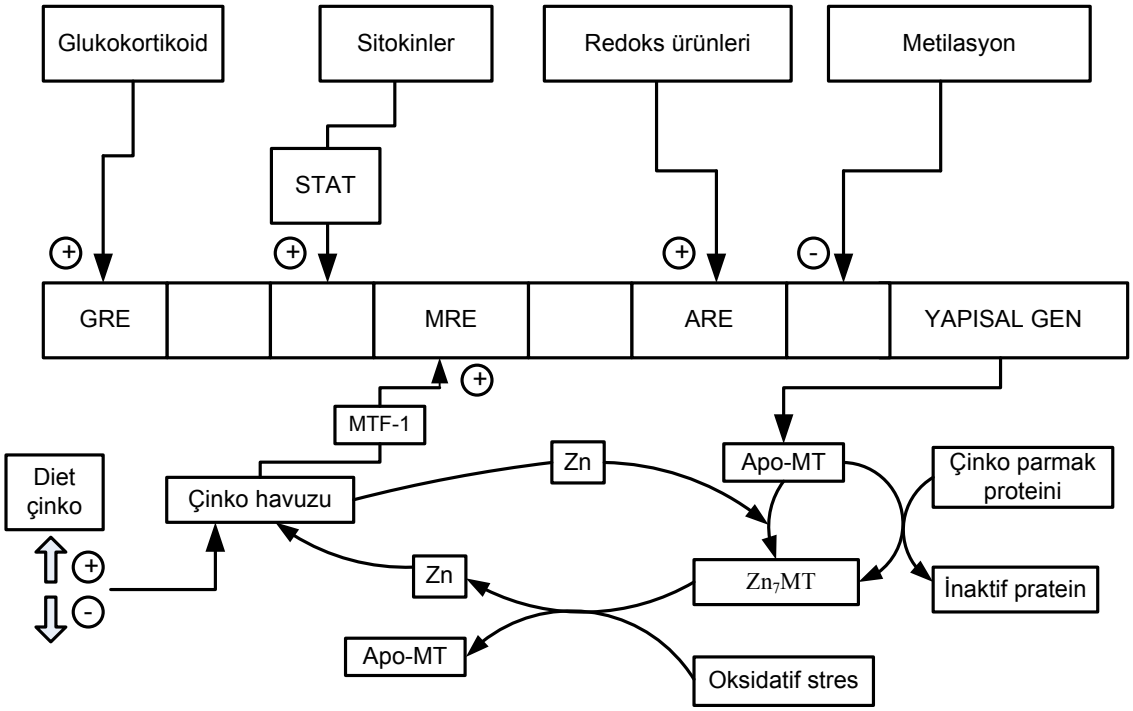
Memelilerden saflaştırılan MT'lerin birincil yapıları karşılaştırıldığında, aminoasit dizisinin büyük oranda benzer olduğu ve korunduğu görülür. Proteininin oluşumunda metallerin koordinasyonu ikincil yapıyı belirlerken metal-tiol bağları üçüncül yapıyı belirlemektedir. Türler arasında farklılık gösteren aminoasitler ise MT'in daha çok amino termal kısmında bulunur (37,39).

2.2.2. Metallothionein Ekspresyonunu ve Regülasyonu

MT yapısını ve regülasyonunu anlamaya yönelik çalışmalar, daha çok fare ve insan genlerinden elde edilen bilgiler ışığında yürütülmektedir. MT dokularda genellikle Zn ile kompleks halde bulunur. Memelilerde MT1'den MT4'e kadar dört MT izoformu bulunduğu bilinmektedir. Fare MT gen ailesi 8. kromozom üzerinde lokalize olmuş dört gen (MT1, MT2, MT3, MT4) içermesine rağmen, insanlar ve primatlardaki MT'ler 16. kromozoma lokalize olmuş en az 15 MT geni vardır. Bunlardan birer tanesi MT2, MT3, MT4 geni olmasına rağmen en az 13 tane MT1 geni vardır. Memelilerde en çok üretilen MT geni MT1 ve MT2'dir. Bunlar metaller, ilaçlar, inflamasyon ajanlar uyarısı ile karaciğer, pankreas, ince barsak ve böbrekte bol miktarda üretilir (2,13,37,38). İnsanda MT1 ve MT2 geni total MT ekspresyonunun %50'sini oluşturan bir oranda en çok eksprese edilen MT genleridir ve tüm dokularda mevcuttur. MT olarak adlandırılan genellikle MT1 ve MT2'dir. Mide ve pankreasta MT1 ve MT2 özellikle Zn homeostazından sorumludur. MT3 özellikle beyinde üretilir ve hücre proliferasyonunu baskıladığı bilinir. MT4 genellikle yassı epitelyum hücrelerinde eksprese edilir, dil ve deri gibi dokularda bulunur. MT4 orijinal keşfinin yanı sıra pek bilindik bir MT izoformu değildir. MT1 ve MT2 transkripsiyon aşamasında gözlenmiş ve tanımlanmıştır. Metaller, glükokortikoidler, sitokinler, kimyasal ve fiziksel stres ortamları bu genlerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Fakat MT3 ve MT4 bu uyaranlara cevap vermemektedir. Bununla beraber plasentada bu dört izoform da eksprese edildiği saptanmıştır (2,8,13,37,36,39).

MT ekspresyonu temel olarak transkripsiyon aşamasında kontrol edilir. MT geninin promotor bölgesi farklı ajanlara cevap veren bölümlere sahiptir. Bunlar metal transkripsiyon faktörlerinin etkilediği MRE, glükokortikoidlere cevap veren GRE, oksidatif stres ürünleri ile aktive olan ARE ve sitokin sinyalleri ile aktive olan STAT promotor bölgeleridir. Dolayısıla Zn, glükokortikoidler, reaktif oksijen molekülleri ve sitokinler MT ekspresyonunu başlatıcı ajanlardır. Fakat bazı tümör hücrelerinin

metilasyonu MT ekspresyonunu inhibe etmektedir (Şekil 2-3). MT'in metallere yüksek afinitesinden dolayı transkripsiyonunu aktive eden mekanizmalardan en çok MRE üzerinde çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmalar ile metal bağımlı transkripsiyon faktörlerinin (MTF-1) bu bölgeye bağlandığı gösterilmiştir. MTF-1 aracılı MT ekspresyonu için metal zorunludur. Zn yokluğunda MTF-1, metallothionein transkripsiyon inhibitörü (MTI) ile kompleks halde olup aktif değildir. Diyetle alınan Zn arttığında MTF-1, MTI'dan ayrılır. MTF-1 aktifleşerek, MT gen promotor bölgesindeki MRE bölümüne bağlanarak MT ekspresyonunu başlatır. Yeni sentezlenen ve metal bağlı olmayan MT (Apo-MT)'lere Zn'ların bağlanması MTF-1 ile MTI kompleksini yeniden oluşarak MT sentezi durdurulur. Yapılan invitro çalışmalar stresin MT1 ve MT2'den Zn serbestleşmesini sağladığını ve bunun da MTF-1'in aktivitesini ayarlamaya yardımcı olduğunu göstermiştir. Ortamda artan ağır metallerin MT'e bağlanması veya oksidatif stres sonucunda MT'den Zn salınımının MTF-1'i aktive etmesi ile MT sentezinin arttığı belirtilmiştir (17,13,33,37,38).



Şekil 2-3: MT gen regülasyonu (2).

MTF-1'den yoksun mutant farelerde MT1 ve MT2 genlerinin transkripte edilememesinin yanında, γ-glutamilsistein sentezinin transkripsiyonu da önemli ölçüde azalır. Bu bulgu MTF-1'in glutatyon sentezi içinde de önemli bir enzim olduğunu gösterir. MTF-1'den yoksun mutant fare embriyolarının gebeliğin 14. gününde ölmeleri, MTF-1'in yaşam için mutlak gerekli olduğunu gösterir (37).

Fiziksel travma ve mikrobiyal enfeksiyon gibi çeşitli stres durumları hayvanlarda MT sentezini arttır ve buna bağlı MT gen ekspresyonu interleunkin-1 aracılığıyla gerçekleşir. Non-streoidal inflamasyon ilaçları da karaciğerde MT seviyesini arttırır ve dokudaki MT dağılımını düzenler. Ayrıca MT'in insan derisini UV radyasyona karşı koruduğu gözlemlenmiştir(3,38). MT' in metal içeriği üretildiği doku, yaş ve gelişim safhasına göre değişmektedir (36).

Metallothionein özellikle MT1 ve MT2 belirli bir düzen içinde koordine edilir ve çeşitli patolojik koşullar tarafından hızlıca arttırıldığı belirtilmektedir (42). Dokularda Zn, Cu, Cd, Hg gibi esansiyel ya da toksik elementlerin artması da MT1 ve MT2 transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasını sağlar. Zn taşıyıcılarının aktivitesinin intrasellüler Zn havuzunun regülasyonuna bağlı olarak değişimi MT dönüşüm hızını etkilemektedir. (37,38).

Sentezlenen MT proteininin yıkımı regulasyonu açısında önemlidir. Sentezlenen MT'nin yarı ömrü saatlerle ifade edilmektedir ve MT genini uyaran faktöre göre büyük farklar göstermektedir. Zn bağlamış MT (Zn-MT)'in yarı ömrü 18-20 saat, Cd bağlanmış MT (Cd-MT)'in yarı ömrü ise 3 gündür. Yetişkin sıçanlarda MT'in yarı ömrü 4 saattir, yeni doğanlarda ise bu süre 49 saate kadar çıkabilmektedir. MT'in yıkımı metal içeriği ve canlının yaşına göre farklılık göstermektedir (37,38,43).

Fetal gelişim boyunca dokulardaki MT1 ve MT2 konsantrasyonları büyük değişimler gösterir. MT1 ve MT2 sıçan karaciğerinde en erken gebeliğin 18. gününde belirlenebilir ve doğumda maksimum konsantrasyona erişir. Yeni doğan sıçan karaciğerindeki MT konsantrasyonu yetişkine göre 20 kat daha fazladır. Doğumda erişilen bu yüksek MT konsantrasyonu doğumdan sonra iki hafta devam eder, sonrasında hızla düşerek 35 günde yetişkin seviyesine iner. Sıçanlarda benzer şekilde yeni doğan farelerde de böbrek, dalak, kalp, akciğer, pankreas ve mide MT değerleri yetişkinlerden 3-10 kat fazladır ve 3-4 hafta sonra yetişkin düzeyine iner. Çalışılan tüm dokularda fetüs ve yeni doğanlarda MT konsantrasyonu yüksek bulunmasına rağmen,

sadece beyin MT konsantrasyonu yeni doğanda yetişkine göre %50 azdır, doğumdan sonra yükselir ancak 21. günde yetişkin seviyesine erişir (37,44).

MT'in hücresel lokalizasyonunun bilinmesi fizyolojik fonksiyonlarının aydınlatılması açısından önemlidir. MT genellikle sitoplazmada bulunur fakat hücre diferansiyasyonu ve poliferasyonunun özellikle hücre döngüsü aşamaları sırasında MT çekirdeğe taşınır (45). Buna bağlı olarak fetüs ve yeni doğanda MT'in daha çok çekirdekte olduğu, oysa yetişkin hücrelerde daha çok sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir. Bu da fetüs ve yeni doğanda, MT'in intraselüler yıkım sistemlerinden uzak kalarak yüksek konsantrasyonda bulunduğunu gösterir. Sitoplazmada ve çekirdekte bulunan MT'lerin fonksiyonlarının araştırılması amacıyla MT-null hücrelerde yapılan çalışmada, sitoplazmada bulunan MT oksidatif hasarı ve ağır metal toksisitesini baskılayıcı etki gösterirken, çekirdekte bulunan MT'in böyle bir etki sağlamadığı tespit edilmiştir. Çekirdekte bulunan MT ise ultraviyole ışınlar ve hidrojen peroksite bağlı olarak oluşan DNA hasarında koruyucu etki sağladığı saptanmıştır (8,36,37,38,46,47).

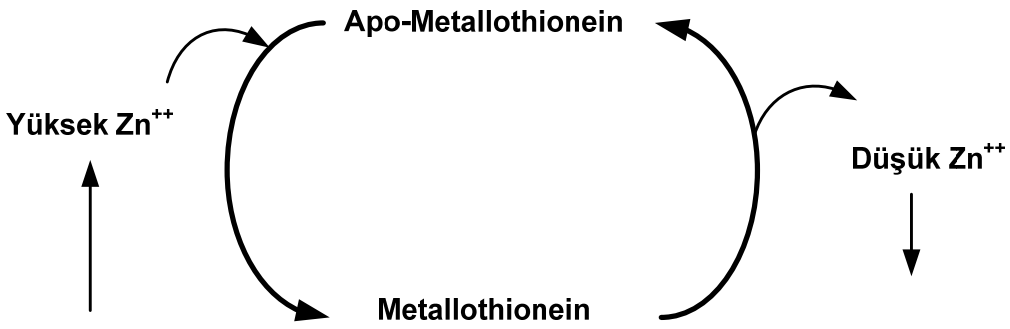
MT1 ve MT2 regülasyonu lizozomal ve lizozomal olmayan çeşitli hücresel yıkım sistemleriyle kontrol edilir. MT proteolizinin lizozomda daha fazla olduğu belirtilmektedir (48).

2.2.3. Metaller ve Metallothionein Etkileşimi

Metal içermeyen MT (Apo-MT), içerdiği çok sayıda sülfidril grubunun Zn'ya yüksek ilgisinden dolayı potansiyel bir Zn bağlayıcısıdır. Apo-MT metal (Zn,Cd) bağlandığında daha stabil ve proteolize karşı dirençli bir yapı oluşturur (37,38,2). Zn, reversibil olarak MT'in sülfidril gruplarına yüksek afinite ile bağlanır. Zn ve MT'in bu ilişkisinden dolayı MT üzerindeki Zn serbestleşerek çeşitli enzimlerin aktivasyonunda etkili olur. MT bu özellikleri sayesinde çeşitli moleküler süreçlerin aktivasyon ya da inaktivasyonunda etkili olduğu belirtilmektedir. Örneğin, Zn'nun transkripsiyon faktör IIIA (TFIIIA)'dan apo-MT'e transferi sonucunda TFIIIA'nın inaktive olduğu gösterilmiştir (13,37). Bu nedenle Zn absorbsiyonunu düzenleyen veya çeşitli enzim ve transkripsiyon faktörlerinin gelişimi, protein sentezi sırasında onlara Zn sağlayan MT, Zn için depo protein görevi görmektedir. Dokulardaki Zn birikimi ile MT sentezi

arasında bir korelasyon olduğu ve plazma MT'i hücresel Zn homeostazını sağlamada önemli bir yer tutmaktadır.

Hücrede serbest Zn seviyesinin artması apo-MT sentezini arttırarak MT oluşumunu sağlar ve serbest Zn seviyesi azaldığında ise MT, Zn salınımı gerçekleşir. (Şekil 2-4) (8,37,39,38).



Şekil 2-4: Zn homeostatik mekanizmasında Apo-MT/MT çifti (8).

Çinko bağlı MT Zn-MT ve apo-MT çinkoya bağlı proteinler; çinko parmak transkripsiyon faktörünün DNA'ya bağlanma aşamasında önemli olduğu yapılan invitro çalışmalarda gösterilmiştir. MT-transgenik ve MT-null farelerde yürütülen çalışmalar, MT'in Zn'nun barsaktan absorbsiyonunda da rol aldığını göstermiştir. Tek bir oral doz Zn'nun uygulanmasından sonra serum Zn konsantrasyonunun kontrole göre MT-null farelerde 2 kat artarken, MT-transgenik farelerde 1/3 oranında kalmıştır. Bu da MT'in barsaktan Zn emilimini kontrol ettiğini düşündürür (13,37).

MT, özellikle Zn eksikliğinde önem kazanan önemli bir biyolojik Zn havuzu olarak düşünülür. Zn eksikliğinin sebep olduğu teretojenik etkilerden MT-1 transgenik farelerin daha az etkilendiği gösterilmiştir. Yeni doğan MT-null farelerinin karaciğer Zn konsantrasyonu %60 daha azdır ve MT-null fareler Zn'dan yoksun diyetle beslendiklerinde böbrek gelişiminin geciktiği tespit edilmiştir (18,37,38).

Tiol bağlarının oksidasyonu metalin proteinlerden ayrılmasını sağlar. Son yapılan çalışmalar GSH-GSSG gibi hücresel redoks çiftlerinin Zn-MT'den metal serbestleşmesini arttırdığı belirtilmektedir. Bazal seviyedeki MT izoformları hücresel poliferasyon sırasında artmaktadır. MT bir yandan Zn bağlayarak Zn-MT oluşturup hücreyi yüksek Zn seviyesinden korur, bir yandan da apo-MT sentezinde etkili olarak

hücreye Zn alımını sağlar (13). Dolayısıyla MT, Zn homeoastazının sürdürülmesi ve Zn aracılı toksiteden korunmak için önemlidir (37).

MT'e bağlanan eser elementlerden bir diğeri de bakır olmasına rağmen MT, Cu homeostazında mutlak gerekli değildir. Bununla birlikte MT hücresel olarak artan Cu'ı bağlayarak Cu toksisitesine karşı önemli bir koruyucu olduğu belirtilmektedir (13,37,38).

Cu fazla alındığında ya da atılım azaldığında organizmada birikerek toksik etkiler gösterebilen bir metaldir ve organizmada dağılımının bozulmasının Wilson's ve Menkes' hastalıklarına sebep olduğu bilinmektedir. Wilson's hastaları üzerinde yürütülen çalışmalar, MT'in karaciğerde en önemli Cu bağlayan protein olduğunu ve birikmiş Cu'ın detoksifisakyanunda karaciğer MT seviyesinin arttığını göstermiştir. Wilson's hastalarına Zn uygulanarak yapılan tedavide, MT konstrasyonu artarak Cu'ı bağlamasının etkili olduğu düşünülmektedir. MT'den zengin hücreler Cu toksititesine dirençlidir. Bu bulgular, MT'in Cu'ı bağlayarak Cu'a bağlı oksidatif stresten ve böylece organizmayı toksisiteden koruduğu fikrini desteklemektedir (8,18,37).

MT'in toksik metallere karşı koruyucu etkisi, proteinin toksik metallere (Cd ve Hg) olan yüksek afinitesinden gelmektedir. Pek çok doku için toksik olan Cd'un akut alınımı karaciğer, akciğer ve testiste hasar oluşturur. Cd'un kronik toksisitesi ise böbrek hasarına yol açar ayrıca kemikte birikerek osteoporoz ve osteomalaziye sebep olur ve bazı dokularda kanser gelişiminde de rol oynadığı tespit edilmiştir. Bununla ilgili pek çok çalışma ile MT'in Cd detoksifikasyonunda çok önemli olduğu gösterilmektedir (2,8,18,37,39).

Cd absorbsiyon, dağılım ve eliminasyonuna etkili faktörler hala araştırılmaktadır. Vücutta Cd dağılımında MT'nin rolü MT-transgenik farelerde çalışılmıştır. Bu çalışmalar MT'in barsak Cd absorbsiyonunu engellemediğini ve çeşitli dokulara Cd dağılımının ilk basamaklarında etkili olmadığını, Cd'u dokularda tutulumunu sağlayan temel faktör olduğunu göstermiştir. Cd-MT kompleksi karaciğerde oluşur, kanda ayrılır ve böbreklere gider (49).

Kültür hücrelerinde Cd'a direnç ve MT seviyesi arasında güçlü bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Düşük doz Cd'a maruz bırakılan deney hayvanlarının, akut Cd uygulamasının sebep olduğu karaciğer toksisitesi ve öldürücü etkilerinden daha az etkilendiği görülmüştür. Benzer şekilde, karaciğer MT konsantrasyonu normalden 10 kat fazla olan MT-transgenik farelerde Cd'un indüklediği karaciğer toksisitesine ve

ölüme karşı daha dirençlidir. MT-null fareler ise Cd'un indüklediği toksisite ve ölüme daha duyarlıdır. Sonuç olarak dokulardaki mevcut MT, Cd detoksifikasyonunda önemlidir. MT özellikle karaciğer hücrelerinin sitozolünda Cd'u yüksek afinite ile bağlayarak ve böylece serbest Cd'un diğer kritik organeller üzerinde sebep olabileceği hasarı engeller. Kronik Cd uygulamasının sebep olduğu, kemik dokusunun azalması, anemi, inflemasyon, timus atrofisi ve splenomegali MT-null farelerde normallere göre daha hızlı ve belirgin bir şekilde gelişir. Diğer dokuların tersine MT, Cd'un indüklediği testis toksisitesine karşı koruyucu olmadığı da belirtilmektedir (37,50,59).

İnorganik civa da MT sentezini uyaran elementlerdendir. Brandao R. Ve ark. yaptıkları çalışmada $HgCl_2$'e maruz kalan farelerin karaciğer ve böbreklerinde MT seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Hg, Zn ile yarışarak hem MT1 hem de MT2 izoformlarına bağlanabilir. MT'den zengin hücreler $HgCl_2$ toksisitesine daha dirençlidir. Böbrekte ve karaciğerde Zn aracılı MT indüksiyonu, Hg toksisitesine karşı koruyucu etki sağlamaktadır. MT'in $HgCl_2$ toksisitesine karşı koruyucu etkileri, MT'in, Hg'yi sitozolde bağlamasından dolayı olduğu gösterilmiştir (51,52).

Cd, Cu, Hg, Pb ve As metallerinin alınımı ve buna bağlı olarak ölüm oranları MT-null farelerde araştırıldığında, Cd birikimine bağlı ölüm oranının MT-null farelerde yedi kat arttığı saptanmıştır. Fakat Cu ve Hg'da bu oran 1.3-1.4 civarındadır. MT serbest metalleri bağlayarak koruyucu etki sağlamaktadır (2,41).

2.2.4. Metallothionein'in Biyolojik Önemi

MT'in metalle ilişkili görevlerinin haricinde organizmayı reaktif oksijen moleküllerinden koruma görevi de vardır. Strese adaptasyon, doku hasarına karşı koruyuculuk, antikanser ilaçlarının oluşturduğu etkiler, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu gibi çeşitli oksidatif zararlara karşı koruyucu etki sağladığı belirtilmektedir (13). Sürekli çevresel strese maruz kalan organizmanın homeostazının sağlanması için çeşitli anti-stres sistemleri mevcuttur (2). Radikallerin oluştuğu şartlarda MT'in radikal koruyucu aktivite sağladığı gösterilerek MT'in bir antiokisdan olarak görev yaptığı saptanmıştır (53).

Organizmanın oksidatif hasara karşı etkili savunma sistemlerinden birinin anahtar proteini olan MT'in ekspresyonundan yoksun olması toksik etkilere karşı hassasiyetini arttırmaktadır. MT'in antioksidan etkisi çok yönlüdür ve hücresel

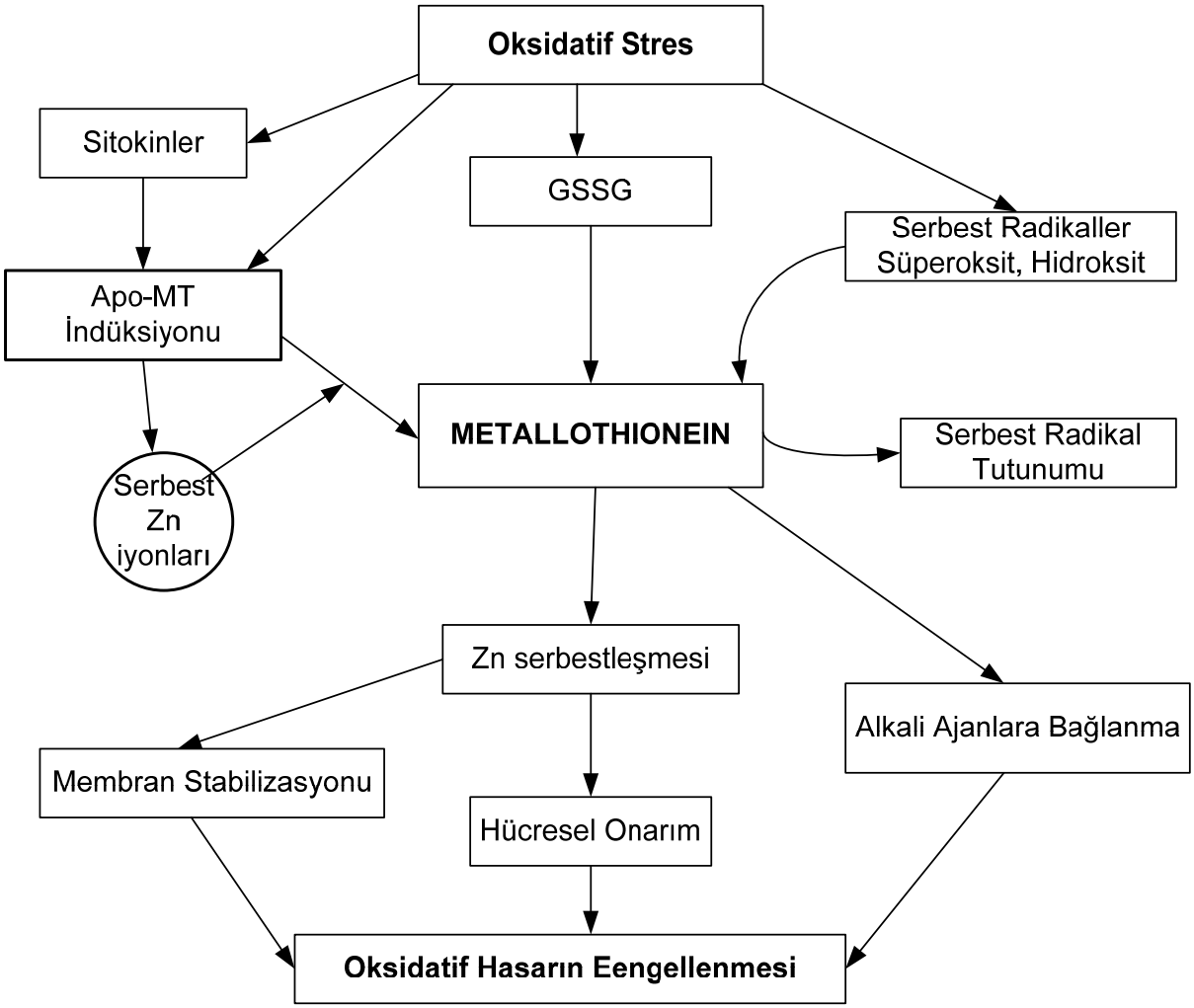
lokalizasyon, metal içeriği, oluşan reaktif oksijenin türü ya da oksidatif stresin kaynağı gibi faktörlere bağlıdır. Örnek olarak Cu-MT gibi spesifik MT'lerin antioksidan özellikleri iyi bilinmekte ve santral sinir sistemi gibi Cu'dan zengin dokularda spesifik rollere sahip olabileceği düşünülmektedir (2,8,18,36).

Dokularda oluşan oksijen radikallerinin yarı ömürleri oldukça kısadır, kendiliğinden ya da SOD gibi biyolojik savunma sistemleri tarafından yıkılırlar veya doku hasarı ile sonuçlanacak şekilde hücresel moleküller ile etkileşime girerler. MT'ler radikal tutunumu sağlayarak antioksidan etki gösterebilmektedir (18).

Çeşitli metallerin yanında (Cd,Hg,Zn,Cu), sitotoksik ajanlar (etanol, karbon tetraklorid) stres oluşturan durumlar (starvasyon,enfeksiyon) ve sitokinler dokularda MT sentezini arttırmaktadır (8,18,47).

Ratlarda reaktif oksijen partikülleri (ROS), lipid peroksidasyonu, redoks döngüsü oluşturarak ve glutatyon (GSH) miktarını azaltarak stres oluşturan farklı ajanla yapılan çalışmada MT seviyesinin dokularda arttığı belirtilmiştir. Bu da MT'in oksidatif strese karşı hücresel koruma sağladığını göstermektedir (8,18,47).

Yapılan çalışmalarda özellikle yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) olmak üzere hücresel disülfür gruplarını MT'i oksitleme yeteneğine sahip oldukları ve bu sayede Zn iyonların proteinden ayrılmasını sağladığı belirtilmiştir. Buna bağlı olarak GSH/GSSG'ın redoks aktivitesinin MT isleyişinde ve Zn homeostazının düzenlenmesinde önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir (18). Ayrıca Sato ve ark. (54) yaptıkları çalışmada da oksidatif stresin sitokinler aracılığıyla MT'i indüklediğini belirtmişlerdir (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: MT'in antioksidan etkisinin oluşum şeması (18).

Cai ve ark. yaptıkları invitro çalışmada hidrojen peroksit (H_2O_2)'ten oluşan reaktif serbest radikallerin sebep olduğu DNA hasarına karşı, Cu varlığında ZnMT'in koruyucu etki sağladığı belirtilmiştir (19).

Normal şartlarda doğan bir MT-null fare için Zn metabolizmasında MT esansiyel değildir. Fakat stres altındaki bir farenin Zn regülasyonunda MT'in önemi anlaşılmaktadır (2).

Ayrıca MT'nin radyasyon hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu, çeşitli ajanlar ile MT sentezi uyarıldıktan sonra yürütülen in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Radyasyona karşı koruyucu etki MT'nin bizzat kendisi ya da onun modüle ettiği diğer hücresel faktör aracılığı ile gerçekleşebilir. Radyasyonun indüklediği MT'in apoptoz üzerine koruyucu etkisi henüz tam olarak açıklanmamıştır.

Fakat bu etki hem radyasyona karşı korunma, hem de bazı kanser tiplerinin ilaç ve radyasyon ile tedavi süreçlerini ilgilendiren önemli bir parametre olabileceğinden üzerinde durulması gereken bir konu olduğu belirtilmektedir (19,55).

İnvitro ve invivo çalışmalar apo-MT nin proteolize oldukça hassas olduğunu göstermiştir. Ancak Zn ve Cd'un bağlanması MT'i proteolize dirençli yapmaktadır. İntraselüler havuzlardan gelen hücresel MT birikimi ve dönüşümü Zn bağlanmasını elverişli kılar (8,39).

Canlılarda gen baskılanması ve aktivasyonundaki düzensizlik hastalıkların temel nedenini oluşturmaktadır. Zn-parmak protein ailesi birçok transkripsiyon faktörünün yapısında bulunuyor olması bu proteinin hastalık oluşumundaki rolünü göstermektedir. Nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlılıkta görülen patolojik bozukluklarda metal metabolizmasının bozulması ve reaktif oksijen partiküllerinin (ROS) oluşmasına bağlı olarak MT ekspresyonunun değiştiğini göstermektedir (14,56,57). Alzheimer hastalığında Cu'ın amiloid-β peptitine bağlanmasının ve ROS oluşumunun hastalığın ilerlemesinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilindiğinde MT'in önemi açıkça görülmektedir. Son yıllarda bu proteinin beyin fonksiyonları ile ilişkilendirilmesini gösteren çalışmalar artmıştır. Bunun sonucunda MT1 ve MT2'nin inflamatuar bir cevap olduğu saptanmıştır. MT1 ve MT2'nin yanında beyin için spesifik olan MT3 izoformu speisifik biyolojik aktivite gösterir. Bu izoform bazı nöronlardan eksprese edilir (14,58,59).

Kanser ile ilgili yapılan son çalışmalarda tümör hücrelerini baskılayan p53 proteini ile MT arasında güçlü bir ilişki tespit edilmiştir. MT'in DNA'ya bağlanan p53 proteinini regüle ettiği gösterilmiştir. MT'in kalp yetmezliğine karşı da koruyucu etkisi olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Sonuç olarak MT ekspresyonu hastalığın evresi ve prognozu hakkında belirleyici olabilmektedir (14,47,60).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kit ve Kimyasallar

Çinko klorür (Merck)

Nitrik asit (Ridel-de Haën)

Perklorik asit (Ridel-de Haën)

Zn standart çözeltisi (Titrisol-Merck)

MT Elisa Kit (USCN Life)

Zn-MT Elisa Kit (USCN Life)

Deiyonize su

Fosfat tampon solüsyonu

Fosfat tamponu (PBS) pH=7.2-7.4

NaCl 8.79gr

KH_2PO_4 0.272gr

$NaHPO_4$ 1.135gr

1000cc deiyonize suda çözüldü.

3.2. Cihazlar

Atomik absorbsiyon spektrofotometresi (Shimadzu-AA-680)

Etüv (Elektrohelios)

Soğutmalı homojenizatör

ELISA cihazı (ORGANON TEKNIKA-Tek Time)

Ayarlanabilir otomatik pipet (Labmate Soft)

Hassas terazi (Scaltec)

Deiyonize su cihazı (Nüve NS104)

Santrifüj (Hettich-Universal 30 RF)

Vorteks (Vortex Mixer Vm-20)

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Çalışma İ.Ü Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan erişkin Wistar-Albino tipi erkek sıçanlarla yürütüldü. Sıçanların bakımı ve barınması İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuarında gerçekleştirildi. Çalışmada, kullanılacak sıçanlar (n=24) biri kontrol diğer ikisi deney gruplarını oluşturmak üzere üç gruba ayrıldı.

a) Kontrol grubu (n=8):

Sıçanlar deney süresince (4 hafta) standart sıçan yemi ve deiyonize su ile beslendi.

b) I. grup (n=8):

Sıçanlara deney süresince normal yem ve çinko katkılı (100mg/l) deiyonize su verildi.

c) II. grup (n=8):

Sıçanlara deney süresince normal yem ve çinko katkılı (200mg/l) deiyonize su verildi.

Sıçanlar deney süresince polietilen kafeslerde (4 hafta) 21-23 ^{0}C sıcaklıkta ve gün içerisinde siklusu 12 saat aydınlık - karanlık olan sabit çevre ortamında *ad libitum* olarak beslendi.

3.4. Örneklerin Alınması

Deney süresi sonunda tüm gruplara ait hayvanların kan örnekleri eter anestezi altında kalplerinden alındı. Alınan kan örnekleri satrifuj edilerek serumları ayrıldı ve plastik tüpler içerisinde -20ºC'de tutuldu. Sakrifiye edilen hayvanların karaciğer ve böbrek örnekleri ölçüme kadar -20ºC'de tutuldu.

3.5. Örneklerin Deney için Hazırlanması

3.5.1. Doku homojenizasyonu

Karaciğer ve böbrek dokusundan alınan parçalar tartıldıktan sonra 1:10 (w/V) oranında PBS eklenerek +4ºC'de homojenize edildi. %10'lu doku homojenatları

hazırlandı. Bu homojenatlar 3500 devirde 10 dak. satrifuj edilerek süpernatanları alınıp dokuda MT ve Zn-MT ölçümüne hazırlandı.

3.5.2. Doku yaş yakma

Her bir örnekten alınan yaklaşık 0.5 gr dokunun üzerine, dereceli ve ısıya dayanıklı cam tüplerde 2.5ml %65 'lik HNO_3 (Nitrik asit) ilave edildi. Bir saat oda ısısında, yaklaşık iki saat 100-120ºC sıcaklıktaki etüvde doku örnekleri erimeye bırakıldı. Etüvden çıkarılan örnekler oda ısısında soğutulduktan sonra üzerine 0.5ml%65 'lik $HClO_4$ (Perklorik asit) ilave edilerek 150-180ºC sıcaklıktaki etüvde iki saat tutularak yaş yakma yapıldı. Etüvden çıkarılan örnekler soğuduktan sonra üzerine kör çözelti ilave edilip karıştırılarak element ölçümüne hazır hale getirildi (25).

3.6. Yapılan Analizler

3.6.1. Dokulardaki Zn-MT ve MT miktarlarının belirlenmesi

Dokularda protein ölçümleri kit (MT, Zn-MT ELISA kit USCN Life) protokollerine uygun olarak ELISA yöntemi ile yapıldı. Ölçüm yapılmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına alındı. 30ml'lik yıkama solüsyonu deiyonize su ile 750ml'ye tamamlanarak kullanıma hazırlandı. Stok standartı hazırlamak üzere 1ml örnek sulandırıcı ile Standart solüsyonu karıştırılarak 20ng/ml'lik stok standardı oluşturuldu. Oluşturulan stok standartı altı kez seri sulandırmaları yapılarak sulandırıldı. Sonuncusu blank olmak üzere 20 -10 -5 -2,5 -1,25 - 0,625 - 0,312 - 0 ng/ml'lik sekiz farklı standart oluşturuldu.

1) Plate kuyucuklarından ilki boş bırakıldı. İkincisinden başlayarak sırasıyla 20 - 10 -5 -2,5 -1,25 -0,625 -0,312 - 0 ng/ml'lik standartlardan, devamındaki kuyucuklara da ölçülecek örneklerden 100µl konuldu ve iki saat 37ºC'de inkübe edildi.
2) İki saat sonunda sıvılar kuyucuklardan alındı fakat yıkama yapılmadı.
3) 100µl Detection Reagent A konularak bir saat 37ºC'de inkübe edildi.
4) Kuyucuklardaki sıvılar alınarak ORGANON TEKNIKA-Tek Time ELISA cihazında üç defa yıkama yapıldı.

5) 100µl Detection Reagent B konularak bir saat 37ºC'de inkübe edildi.
6) Kuyucuklardaki sıvılar alınarak ORGANON TEKNIKA-Tek Time ELISA cihazında beş defa yıkama yapıldı.
7) 90µl Substrate Solution konuldu ve ışıktan korunarak 15-30 dakika 37ºC'de inkübe edildi.
8) İnkübasyondan sonra kuyucukların tümüne 50µl Stop Solution konuldu ve oluşan renk değişimi ORGANON TEKNIKA-Tek Time ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda okutularak sonuçlar kaydedildi.

3.6.2. Dokulardaki Zn miktarlarının belirlenmesi

Dokularda element ölçümleri atomik absorbsiyon spektrofotometresinde yapıldı. İçerisinde 1000±0.002g saf Zn içeren atomik absorbsiyon hazır standart çözeltisi deiyonize su ile bir litreye tamamlanarak stok çözeltisi (1000µg/ml) hazırlandı. Deiyonize su ile stok çözeltisinden 0.5,1,2 µg/ml'lik çalışma standartları elde edildi. Blank çözeltisi olarak deiyonize su kullanıldı.

Atomik absorbsiyon spektrofotometresinde Zn ölçümüne uygun dalga boyunda ışık veren oyuk katot lambası (Hollow Cathod Lamp-HLC) kullanıldı. Zn'ya uygun slit aralığı, hava-asetilen gaz karışımı ve BCG(Backround) modları seçildi. Bu şekilde ölçüme hazır hale getirilen atomik absorbsiyon spektrofotometresinde blank ve Zn standart çözeltileri yardımıyla kalibrasyon grafiği çizildi ve hazırlanan örneklerin element konsantrasyonlarının ölçümü yapıldı (25).

3.7. İstatiksel Analiz

Tüm deney sonuçları ortalama ±SD (standart sapma) olarak verildi. Deney grupları ile kontrol grubu arasındaki değişimi değerlendirmek için SPSS programında 'Student's t' karşılaştırma testi kullanıldı ve p değerleri hesaplandı.

4. BULGULAR

Dört haftalık deney süresince içme sularında 100 mg/l Zn bulunan I. grup, içme sularında 200 mg\l Zn bulunan II. grup ve kontrol gurubuna ait serum, karaciğer, böbrek dokuları Zn, MT, Zn-MT konsantrasyonları ölçüldü. Deney gruplarının tespit edilen değerleri ile kontrol grubunun değerlerinin istatistiksel karşılaştırılmalarının sonuçları Tablo 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9'da ve Şekil 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9'da verilmiştir.

4.1. Dokulardaki Zn konsantrasyonları

İçme sularına Zn katılarak 4 hafta süre ile normal yemle beslediğimiz deney hayvanlarının serum, karaciğer ve böbrek dokularında Zn konsantrasyonları ölçüldü. Deney gruplarında bulunan değerlerin kontrol grubunun benzer dokularında tespit edilen değerlerle istatistiksel karşılaştırılması yapıldı.

Deney gruplarını oluşturulan deney hayvanlarının serumlarında ölçülen Zn değerlerinin (I. grupta 1,51±0,22 μg/ml, II. grupta 1,65±0,36 μg\ml) kontrol grubunun serum Zn değerlerine (1,21±0,11 μg/ml) göre anlamlı ($p<0,05$) arttığı saptandı (Tablo 4-1, Şekil 4-1).

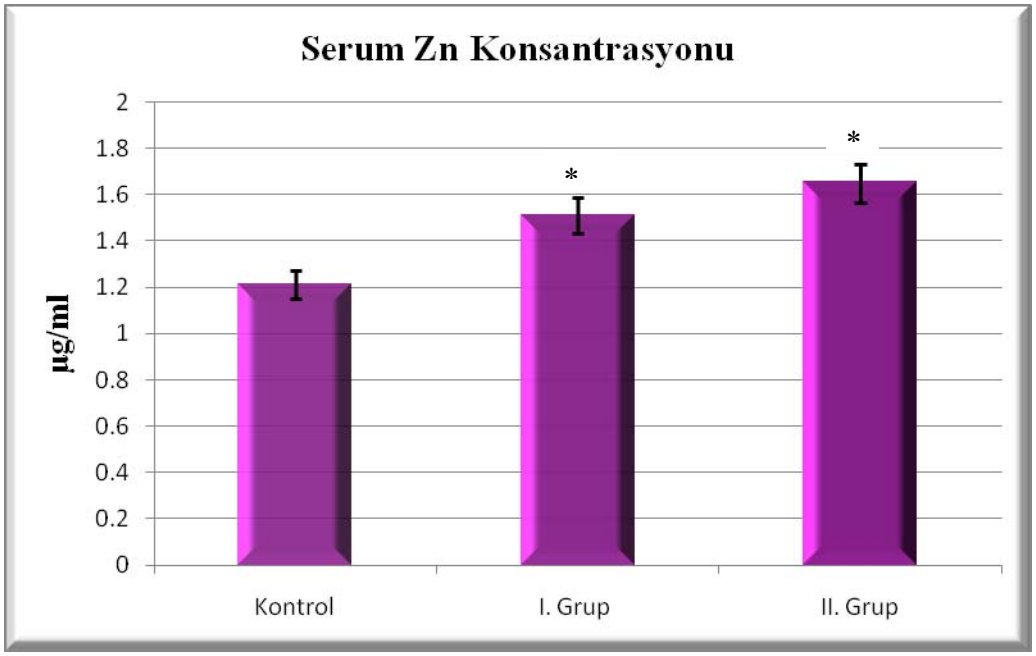
Karaciğer dokusunda ölçülen Zn konsantrasyonları kontrol grubunda 25,87±5,07 $\mu g\backslash g_{doku}$, I. grupta 26,41±3,20 $\mu g/g_{doku}$, II. grupta 30,74±3,03 $\mu g/g_{doku}$ olarak tespit edildi. Kontrol grubu karaciğer dokularındaki Zn konsantrasyonlarının deney gruplarının benzer doku değerleri ile karşılaştırılmasında I. grup ile anlamlı bir fark olmadığı ancak II. grupu karaciğer dokusu Zn değerlerinin anlamlı ($p<0,05$) olarak arttığı tespit edildi (Tablo 4-2, Şekil 4-2).

Zn'ya maruz bırakılan I. grup hayvanlarının böbrek dokularındaki Zn konsantrasyonlarının (31,11±3,13 $\mu g/g_{doku}$) kontrol grubu değerleri (26,56±4,17 $\mu g/g_{doku}$) ile karşılaştırılmasında anlamlı bir artış gözlenmezken, II. grup böbrek dokularındaki Zn değerlerinin (33,48±5,63 $\mu g/g_{doku}$) artışının anlamlı ($p<0,05$) olduğu tespit edildi (Tablo 4-3, Şekil 4-3).

Tablo 4-1: Kontrol ve deney gruplarının serumlarında ölçülen Zn konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD).

PARAMETRE	KONTROL GRUBU (n=8)	I.GRUP (n=8)	II. GRUP (n=8)
ÇİNKO (µg/ml)	1,21 ± 0,11	1,51 ± 0,22*	1,65 ± 0,36*

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*



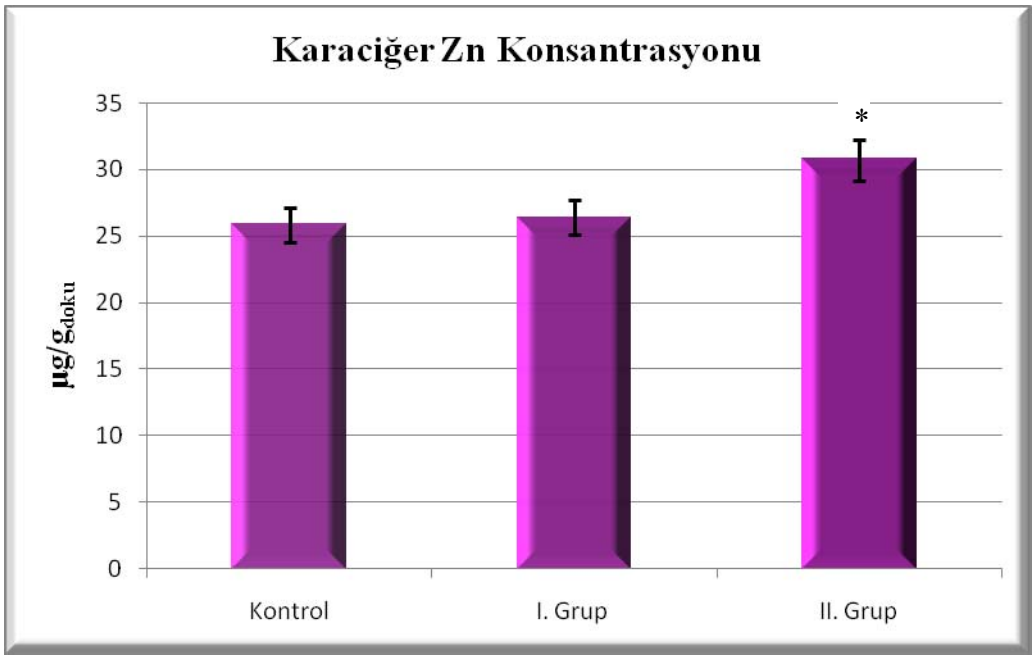
Şekil 4-1: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun serumlarındaki Zn konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi.
(Dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*

Tablo 4-2: Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokularında ölçülen Zn konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD).

PARAMETRE	KONTROL GRUBU (n=8)	I. GRUP (n=8)	II. GRUP (n=8)
ÇİNKO ($\mu g/g_{doku}$)	25,87 ± 5,07	26,41 ± 3,20	30,74 ± 3,03*

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*



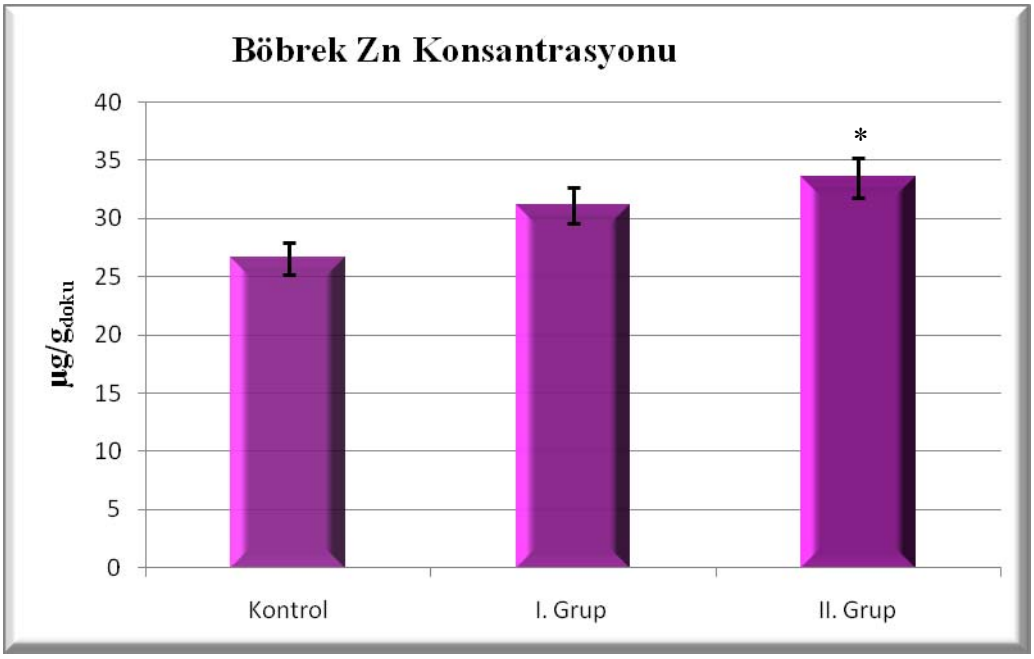
Şekil 4-2: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun karaciğer dokularındaki Zn konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi. (Dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*

Tablo 4-3: Kontrol ve deney gruplarının böbrek dokularında ölçülen Zn konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD).

PARAMETRE	KONTROL GRUBU (n=8)	I. GRUP (n=8)	II. GRUP (n=8)
ÇİNKO ($\mu g/ g_{doku}$)	26,56 ± 4,17	31,11 ± 3,13	33,48 ± 5,63*

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*



Şekil 4-3: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun böbrek dokularındaki Zn konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi.
(Dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*

4.2. Dokulardaki MT konsantrasyonları

Araştırmamızda kullanılan tüm deney hayvanlarının karaciğer ve böbrek dokularının homojenetlarında ve de serumlarında ELISA yöntemi ile MT konsantrasyonları saptandı. Her gruptaki değerlerin kendi içinde ortalama ve standart sapmaları hesaplandı. Ayrıca her bir doku için kontrol grubu ve deney grupları arasında istatistiksel değerlendirmeler yapıldı.

Deney hayvanlarının serumdaki MT konsantrasyonu kontrol grubunda 0,43±0,05 ng/ml, I. grupta 0,52±0,08 ng/ml, II. grupta 0,54±0,03 ng/ml olarak ölçüldü. Deney grupları ile kontrol grubunun ölçülen MT konsantrasyonlarının istatistiksel karşılaştırılmasında her iki deney grubundaki artışın anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı (Tablo 4-4, Şekil 4-4).

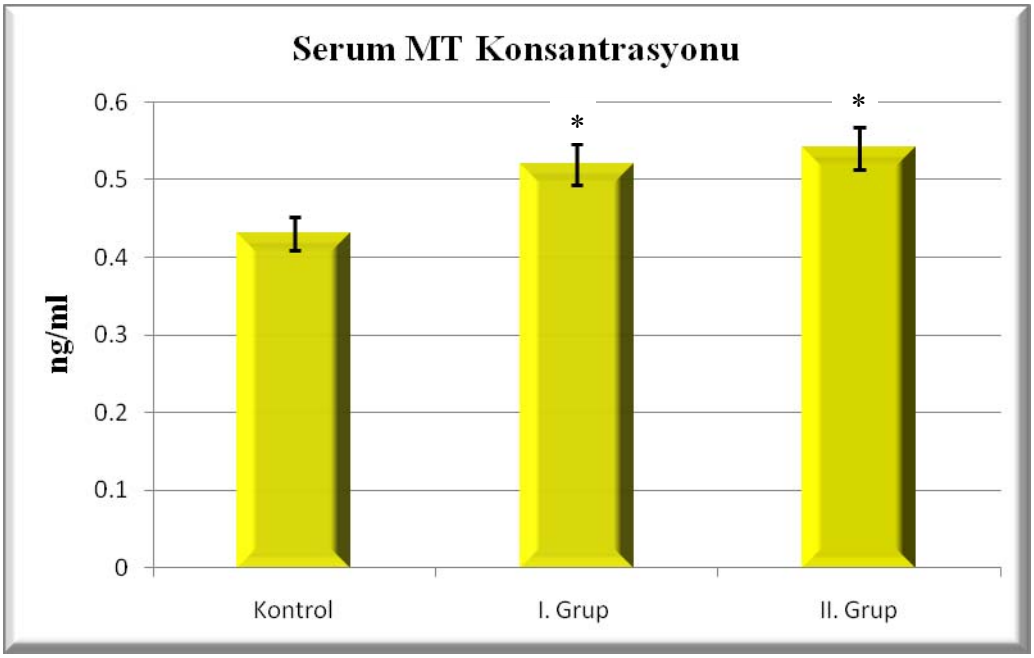
Karaciğer doku homojenatlarında MT konsantrasyonu kontrol grubunda 39,16±11,83 ng/g_{doku} olarak ölçülürken ve II. grupta 62,57±14,87 ng/g_{doku} olarak ölçüldü. II. gruptaki MT değerinin artışının kontrol grubuyla istatistiksel karşılaştırılmasında II. gruptaki artışın anlamlı ($p<0,01$) olduğu saptandı (Tablo 4-5, Şekil 4-5). I. grup karaciğer MT konsantrasyonları ise ELISA kit plate kuyucuk yetersizliğinden dolayı ölçülemedi.

Zn katkılı olarak beslenen deney gruplarının böbreklerindeki MT konsantrasyonları (I. grupta 1801,15±167,80 ng/g_{doku}, II. grupta 1895,59±138,22 ng/g_{doku}) ile kontrol grubunun MT konsantrasyonları (1707,58±152,07 ng/g_{doku}) karşılaştırıldığında her iki grupta da matematiksel artış görüldü. Fakat sadece II. gruptaki artışın anlamlı ($p<0,05$) olduğu tespit edildi (Tablo 4-6, Şekil 4-6).

Tablo 4-4: Kontrol ve deney gruplarının serumlarında ölçülen MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD).

PARAMETRE	KONTROL GRUBU (n=8)	I. GRUP (n=8)	II. GRUP (n=8)
MT (ng/ml)	0,43 ± 0,05	0,52 ± 0,08*	0,54 ± 0,03*

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*



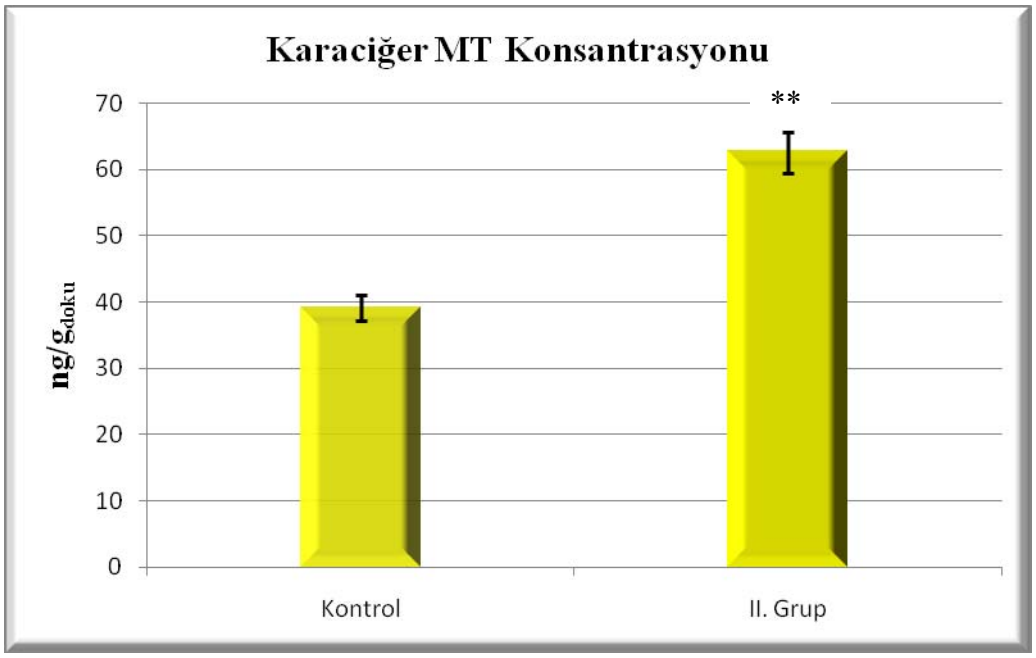
Şekil 4-4: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun serum MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi.
(Dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*

Tablo 4-5: Kontrol ve deney grubunun karaciğer dokularında ölçülen MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD).

PARAMETRE	KONTROL GRUBU (n=8)	II. GRUP (n=8)
MT (ng/g_{doku})	39,16 ± 11,83	62,57 ± 14,87**

*(**) Kontrol ve deney grubunun karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (**p<0,01).*



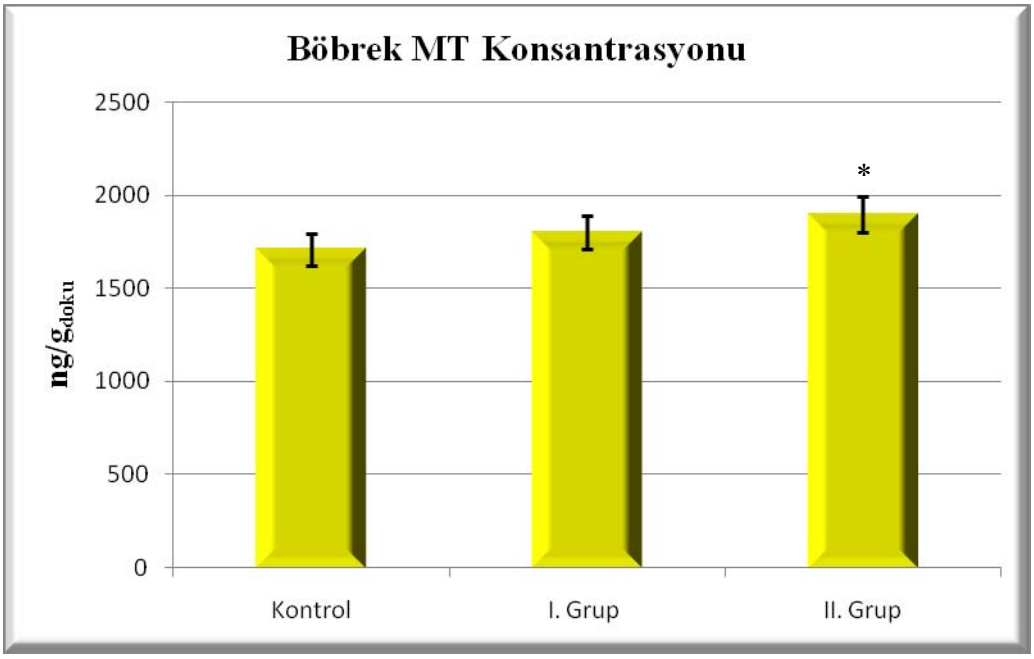
Şekil 4-5: Zn katkılı içme suyu verilen II. grup ile kontrol grubunun ortalama karaciğer MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi.
(Dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

*(**) Kontrol ve deney grubunun karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (**p<0,01).*

Tablo 4-6: Kontrol ve deney gruplarının böbrek dokularında ölçülen MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD).

PARAMETRE	KONTROL GRUBU (n=8)	I. GRUP (n=8)	II. GRUP (n=8)
MT (ng/g_{doku})	1707,58 ± 152,07	1801,15 ± 167,80	1895,59 ± 138,22*

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*



Şekil 4-6: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun böbrek MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi.
(Dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*

4.3. Dokulardaki Zn-MT konsantrasyonları

Çalışmada Zn katkılı olarak beslenen deney grupları ve kontrol grubunun serumlarında ve karaciğer, böbrek homojenatlarında Zn-MT değerleri tespit edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda deney gruplarının kontrol grubuyla istatistiksel karşılaştırılması yapıldı.

Deney hayvanlarının serumlarındaki Zn-MT konsantrasyonu kontrol grubunda 0,25±0,02 ng/ml, I. grupta 0,34±0,05 ng/ml, II. grupta 0,28±0,02 ng/ml olarak ölçüldü. Deney grupları ile kontrol grubunun serumda ölçülen Zn-MT konsantrasyonlarının istatistiksel karşılaştırılmasında her iki deney grubundaki artışın anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı (Tablo 4-7, Şekil 4-7).

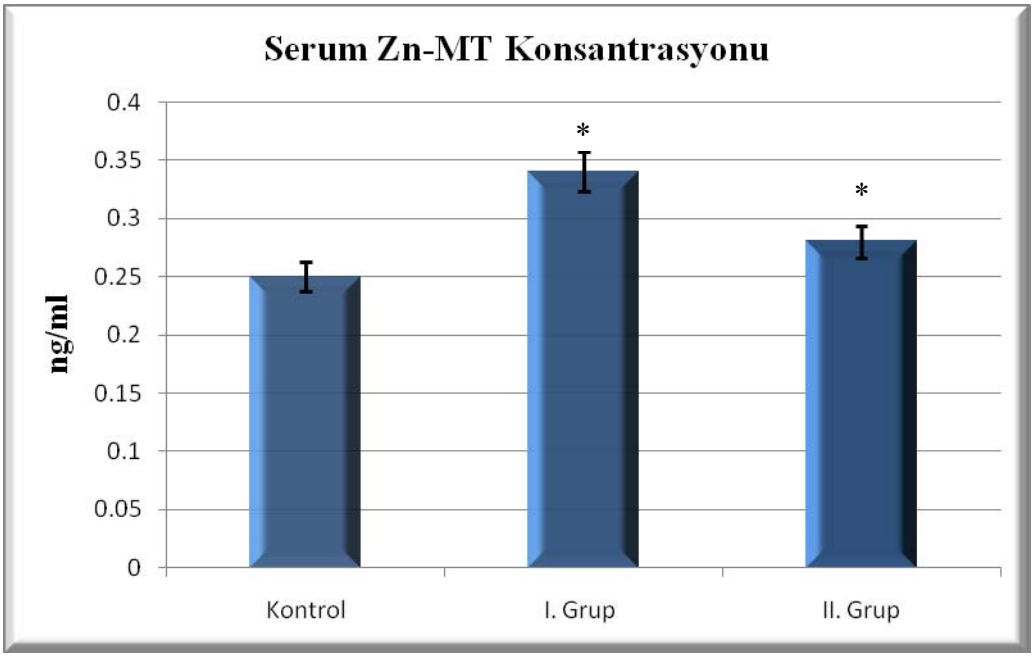
Zn'ya maruz bırakılan deney gruplarının karaciğer dokularında Zn-MT konsantrasyonu I. grupta 25,97±8,04 ng/g_{doku}, II. grupta 37,29±12,44 ng/g_{doku} olarak tespit edilirken, kontrol grubunda 20,86±6,49 ng/g_{doku} olarak ölçüldü. Deney grupları ile kontrol grubunun Zn-MT değerlerinin istatistiksel karşılaştırılmasında sadece II. gruptaki artışın anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı (Tablo 4-8, Şekil 4-8).

Deney gruplarının böbrek doku homojenatlarındaki Zn-MT konsantrasyonlarının (I. grupta 43,07±17,01 ng/g_{doku}, II. grupta 63,26±16,18 ng/g_{doku}) kontrol grubu ile (38±8,52 ng/g_{doku}) istatistiksel karşılaştırılmasında II. gruptaki artışın anlamlı ($p<0,01$) olduğu saptandı (Tablo 4-9, Şekil 4-9).

Tablo 4-7: Kontrol ve deney gruplarının serumlarında ölçülen Zn-MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD).

PARAMETRE	KONTROL GRUBU (n=8)	I. GRUP (n=8)	II. GRUP (n=8)
Zn-MT (ng/ml)	0,25 ± 0,02	0,34 ± 0,05*	0,28 ± 0,02*

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*



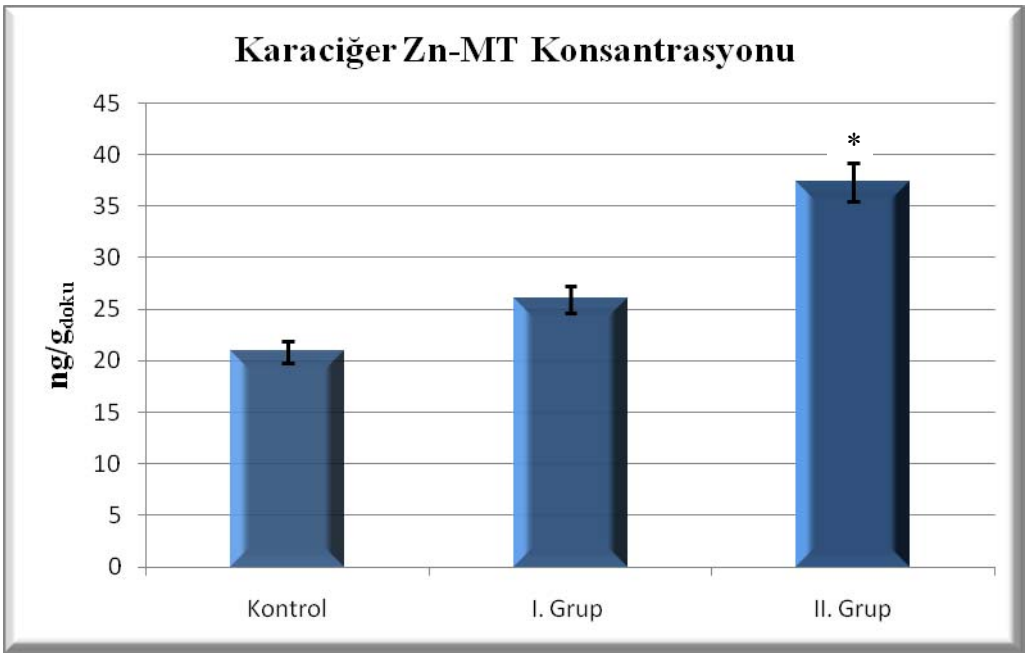
Şekil 4-7: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun serum Zn-MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi.
(Dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*

Tablo 4-8: Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokularında ölçülen Zn-MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD).

PARAMETRE	KONTROL GRUBU (n=8)	I. GRUP (n=8)	II. GRUP (n=8)
Zn-MT (ng/g_{doku})	20,86 ± 6,49	25,97 ± 8,04	37,29 ± 12,44*

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*



Şekil 4-8: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun karaciğer Zn-MT konsantrasyonlarının konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi.

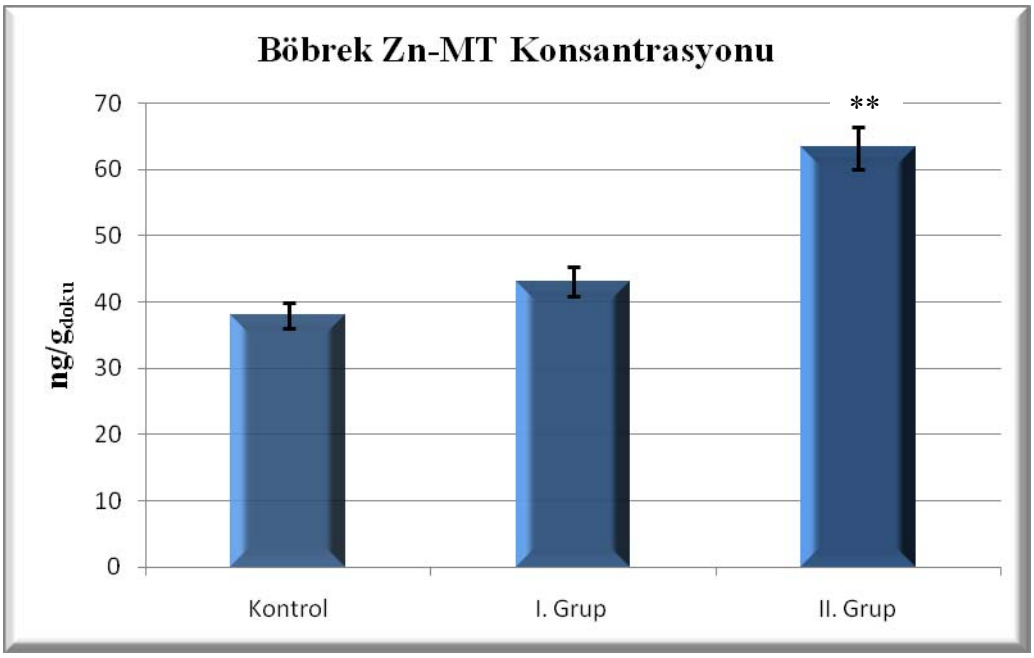
(Dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

*(*) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*p<0,05).*

Tablo 4-9: Kontrol ve deney gruplarının böbrek dokularında ölçülen Zn-MT konsantrasyonlarının ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD).

PARAMETRE	KONTROL GRUBU (n=8)	I. GRUP (n=8)	II. GRUP (n=8)
Zn-MT (ng/g_{doku})	38±8,52	43,07±17,01	63,26±16,18**

*(**) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (**p<0,01).*



Şekil 4-9: Farklı seviyelerde Zn katkılı içme suyu verilen I. ve II. gruplar ile kontrol grubunun böbrek Zn-MT konsantrasyonlarının grafiksel gösterilmesi.
(Dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

*(**) Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (**p<0,01).*

5. TARTIŞMA

MT düşük molekül ağırlığa sahip, sisteince zengin bir protein olup hücresel homeostazın sağlanmasında pek çok rol oynar. MT, esansiyel (Zn, Cu, Se) ve esansiyel olmayan (Cd, Hg, Ag) ağır metelleri tiol grupları aracılığıyla bağlama yeteneğine sahiptir (50). MT sentezi esansiyel ve toksik ağır metaller, oksidatif stres, glukokortikoid, anti kanser ajanları, doku yaralanmaları ve sıcaklık gibi çeşitli hücresel streslerin etkisine bağlı olarak artar. MT hem intraselüler hem de ekstraselüler sıvıda bulunur ayrıca MT'nin fonksiyonu lokalize olduğu yere bağlıdır. Ekstraselüler sıvıda bulunan MT güçlü antioksidan özelliğine sahiptir ve dokular arası ağır metal dağılımını düzenler. Hücre poliferasyonu sırasında ise MT'in çekirdeğe geçişi söz konusudur. Metallerin bağlandığı önemli bir protein olan MT geniş bir doku yelpazesinde değişik konsantrasyonlarda bulunur. Özellikle karaciğer, böbrek, bağırsak ve pankreasta bol miktarda bulunmaktadır (2,14,38,45,61). Bu proteinin dokulardaki miktarı dokunun özellikle Zn ve Cu konsantrasyonlarına bağlı olduğu gibi patolojik koşullara göre de değişiklik göstermektedir (38).

Yapılan çalışmalar biyolojik sistemlerde MT proteinlerinin Zn'nun alınmasında, taşınmasında ve regülasyonunda önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. MT'in Zn bağlayan bölgeleri tipik olarak sisteinden zengindir ve sıklıkla üç ve dört Zn iyonu bağlar. MT, Zn bağlaması ve serbestleştirmesi ile Zn'nun hücre içi homeostazını düzenler. Zn belirli transkripsiyon faktörlerinin (MTF-1 gibi) aktivasyonu için anahtar bir elementtir. Aynı zamanda MT, Zn iyonlarını hücrenin bir bölgesinden diğer bir bölgesine taşır. Hücre içerisinde serbest Zn seviyesi oldukça düşüktür. Bu sebeple intraselüler ortamda bulunan serbest Zn hücreye girdiği zaman apo-MT tarafından tutunarak MT oluşturur ve hücrenin gerekli bir diğer bölgesinde MT'den ayrılır. Buna bağlı olarak apo-MT ve Zn-MT çifti hücresel Zn sinyal sisteminin de anahtar proteinidir (8,39).

Diyet ile alınan Zn'nun emilimi ve MT sentezi üzerine etkisi Menard ve ark. (62) tarafından araştırılmıştır. Bu ilişki özet olarak: 1) Zn ince barsak mukozal hücrelerine girer, 2) Hücre içi Zn seviyesinin artmasıyla MT oluşumu için uyarı oluşur, 3) MT mRNA transkripsiyonu gerçekleşir, 4) Apo-MT oluşumu gerçekleşir, 5) Hücre

içindeki serbest Zn iyonları ya apo-MT'e bağlanır ya da ince barsak mukozal hücresinden taşınarak plazmada Zn taşıyıcı proteinlere bağlanır.

MT'in oluşumu ve önemi üzerindeki çalışmalar MT'i indüklediği bilinen kimyasallarla ya da metallere maruz bırakılan hayvanlar ile yürütülmektedir (2,37).

Çalışmamızda Zn'ya maruz bırakılan sıçanların serum, karaciğer ve böbrek dokularındaki Zn birikiminin ve buna bağlı olarak Zn-MT ve total MT konsantrasyonlarındaki değişimi araştırdık. Bu amaçla kontrol ve deney gruplarını oluşturan yetişkin Wistar Albino sıçanlar kullanıldı. Deney süresince her üç grup normal yem ile beslenirken kontrol grubuna içme suyu olarak deiyonize su verildi. Deney gruplarından birincisine içerisinde 100 mg/l Zn ve ikinci deney grubuna 200 mg/l Zn bulunan deiyonize su içme suyu olarak verildi.

Çalışmamızda deney gruplarının serumlarında ölçülen Zn değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her iki gruptaki artışın anlamlı ($p<0.05$) olduğu tespit edildi. Deney grupları serumlarında ölçülen MT değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0.05$) artış görüldü.

Karaciğer ve böbrek dokusunda ölçülen Zn değerlerinin gruplar arası yapılan değerlendirmede; I. grup ve kontrol grubu arasında matematiksel bir artış olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık görülmedi. II. grup ve kontrol grubu doku Zn değerleri arasında $p<0.05$ düzeyinde anlamlılık tespit edildi.

Böbrek dokusu MT seviyeleri arasında yapılan karşılaştırmada; I. grup ile kontrol grubu arasında matematiksel olarak artış görülse de istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. II. grup ile kontrol grubu arasında anlamlı ($p<0.05$) bir artış olduğu görüldü. Karaciğer MT değerlerine bakıldığında ise II. grup ile kontrol grubu arasında $p<0.01$ düzeyinde anlamlılık tespit edildi.

Maitani ile ark.(63) ve Szczurek ile ark. (64) kemirgen ve invitro modellerle yaptıkları immunohistokimyasal çalışmalarda böbrek MT yoğunluğunun diyetle alınan Zn ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Jamieson ve ark. (65) yaptıkları çalışmada diyetlerine Zn eklenen (300 mg/kg $ZnCO_3$) ratların böbreklerindeki MT ekspresyonunun Zn yetersiz (8mg/kg) diyetle beslenenlerden daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Szczurek ve ark. (66) sıçanlarda yaptığı deneysel çalışmada diyet ile alınan Zn'ya bağlı olarak böbrek dokusunda oluşan MT konsantrasyonuna bakılmıştır. Zn'dan yetersiz diyet (<1mgZn/kg) ile beslenen grupta böbrek dokusunda Zn ve MT

konsantrasyonlarında kontrollere göre azalma tespit edilmiştir. Yetersiz Zn ile beslenen diğer bir gruba Zn katkılı (30 mgZn/kg) yem verildiğinde böbrek Zn ve MT konsantrasyonunun kontrol gruplarınınki ile eşdeğer olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak diyet ile alınan Zn'nun böbrek MT konsantrasyonu ile ilişkili olduğu ve MT'in böbrek Zn konsantrasyonu ile ilgili olduğu gösterilmiştir.

Bu bulgular araştırmamızda, Zn alımına bağlı olarak böbrek dokusundaki Zn ve MT konsantrasyonlarındaki artış ile paralellik göstermektedir.

Hücre içerisinde Zn homeostazı oldukça sıkı kontrol edilir ve dolayısıyla serbest Zn iyonu oldukça sınırlıdır (67,16). Karaciğer hücrelerinde de Zn hareketi oldukça komplekstir ve Zn taşıyıcı proteinler ile düzenlenir. Karaciğer kültür hücrelerinde yapılan çalışmada Zn'nun başlıca depolanması MT'lere bağlanarak olduğu gösterilmiştir. Hücre içerisinde Zn konsantrasyonu MT ve apo-MT sistemi ile kontrol edilir. Protein-protein etkileşmesi için gerekli olan Zn, Zn-MT'den serbestleşir (68). Bundan dolayı Zn'ya bağlı MT ekspresyonu önemli hücresel aktivitelerde kritik öneme sahip olduğu Davis ve ark. tarafından gösterilmiştir (38).

Çalışmamızda ölçülen Zn-MT konsantrasyonlarına bakılacak olursa; her iki grubun serum değerlerinin artışı kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Fakat I. grup Zn-MT değerlerinin II. gruptan fazla olduğu tespit edilmiştir. Karaciğer ve böbrekte kontrol değerleri ile karşılaştırılan I. grupta anlamlı artış görülmemiştir. II. grubun kontrol grubuyla karşılaştırılmasında ise karaciğerde $p<0.05$ düzeyinde, böbrekte $p<0.01$ düzeyinde anlamlılık tespit edilmiştir.

Ajjimaporn ve ark. (69) santral sinir sistemi bozukluklarında kullanılan metamfetamin maddesinin nöronlarda oluşturduğu reaktif oksijen partiküllerine karşı Zn ve MT'in koruyucu etkisini kültür hücrelerinde araştırmışlardır. 25, 50, 75µM $ZnCl_2$ verilerek yapılan çalışmada en fazla MT artışının 50µM $ZnCl_2$'e maruz kalan hücrelerde görüldüğü saptanmıştır. Bu sonuçlar serum Zn-MT sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir.

Demoor ve ark.(70) tümör hücre kültüründe yaptıkları çalışmada (20-100 µM $ZnCl_2$) Zn'ya bağlı olarak MT ve Zn-MT konsantrasyonlarının arttığını göstermişleridir.

Saito ve ark. (71) yaptıkları çalışmada gümüş (Ag) katkılı olarak beslenen ratların karaciğerlerinde biriken Zn ve MT miktarları arasındaki ilişki incelenmiştir. Ag katkılı olarak beslenen sıçanların karaciğerlerinde bulunan Zn miktarlarında %60 oranında bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu durum mevcut Zn-MT'den Zn

serbestleşerek serbest radikallere karşı hücresel antioksidan savunma sistemine katkı sağladığı ve hücre membranında lipid peroksidasyonunu engellediği ortaya koymuştur. Dolayısıyla Zn-MT'in Ag toksisitesine karşı dokuları koruyucu öneme sahip olduğu belirtilmektedir.

Takeda ve ark. (72) karaciğer hücrelerinde tümör oluşturulan farelere intravenöz olarak enjekte edilen ($^{65}ZnCl_2$ 92.5 MBq) Zn'nun karaciğerde Zn artışına bağlı olarak MT miktarını arttırdığı göstermiştir.α

Yang ve ark. (73) diabet oluşturulan sıçanlarda yaptıkları araştırmalarda Zn uygulamasının karaciğer böbrek ve pankreasta hem Zn'nun hem MT'in arttığını dolayısıyla lipid peroksidasyonun anlamlı olarak azaldığını ileri sürmektedirler.

Deneysel Wilson modeli oluşturulan ratlarda oral olarak günlük 80 mg çinko asetat uygulaması sonucunda sıçanların karaciğer ve böbrek dokusunda Zn ve MT seviyesinin arttığı, dolayısıyla Zn alımıyla artan MT'in oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (74).

Bolkent ve ark. (75) alkol alımına bağlı olarak karaciğer hasarı oluşan sıçanlara gavaj yoluyla uygulanan günlük 100mg/kg $ZnSO_4$' ın karaciğer dokusu MT konsantrasyonunda artışa neden olarak koruyucu etki sağladığını belirtmişlerdir.

Diyabet modeli oluşturulan sıçanlara günaşırı intraperitoneal olarak 5 mg/kg $ZnSO_4$ verilmesinin histokimyasal olarak tespit edilen kardiyak MT ekspresyonunda önemli bir artışın diyabetik kardiyomiyopatiyi önlediği belirtilmektedir (76).

Antikanser ilaçlarının (daunorubisin) oluşturduğu kardiotoksisite ve hepatoksisiteye karşı Ali ve ark. yaptıkları çalışmada enjeksiyonla verilen günlük 20 mg/kg Zn'nun artan MT seviyesine bağlı olarak sağladığı koruyucu etki hayvan modelleri üzerinde gösterilmiştir (77).

Yukarıda belirtildiği gibi Zn'nun yararlı etkilerinden dolayı farklı medikal alanlarda tedavide kullanım amacı ile pek çok çalışmalar yürütülmektedir. Patoloji oluşturulan deneysel hayvan modellemelerinde çok farklı dozlarda ve değişik yöntemler ile verilen çinkonun önemi ve rolünü belirten araştırmalar vardır. Bu çalışmalarda, verilen doza bağlı olarak farklı dokularda Zn birikimi ile birlikte MT konsantrasyonundaki değişiminin de önemli olduğu gösterilmiştir. Zn'nun yararlı etkilerindeki en önemli faktör Zn alımına bağlı olarak dokularda MT sentezinin artmasıdır.

Literatür bilgilerine göre Zn'ya bağlı olarak MT'in sentezi arasındaki ilişkinin tamamıyla belirlenmesinin MT'in tedavi amaçlı kullanılmasına imkan sağlayacağı vurgulanmaktadır (2,38).

Çalışmamızda Zn'ya maruz bırakılan sıçanların serum, karaciğer ve böbrek dokularındaki Zn birikimini ve buna bağlı olarak Zn-MT ve total MT konsantrasyonlarındaki değişimin sonuçlarına göre içme suyu ile verilen her iki doz Zn'da serumda MT ve Zn-MT değerlerini anlamlı olarak arttırmaktadır. Fakat, uyguladığımız düşük doz Zn'nun karaciğer ve böbrek dokularında Zn-MT ve total MT'in ekspresyonuna anlamlı olarak etkisi olmadığı anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak Zn'ya maruz bırakılan sıçanların dokularındaki Zn konsantrasyon artışına MT ve Zn-MT artışı eşlik etmiştir. Zn'nun doku MT ekspresyonunda etkili olduğunu söylemekle beraber, anlamlı bir artış için verilen Zn dozunun önemli olduğu görülmektedir.

Bundan dolayı dokularda MT ekspresyonu üzerinde anlamlı artışı sağlayacak Zn dozunun ileriki araştırmalarla saptanması, tedavi amaçlı verilecek Zn dozunun belirlenmesine katkı sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Maret W., Sandstead H.H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2006; 20: 3–18.
2. Sato M., Kondoh M. Recent Studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Thoku Journal Experimental Medicine.* 2002; 196: 9-22.
3. Black M.M. Zinc deficiency and child development. *American Journal of Clinical Nutrition.* 1998; 68: 464-469.
4. Fraker P.J.,King L.E., Laako T.,Volmer T.L. The dynamic link between the integrity of immune system and zinc status. *The Journal of Nutrition.* 2000; 130:1399-1406.
5. Goto T., Komai M., Suzuki H., Furukawa Y. Long-term zinc deficiency decreases taste sensitivity in rats. *The Journal of Nutrition.* 2001;131: 305–310.
6. Gong H., Amemiya T. Optic nerve changes in zinc-defcient rats. *Experimental Eye Research.* 2001; 72: 363-369.
7. Sandstead H.H. Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *The Journal of Nutrition.* 2000; 130: 347–349.
8. Tapiero H., Tew K.D. Trace elements in human physiology and pathology:zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2003; 57: 399–41.
9. McMahon R.J., Cousins R.J. Mammalian zinc transporters. *The Journal of Nutrition.* 1998;128: 667–670.
10. Gaither L.A., Eide D.J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals*. 2001; 14: 251–270.
11. Harris E. D. Cellular transporters for zinc. *Nutrition Reviews.* 2002;60(4): 121-124.
12. Andrews G.K. Regulation of metallothionein gene expression. *Progress in Food & Nutrition Science.* 1990; 14(2-3): 193-258.
13. Vašák M. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2005; 19: 13–17.

14. Carpenè E., Andreani G., Isani G. Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2007; 21 (S1): 35–39.

15. Suzuki K. T., Someya A., Komada Y., Ogra Y. Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2002; 88: 173–182.

16. Faa G., Nurchi V. M., Ravarino A., Fanni D., Nemolato S., Gerosa C., Eyken P. V., Geboes K. Zinc in gastrointestinal and liver disease. *Coordination Chemistry Reviews*. 2008; 252: 1257–1269.

17. Andrews G.K. Cellular zinc sensors:MTF-1 regulation of gene expression. *BioMetals*. 2001; 14: 223–237.

18. Kiningham K., Kasarskis E. Antioxidant function of metallothioneins. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 1998;11:219–226.

19. Cai L., Satoh M., Tohyama C., Cherian M.G. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology*. 1999;132: 85–98.

20. Halsted J.A., Smith J.C., Irwin M.I. A conspectus of research on zinc requirements of man. *The Journal of Nutrition.* 1974; 104(3): 345-378.

21. U.S. Department of Health and Human Services. Toxicological Profile For Zinc. Atlanta, Georgia 2005

22. Gibson R.S. Zinc nutrition in developing countries. *Nutrition Research Reviews*. 1994; 7: 151-173.

23. Hunt J.R. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2003;78 :633–639.

24. King J.C., Shames D.M., Leslie R. Woodhouse. Zinc homeostasis in humans. *The Journal of Nutrition.* 2000; 130: 1360-1366.

25. Özçelik D. Bakır, çinko, kurşun ve kadmiyum katkılı besinlerle beslenen civcivlerin kan, serum ve değişik dokularındaki element konsantrasyonlarının ölçülmesi ve besi performansına etkilerinin saptanması. *İ.Ü. CerrahpaşaTıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Doktora Tezi*, İstanbul1998.

26. Belgemen T., Akar N. Çinkonu yaşamsal fonksiyonları ve çinko metabolizması ile ilişkili genler.*Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 2004; 57(3): 161-166.

27. Lönnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption. *The Journal of Nutrition.* 2000; 130: 1378-1383.

28. Sandstead H.H., Smith J.C. Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations. *The Journal of Nutrition.* 1996; 126: 2410-2418.

29. Lönnerdal B., Cederblad A., Davidson L., Sandström B. The effect of individual components of soy formula and cows'milk formula on zinc bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition.* 1984;40:1064-1070.

30. Kordas K., Stoltzfus R.J. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *The Journal of Nutrition.* 2004; 134: 1295-1298.

31. Krittaphol W, Bailey KB, Pongcharoen T, Winichagoon P, Thomson C, Gibson RS. Primary school children from northeast Thailand are not at risk of selenium deficiency. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.* 2006;15(4):474-81.

32. Rink L., Haase H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends in Immunology.* 2006; 28(1): 1-4.

33. Beyersmann D. Homeostasis and cellular functions of zinc. *Werkstofftech*. 2002;33:764-769.

34. Formigari A., Irato P., Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 2007; 146 (Part C) 443–459.

35. Grüngreiff K. Zinc in liver disease. *Journal of Trace Elements Experimental Medicine.* 2002; 15: 67-78.

36. Nordberg M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta.* 1998; 46: 243-254.

37. Klassen C.D., Liu J., Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 1999; 39: 267-294.

38. Davis S. R., Cousins R.J. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function. *The Journal of Nutrition.* 2000; 130(5); 1085-1088.

39. Rigby K.E., Stillman M.J.Structural studies of metal-free metallothionein. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004; 325:1271-1278.

40. Fischer E.H., Davie E.W. Recent excitement regarding metallothionein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998; 95; 3333–3334.

41. 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. *Toxicology Letters.* 2003;142: 11-/18.

42. Hidalgo J., Aschner M., Zatta P., Vašák M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Research Bulletin.* 2001;55(2): 133-145.

43. Klaassen C.D., Choudhuri S., McKim J.M.,Lehman-McKeeman L.D., Kershaw W.C. In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. *Environ Health Perspect.* 1994; 102(3):141-146.

44. Wong K.L., Klaassen C.D. Isolation and characterization of metallothionein which is highly concentrated in newborn rat liver. *The Journal of Biological Chemistry.* 1979; 254(24): 12399-12403.

45. Tsujikawa K., Imai T., Kakutani M., Kayamori Y., MimuraT., Otaki N., Kimura M., Fukuyama R., Shimizu N. Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. *Federation of European Biochemical Societies.* 1991; 283(2): 239-242.

46. Woo E.S., Monks A., Watkins S.C., Wang A.S., Lazo J.S. Diversity of metallothionein content and subcellular localization in the National Cancer Institute tumor panel. *Cancer Chemother Pharmacol.*1997; 41: 61-68.

47. Kang Y.J. The antioxidant function of metallothionein in the heart. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine.* 1999; 222: 263-273.

48. Klassen R.B., Crenshaw K., Kozyraki R., Verroust P.J., Tio L., Atrian S., Allen P.L., Hammond T.G. Megalin mediates renal uptake of heavy metal metallothionein complexes. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 2004; 287: 393-403.

49. Klassen C.D., Liu J., Diwan B.A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2009; 238: 215-220.

50. Park J.D., Liu Y., Klaassen C.D. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology*. 2001; 163: 93–100.

51. Peixoto N.C., Serafim M.A., Flores E.M.M., Bebianno M.J., Pereira M.E. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. *Life Sciences.* 2007; 81: 1264–1271.

52. Brandão R., Santos F.W., Farina M., Zeni G., Bohrer D., Rocha J.B.T., Nogueira C.W. Antioxidants and metallothionein levels in mercury-treated mice. *Cell Biology and Toxicology.* 2006; 22: 429–438.

53. Ghoshal K., Majumder S., Li Z., Bray T.M., Jacob S.T. Transcriptional induction of metallothionein-I and -II genes in the livers of Cu,Zn-superoxide dismutase knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1999; 264: 735–742.

54. Sato M., Sasaki M., Oguro T., Kuroiwa Y., Yoshida T. Induction of metallothionein synthesis by glutathione depletion after trans- and cis-stilbene oxide administration in rats. *Chemico-Biological Interactions.* 1995;98(1): 15-25.

55. Nordberg M. Trace elements and metallothionein related to geo-environment. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine.* 2000; 13: 97-104.

56. Meloni G., Faller P., Vašák M. Redox silencing of copper in metal-linked neurodegenerative disorders. *Journal of Biological Chemistry.* 2007; 282(22): 16068-16078, 2007.

57. Mocchegiani E., Giacconi R., Muti E., Cipriano C., Costarelli L., Tesei S., Gasparini N., Malavolta M. Zinc-bound metallothioneins and immune plasticity: lessons from very old mice and humans. *Immunity & Ageing.* 2007; 4:7.

58. Yu W.H., Lukiw W.J., Bergeron C., Niznik H.B., Fraser P.E. Metallothionein III is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Research.* 2001; 894: 37–45.

59. Richarz A.-N., Brätter P. Speciation analysis of trace elements in the brains of individuals with Alzheimer's disease with special emphasis on metallothioneins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2002;372 :412–417.

60. Méplan C., Richard M.-J., Hainaut P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene.* 2000; 19: 5227 – 5236.

61. Kubo K., Sakita Y., Minami T. Effect of heat treatment on metallothionein isoforms using capillary zone electrophoresis. *Analusis.* 2000;28(5) :366-369.

62. Menard M.P., McCormick C.C., Cousins R.J. Regulation of intestinal metallothionein biosynthesis in rats by dietary zinc. *The Journal of Nutrition.* 1981; 111: 1353-1361.

63. Maitani T., Watahiki A., Suzuki K.T. Induction of metallothionein after lead administration by three injection routes in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1986; 83: 211-217.

64. Szczurek E.I., Bjornsson C.S., Taylor C.G. Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats. *The Journal of Nutrition.* 2001; 131: 2132 - 2138.

65. Jamieson J.A., Stringer D.M., Zahradka P., Taylor C.G. Dietary zinc attenuates renal lead deposition but metallothionein is not directly involved. Biometals. 2008; 21: 29–40.

66. Szczurek E.I., Bjornsson C.S., Noto A.D., Taylor C.G. Renal metallothionein responds rapidly and site specifically to zinc repletion in growing rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2009; 23: 176–182.

67. Outten C.E., O′Halloran T.V. Metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science.* 2001; 292: 2488.

68. Feng W., Cai J., Pierce W.M., Franklin R.B., Maret W., Benz F.W., Kang Y.J. Metallothionein transfers zinc to mitochondrial aconitase through a direct interaction in mouse hearts. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2005; 332: 853-858.

69. Ajjimaporn A., Swinscoe J., Shavali S., Govitrapong P., Ebadi M. Metallothionein provides zinc-mediated protective effects against methamphetamine toxicity in SK-N-SH cells. *Brain Research Bulletin.* 2005; 67: 466–475.

70. DeMoor J. M., Kennette W.A., Collins O.M., Koropatnick J. Zinc-metallothionein levels are correlated with enhanced glucocorticoid responsiveness in mouse cells exposed to ZnCl2, HgCl2, and heat shock. *Toxicological Sciences.* 2001; 64: 67–76.

71. Saito S., Kurasaki M., Saito T., Yoshida K. The effect of silver on zinc and copper in liver and metallothionein. *Trace elements and electrolytes.* 2001; 18(4): 186-197.

72. Takeda A., Goto K., Sato T., Tamano H., Okada S. Zinc-specific response in metallothionein induction in liver of tumor-bearing mice. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine.* 1997;10:243-248.

73. Yang J., Cherian M.G. Protective effects of metallothionein on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences.* 1994; 55(1): 43-51.

74. Medici V., Santon A., Sturniolo G.C., D'Inca`R., Giannetto S., Albergoni V., Irato P. Metallothionein and antioxidant enzymes in Long-Evans Cinnamon rats treated with zinc. *Archives of Toxicology.* 2002; 76: 509–516.

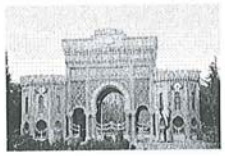
75. Bolkent S., Arda-Pirincci P., Bolkent S., Yanardag R., Tunali S., Yildirim S.. Influence of zinc sulfate intake on acute ethanol-induced liver injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(27): 4345-4351.

76. Wang J., Song Y., Elsherif L., Song Z., G. Zhou, Prabhu S.D., Saari J.T., Cai L. Cardiac metallothionein induction plays the major role in the prevention of diabetic cardiomyopathy by zinc supplementation. *Circulation*. 2006;113:544-554.

77. Ali M.M., Frei E., Straub J., Breuer A., Wiessler M. Induction of metallothionein by zinc protects from daunorubicin toxicity in rats. *Toxicology.* 2002; 179: 85–93.

ETİK KURUL KARARI

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 155 26.11.2008

Sn. Doç. Dr. Derviş Özçelik
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Karar No: 121
Başvuru Tarihi: 11.11.2008

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Yüksek Lisans Öğrencisi Nural Pastacı'ya ait "Diyet ile alınan çinkonun metallothionein seviyesine etkisi" isimli proje Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mehmet KAYA İ. Ü. HADYEK Başkanı	Prof. Dr. Müjdat UYSAL Üye	Prof. Dr. Nuriye AKEV Üye
Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN Üye	Doç. Dr. Alper YILMAZ Üye	Doç. Dr. Mehmet YALTIRIK Üye
Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ Üye	Avukat Safiye ALTUN Üye	Mak. Müh. Seyfettin AVCI Üye

İstanbul Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Vakıf Gureba Caddesi 34280 Şehremini-İSTANBUL
TEL : (0 212) 414 20 00/33375
E mail : deneyhyv@istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	NURAL	**Soyadı**	PASTACI
Doğ.Yeri	İSTANBUL	**Doğ.Tar.**	18.08.1984
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	47737148742
Email	nuralpastaci@hotmail.com	**Tel**	05353258324

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ	2007
Lise	BEYOĞLU ANADOLU LİSESİ	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	55.00	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	77.027	73.844	68.373
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft word	İyi
Microsoft excel	İyi
SPSS	İyi

Katıldığı Bilimsel Etkinlikler

1. XX. Ulusal Biyofizik Kongresi 22-25 Ekim 2008, Mersin.
2. The 2nd International Biophysics and Biotechnology Congress at GAP & 21st National Biophysics Congress 5-9 october 2009, Diyarbakır, Turkey.

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
16-27 Şubat 2009 ,İstanbul

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Yürüyüş yapmak, kitap okumak, müzik dinlemek