

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İSKEMİ - REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN SIÇAN BÖBREK, TESTİS VE KALP DOKULARINDA ÇİNKO SÜLFAT UYGULAMASININ METALLOTİONİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Betül YAZĞAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Abdulkerim Kasım BALTACI

KONYA – 2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İSKEMİ - REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN SIÇAN BÖBREK, TESTİS VE KALP DOKULARINDA ÇİNKO SÜLFAT UYGULAMASININ METALLOTİONİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Betül YAZĞAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Abdulkerim Kasım BALTACI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13102019 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA – 2014

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na;

Betül YAZĞAN tarafından savunulan bu tez çalışması, jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Abdulkerim Kasım BALTACI** İmza
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

Üye: **Prof.Dr. Rasim MOĞULKOÇ** İmza
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

Üye: **Prof. Dr. Nilsel OKUDAN** İmza
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mezuniyet Sonrası Eğitim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca; yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu …… tarih ve …… sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Oktay SARI
Dekan

Önsöz ve Teşekkür

"İskemi – Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçan Böbrek, Testis ve Kalp Dokularında Çinko Sülfat Uygulamasının Metallotionin Düzeyleri Üzerine Etkisi" başlıklı tezimin hazırlanmasında yardımlarını gördüğüm Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr.Mustafa Cihat Avunduk'a ve istatistik analizlerde yardımını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. İsmail Keskin'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY FORMU……..……..ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR ……..……...……...iii
İÇİNDEKİLER……...iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……..……...vi
ŞEKİLLER DİZİNİ…….…….....viii
ÇİZELGELER DİZİNİ……..……..…….ix
1.GİRİŞ……..…….……...…1
1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı…….....3
1.1.1. Testis Dokusunda İskemi Reperfüzyon Hasarı…….....…6
1.1.2. Böbrek Dokusunda İskemi Reperfüzyon Hasarı …….……...…6
1.1.3. Kalp Dokusunda İskemi Reperfüzyon Hasarı…….…....7
1.2. Serbest Radikaller……..……..…...…….....7
1.3. Oksidatif Stres…….....10
1.4. Antioksidanlar……...12
1.5. Çinko…….…13
1.5.1.Çinkonun Biyokimyasal Fonksiyonları …….13
1.5.2.Çinkonun Fizyolojik Sistemlerdeki Etkileri …….....14
1.5.3. Çinkonun Taşınması ve Hücre içi Dengesi……..…….17
1.5.4.Antioksidan Savunmada Çinkonun Önemi…….……...18
1.6. Metallotioninler……..…….…..20
2. GEREÇ VE YÖNTEM…….……..……...…..24
2.1. Deney Hayvanları ……...…….....…….24
2.2. Etik Kurul ……..…..…….25
2.3. Hayvan Gruplarının Oluşturulması……..…….25
2.3.1. Testis Dokularının Elde Edildiği Sıçan Grupları……...…..…….25
2.3.2. Böbrek Dokularının Elde Edildiği Sıçan Grupları……....26
2.3.3. Kalp Dokularının Elde Edildiği Sıçan Grupları…….....…27
2.4. Çinko Sülfat Uygulaması……...……...28
2.5. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü.....29
2.6. Preperatların Fotoğraflanması ve İmmünoreaktivitenin Değerlendirilmesi…..29
2.7. İstatitistiksel Değerlendirmeler……..……..…..33

3. BULGULAR …….....34
3.1. Testis Çalışması Analiz Sonuçları……...……..…….....34
3.1.1. Testis Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları …….....34
3.2. Böbrek Korteks ve Medulla Çalışması Analiz Sonuçları……...……...36
3.2.1. Böbrek Korteks Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları….36
3.2.2. Böbrek Medulla Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları ...37
3.3. Kalp Örneklerinde MT Boyama Analiz Sonuçları …….……..39
4. TARTIŞMA ……....40
4.1. Testis Dokusundaki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması……...40
4.2. Böbrek Dokusundaki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması…….42
4.2.1.Böbrek Korteks Bölümündeki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması.42
4.2.2.Böbrek Medulla Bölümündeki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması44
4.3. Kalp Dokusundaki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması…….….45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER ……..….48
6. KAYNAKLAR……...……..50
7. ÖZET…….…...57
8. SUMMARY……..…....58
9. EKLER…….....59
EK. A: Etik kurul Raporu
10. ÖZGEÇMİŞ……...60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMP : Adenozin Monofosfat

ATP : Adenozin Trifosfast

Cu : Bakır

Cu-Zn SOD : Bakır- çinko süperoksit dismutaz

FSH : Folikül Stimulan Hormon

GH : Büyüme Hormonu

GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz

GSH-R : Glutatyon Reduktaz

GSK-3β :Glikojen Sentaz Kinaz-3β

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

IGF–1 : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

İ/R : İskemi-Reperfüzyon

KAT : Katalaz

KDH : Ksantin dehidrojenaz

KO : Ksantin oksidaz

LH : Luteinizan Hormon

MDA : Malondialdehit

MT : Metallotionin

NAD^+ : Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NO : Nitrik Oksit

NOS : Nitrik Oksit Sentaz

PAF : Platelet Aktivatör Faktör

ONOO- : Peroksinitrit

PMNL : Polimorf nüveli lökositler

RNT : Reaktif Nitrojen Türleri

ROT : Reaktif Oksijen Türleri

SOD : Süperoksit Dismutaz

TEC : Timik Epitelyal Hücreler

TNF : Tümör Nekroz Faktör

Zn : Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Oksidasyon durumunda çinko proteinlerin tiol gruplarından salınan çinkonun redoks sinyalini düzenlemesi …….……..……....20
Şekil 1.2. MT'nin moleküler yapısı …….…….…..…..21
Şekil 1.3. MT redoks siklusu ……..…….....23
Şekil 2.1. Nikon micrometer microscope slide kalibrasyon görüntüsü ……..…....30
Şekil 2.2.a. Clemex Vision Lite 3.5 görüntü analizi sistemi ile testis örnekleri için 10'luk büyütmedeki alanın hesaplanması……...…….....31
Şekil 2.2.b. Clemex Vision Lite 3,5 Image Analysis program ile MT pozitif boyanmış testis hücrelerinin işaretlenerek sayılması ……..31
Şekil 2.3.a. Clemex Vision Lite 3,5 görüntü analizi sistemi ile böbrek örnekleri için 10'luk büyütmedeki alanın hesaplanması…….32
Şekil 2.3.b. Clemex Vision Lite 3,5 görüntü analizi sistemi ile MT pozitif böbrek hücrelerinin işaretlenerek saydırılması……32
Şekil 2.4. Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis program ile kalp örnekleri için 20'lik büyütmedeki alanın hesaplanması MT pozitif boyanmış miyositlerin işaretlenerek saydırılması…….....33
Şekil 3.1. Testis Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu ……...35
Şekil 3.2. Böbrek Korteks Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluu ……....37
Şekil 3.3. Böbrek Medulla Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu …….38
Şekil 3.4. Kalp dokusunda MT boyanma oranları ……...39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Testis Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları…….35
Çizelge 3.2. Böbrek Korteks Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları.....37
Çizelge 3.3. Böbrek Medulla Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları...38
Çizelge 3.4. Kalp dokusunda MT boyanmış total hücre yüzdeleri……...39

1. GİRİŞ

Bir dokuya gelen kan akımının kesilmesi veya önemli düzeyde azalması olarak tanımlanan iskemi, tedavi süreçleri sırasında veya patolojik durumlar sonucunda ortaya çıkabilen sık rastlanan bir durumdur. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasının yeniden sağlanmasıdır. İskemi/Reperfüzyon (İ/R) hasarında, serbest radikallerin antioksidan kapasiteyi aşacak düzeyde üretilmesi, lokal ve sistemik olarak ciddi boyutlarda hasar oluşturması söz konusudur. Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres, İ/R hasarı başta olmak üzere, bu gün bilinen neredeyse tüm hastalıkların oluşumunda önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle de antioksidan kapasitenin artırılması insanlarda çeşitli fonksiyon bozukluklarının düzeltilmesinde önem arz etmektedir. Sonuç olarak oksidatif stres ve antioksidanlar konusunun araştırılmasında gittikçe artan bir ilgi söz konusudur. Konuyla ilgili gerçekleştirilen araştırmalar daha çok insanlarda antioksidan kapasitenin nasıl artırılabileceğine odaklanmış görülmektedir. Antioksidan kapasitenin güçlendirilmesinde iki ana yol tercih edilmektedir; 1. Endojen antioksidanların aktivitesinin artırılarak, işlevlerinin daha güçlü sürdürülmesi ve oksidatif stresin oluşturduğu hasar sonucu bozulan yapıların onarımının sağlanması. 2. Dış kaynaklı antioksidan maddelerin kullanımı.

Eser elementlerin metabolik, biyokimyasal ve klinik öneminin araştırılması çok sayıda ve önemli çalışmaların odağında yer almaktadır. Çinko bu elementler içerisinde, biyolojk sistemlerde en yaygın kullanılanıdır. Çinko, hidrolazlar, transferazlar, oksiredüktazlar, ligazlar, izomerazlar ve lizazları da içeren çok sayıda enzimin yapısında yer almaktadır. Hatta çinko organizmadaki bütün enzimlerle ilişkisi olan tek metal olarak kabul edilmektedir. Bunun doğal bir sonucu olarak da vücudun hemen her hücresinde bulunmaktadır. Çinko, tüm organlar, dokular ve vücut sıvılarında yer alan, proteinlerin yapısına katılan, enzimlerin aktif bölgelerine bağlanarak aktivitelerinde anahtar rol oynayan önemli bir eser elementtir. Biyolojik zarların ve iyon kanallarının stabilitesini ve bütünlüğünü koruyan çinko, aynı zamanda intrasellüler bir düzenleyici olarak, moleküler etkileşimler esnasında proteinler için yapısal destek sağlar. Nükleik asitler veya diğer gen düzenleyici proteinlerde yapısal element olarak rol oynar. Buna paralel olarak çinko; enzim aktivitesi, gen

transkripsiyonu, enerji metabolizması, hücre siklusu, hücrelerin migrasyonu ve invazyonu, apoptozisi ve proliferasyonu gibi bir çok fizyolojik olayda da etkilidir. Çinkonun organizmadaki seviyelerinde bir baskılanmanın veya azalmanın ortaya çıkması da birçok fizyolojik fonksiyonda kısıtlamaya, hatta bozulmaya yol açabilecektir.

Antioksidan sistemde merkezi bir rol üstlenen çinko, çok yönlü bir antioksidan olarak tanımlanır. Çinkonun antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olduğu hem hayvansal, hem de hücresel deneylerde çinko eksikliğinde artan oksidatif stresle gösterilmiştir. Hayvan ve hücre modellerinin her ikisinde de çinko eksikliği oksidatif hasara ve antioksidan enzim düzeylerinde değişikliklere yol açar. Ayrıca bakır- çinko süperoksit dismutaz (Cu-Zn SOD) bir antioksidan enzim olarak reaktif oksijen türleri'nin (ROT) önemli bir süpürücüsüdür. Bu enzimin katalitik aktivitesi için bakır önemli olmasına rağmen, çinko yapısal bir role sahiptir ve enzimin tam aktivitesi için gereklidir. Çinko eksikliğinde Cu–Zn SOD aktivitesinin de düşük olduğu bildirilmiştir. Redoks aktivitesinin olmaması nedeniyle bağlandığı proteini oksidasyona karşı kararlı hale getirmesi, çinko eksikliğinin glutatyon (GSH) metabolizmasının bozulmasıyla sonuçlanması ve hücrelerin oksidatif strese duyarlılığının artması çinkonun antioksidan sistemdeki kritik rollerine işaret eder. Çinko bu nedenle çok sayıda hücresel düzeydeki antioksidan savunma sisteminin bir komponenti olarak kabul edilir. Çinko antioksidan savunma sisteminde ayrıca endirekt fonksiyona da sahiptir. Çinko pro-oksidan aktivitesiyle metallere bağlanarak hidroksil radikalleri ve oksijen radikalini yok edebilen metallotionin (MT) sentezini uyaran bir antioksidan gibi de görev alır.

Küçük molekül ağırlıklı MT'ler olarak adlandırılan, sistein grupları bakımından zengin protein ailesi, başta oksidatif stres olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol almaktadır. MT'ler ağır metalleri bağlayarak neden olabilecekleri hasarları önler, hidroksil radikali, süperoksit anyonu ve peroksinitrit gibi serbest radikalleri yakalar ve hidroksil radikali ile süperoksit anyonunun neden olduğu DNA hasarını önler. MT'lerin bu etkisi GSH'den 800 kat daha fazladır. Ayrıca çinkoyu yüksek bir affiniteyle bağlayan MT, önemli bir hücre içi çinko deposu olarak da fonksiyon görür. Hücre içi serbest çinkoya ihtiyaç duyulduğunda, çinkoyu salar ve

çinkonun eşsiz fizyolojik rollerine aracılık etmiş olur. MT'nin ekspresyonu, çinko artışıyla indüklenir, böylece çinko homeostazisi sağlanmış olur. MT'nin, güçlü radikal yakalayıcı özelliğinin yanında çinkonun etkilerine aracılık etmesi oksidatif stresin önlenmesindeki önemini gösterir.

MT'ler, gerek hücre içi çinko dengesinin düzenlenmesinde rol alarak çinkonun fizyolojik etkilerine aracılık etmeleri, gerekse güçlü antioksidan etkileri nedeniyle üzerinde daha fazla araştırma yapılması gereken proteinlerdir. Çalışmamızda, İ/R modeli oluşturulmuş sıçan testis, böbrek ve kalp dokularında serbest radikallerin yol açtığı hasarın çinko ilavesiyle azaltılması ve çinko bağlayan-antioksidan bir protein olan MT seviyelerinin nasıl etkilendiğinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız, İ/R hasarının neden olduğu oksidatif streste ve çinko takviyesinde hücre içi MT ekspresyonunun immünhistokimyasal olarak gösterilmesini içermektedir. Hücrede çinkonun etkinliğini gösterecek önemli bir ipucu niteliğinde olan MT expresyonunun gösterilmesi antioksidan kapasitenin değerlendirmesine önemli katkılar sağlayabilecektir.

1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi, bir dokunun arteriyel ya da venöz kan akımının herhangi bir nedenle azalması veya durmasıdır. Kan akımının azalması; turnike, cerrahiler, organ transplantasyonları gibi birçok klinik durumda görülebilir (Yağmurdur ve Başar 2007). İskemi sırasında hücre içi oksijenin azalması nedeniyle mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellendiği için Adenozin Trifosfat (ATP) ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfatların sentezi azalır ya da tamamen sona erer. Mevcut ATP'nin hızlı bir şekilde parçalanması sonucu dokuda inozin ve hipoksantin metabolitleri birikir, ayrıca iskemi nedeniyle ksantin dehidrojenaz (KDH) enzimi ksantin oksidaz'a (KO) dönüştüğünden hipoksantinin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanıldığı için oksijen radikali oluşarak oksidatif hasarda da artış meydana gelir (Kalyanaraman 2013; Şener ve Yeğen 2009). Ayrıca hücre zarında bulunan ve hücre canlılığının devamı için hayati önemi bulunan Na^+,K^+-ATP az pompası inhibe olur.

Böylece hücre içinde Na^{+} ve Ca^{2+} iyon konsantrasyonları artar. Hücre içinde Ca^{2+} iyon konsantrasyonunun artması birçok enzim sistemini aktive ederek ciddi düzeyde oksidatif strese neden olur. $NO^{\cdot}$ üretimi ve peroksinitrit ($ONOO^{-}$) formasyonunun oluşumunda artışa neden olan Ca^{+2}-Kalmodilin bağımlı nitrik oksit sentaz, araşidonik asit salınımı sonucu prostaglandin/lökotrien/HETE sentezine yol açan fosfolipaz A_2 ve Ca^{+2} bağımlı nükleaz gibi önemli enzim sistemlerinin aktivasyonuna ve nonenzimatik lipid peroksidasyonuna neden olur (Gutteridge ve Halliwell 2010). Ayrıca iskemi sonrası hücrede iyon dengesinin bozulması ile pro-inflamatuar sitokinlerin ve lökosit adezyon moleküllerinin yapımında artış olur, bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara duyarlı hale getirir (Şener ve Yeğen 2009).

İskeminin hücreler üzerindeki bir diğer etkisi, aerobik solunumun durması nedeniyle enerjinin anaerobik metabolizma ile sağlanmasıdır. Glikojen depoları hızla tükenir. Glikolizde, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine bu da hücre içi pH'yı düşürerek asidoza neden olur. Ayrıca iskeminin etkisiyle ribozomlar granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılır ve protein sentezi azalır. Hipoksi devam ederse zar geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları yavaşlar. Sonuç olarak, organeller su alarak şişer ve hücrelerde belirgin şişme meydana gelir. İskeminin devam etmesi durumunda geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar. Bu geri dönüşümsüz zedelenmeye rağmen serbest radikal oluşumu yüksek düzeylerde değildir. İskemi sırasında düşük oranda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarlarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar doku hasarını daha da artırmaktadır (Boys ve ark 2010).

İskemik dokunun kanlanmasının yeniden başlaması reperfüzyon olarak tanımlanır. Reperfüzyon, hücrenin rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenmesini sağlasa da iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (Zimmerman ve Granger 1992). Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (Wilhelm 1990). İ/R hasarının fizyopatolojisi ile ilgili günümüze dek birçok çalışma yapılmış ve hasarı oluşturan çeşitli mekanizmalar ve faktörler ileri

sürülmüştür. Reperfüzyon hasarının, yaygın ödem ve doku hasarı ile karakterize olan lokal etkisi ve buna ilave olarak bir çok organda işlev kaybı ve ölümü ile sonuçlanabilen sistemik etkileri olmak üzere iki temel bileşeni vardır (Gormus ve ark 2009). Hasarın temel mekanizmalarını, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidatif stres ve inflamatuar reaksiyonlar oluşturur (Chen ve ark 2013).

Reperfüzyon sırasında nötrofil aktivasyonu, kemotaksi ve lökosit endotel hücre adezyonu meydana gelir. Nötrofiller oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz ezimlerini içerirler. Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan bu enzimler oksidatif doku hasarında rol alırlar. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenerek ROT üretimi başlatılmaktadır. Mikrovasküler oklüzyon, vasküler permeabilite artışı, sitotoksik enzim salınımı ve sitokin salınımında artış, İ/R hasarında lökositlerin neden olduğu diğer bazı mekanizmalardır (Eltzschig ve Collard 2004; Korthuis ve Granger 1993). Nötrofillerin aktivasyonu ile ayrıca apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kollajenaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır (Korthuis ve Granger 1993). Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (Korthuis ve Granger 1993). Aktif nötrofiller, salgıladıkları maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde birikerek ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar. Yapılan çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında direk bir bağlantı olduğu bulunmuştur (Vinten-Johansen 2004).

Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda süperoksit radikali oluşurken, nitrit oksit (NO) oluşumu azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden platelet aktive edici faktör (PAF), tümör nekroz faktör-α (TNF-α) gibi inflamatuvar maddelerin salınmasına ve

lökosit-endotel hücre adezyonuna aracılık eden adezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur (Şener ve Yeğen 2009).

İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri de önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman sistemi aktive edilir; lökosit adezyon moleküllerinin üretimi artar, IL-1, PAF, prostaglandinler (PG I2, PG E2), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A2 (TxA2) salgılarlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir (Weight ve ark 1996).

1.1.1. Testis Dokusunda İskemi Reperfüzyon Hasarı

Testiste torsiyon/detorsiyon ve testisin kan akımında ciddi düzeyde azalmaya neden olan diğer patolojiler sonucu oluşan İ/R hasarı, serbest radikallerin başlattığı fizyopatolojik süreçlerle karakterizedir. Testis torsiyonu, spermatik kord ve yapılarının kendi etrafında dönmesidir. Puberte döneminde daha yaygın görülmekle birlikte her yaşta ortaya çıkabilen, derecesi ve süresi arttıkça testiküler fonksiyonlarda bozulmaya yol açan, ciddi bir ürolojik problemdir. Tek taraflı testis torsiyonunun, fertilizasyona neden olma riski düşük olsa da karşı testiste de histolojik ve hemodinamik değişikliklere neden olduğu, uzun süreli hasta izlemlerinden elde edilen bulgularla desteklemiştir (Barada ve ark 1989). Torsiyonun geri çevrilmesi (detorsiyon) durumunda ise İ/R hasarı ortaya çıkar ve spermatogenezisin bozulması, germ hücre ölümü, testiküler atrofi, sperm veriminde ve epididimal sperm motilitesinde azalma gibi testislerin hayati işlevlerinin bozulmasına neden olur (Turner ve Lysiak 2008).

1.1.2. Böbrek Dokusunda İskemi Reperfüzyon Hasarı

Böbrek iskemisi, böbrek transplantasyonu, parsiyel nefrektomi, kardiyopulmoner girişimler, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ve hidronefroz gibi

çeşitli klinik durumların sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Ozer Sehirli ve ark 2009). Reperfüzyon ise iskemik dokuların canlılığının sürdürülmesini sağlarken; oluşan oksidatif strese bağlı olarak dokuda reperfüzyon hasarı oluşmasına yol açmaktadır (Ardalan ve ark 2013). Deneysel renal arter oklüzyonu veya intrarenal norepinefrin infüzyonu yapılarak İ/R hasarı oluşturulmuş hayvan modellerinde reaktif oksijen radikal üretiminin arttığı ve renal hasarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Baud ve Ardaillou 1993). İskemi ve reperfüzyon sırasında serbest radikal üretimi artarken, bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol oynayan antioksidan enzimlerinde bir azalma söz konusudur. (Dobashi ve ark 2000). İ/R sırasında antioksidan dengede oluşan bu bozulma; glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübüler nekroz ve böbrek damarlarında direnç artışıyla karakterize olan iskemik akut böbrek yetmezliği ile sonuçlanmaktadır (Ardalan ve ark 2013).

1.1.3. Kalp Dokusunda İskemi Reperfüzyon Hasarı

Dünya üzerinde en sık ölüm nedenlerinden biri kardiyovasküler hastalıklardır. Bu hastalıklardan en sık görüleni, miyokardı besleyen kan akımının klinik ve patolojik belirti verecek düzeyde azalmış olduğu miyokardiyal iskemidir. Miyokard iskemisi, ateroskleroz, tromboembolizm, koroner arter bypass ve transplantasyon gibi fizyolojik ve terapotik uygulamalar sonucunda ortaya çıkabilmektedir (Sağır 2013). İskemik hasarının azaltılmasında en etkili yol kanlanmanın yeniden sağlanmasıdır. Ancak reperfüzyon sonucu oluşan hasar daha ciddi boyutlarda olup durumu daha da kötüleştirir. İskemik miyokard dokusunda biriken serbest radikaller, miyokardiyal İ/R hasarına neden olan kimyasal reaksiyonlarının başlamasına, miyositlerde ve endotel hasarına, sonuç olarak miyokard dokusunda kasılma yetersizliğine, miyokardiyal sersemlemeye hatta hücre ölümüne yol açabilir (Cui ve ark 2013; Inafuku ve ark 2013)

1.2. Serbest radikaller

Serbest radikaller, biyolojik sistemlerde hem yararlı hem de zararlı etkilere sahip olan moleküllerdir (Valko ve ark 2007). Serbest radikaller, enfeksiyon yanıtındaki önemli işlevleriyle ve hücresel sinyal sistemlerinin bir parçası olmalarıyla

önemli rol oynamaktadırlar. Buna karşılık çeşitli nedenlerle konsantrasyonlarının artması durumunda nükleik asitler, lipidler, proteinler ve hücre zarları gibi temel hücresel yapılara zarar veren en önemli mediyatörler olarak karşımıza çıkmaktadır (Valko ve ark 2007). Birçok hastalığın patogenezinde yer alan serbest radikaller, hücresel yaşlanmanın ve ölümün en önemli nedenlerindendir.

Serbest radikaller, son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron içeren molekül ya da atomlardır. Fizyolojik olarak metabolizma sırasında veya patolojik değişimler sırasında üretilen en etkili serbest radikaller ROT'lar ve Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)'lerdir (Woods ve ark 2001). Biyolojik sistemlerde oluşan bu radikallerin endojen kaynakları oksijen, NO, fagositoz hücreleri, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom, plazma membranındaki doymamış yağ asitleri, katekolaminlerin oksidasyonu ve NADPH bağımlı oksidazlar olarak sayılabilir (Seshiah ve ark 2002; Woods ve ark 2001).

Süperoksit radikali, gerek çevresel etkenler, gerekse organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en fazla ve en kolay oluşan serbest radikaldir (Halliwell 1991). Kimyasal olarak oksijen molekülüne bir elektronun ilavesi ile oluşur. Bu radikalin, lökositlerde fagositoz sürecinde ve mitokondride oksidatif fosforilasyon sırasında üretimi fizyolojik bir durumdur.

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -} \text{ (Süperoksit radikali)}$$

$$2\,NADPH + H^+ + 2O_2 \xrightarrow[\text{Hegsoz monofosfat şantı}]{\text{NADPH oksidaz şantı}} 2\,NADP^+ + H_2 + 2\,O_2^{\bullet -}$$

Serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidatif hasar oluşumu ile birlikte seviyesi artan SOD (süperoksit dismutaz) ile indirgenir.

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için oksijen radikali kadar reaktif olmasa da hücre zarından daha kolay geçebilir. Toksik özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2'nin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. H_2O_2, KAT (katalaz) veya GSH-Px (glutatyon peroksidaz) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüştürülür (Halliwell 1991).

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{KAT} 2\ H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + 2\ GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} 2\ H_2O + 2GSSG$$

Bu reaksiyonun ürünü olarak oluşan okside glutatyon GSH-R(GSH-redüktaz) enzimi ile tekrar redükte formuna çevrilir.

Ortamdan uzaklaştırılamayan H_2O_2, özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, güçlü oksitleyici özelliklere sahip reaktif demir formlarını oluştururken (Halliwell 1991) aynı zamanda oldukça reaktif bir molekül olan OH • (hidroksil radikali)'inin oluşmasına neden olur. Bu reaksiyona Fenton Reaksiyonu adı verilir.

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow \bullet OH + OH^- + Fe^{+3}$$

H_2O_2'nin metallerin katalizörlüğünde girdiği oksitleyici bir diğer reaksiyonu, Haber-Weiss Reaksiyonu'dur (Grace 1994; Zago ve Oteiza 2001).

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{Fe\ /\ Cu} \bullet OH + OH^- + O_2$$

Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir; elektronegativitesi ve hücre nükleusundaki membran bariyerleri kolayca geçmesi nedeni ile DNA için mutajeniktir (Parke ve Sapota 1996), ayrıca protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur (Kehrer 1993). Diğer bir önemli radikal olan singlet oksijen, son yörüngesindeki paylaşılmamış elektronun bir üst enerji seviyesine çıkması sonucunda oluşur ve yarı ömrü kısadır (Giordano 2005). Hipoklorit iyonu (OCI^-), lökositlerin yabancı mikroorganizmaları öldürmeleri sırasında üretilen güçlü bir radikaldir (Parke ve Sapota 1996). Alkilperoksil radikali ise (-OOCR), O_2^- ve OH^- ile birlikte lipit peroksidasyonunu başlatan oksijen radikalidir (Patockova ve ark 2003; Woods ve ark 2001). Oksidatif durumda NO oksitlenerek $ONOO^-$ ve nitrotirozin (3-NT) gibi çeşitli reaktif nitrojen oksit türlerine dönüşür (Phillips ve ark 2009). A skorbik asit, GSH ve tokoferoller gibi hücresel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur (Cheeseman ve Slater 1993) .

1.3. Oksidatif Stres

Biyolojik sistemlerde, fizyolojik olaylar sonucu reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ve bunların aynı hızla antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılması söz konusudur. Dengenin reaktif oksijen türleri lehine bozulması, oksidatif stres olarak tanımlanır (Belviranli ve ark 2013).

Oksidatif stres; İ/R hasarı, ateş, travma, donma, aşırı egzersiz, toksinler, radyasyon, enfeksiyon gibi etkenlerle oluşabilen (Gutteridge ve Halliwell 2010) bir durumdur ve kanser, diyabet, hipertansiyon, nörodejeneratif ve inflamatuar hastalıklar gibi bir çok hastalığın ve yaşlanmanın patogenezinde önemli bir yer tutmaktadır (Valko ve ark 2007).

Oksidanların özellikle ROT'ların aşırı birikmesiyle oluşan oksidatif stres, membran lipitlerindeki doymamış yağlardaki bağları koparıp membran viskozitesini ve geçirgenliği artırır (Opara ve ark 1999). ROT'lar, hücre membranında bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinin,

serbest oksijen radikalleri tarafından peroksit, alkol, aldehit, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli zararlı ürünlere dönüşmesine neden olur. Lipid Peroksidasyonu sonucunda oluşan ürünlerden en önemlileri; malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE)'dir (Gutteridge 1995). MDA, yüksek reaktiviteli, uzun ömürlü bir bileşiktir. Hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümsüz hasarlara yol açmaktadır. Ayrıca membranın akıcılığının azalmasına, fonksiyonlarının yavaşlamasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktif olmasına ve de Ca^{+2} iyonlarına geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır (Gutteridge 1995; Prasad ve ark 1989). Lipid peroksitleri ve MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranda deformasyon sonucu, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin birarada tutulması gibi özellikler değişir (Gutteridge 1995). Ayrıca DNA'nın nitrojen bazlarıyla reaksiyona girerek mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkilere neden olur (Valko ve ark 2007).

Serbest radikaller, proteinlerde de yapısal değişiklikler meydana getirebilirler. Özellikle doymamış bağlara ve sülfür gruplarına sahip amino asitler (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) içeren proteinler, serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu proteinlerdeki sistein rezidüelleri serbest radikallerle oksitlenince, proteinlerin tiol grupları (-SH)'nın disülfid bağları arasında ve GSH (S-glutathiolation) gibi küçük molekül ağırlıklı tioller arasında geri dönüşümlü çapraz bağlanmalara neden olabilir (Valko ve ark 2007). Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda; proteinlerde fragmantasyon, ve agregasyon meydana gelir.

Serbest radikaller, DNA'da sakkarit halkalarında kopmalar sonucu mutasyonlara, bazlardaki modifikasyonlara bağlı translasyon hatalarına, zincir kırılmalarından dolayı protein sentezinde inhibisyonlara neden olur. Sonuç olarak hücre ölümü gerçekleşir (Giles ve ark 2003). Süperoksit radikali, güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle kolayca tepkimeye girer. Hidroksil radikali, pürin ve pirimidin bazlarını etkileyerek mutasyonlara neden olur. H_2O_2 membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine

ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Halliwell 1991).

1.4.Antioksidanlar

Biyolojik sistemlerde sürekli olarak üretilen serbest radikallerin, hedef moleküller üzerindeki yıkıcı etkilerinin önlenebilmesi için, endojen ve eksojen antioksidanlar mevcuttur. Bunlardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu önlerken, diğer kısmı oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler.

Biyolojik sistemlerde bulunan enzimatik endojen antioksidanlar SOD, GSH-Px, KAT ve sitokrom oksidazdır. Enzim olmayan endojen antioksidanlar; Melatonin, seruloplazmin, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, ve albümindir (Şener ve Yeğen 2009). Askorbik asit (Vitamin C), α-tokoferol (Vitamin E), GSH, karotenoidler, flavonoidler, çinko ve diğer antioksidanlar ise eksojen antioksidanlardır (Valko ve ark 2007).

Süperoksit Dismutaz: İki serbest oksijen radikalini, radikal olmayan moleküllere dönüştürdüğünden, antioksidan sisteminin en önemli enzimlerinden biridir. İnsan vücudunda 3 farklı SOD enzimi vardır: Mn-SOD; esas olarak mitokondride bulunur. EC-SOD (CuZn-SOD); Bu enziminin aktivitesinden bakır (Cu), kararlılığından çinko (Zn) sorumludur. Cu/Zn-SOD: Sitoplazmiktir, aktif bölgesinde kofaktör olarak bakır ve çinko vardır ve antioksidan savunmada ana rolü oynayan enzimdir (Bergendi ve ark 1999).

Glutatyon Peroksidaz: Bu enzim, H_2O_2 ve lipit peroksitler, indirgenmiş (redükte) glutatyonla (GSH) reaksiyona girerek, H_2O ve yükseltgenmiş okside glutatyon (GSSG) oluşmasını katalizler. GSH-Px'in iki türü vardır: Se-bağımlı GSH-Px: Substrat olarak hem H_2O_2'yi, hem de organik hidroperoksitleri kullanır. Se-bağımsız GSH-Px: Substrat olarak organik hidroperoksitleri kullanır, H_2O_2 yıkılımını kataliz etmez (Halliwell ve Gutteridge 1990)

Katalaz: Solunum yapan tüm organizmalarda bulunan ve iki fonksiyonu olan bir enzimdir: 1. H_2O_2'nin O_2 ve H_2O vermek üzere ayrıştırır ve 2. H_2O_2'nin parçalanması ile oluşan reaksiyon sonucunda, metanol, etanol, formik asit veya fenollerin yükseltgenmesinde görev alır.

Sitokrom Oksidaz: Mitokondrial elektron taşıma zincirinde, elektronları oksijene aktaran enzimdir. Süperoksit radikalinin oluşmasını önleyici rolü vardır.

1.5.Çinko

1.5.1.Çinkonun Biyokimyasal Fonksiyonları

İlk kez Raulin tarafından önemli bir eser element olarak biyolojik aktivitesi açıklanan çinko, atom ağırlığı: 65,4, atom numarası: 30, yoğunluğu: 17, erime noktası: 420 ^{0}C, kaynama noktası: 907 ^{0}C olan mavimsi-beyaz renkte heksagonal bir element olup, dünya üzerinde bol miktarda bulunmaktadır (Chandra 1984). Çinkonun büyüme, gelişme ve enzim aktiviteleri için gerekli olduğu ilk defa 1934'de yapılan çalışmalarla açıklanmış, Keilin ve Mann'ın 1940 yılında çinko ihtiva eden karbonik anhidraz enzimini bulmalarıyla bu alana olan ilgi artmıştır (Ripa ve Ripa 1996). Ancak insanlarda çinko noksanlığının önemi 1960'lara kadar ortaya konulamamıştır. 1970'li yılların başında ise Acrodermatitis Enteropathica hastalığının, kalıtsal olarak çinkonun bağırsaklardan absorbsiyonunun bozukluğuyla ilgili olduğu belgelenmiş ve bu eser element üzerine olan çalışmalar giderek yoğunluk kazanmıştır (Oleske ve ark 1979).

Çinko, hidrolazlar, transferazlar, oksiredüktazlar, ligazlar, izomerazlar ve lizazları içeren 2700'den fazla enzimin yapısında yer almaktadır. Bu enzimlerin yaklaşık %70'inde çinkonun katalitik bir fonksiyonu varken, aynı zamanda yapısal rolleri vardır, enzimlerin aktivitelerini düzenler veya reaksiyonlarda substrat olarak görev alır (Andreini ve Bertini 2012). Çinko enzimleri olarak tanımlanan, çok sayıdaki enzim, DNA, RNA ve lipitlerin sentezlerinde görev almalarının yanı sıra, genomik kararlılık için de çinkoya ihtiyaç duymaktadırlar. Ayrıca çinko, antioksidan etkinliği sayesinde DNA onarımında, DNA hasar yanıtında ve metionin gibi DNA metilasyonu

için gereken moleküllerin sentezinde ihtiyaç duyulan önemli bir metaldir. Bunlara ek olarak hücre redox dengesi ve redox duyarlı sinyal yolunun düzenlenmesi, tubilin polimerizasyonunun sağlanması gibi etkilere de sahiptir (Oteiza 2012).

Çinko toksisitesi düşük olup, vücutta spesifik bir deposu yoktur (Prasad 1985). Büyüme çağında, gebelikte, laktasyonda, fiziksel yaralanma gibi çinko ihtiyacını arttıran durumlarda artan çinko ihtiyacı karşılanmalıdır (Wellinghausen ve ark 1997). Gıdalarla alınan çinkonun ancak %20-30'u emilebilmektedir. Çinko, bütün ince bağırsaklar boyunca, özellikle duodenum ve proksimal jejenumda daha hızlı olmak üzere emilime uğramaktadır (Vallee ve Falchuk 1993). Genellikle lifli ve yüksek oranda fitat içeren hububatlar çinkoyu bağlayarak absorpsiyonu sınırlarlar (Cakmak ve ark 1999). Demir ve magnezyumun da çinkonun bağırsaklardan absorpsiyonunu azalttığı bilinmektedir. İnce bağırsağı kaplayan mukozada sistinden zengin, metallotionin olarak bilinen protein ailesi; bakır, çinko ve kadmiyumu nonspesifik bir şekilde bağlayarak, dolaylı yoldan aşırı çinko emilimini engeller. Bu da çinko homeostazisi için önemli bir mekanizmadır (Rani ve ark 2014).

1.5.2.Çinkonun Fizyolojik Sistemlerdeki Etkileri

Çinkonun fizyolojik sistemlerde çok önemli ve kritik rolleri vardır. Çinko immun sistemde merkezi bir rol oynamaktadır. Hiçbir element eksikliği immün sistemde çinkodan daha fazla bozukluğa neden olmamakta ve çinko eksikliği insanlarda, immün yetmezliğin en sık rastlanan nedenleri arasında kabul edilmektedir (Salgueiro ve ark 2000). Timustan salgılanan ve hücresel immün fonksiyonların gelişimi ve devamı için gerekli olan timulin hormonu çinko bağımlı bir hormondur. Çinko ile bağlanmamış timulin inaktiftir ve aktif timulin üzerine de inhibitör etkilere sahiptir, çinko – timulin kompleksi Timik Epitelyal Hücreler (TEC) tarafından oluşturulur ve TEC dolaşımdan çinkoyu alarak T-lenfositlere taşır, ayrıca TEC tarafından çinko – timulin kompleksinin salgılanmasını uyaran faktörler de çinko ve IL-1'dir (Hadden 1998). IL-1, çinko-timulin kompleksi ile koordineli bir biçimde çalışarak T-lenfositleri içinde IL-2 üretimi ve IL-2 reseptör (IL-2r) aktivitesini destekler. IFN-γ, TNF-α üretimini artırır (Hadden 1998). Diyette çinko eksikliği CD4

hücrelerini özellikle Th1 fonksiyonlarını ve buna bağlı olarak Th1'in ürünleri olan IL-2, IFN-γ, TNF-α üretiminin azalmasına yol açarak hücre aracılı immüniteyi olumsuz etkiler (Baltaci ve Mogulkoc 2012). Çinko, Th1 hücreleri ve onların salgıladıkları sitokinlerden başka, NK hücrelerinin aktivasyonu üzerinde de etkilidir (Bao ve ark 2003). Diğer yandan organizmada yeterli çinkonun CD4:CD8 oranının korunmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Çinko eksikliğiyle hücresel immun reaksiyonlarda ortaya çıkan defektlerin çinko takviyesiyle tersine çevirildiği gösterilmiştir. Fetal çinko eksiklikleri, doğal antikorları azaltmak suretiyle immunolojik gelişmeyi etkileyebilir, aynı zamanda çinko antikorların anneden fetusa plasental taşınmasından da sorumludur (Salgueiro ve ark 2000).

Çinkonun, büyüme üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu etkilerini şu yollarla göstermektedir: 1.Çinko; karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasına katılarak büyümeyi etkiler. 2.Çinko ön hipofizden büyüme hormonu'nun (GH) sentezini ve reseptör sayısını artırır, ayrıca GH'nin reseptörüne bağlanmasında önemli bir aracıdır. Çinko iyonları GH'nin dimerizasyonuna neden olur. Çinko iyonu-GH dimerik kompleksinin oluşumu salgı granülleri içerisinde GH'nin depolanması için önemlidir. 3.Karaciğerden İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1) üretiminde hem direk, hem de büyüme hormonu aracılığıyla dolaylı olarak etkilidir. Çinkonun hipofizektomiden sonra bile büyüme üzerinde etkili olduğunun bildirilmesi, çinkonun IGF-1 üzerinde direkt etkisinin daha önemli olduğunu gösterir. Hatta IGF-1'in çinko bağımlı bir faktör olduğu da ileri sürülür. Diyette çinko eksikliğinin büyümeyi yavaşlattığı, dolaşımda IGF-1 düzeylerini azalttığı ayrıca karaciğerde hem büyüme hormonu hem de büyüme hormonu reseptörlerini azalttığı gösterilmiştir (Lefebvre ve ark 1998). 4.Çinko insülin ve tiroit hormonlarının sentezini uyararak da büyüme ve gelişme üzerinde etki gösterir. Çinko yetersizliği olan küçük çocuklara çinko takviyesinin, çocuklarda büyümeyi normalleştirdiği ve IGF-1 ile osteokalsin konsantrasyonlarını artırdığını gösterilmiştir (Nakamura ve ark 1993).

Çinkonun kemik metabolizmasında da önemli fonksiyonları vardır. Kemik dokusunda çinko osteoblastik hücrelerde çoğalma ve farklılaşmayı uyarmakta, kalsiyum metabolizmasını düzenleyen kalsitriol ve parathormon aktivitelerini regüle

ederken kemik yıkımını da baskılamaktadır (Yamaguchi ve ark 2000; Yamaguchi ve ark 1989). Kemik büyümesinde gecikme, beslenmedeki çinko eksikliği ile ilişkili çeşitli hastalıklarda yaygın bir bulgudur (Baltaci ve ark 2004). Ayrıca kemik çinko içeriğinin yaşlanmada, çeşitli kemik hastalıklarında ve menopoz sonrası kemik metabolizmasında azaldığı gösterilmiştir ve bu nedenle kemik bozukluğunda çinkonun önemli rolü olduğu kabul edilmektedir (Sunar ve ark 2008). Büyümekte olan sıçanlarda diyetle oluşturulan çinko eksikliğinin kemik dayanıklılığının azalmasına neden olduğu ve çinko ilavesinin ise kemik dayanıklılığı üzerine doza bağlı olarak pozitif etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Ovesen ve ark 2001). Overektomize sıçanlarda çinko eksikliğinin, kemik dokusundaki kalsiyum ve fosfor düzeylerinde önemli bir azalmaya yol açtığı, kemik yıkımında artışa neden olduğu ve çinko uygulamasıyla bu olumsuzlukların önlendiği rapor edilmiştir (Baltaci ve ark 2014). Sonuç olarak çinko osteoblastik hücrelerde protein sentezini uyarmakta ve kemik kütlesinin muhafazasında önemli bir rol oynamaktadır (Baltaci ve ark 2004; Igarashi ve Yamaguchi 1999).

Çinko ile pankreas ve insülin arasında bir ilişkinin varlığı bilinmektedir. Çinko pankreasın beta ve alfa hücrelerinde bulunur. Çinko, insülinin en önemli yapı taşlarından birini oluştururken (Onosaka ve ark 2002) aynı zamanda aktivitesinde de önemli etkilere sahiptir (Jansen ve ark 2009). Çinko iyonları, çeşitli mekanizmalarla insülin sinyal yolunu etkiler: 1.insülin reseptörünün beta alt ünitesinin fosforilasyonunu uyarır, 2. İnsülin sinyal yoluna ait çinkonun ileri bir hedef molekülü olan glikojen sentaz kinaz-3β'yı (GSK-3β) inhibe ederek hücre içine glukoz alımını arttırır ve kan glukozunu azaltır. GSK-3 β düzeylerinin artması, glikojen düzeyinin bozulmasına ve insülin direncine yol açar. Tip II diabetik hastalarda düzeyi ve aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Ilouz ve ark 2002). Çinkonun, GSK-3β inhibitörü olarak hayvan modellerinde oral veya intraperitonel yoldan verilmesi sonucu kan glukoz düzeyi hızlı bir şekilde düşmüş; insülin cevapları ve insülin duyarlılığı düzelmiştir (Henriksen ve ark 2003) 3. Çinko bağımlı bir molekül olan, insulin-responsive aminopeptidase (IRAP), glukoz taşıyıcısı 4 (GLUT 4) seviyelerinin korunması için gereklidir (Keller 2004), çinko GLUT'un hücre yüzeyine geçişini uyarır, böylece glukozun hücre içerisine girişi artar ve kan glukoz düzeyleri azalır.

Çinko, erkeklerde ve dişilerde üremede temel bir rol oynar. Çinko Luteinizan Hormon (LH) ve Folikül Stimulan Hormon (FSH) sentezi ve sekresyonu, gonadal farklılaşma, testiküler büyüme, spermatozoa oluşumu ve olgunlaşması ve fertilizasyon için gereklidir. Erkek sıçanlarda çinko eksikliğinin sadece testosteron değil, LH ve FSH salınımını önemli ölçüde baskıladığı (Ozturk ve ark 2005), buna karşın çinko uygulamasının LH ve FSH düzeylerinde artışla sonuçlandığı (Baltaci ve ark 2006) gösterilmiştir. Çinko ilavesinin kadınlarda ve erkeklerde kısırlığı önlediği kanıtlanmıştır. (Salgueiro ve ark 2000). Sıçanlarda çinko eksikliği seminifer tübüllerde atrofi ve spermatogenezde bozulmayla sonuçlanmaktadır (Ozturk ve ark 2003). Çinko aynı zamanda sperm fizyolojisi için önemli fonksiyonlarla da ilgilidir. Çinkonun sperm membran bütünlüğünü sağladığı, sperm motilitesini artırdığı, sperm kuyruğunun helezonik hareketlerini düzenlediği gösterilmiştir (Lewis-Jones ve ark 1996). Çinko özellikle testosteronun dihidrotestosterona dönüşümünde etkilidir. Bu olayda rol oynayan 5α-redüktaz enzimi çinko bağımlı bir enzimdir.

Çinko ayrıca T_4'ün T_3'e dönüşümü için gerekli olan 1,5'- deiyodinaz enziminin aktivitesine karışır ve T_3 hormon reseptörünün biyolojik olarak aktif olan durumunu muhafaza edebilmesi için çinkoya ihtiyaç olduğu ileri sürülmüştür (Freake ve ark 2001). Pineal bez üzerinde de etkili olan çinko, önemli bir antioksidan olan melatoninin sentezi için gerekli olan serotoninin yapısında bulunur. Melatonin de çinkonun sindirim sisteminden emilimini artırır. Çinko eksikliğinin serum melatonin düzeylerinde baskılanmaya, çinko uygulamasının ise melatonin salınımında önemli bir artışa yol açtığı rapor edilmiştir (Bediz ve ark 2003).

1.5.3. Çinkonun Taşınması ve Hücre içi Dengesi

Ökaryotik hücrelerde total hücre içi çinko konsantrasyonu yaklaşık 200 μM'dır ve bunun çok az miktarı (nano/pikomolar düzeyde) fizyolojik olarak aktif formu olan serbest çinko iken büyük kısmı metallotioninler gibi proteinlere bağlı durumundadır (Xu ve Zhou 2013). Sistemik ve hücresel çinko dengesinin kontrolü insan sağlığı için hayati önem taşımaktadır. Çinko dengesi, çinko taşıyıcılar, çinko bağlayan moleküller ve çinko algılayıcılarla sağlanır (Foster ve Samman 2010). Çinkonun, hücre

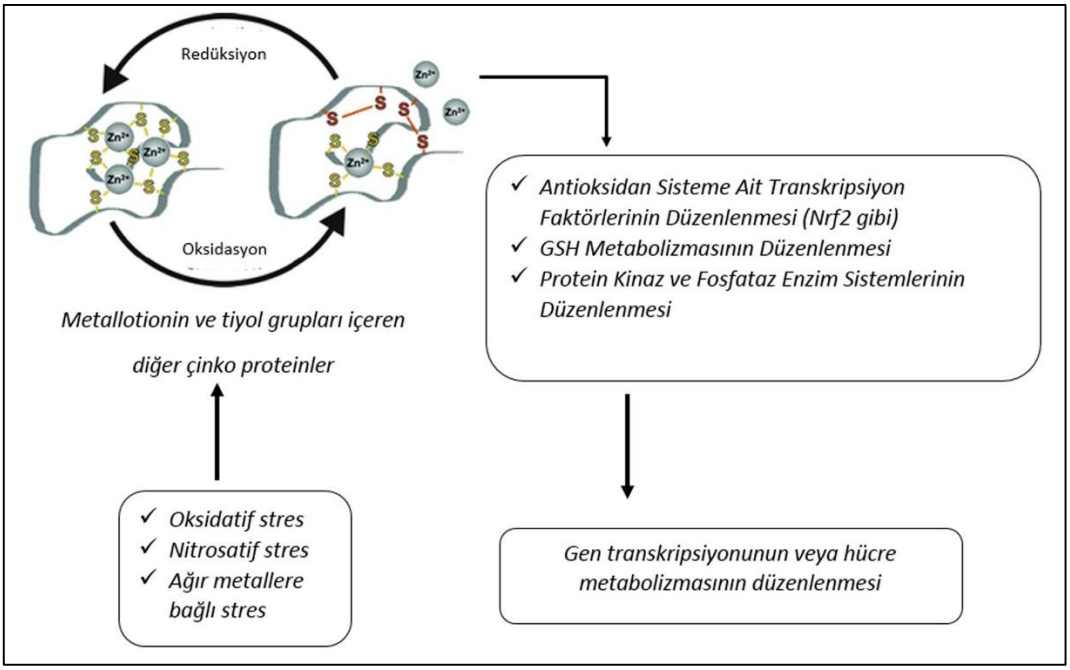
zarlarından geçmesi mümkün olmadığından, hücre içine taşınmasını sağlayacak taşıyıcılar gereklidir. Memelilerde ZnT (SLC30) ve ZİP (SLC39) olarak adlandırılan iki spesifik çinko taşıyıcı ailesi vardır (Liuzzi ve Cousins 2004). ZİP ailesinin 10 ve ZnT ailesinin 14 üyesi mevcuttur. ZnT ailesi çinkonun hücre dışına, organellere veya sekretuar vezikül ve granüllere taşınması ile ilgili iken; ZİP ailesi çoğunlukla hücre zarında yerleşimlidir ve çinkonun hücre içine taşınmasını ve sitozolik çinko miktarının artışını sağlamakla görevlidir.(Schweigel-Rontgen 2014). ZnT1 ve ZnT5 hücre zarında bulunur, ZnT1 hücre içi çinko miktarını azaltırken, ZnT5 arttırmaktadır (Valentine ve ark 2007). Diğer ZnT ailesi üyelerinin tamamı hücresel organeller üzerinde yerleşimlidir ve çinkonun sitozolden organellere taşınmasında görevlidir (Xu ve Zhou 2013). Bu taşıyıcıların expresyonlarının çinko seviyelerindeki değişiklikler, hormonlar ve sitokinlerle düzenlendiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Begum ve ark 2002; Liuzzi ve ark 2005). Bu taşıyıcıların genlerinde oluşan mutasyonların yanısıra expresyonlarında veya fonksiyonlarında meydana gelen düzensizlikler, birçok hastalığın ortaya çıkması ile ilişkili bulunmuştur (Kambe ve ark 2014).

1.5.4.Antioksidan Savunmada Çinkonun Önemi

Çinko, redoks aktivite göstermediği için, fizyolojik şartlarda potansiyel okside ya da redükte formu yoktur. Çinko çok iyi bir elektron alıcısıdır, sülfür ve nitrojen atomları ile istikrarlı kompleksler yaparak protein, steroid ve nükleik asitleri biyolojik olarak kararlı halde tutulmasını sağlar (Arcasoy 2001). Çeşitli hücre ve dokularda çinko eksikliğinin oksidatif stresle ilişkili olduğu ve çinko takviyesinin oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir. Çinkonun azalması hücresel oksidanların artışı (Aimo ve ark 2010; Andreini ve ark 2006), antioksidan defans sisteminde değişim (Oteiza ve ark 1996) ve doku oksidatif parametrelerinde artış (Bicer ve ark 2012; Oteiza ve ark 1996) ile ilişkilidir. Konu ile ilgili tüm çalışmalar, çinkonun biyolojik sistemlerde antioksidan ağın önemli bir parçası olduğunu göstermektedir. Hücresel çinkonun çoğu yüksek bir affiniteyle proteinlere, MT'lere GSH'ye, sistein, histidin ve difosfat moleküllerini içeren diğer hücresel komponentlere bağlı olup aktif formu olan serbest hücresel çinko nisbeten daha azdır. (Bozym ve ark 2006; Dittmer ve ark 2009).

Çinkonun antioksidan rolleri üzerine yapılan çalışmalar, birkaç temel mekanizma üzerinde yoğunlaşmıştır: a) Çinko, membranlardaki bağlanma bölgeleri için redox-aktif metallerle (demir, bakır) yarışarak hücre komponentlerini oksidatif hasardan korur. Demir ve bakır membranda lipid peroksidasyonuna neden olabilmektedir. Redox-inaktif çinkonun bu metallerle yer değiştirmesi yüksek reaktif oksidant formasyonlarının oluşmasını önler. Demirin membrana bağlanma miktarı ile lipid oksidasyonu arasında pozitif bir korelasyon vardır. Membrandaki bağlanma bölgeleri için çinko ile demir arasındaki yarışma da çinko konsantrasyonu antioksidan durumu belirler (Zago ve ark 2000). b) Çinkonun bir diğer antioksidan etkisi, sülfür içeren tiol gruplarına bağlanma kapasitesidir. Redoks inaktif çinko, bu proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanıp onları kararlı hale getirirek oksidasyondan korur. Ayrıca tiollere bağlanabilen Cd, Pb, Hg gibi metaller tiollere bağlı çinko miktarı ile düzenlenebilir. Çinko parmak proteinlerden oksidatif durum varlığında çinko serbestleşip, yerine AL, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb gibi metaller bağlanabilir (Oteiza 2012). Bu yer değiştirme bu proteinlerin etkisiz moleküllere dönüşmesine veya etkilerinin değişmesine veya sistein oksidasyonuna yol açar (Zago ve Oteiza 2001). Yeterli çinko varlığında, redox aktif bu moleküllerin hedef moleküllere bağlanmaları önlenir (Zago ve Oteiza 2001) c) Çinko, sisteinden zengin tioller içeren proteinlerin sentezini arttırarak, hücre antioksidan ağın majör bir elemanı olarak görev alır. Özellikle, MT expresyonunu arttırması önemlidir. Bu artışı, metal regulatory transcription factor 1 (MTF-1) yapımını indükleyerek gerçekleştirir (Moleirinho ve ark 2011). Serbest çinko seviyelerindeki artışa direkt yanıt veren bu protein, MT geninin metal duyarlı bölgesini bağlar ve MT transkripsiyonunu başlatır . Bu otoregülatör döngü ile hücre içi çinko'nun optimal düzeyleri sürdürülmüş olur (Moleirinho ve ark 2011) . d) Çinko proteinler içerdikleri sülfür kümelerine bağlı çinkoyu, metaller, NO, H_2O_2 ve okside GSH gibi serbest radikal üreten moleküller etkileşimleri sırasında serbest bırakır (Kang 2006; Pirev ve ark 2008) ve çinkonun aktif formu olan bu serbest çinko, antioksidan sinyalini düzenleyici yolaklarda rol alır (Şekil 1.1.). e) Enzimatik ve nonenzimatik olarak oksidatif stresi önleyen GSH'nin, işlevlerinin sürdürülmesinde çinko önemli bir etkendir. Çinkonun GSH metabolizmasında önemli rolü olduğu ve GSH yetersizliğinin çinko eksikliği ile bağlantılı olduğu çeşitli hücre ve dokularda yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir, (Baltaci ve ark 2004; Kraus ve ark 1997;

Oteiza ve ark 1996). Antioksidan yanıt elementi aktive edici transkripsiyon faktörü'nün (Nrf2) çinkoya bağlı olarak aktive olduğu ve bu aktivasyonun GCL expresyonunu ve GSH sentezinin arttırdığı belirlenmiştir (Cortese ve ark 2008).

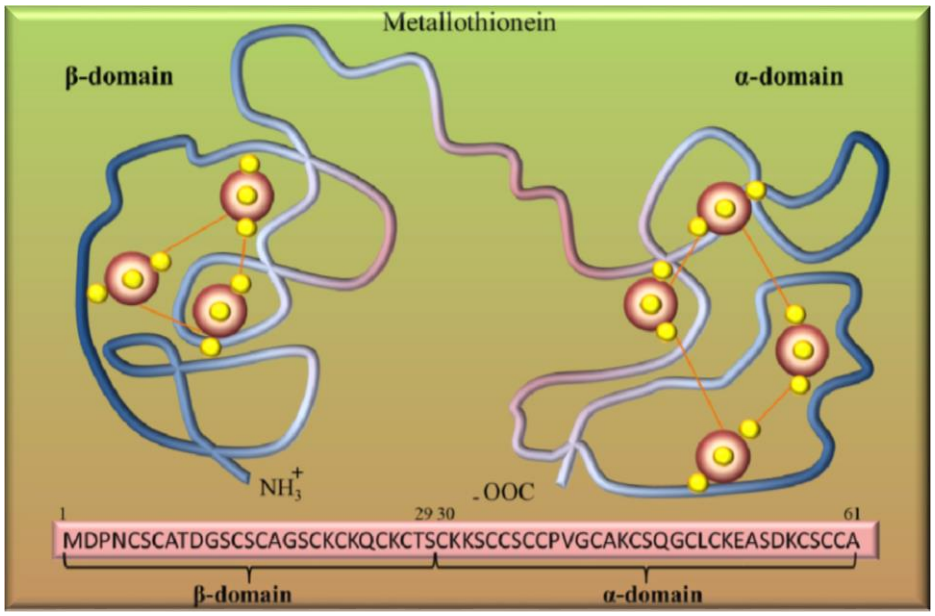


Şekil 1.1: Oksidasyon durumunda çinko proteinlerin tiyol gruplarından salınan çinkonun redoks sinyalini düzenlemesi

1.6. Metallotioninler

Metallotioninler, ilk olarak 1957 yılında at böbreği korteksinden bir kadmiyum bağlayıcı protein olarak izole edilmiştir. Bu protein, 1960 yılında Kagi ile Vallee ve 1976'da Kojima tarafından tanımlanmıştır. Bu proteinin insan, bakteri, bitki, vertebralı ve vertebrasız tüm canlılarda bulunduğu (Villarreal ve ark 2006), sistein aminoasidi bakımından zengin, düşük molekül ağırlıklı (7 kDa), baş kısmı stabil ve metal bağlayıcı bir protein olduğu rapor edilmiştir (Coyle ve ark 2002; Vasak 2005). MT'nin N-Terminal ucunu oluşturan beta bölgesi divalent (iki değerli) metal iyonları için üç bağlanma bölgesi içerirken C- Terminal ucu oluşturan alfa bölgesi de dört divalent metal iyonu bağlayabilmektedir (Ruttkay-Nedecky ve ark 2013) (Şekil.1.2).

Memeli MT'nin 4 izoformu (M1-M4) vardır. Farklı formları temel olarak post-translasyonel modifikasyonlarla oluşmakta, primer yapılarındaki küçük değişiklikler bağlayacağı metal iyonlarının tipi ve bozulma hızını belirlemektedir. Formlarının fiziksel-kimyasal yapılarının benzerliğine rağmen, rolleri ve dokulardaki çeşitliliği istatiksel olarak anlamlı derecede çeşitlilik göstermektedir (Villarreal ve ark 2006). MT-1 ve MT-2 memelilerde tüm dokularda eksprese edilen en yaygın formudur (Coyle ve ark 2002).



Şekil.1.2: MT'nin moleküler yapısı. Sarı boncuklar sülfür atomlarını, kırmızı boncuklar metal atomlarını ifade etmektedir.

MT-3 en fazla beyin dokusunda olmak üzere, kalp, böbrek ve reprodüktif organlarda MT-4 genleri ise oral epitel, özofagus, mide üst bölgesi, kuyruk, ayak tabanı ve yenidoğanın derisiyle ilişkili stratifiye squamöz epitel hücrelerinde tespit edilmiştir (Gonzalez-Iglesias ve ark 2014) . İnsanlarda MT 16q13 kromozomu üzerinde bulunan ailesel bir gen tarafından kodlanmaktadır, MT-2, MT-3 ve MT-4 proteinleri tek bir gen tarafından kodlanırken; MT-1 proteini birçok gen tarafından kodlanan (MT-1A, 1B, 1E, 1F, 1G, 1H, 1M, 1X) alt tiplere, MT-2 ise MT-2 ve MT-2A alt tiplerine ayrılmıştır (Moleirinho ve ark 2011).

Metallotioninlerin rolleri üç ana başlık altında incelenebilir: 1- çinko ve bakır gibi eser elementlerin dengesine katılan metal iyonlarının tutulması ve dağıtılmasını

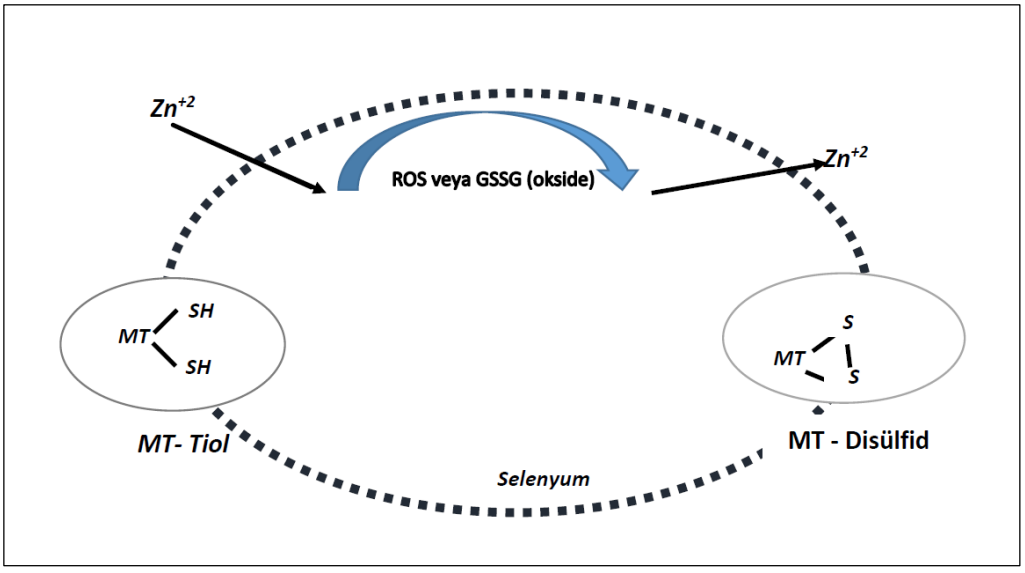
sağlar. 2. Çinko-metalloproteinlerin, enzimlerin ve çinko bağımlı transkripsiyon faktörlerinin biyosentezinin düzenlenmesinde rol alır 3. Reaktif oksijen türleri, iyonize radyasyon, elektrofilik antikanser ilaçlar, metaller ve her türlü mutajen etkenin yol açtığı sitotoksik etkilerinden korur.

MT sentezi, diyetteki çinko ve selenyum minerallerinin ve vücutta bulunan histidin ve sistein aminoasitlerinin miktarıyla ilişkili olarak yapılmaktadır. Çinko takviyesinde MT ekspresyonunun arttığı; eksikliğinde ise azaldığı gösterilmiştir (Cao ve ark 2001). MT ekspresyonunun ağır metaller, hormonlar ve sitokinlerle, ayrıca çeşitli kimyasal, fiziksel etkenlerle ve serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stresle indüklenebildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. MT'lerin fizyolojik sistemlerde birçok fonksiyonu vardır. Hücre içi çinko metabolizmasının düzenlenmesi ve depolanmasında, ayrıca çinkonun bağırsaklardan emiliminde de önemlidir. Yüksek ve hızlı lüminal çinko konsantrasyonunda MT ekspresyonunun indüklendiği, bağırsaklardaki çinko emilimi ve atılımının MT ile düzenlendiği (Cousins 1985; Tran ve ark 1999) ve yüksek çinko varlığında MT tarafından emiliminin kısıtlandığı (Cousins 1985) belirlenmiştir. MT, civa ve kadmiyum gibi ağır metallerin detoksifikasyonu sağlaması, bakır ve çinko gibi esansiyel metallerin vücutta regülasyonu, oksijen radikallerine karşı antioksidasyon ve DNA'yı hasarlara karşı koruma, hücrelerin canlılığının sürdürülmesi, anjiyogenez, apoptozis ve bununla birlikte çoğalma fonksiyonları gibi birçok önemli olayda rol oynamaktadır (Thirumoorthy ve ark 2011). İmmünhistokimyasal çalışmalar hızlı hücre çoğalması durumunda MT ekspresyonunun sitoplazmada ve çekirdekte arttığını göstermiştir. Çekirdekteki artışın DNA'nın oksidatif hasardan korunması veya çinko içeren enzimler ve transkripsiyon faktörlerinin sentezi için olabileceği tahmin edilmektedir (Cherian ve Apostolova 2000).

MT, en fazla çinko bağlayabildiği halde, farklı affinite düzeylerinde başka metaller de bağlayabilir ve gerekli durumlarda bu metaller çinkoyla yer değiştirebilir, bunun majör düzenleyicisi serbest hücresel çinko içeriğidir (Bell ve Vallee 2009). MT'lerin alfa ve beta bölgeleri arasındaki çinkonun, çinko kümeleri içeren diğer proteinler arasında yer değiştirebildiği kabul edilmiştir (Bell ve Vallee 2009). MT'ler

mevcut çinkonun hızlı bir kaynağıdır ve MT'lerdeki çinko, birçok durumda ihtiyaç duyulan miktarda hücre bölümlerinde dinamik bir şekilde yer değiştirir. MT'nin bu rolü ve direkt antioksidan etkisi MT-1 ve 2 yokluğuna sahip farelerde araştırılmıştır, MT-1 ve 2'nin genetik olarak eksikliği toksisiteye ve çinko eksikliğine karşı duyarlılığı arttırmıştır (Kelly ve ark 1996). Benzer şekilde MT-1 ve 2 eksik embriyonik fare hücrelerinde oksidatif stres duyarlılığı artmıştır (Lazo ve ark 1995).

MTnin serbest radikalleri yakaladığı, hidroksil radikali, süperoksit anyonu ve peroksinitritin etkilerinden dokuları koruduğu ve hidroksil radikali ile superoksit anyonunun neden olduğu DNA hasarını önlediği gösterilmiştir MT'nin bu etkisi GSH'den 800 kat daha fazladır. (Abel ve de Ruiter 1989; Cai ve ark 2000). İnvivo çalışmalarda, fare MT over-expresyonunun, İ/R'nin neden olduğu oksidant durumdan koruduğu bulunmuştur (Kang ve ark 2003). MT'lerdeki çinko-tiyol ilişkisi redox düzenleyici olarak rol oynar, okside GSH, MT'lerle ilişki kurarak çinko salınımına sebep olur. MT – Tiyol'lerin serbest –SH bağları ROT'lar veya GSH'nin okside formu olan gulutatyon disülfid (GSSG) ile reaksiyona girerek oksitlenmiş MT-disülfit formuna dönüşürken, onları indirgeyerek oluşturabilecekleri hasarı önler. Ayrıca normal koşullarda MT-Tiyollere bağlı çinko oksidan durumda serbest bırakılarak işlevlerini yerine getirmesi sağlanır (Şekil1.3) (Ruttkay-Nedecky ve ark 2013).



Şekil1.3: MT redoks siklusu

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Deney Hayvanları

Bu projede canlı hayvan kullanılmadı. Daha önce etik kurul onayı alınmış üç ayrı projede kullanılan sıçanların testis, böbrek ve kalp dokuları çalışmada kullanılmak üzere alındı. 1.Testis dokuları: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden; 28.12.2011 tarih ve 2011/112 karar sayısı ile etik kurul onayı alınan ve "Tek Taraflı Testiküler Torsiyon- Detorsiyonun Yol Açtığı Testiküler İskemi – Reperfüzyon Hasarı Üzerine Çinko ile Melatoninin Ayrı Ayrı ve Kombine Uygulamasının Etkileri" isimli tez projesinde kullanılan sıçanlardan elde edildi. 2. Böbrek dokuları: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden; 28.12.2011 tarih ve 2011/113 karar sayısı ile etik kurul onayı alınan "Sıçanlarda Deneysel Böbrek İskemi – Reperfüzyon Hasarında Çinko ile Melatoninin Etkisi" isimli tez projesinde kullanılan sıçanlardan elde edildi. 3. Kalp dokuları: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 25.04.2012 tarih ve 2012/040 karar sayısı ile etik kurul onayı alınan "Sıçanlarda Miyokardiyal İskemi – Reperfüzyon Hasarı Üzerine Kronik ve Akut Çinko Sülfat Uygulamasının Etkileri " isimli tez projesinde kullanılan sıçanlardan elde edildi.

1. ve 2. projelerde 250 – 350 gr ağırlığında Wistar-Albino cinsi erişkin erkek sıçanlar (Kombassan Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Konya) kullanıldı. Deneyler süresince sıçanlar Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanı Ünitesinde 12 saat gece, 12 saat gündüz aydınlatması yapılan ortamda, 22 ± 3^0C sıcaklıkta, her kafeste 6'şar sıçan olacak şekilde çelik kafeslerde tutuldu. Çinko uygulanan gruplar da dahil olmak üzere tüm sıçanlar standart yem ve suyla beslendi. Benzer şekilde 3. Projede de 250 – 350 gr ağırlığında Wistar-Albino cinsi erişkin erkek sıçanlar (Fırat Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Elazığ) kullanıldı ve sıçanların bakımı ve deney prosedürleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirildi.

2.2. Etik Kurul

Projemizde kullanılacak dokular için, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden; 20.03.2013 tarih ve 2013/012 karar sayısı ile "Canlı Hayvan Kullanılmayacak Araştırmalar İçin Etik Kurul Raporu" alındı (Ek. A).

2.3. Hayvan Gruplarının Oluşturulması

2.3.1. Testis Dokularının Elde Edildiği Sıçan Grupları

Bu sıçanlar rastgele olarak gruplandırıldı ve sıçanlara aşağıda tarif edilen uygulamalar yapıldı:

1. Testis Kontrol Grubu (T-Kont, "n = 8"): Bu gruptaki sıçanlara deney sürecinde herhangi bir uygulama yapılmadı. 50 mg/kg intramüsküler ketamin HCl (Ketalar, Pfizer), 10 mg/kg ksilazin HCl (Rompun %2, Bayer) genel anestezisi altında sıçanlara dekapitasyon yapıldı ve ardından sol testisleri alındı.

2. Testis Sham Grubu (T-Sh, "n = 8"): Bu gruptaki sıçanlara deney sürecinde herhangi bir uygulama yapılmadı. Dekapitasyon öncesinde sıçanlara 50 mg/kg intramüsküler ketamin HCl (Ketalar, Pfizer), 10 mg/kg ksilazin HCl (Rompun %2, Bayer) ile genel anestezi yapıldı ve sol testis alanları cerrahi olarak açılıp kapatıldı.

3. Testis İ/R Grubu (T-İ/R, "n = 8"): Bu gruptaki sıçanlara deney sürecinde herhangi bir uygulama yapılmadı. Cerrahi işlem öncesi 50 mg/kg intramüsküler ketamin HCl (Ketalar, Pfizer), 10 mg/kg ksilazin HCl (Rompun %2, Bayer) ile genel anestezi yapıldı. Testis dokusunda iskemi oluşturmak amacıyla, sol inguinoskrotal insizyonla sol testislerine ulaşılarak, tunika vajinalis açıldı ve sol testis insizyon dışına alınıp saat yönünde 720^0 çevrilerek torsiyone edildi. Torsiyone pozisyondaki testis, 3-0 poliglaktin sütür materyali ile skrotum cildine fikse edildi. Cerrahi girişimin ardından skrotum kapatılıp, testis torsiyone pozisyonda iken 60 dakika bekletmek suretiyle iskemi oluşturuldu. 60 dakikanın sonunda spermatik kord detorsiyone edildi, ardından

60 dakika boyunca dokunun reperfüze olması sağlandı (Ergur ve ark 2008). İskemi ve reperfüzyonun uygulandığı süre içerisinde inguinoskrotal bölge üzerine serum fizyolojikle ıslatılmış tampon konularak bölge korundu. Daha sonra tüm sıçanlardan orşiektomize sonrası testis doku örnekleri alındı.

4. Testis Çinko I/R Grubu (T/Zn-İ/R, "n = 8"): Bu sıçanlara 21 gün süreyle sıçan başına 5 mg / kg gün olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonla çinko sülfat uygulandı. Operasyon öncesi genel anestezi oluşturmak amacıyla 50 mg/kg intramüsküler ketamin HCl (Ketalar, Pfizer), 10 mg/kg ksilazin HCl (Rompun %2, Bayer) uygulandı. Ardından T-I/R Grubu'na uygulanan deneysel testis İ/R prosedürü uygulandı ve ardından tüm sıçanlardan orşiektomize sonrası testis doku örnekleri alındı.

2.3.2. Böbrek Dokularının Elde Edildiği Sıçan Grupları

Bu gruptaki sıçanlar rastgele olarak gruplandırıldı ve sıçanlara aşağıda tarif edilen uygulamalar yapıldı:

1. Böbrek Kontrol Grubu (B-Kont, "n = 8"): Bu gruptaki sıçanlara deney sürecinde herhangi bir uygulama yapılmadı. 50 mg/kg intramüsküler ketamin HCl (Ketalar, Pfizer), 10 mg/kg ksilazin HCl (Rompun %2, Bayer) genel anestezisi altında sıçanlara dekapitasyon yapıldı. Daha sonra tüm sıçanlardan nefrektomi sonrası böbrek doku örnekleri alındı.

2. Böbrek Sham Grubu (B-Sh, "n = 8"): Bu gruptaki sıçanlara deney sürecinde herhangi bir uygulama yapılmadı. Dekapitasyon öncesinde sıçanlara 50 mg/kg intramüsküler ketamin HCl (Ketalar, Pfizer, 10 mg/kg ksilazin HCl (Rompun %2, Bayer) genel anestezisi yapıldı ve sol böbrek alanları cerrahi olarak açılıp kapatıldı. Daha sonra dekapite edilen tüm sıçanlardan nefrektomi sonrası böbrek doku örnekleri alındı.

3. Böbrek I/R Grubu (B-İ/R, "n = 8"): Bu gruptaki sıçanlara deney sürecinde herhangi

bir uygulama yapılmadı. Cerrahi işlem öncesi 50 mg/kg intramüsküler ketamin HCl (Ketalar, Pfizer), 10 mg/kg ksilazin HCl (Rompun %2, Bayer) ile genel anestezi yapıldı. Sıçanlara operasyondan yaklaşık 2 dakika kadar önce karın traşı yapılarak operasyon sahası %10 Povidon İodine (Polyad, Drogsan) ile temizlendi, yalnızca insizyon uygulanacak saha açık kalacak şekilde steril olarak örtüldükten sonra, steril aletler kullanılarak orta hat karın insizyonu ile laparotomi yapıldı. Böbrek dokusunda geçici iskemi oluşturmak amacıyla, sol böbrekte, hilus seviyesinde vasküler klemp takıldı ve 60 dakika boyunca iskemiye maruz bırakıldı. Ardından klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon uygulandı (Ozturk ve ark 2014). İskemi ve reperfüzyonun uygulandığı süre içerisinde batın bölgesi üzerine serum fizyolojikle ıslatılmış tampon konularak bölge korundu. Daha sonra tüm sıçanlardan nefrektomi sonrası böbrek doku örnekleri alındı.

4. Böbrek Çinko I/R Grubu (B/Zn-İ/R, "n = 8"): Bu gruptaki sıçanlara 21 gün süreyle sıçan başına 5 mg / kg gün olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonla çinko sülfat uygulandı. Ardından B-İ/R Grubu'na uygulandığı gibi deneysel böbrek iskemi – reperfüzyon prosedürü uygulandı. Daha sonra tüm sıçanlardan nefrektomi sonrası böbrek doku örnekleri alındı.

2.3.3. Kalp Dokularının Elde Edildiği Sıçan Grupları

Bu gruptaki sıçanlar rastgele olarak gruplandırıldı ve sıçanlara aşağıda tarif edilen uygulamalar yapıldı:

1. Kalp Kontrol Grubu (K-Kont, "n = 10"): Bu gruptaki sıçanlara deney sürecinde herhangi bir uygulama yapılmadı. İntraperitoneal 1.2-1.4 gr/kg üretan uygulanarak genel anestezi sağlandı. Heparin uygulandı ve kalpler hızlıca çıkartıldı.

2. Kalp I/R Grubu (K-İ/R, "n = 10"): Bu grupta sıçanlara deney sürecinde herhangi bir uygulama yapılmadı. Cerrahi öncesi sıçanlara intraperitoneal 1.2-1.4 gr/kg üretan uygulanarak genel anestezi sağlandı. Ardından yapay solunum için trakea kanülasyonu yapılarak sıçanlar solunum pompasına bağlandı. Karotid artere yerleştirilen bir

kanülden, transdüser (Harvard model, 50-8952) ve bir kaydedici (Harvard Universal ossilograf "penrecorder") yardımıyla kan basıncı ve EKG yazdırıldı. Göğsün sol tarafına 1-1.5 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldıktan sonra cilt altı dokuları ve göğüs kasları geçilerek, sternumun hemen solunda dördüncü kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açıldığı anda, içerdeki negatif basıncın ortadan kalkması nedeniyle, solunum devamı ve normal pCO2, pO2, ve pH değerlerini korumak amacıyla ventilasyon cihazıyla (Harvard Animal Rodent Ventilator) 1.5 ml/100 gramlık hacim ve 60 atım/dakikalık bir hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Perikardiyum yavaşça sıyrılarak kalp serbestleştirildi ve göğsün sağ tarafına hafifçe basılarak kalp dışarı alındıktan sonra, 10 milimetrelik yuvarlak uçlu iğneyle 6/0 ipek iplik sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızlı bir şekilde geçildi. Daha sonra kalp yeniden göğüs içine yerleştirilerek 20 dakika stabilizasyon için beklendi. İpliğin uçları 1 mm çap ve 1 cm boyda ufak bir plastik tüp içinden geçirilerek, 20 dakikalık stabilizasyon periyodu sonunda damarın altından geçirilmiş olan ip plastik tüp ve bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın kapatılması (oklüzyonu) sağlandı. 30 dakikalık iskemi sonunda klemp açılarak tüp içinden geçen iplik gevşetildi ve böylece yeniden kanlanma yani reperfüzyon sağlandı (Parlakpinar ve ark 2005). Reperfüzyon süresi 120 dakika olarak gerçekleştirildi. Deneye son verilmeden önce heparin uygulandı ve kalpler hızlıca çıkartıldı.

3. Kalp Çinko I/R Grubu (K/Zn-İ/R, "n = 10"): Bu sıçanlara 21 gün süreyle sıçan başına 5 mg / kg gün olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonla çinko sülfat uygulandı. Cerrahi işlem öncesi sıçanlara 1.2-1.4 gr / kg üretan intraperitoneal olarak verildi ve genel anestezi sağlandı. Ardından, Kalp-İ/R Grubu'na uygulanan deneysel miyokardiyal İ/R prosedürü gerçekleştirildi. Deneye son verilmeden önce heparin uygulanarak kalpler hızlıca çıkartıldı.

2.4. Çinko Sülfat Uygulaması

Çinko sülfat ($ZnSO_4 7H_2O$) 0,89 gr olarak tartıldı ve serum fizyolojik ile 250 mililitreye tamamlandı. Üç çalışmada da çinko grubu olarak ayrılan sıçanlara, 21 gün

süreyle sıçan başına 5 mg/kg gün olacak şekilde intraperitoneal çinko sülfat uygulandı.

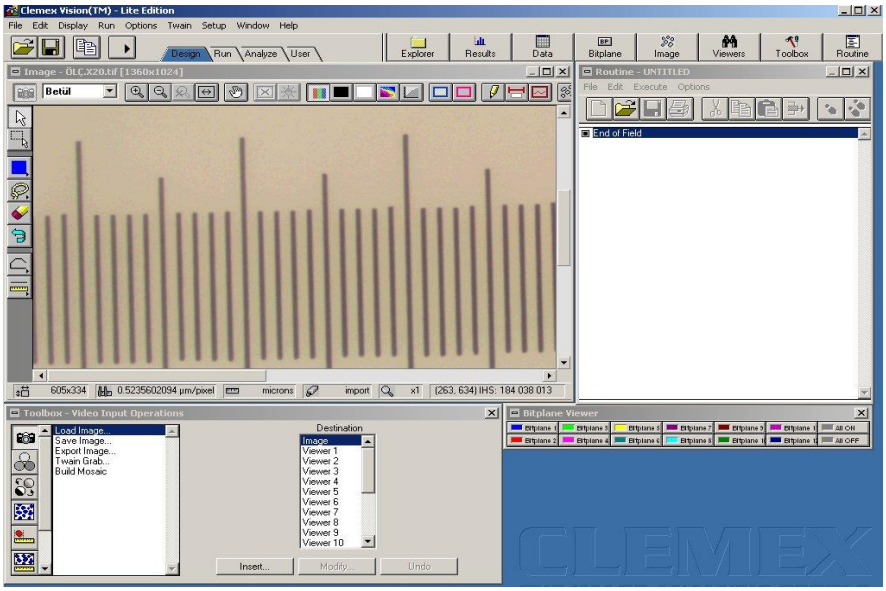
2.5. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

İmmünohistokimyasal boyama prosedürleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Sıçanlardan alınan testis, böbrek ve kalp doku örnekleri cerrahi işlemi takiben % 10'luk tamponlu formaldehit içerisine tespit amacı ile kondu. Tespit işlemi sonrası dokulardan, mümkün olduğunca aynı bölgelerden olmak üzere, uygun örnekler otomatik doku takip cihazına (Leica ASP300 S - Tissue Processing) kasetler içerisine yerleştirildi. Doku takibi işlemi sonrasında dokular parafin bloklara gömüldü. Bloklardan mikrotom (Leica RM 2025 microtome) yardımıyla 5 μm kalınlığında kesitler lizinli lamlar üzerine alındı. Preperatlar 1 gece 60 ^{0} C'de etüvde bekletildi. Ardından preparatlara otomatize slayt işleme sistemi (VENTANA BenchMark XT Automated Slide Processing System) ile, DAB Detection Kit (Ref 760-500 LOT CD1520 ROCH 05269806001) kullanılarak standart immunohistokimya boyama yapıldı. Metallotionin primer antikor ile boyama işlemi 1:100 oranında dilüe edilmiş Monoklonal Primer Metallotionin Antikoru (clone E9; DAKO Copenhagen, Denmark) ile inkübe edilerek yapıldı. Boyama yapıldıktan sonra lamlar 2 tür alkol serisi ve ksilen'den geçirildi ve balzam sürülerek üzeri lamel ile kapatıldı.

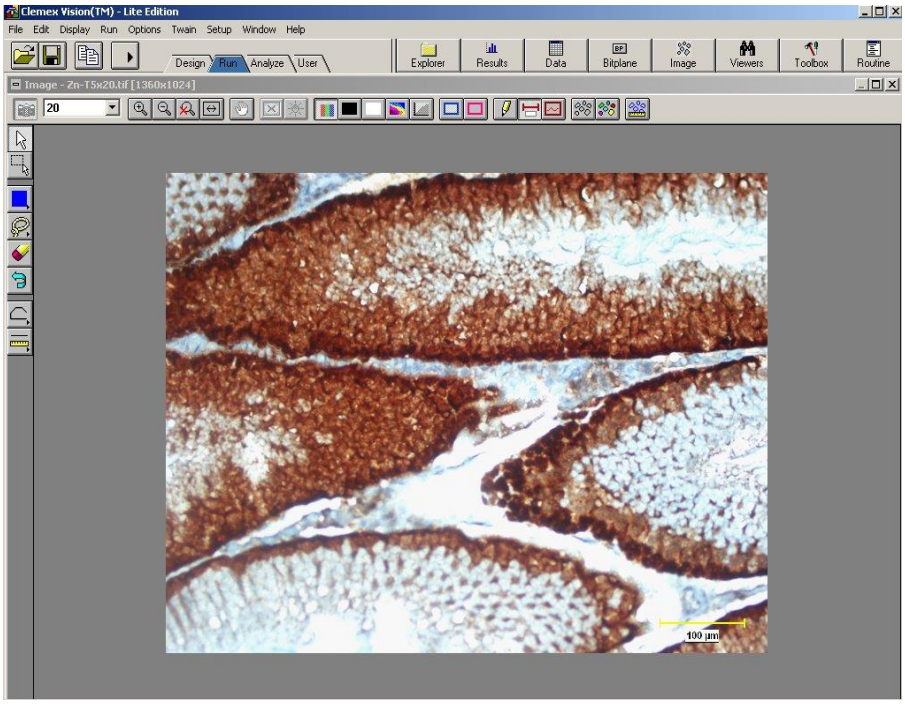
2.6. Preperatların Fotoğraflanması ve İmmünoreaktivitenin Değerlendirilmesi

Tüm boyanan preparatlar Olympus DP 72 (U-TVo.63XC; OLYMPUS, Tokyo, Japan) ışık mikroskobu ile incelendi. İnceleme esnasında aynı zamanda mikroskoba bitişik Olympus DP 72 (U-TVo.63XC; OLYMPUS, Tokyo, Japan) fotograf makinası ile görüntüler alındı. İnceleme işlemi yapılırken hangi büyütmede inceleme yapılıyorsa o büyütmede Nikon micrometer microscope slide (Stage Micrometer Type A, MBM11100) görüntüleri de kalibrasyon amacıyla fotograflandı. Her örnek için mümkün olduğunca aynı alanlarda inceleme ve fotograflama işlemi uygulandı. Kalp dokuları incelenirken 20'lik büyütmede çalışıldı ve fotoğraflandı. Böbrek ve testis dokularının değerlendirilmesi ve fotoğraflanması 10'luk büyütmelik alanda yapıldı.

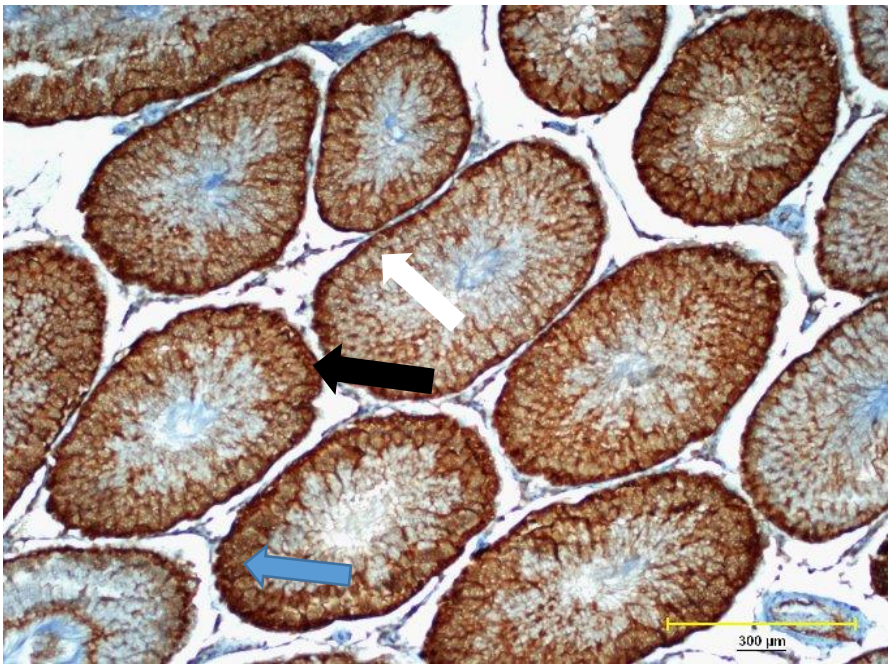
Böbrek doku örneklerinin korteks ve medulla bölgelerinde MT boyanmış hücre oranlarının ciddi düzeyde farklı oldukları görüldüğünden bu bölgeler her doku için ayrı ayrı fotoğraflandı. Fotograflama esnasında 20'lik ve 10'luk büyütmeler için Nikon micrometer microscope slide (Stage Micrometer Type A, MBM11100) görüntüleri de ayrı ayrı fotograflanarak (Şekil 2.1) kalibrasyon amacıyla tüm fotograflarla birlikte PC ortamına aktarıldı. Testis dokuları ile böbrek korteks ve medulla dokularına ait fotograflar aynı büyütme alanındaki Nikon micrometer microscope slide görüntüsü ile PC ortamına aktarılınca ilk olarak micrometer microscope slide görüntüsü ile Clemex Vision Lite 3.5 görüntü analizi sistemi ile alan hesaplaması yapıldı. Bu alan 1576097,8 μm^2 olarak hesaplandı. Bu alandaki MT boyanmış hücreler işaretlendi. İşaretlemede hücrenin gösterdiği renk yoğunluğu kriter olarak alındı ve bu kritere göre; zayıf boyanmış, belirgin boyanmış veya güçlü boyanmış olan hücreler üç ayrı boyanma paternine göre ayrı ayrı işaretlendi ve aynı görüntü analiz sistemi ile otomatik olarak saydırıldı. İşaretleme ve saydırma işlemi deney gruplarını bilmeyen bir araştırmacı tarafından yapıldı (Şekil 2.2.a ve b, Şekil 2.3.a ve b). Güçlü, belirgin ve zayıf MT boyanmış hücre sayıları, ilgili alanlardaki boyanmış toplam hücre sayılarına oranlandı ve elde edilen tüm veriler, alandaki boyanmış hücrelerin yüzdesi şeklinde değerlendirilerek analizleri boyanma özelliklerine göre ayrı ayrı yapıldı.



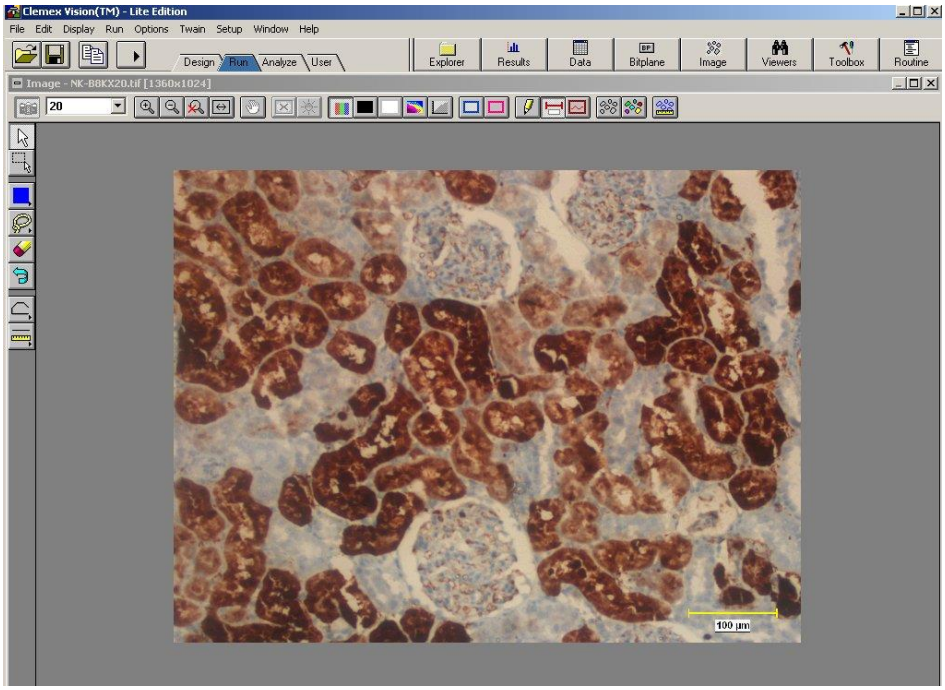
. **Şekil 2.1.** Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis programında kalibrasyonu yapmak için Nikon micrometer microscope slide (Stage Micrometer Type A, MBM11100) görüntüsü



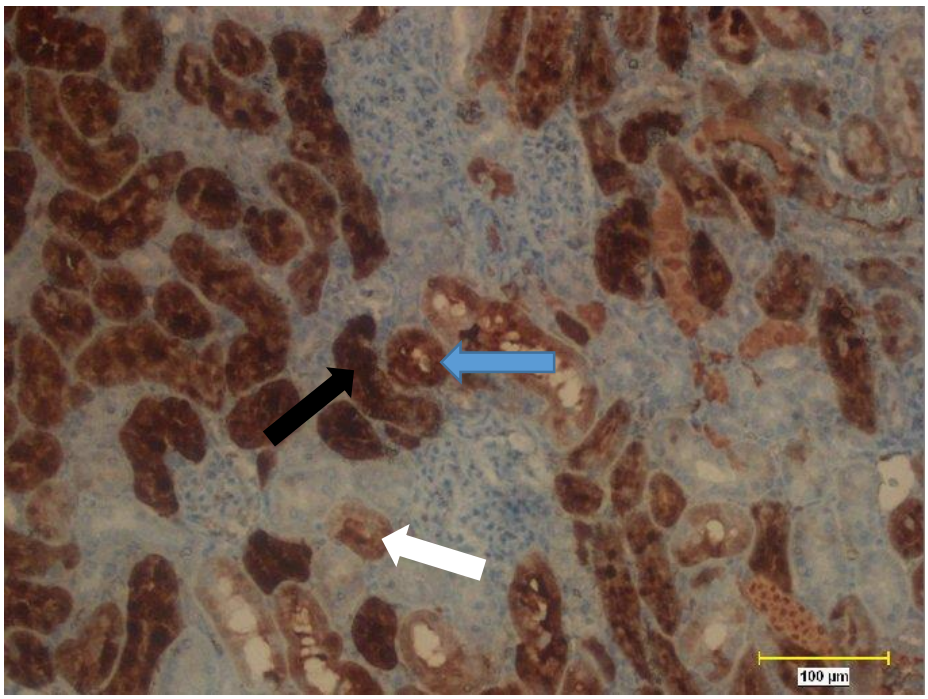
Şekil 2.2.a. Clemex Vision Lite 3.5 görüntü analizi sistemi ile testis örnekleri için 10'luk büyütmedeki alanın hesaplanması.



Şekil 2.2.b. Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis program ile MT boyanmış testis hücrelerinin boyanma yoğunluklarına göre işaretlenerek sayılması. Siyah ok: güçlü boyanmış, mavi ok: belirgin boyanmış ve beyaz ok zayıf boyanmış hücreleri göstermektedir

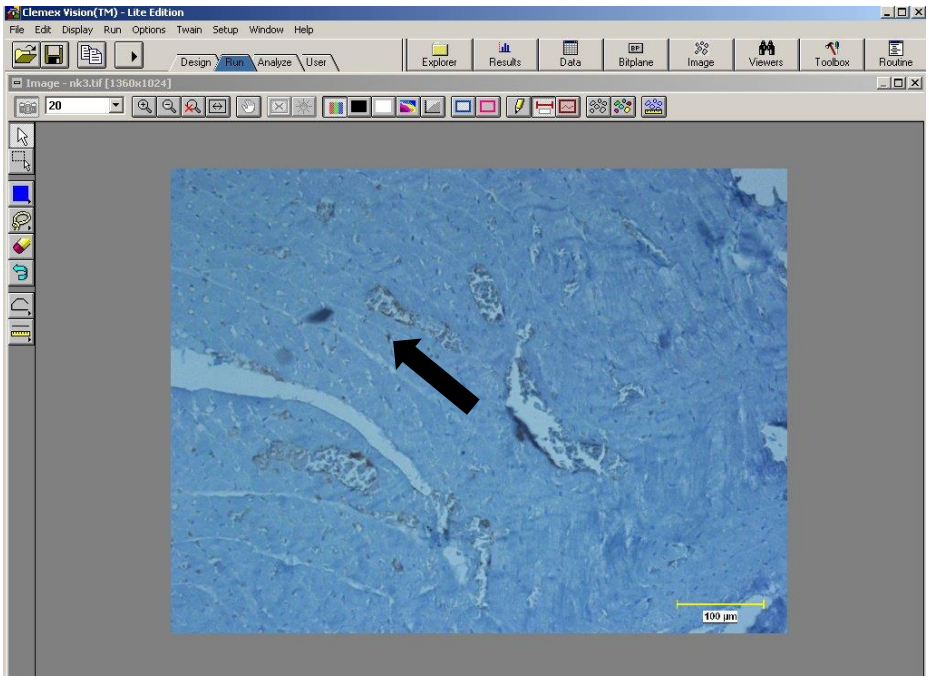


Şekil 2.3.a. Clemex Vision Lite 3.5 görüntü analizi sistemi ile böbrek örnekleri için 10'luk büyütmedeki alanın hesaplanması.



Şekil 2.3.b. Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis program ile MT boyanmış böbrek tübül hücrelerinin boyanma yoğunluklarına göre işaretlenerek sayılması. Siyah ok; güçlü boyanmış, mavi ok; belirgin boyanmış ve beyaz ok; zayıf boyanmış hücreleri göstermektedir.

Kalp dokusuna ait fotograflar aynı büyütme alanındaki Nikon micrometer microscope slide görüntüsü ile PC ortamına aktarılınca ilk olarak micrometer microscope slide görüntüsü ile Clemex Vision Lite 3.5 görüntü analizi sistemi kullanılarak alan hesaplaması yapıldı. Bu alan 381743,9 μm^2 olarak hesaplandı. Bu alandaki MT boyanmış hücreler, deney gruplarını bilmeyen bir araştırmacı tarafından renk yoğunluğu gözetilmeden işaretlendi ve aynı görüntü analiz sistemi ile otomatik olarak saydırıldı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Clemex Vision Lite 3.5 görüntü analizi sistemi ile kalp örnekleri için 20'lik büyütmedeki alanın hesaplanması ve MT boyanmış miyositlerin işaretlenerek saydırılması. Siyah ok, MT boyanmış hücreyi göstermektedir.

2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

Dokuların istatistiksel değerlendirmeleri Minitab Paket Programı ile yapıldı. Veriler, normalite analizine ve homojenlik testine tabi tutulduktan sonra tek yönlü varyans analizleri (ANOVA) yapıldı ve *post hoc* Tukey's testi ile gruplar arası çapraz karşılaştırma uygulandı. Tüm verilerin değerlendirilmesinde istatistiksel olarak $p<0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1. Testis Çalışması Analiz Sonuçları

3.1.1. Testis Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları

Boyanma özelliklerine göre güçlü, belirgin ve zayıf MT boyanmış hücrelerin üç ayrı kategoride mukayese edilmesiyle elde edilen veriler, her kategori içinde ayrı ayrı olmak üzere homojenlik ve normal dağılım testlerinden sonra tek yönlü varyans analizine tabi tutuldu.

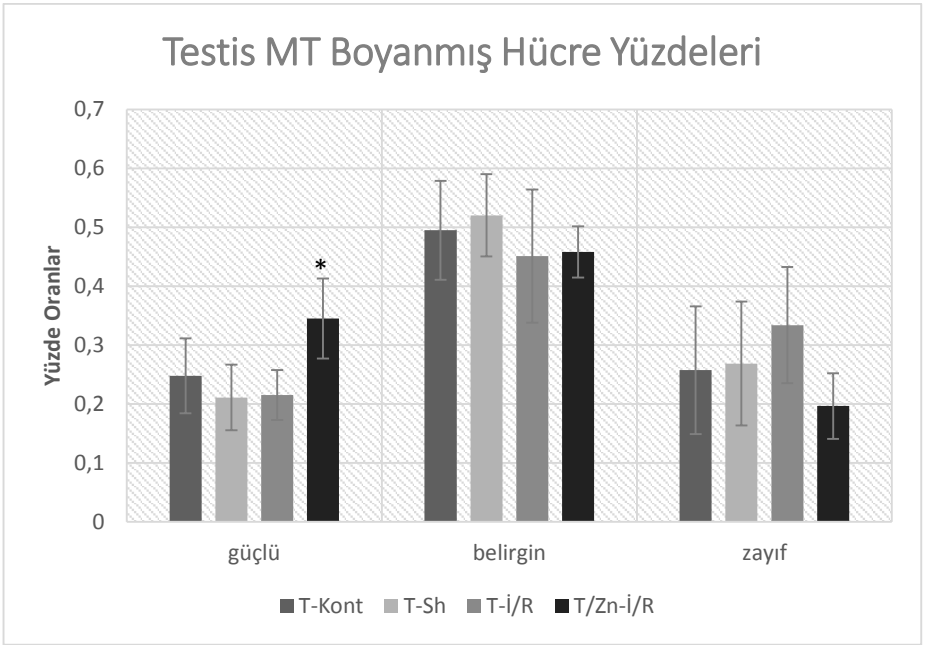
Güçlü MT boyanma kategorisinde, deney grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark vardı (P= 0,000). Gruplar arası çapraz karşılaştırma sonucunda çinko uygulanan İ/R grubunun (T/Zn-İ/R) güçlü MT boyanmış hücre düzeyleri; kontrol (T-Kont), Sham (T-Sh) ve İ/R (T- İ/R) gruplarından anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p = 0,014, p=0,001 ve p=0,002). Kontrol (T-Kont), Sham (T-Sh) ve İ/R (T- İ/R) gruplarının güçlü MT boyanmış hücre seviyeleri ise birbirinden farklı değildi (Çizelge3.1 ve Şekil 3.1).

Belirgin MT ve zayıf MT boyanma kategorilerinde deney gruplarının MT boyanmış hücre düzeyleri istatistiki olarak birbirinden farklı değildi (sırasıyla p= 0,311 ve p= 0,085). Gruplar karşılaştırıldığında, ne cerrahi uygulamanın (T-Sh), ne İ/R hasarının (T- İ/R) ne de İ/R hasarında çinko uygulamasının (T/Zn-İ/R) belirgin ve zayıf MT boyanmış hücre sayılarını etkilemediği görüldü (Çizelge3.1 ve Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Testis Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları

Güçlü MT Boyanma		Belirgin MT Boyanma		Zayıf MT Boyanma	
T-Kont	0,25 ± 0,06[b]	T-Kont	0,49 ± 0,08	T-Kont	0,26 ± 0,10
T-Sh	0,21 ± 0,05[b]	T-Sh	0,52 ± 0,07	T-Sh	0,27 ± 0,11
T-İ/R	0,22 ± 0,04[b]	T-İ/R	0,45 ± 0,11	T-İ/R	0,33 ± 0,01
T/Zn-İ/R	0,35 ± 0,07[a]	T/Zn-İ/R	0,46 ± 0,04	T/Zn-İ/R	0,20± 0,06
Total	0,26 ± 0,08	Total	0,48 ± 0,08	Total	0,26 ± 0,10

Not: Değerler pozitif boyanmış hücre yüzdeleri ± standart sapma şeklindedir. Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 3.1. Testis Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu

3.2. Böbrek Korteks ve Medulla Çalışması Analiz Sonuçları

Böbrek dokusunda korteks kısmı ile medulla kısmı arasında hücre sayıları yönünden fizyolojik farklılıklar bulunması nedeniyle MT boyanmış hücre yüzdeleri de istatiksel olarak ayrı ayrı değerlendirildi.

3.2.1. Böbrek Korteks Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları

Testis örneklerindeki uygulamaya benzer şekilde, boyanma özelliklerine göre güçlü, belirgin ve zayıf MT boyanmış korteks hücreleri üç ayrı kategoride mukayese edilmesiyle elde edilen veriler, her kategori içinde ayrı ayrı olmak üzere homojenlik ve normal dağılım testlerinden sonra tek yönlü varyans analizine tabi tutuldu.

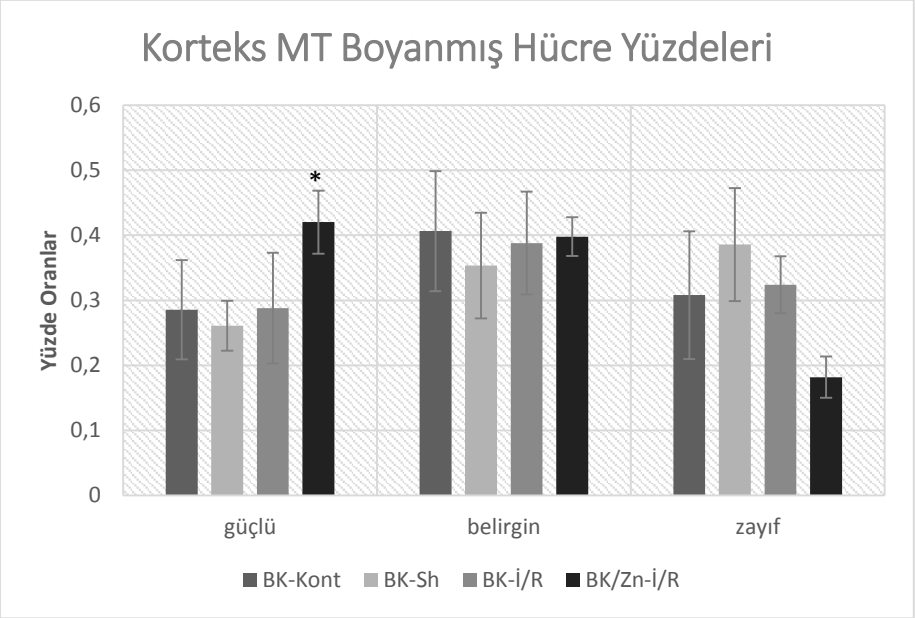
Güçlü MT boyanma kategorisinde, istatistiki olarak anlamlı fark vardı (p= 0,000). Gruplar arası çapraz karşılaştırma sonucunda çinko uygulanan İ/R grubunun (BK/Zn-İ/R) güçlü MT boyanmış hücre seviyelerinin, kontrol (BK-Kont), Sham (BK-Sh) ve İ/R (BK- İ/R) gruplardan anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi (Sırasıyla; p = 0,001, p=0,000 ve P=0,0023). Kontrol (T-Kont), Sham (T-Sh) ve İ/R (T- İ/R) gruplarının güçlü MT boyanmış hücre seviyeleri ise birbirinden farklı değildi (Çizelge.3.2 ve Şekil 3.2).

Belirgin MT boyanma kategorisinde, deney grupları arasında istatistiki olarak fark yoktu (P= 0,512). Zayıf MT pozitif grubunda ise istatistiksel olarak fark vardı (p= 0,000). Gruplar arası çapraz karşılaştırma sonuçları, çinko verilen İ/R grubunun (BK/Zn-İ/R) zayıf MT boyanmış hücre düzeyleri, diğer deney gruplardan anlamlı derecede daha düşüktü (Çizelge.3.2 ve Şekil 3.2).

Çizelge 3.2. Böbrek Korteks Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları

Güçlü MT Boyanma		Belirgin MT Boyanma		Zayıf MT Boyanma	
BK-Kont	0,29 ± 0,07[b]	BK-Kont	0,41 ± 0,09	BK-Kont	0,31 ± 0,10[a]
BK-Sh	0,26 ± 0,04[b]	BK-Sh	0,35 ± 0,08	BK-Sh	0,39 ± 0,09[a]
BK-İ/R	0,29 ± 0,08[b]	BK-İ/R	0,39 ± 0,08	BK-İ/R	0,32 ± 0,04[a]
BK/Zn-İ/R	0,42 ± 0,05[a]	BK/Zn-İ/R	0,40 ± 0,03	BK/Zn-İ/R	0,18 ± 0,03[b]
Total	0,32 ± 0,09	Total	0,39 ± 0,07	Total	0,30 ± 0,10

Not: Değerler pozitif boyanmış hücre yüzdeleri ± standart sapma şeklindedir. Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 3.2. Böbrek Korteks Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu

3.2.2. Böbrek Medulla Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları

Böbrek korteks örneklerindeki uygulamaya benzer şekilde, boyanma özelliklerine göre güçlü, belirgin ve zayıf MT boyanmış böbrek medulla hücreleri üç ayrı kategoride mukayese edilmesiyle elde edilen veriler, her kategori içinde ayrı ayrı

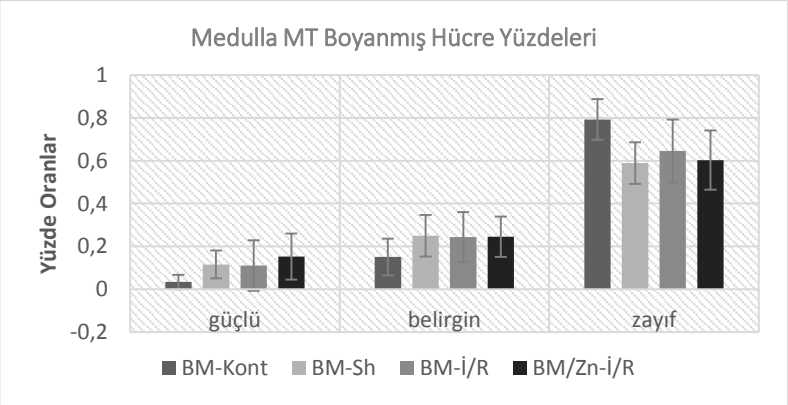
olmak üzere homojenlik ve normal dağılım testlerinden sonra tek yönlü varyans analizine tabi tutuldu.

Güçlü ve belirgin MT boyanma kategorilerinde, deney grupları arasında MT boyanmış hücre düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı fark yoktu (sırasıyla p= 0,064 ve P=0,153) (Çizelge.3.3ve Şekil 3.3). Zayıf MT boyanma kategorisinde, istatistiksel olarak fark mevcuttu (P= 0,008). Kontrol (BM-Kont) grubu, Sham (BM-Sh) ve çinko verilen İ/R grubundan (BM/Zn-İ/R) daha yüksek MT boyanmış hücre seviyelerine sahipken (sırasıyla p=0,010 ve p=0,019), İ/R uygulanan deney grubundan (BM-İ/R) ise farklı değildi (p=0,127) (Çizelge.3.3 ve Şekil 3.3).

Çizelge 3.3. Böbrek Medulla Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu Analiz Sonuçları

Güçlü MT Pozitif Boyanma		Belirgin MT Pozitif		Zayıf MT Pozitif Boyanma	
BM-Kont	0,03 ± 0,03	BM-Kont	0,15 ± 0,09	BM-Kont	0,79 ± 0,09[a]
BM-Sh	0,12 ± 0,07	BM-Sh	0,25 ± 0,10	BM-Sh	0,59 ± 0,10[b]
BM-İ/R	0,11 ± 0,12	BM-İ/R	0,24 ± 0,12	BM-İ/R	0,65 ± 0,15[b]
BM/Zn-İ/R	0,15 ± 0,10	BM/Zn-İ/R	0,25 ± 0,09	BM/Zn-İ/R	0,60 ± 0,14[b]
Total	0,10 ± 0,09	Total	0,22 ± 0,10	Total	0,66 ± 0,14

Not: Değerler pozitif boyanmış hücre yüzdeleri ± standart sapma şeklindedir. Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 3.3. Böbrek Medulla Örneklerinde MT Boyanma Yoğunluğu

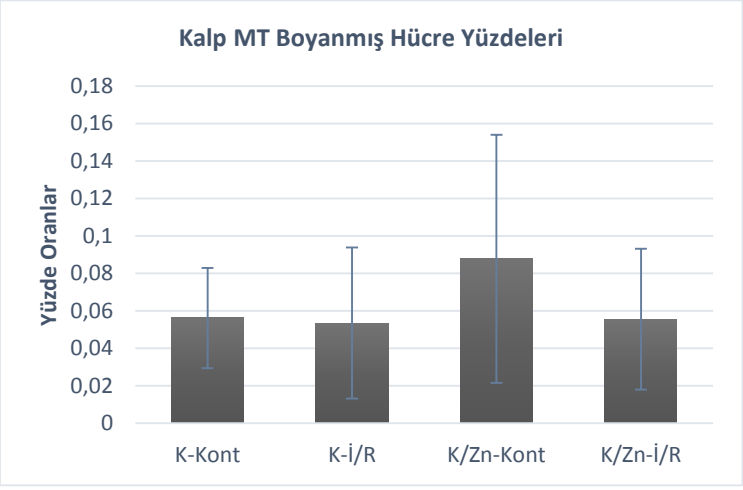
3.3. Kalp Örneklerinde MT Boyama Analiz Sonuçları

Kalp preperatlarında pozitif boyanmış hücre sayısı oldukça azdı (total ortalama 0,06 ± 0,04) ve boyanmada renk yoğunluğu farkı yoktu. Bu nedenle bu dokuda renk yoğunluğu gözönünde bulundurulmaksızın, belirlenmiş alanda total MT pozitif hücreler sayıldı ve alandaki tüm hücre sayısına oranlanarak yüzde değerler elde edildi. Değerlerin homojenliği ve dağılım normalitesi belirlendikten sonra tek yönlü varyans analizine tabi tutuldu. Analiz sonucuna göre deney gruplarının MT boyanmış hücre düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (p= 0,520) (Çizelge.3.4 ve Şekil 3.4).

Çizelge 3.4. Kalp dokusunda MT boyanmış total hücre yüzdeleri.

Deney Grupları	MT Boyanma Yüzdeleri
K-Kont	0,06 ± 0,03
K-İ/R	0,05 ± 0,04
K/Zn-İ/R	0,06 ± 0,04
Total	0,06 ± 0,04

Not: Değerler pozitif boyanmış hücre yüzdeleri ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arasında istatistiki fark bulunmamaktadır, P= 0,520 (p<0,05).



Şekil 3.4. Kalp dokusunda MT boyanma oranları

4. TARTIŞMA

4.1. Testis Dokusundaki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması

Çalışmamızda çinko uygulanan İ/R grubunun (T/Zn-İ/R) güçlü MT boyanmış hücre düzeyleri diğer grupların tamamından [(T-Kont), Sham (T-Sh) ve İ/R (T- İ/R)] önemli derecede yüksekti. MT, hücrenin antioksidan protein havuzunun önemli bir elemanıdır (Islam ve Loots du 2007). Bu düşük molekül ağırlıklı protein çinko ve bakır iyonlarınca bağlanan sistein parçalarının varlığı nedeniyle etkili bir serbest radikal temizleyicidir (Hidalgo ve ark 2001). Zaten MT'lerin temel rolünün ağır metallerin detoksifiye edilmesi, esansiyel metallerin homeostatik düzenlenmesi ve dokuların farklı oksidatif hasarlara karşı korunması olduğu kabul edilir (Islam ve Loots du 2007). MT gen tanımlanması olmayan hayvanların doku hasarına ve oksidatif stresle ilgili hastalıklara karşı daha duyarlı hale geldiğinin gösterilmesinin (Islam ve Loots du 2007) yanı sıra, MT'lerin sıçan (Yang ve ark 1994) ve farelerde (Li ve ark 2004) oksidatif stresin azaltılmasında etkili olduğunun rapor edilmesi de bu düşüncelerin kuvvetli birer delilidir. Canlı organizmada MT sentezi birkaç metallotionerjik element tarafından uyarılabilir, bunlar arasında metal iyonlar da vardır (Chen ve ark 2006). Bu elementler arasında çinko, yüksek dozlarda bile toksik olmaması nedeniyle MT sentezi için en fazla kabul görenidir (Penckofer ve ark 2002). Oral çinko uygulamasının (4, 8 veya 16 mg Zn solüsyonu) piliçlerin pankreas ve karaciğerinde MT sentez ve birikimini uyardığı Mc Cormick (1984) tarafından rapor edilmiştir. Yine benzer şekilde geniş bir çalışmada Yang ve Cherian (1994), çinko enjeksiyonunun sıçanların pankreas, karaciğer ve böbreğinde MT düzeylerini artırdığını göstermişlerdir. Sonuç olarak çinko ile MT sentez-salınımı arasında önemli ve pozitif bir ilişki vardır. Testislerde ve aksesuar seks glandlarında yüksek konsantrasyonda bulunan çinkonun (Wong ve ark 2001) eksikliği seminifer tübüllerde atrofi ve spermatogenezde bozulmayla sonuçlanmaktadır (Baltaci ve ark 2006). Sıçan testisinde toksik maddelere karşı çinkonun germ hücrelerinin korunmasında etkili olduğu, özellikle siklofosfamidle uyarılan testis hasarına karşı çinko uygulamasının MT sentezini uyararak testis hasarını önlediği bildirilmiştir (Maremanda ve ark 2014). Kültür sertoli hücrelerinde yüksek doz çinko uygulamasının (100 ve 500 mikrometre) MT gen

ekspresyonunu artırarak sertoli hücreleri üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu Kheradmand ve ark (2010) tarafından rapor edilmiştir. Buna paralel olarak sıçan testisinde kadmiyumun yol açtığı oksidatif hasarın çinko uygulaması sonucu MT sentezindeki artışa paralel olarak önlendiğinin bildirilmesi de (Amara ve ark 2008), hem çinkonun antioksidan etkisi, hem de testis dokusundaki MT sentez ve salınımı üzerindeki uyarıcı etkisi yönüyle önemli bir bulgudur. Kadmiyum tarafından uyarılan testis toksisitesinde çinko tükenmesinin doku hasarında artışa yol açtığı, buna karşın diyete çinko ilavesinin MT sentezinde artışa yol açarak testis dokusundaki oksidatif hasarı önlediğinin bildirilmesi (Bonda ve ark 2004) çalışmamızda çinko uygulanan İ/R grubunda (T/Zn-İ/R) elde ettiğimiz artmış MT düzeyleriyle uyumludur. Testis dokusunda çeşitli toksik maddelerin meydana getirdiği oksidatif hasara karşı çinko ve MT'nin oluşturduğu antioksidan etki birçok çalışmada rapor edilmesine karşın (Amara ve ark 2008; Bonda ve ark 2004; Kheradmand ve ark 2010; Maremanda ve ark 2014), testis dokusunda oluşturulan iskemi/reperfüzyonda MT düzeyleri ve çinko uygulamasıyla ilişkili herhangi bir yayına rastlayamadık. Çalışmamızda çinko uygulanan İ/R grubunda (T/Zn-İ/R) elde ettiğimiz artmış MT düzeylerinin muhtemelen bu konudaki orijinal ve ilk çalışma olduğu vurgulanabilir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada testis dokusunda çinko uygulanan İ/R grubunun dışında kalan grupların güçlü boyanmayla karakterize MT düzeyleri birbirinden farklı değildi. Çinko uygulanmayan İ/R grubu da buna dahildir. Testis torsiyonu, spermatik kordun kendi ekseni etrafında dönmesine bağlı olarak, testis ve eklentilerinin kan akımının engellenmesi olarak tanımlanır (Guimaraes ve ark 2007). Testis torsiyonu iskemik hasar, detorsiyon ise reperfüzyon hasarı oluşturarak dokuda yapısal ve biyokimyasal bir takım değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur (Guimaraes ve ark 2007; Yildiz ve ark 2011). Çalışmalar dokudaki iskemi-reperfüzyon hasarından serbest oksijen radikallerinin sorumlu olduğunu göstermiştir (Yildiz ve ark 2011). Çalışmamızda çinko uygulanmayan testis İ/R grubunun, çinko uygulanan İ/R grubuna oranla azalmış MT düzeylerine sahip olması, testis iskemi reperfüzyonunda oksidatif hasarın arttığını bildiren (Guimaraes ve ark 2007; Yildiz ve ark 2011) raporlarla uyumludur.

4.2. Böbrek Dokusundaki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması

4.2.1. Böbrek Korteks Bölümündeki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması

Çalışmamızda böbrek korteks bölümündeki en yüksek MT düzeyleri çinko uygulanan İ/R grubunda elde edildi. Çinko fizyolojik koşullar altında MT'nin güçlü bir uyarıcısıdır (Ozcelik ve ark 2012). MT'ler böbrek dokusunun ağır metaller ve oksidatif hasara karşı korunmasında oldukça önemlidir. MT ve MT sentezini uyaran çinko böbrek korteksi içinde lokalizedir (Szczurek ve ark 2009). Çinko eksikliği ve desteğinin sütten yeni kesilmiş sıçanlarda böbrek dokusundaki oksidatif hasarı ve MT düzeylerini nasıl etkilediğinin araştırıldığı çalışmada; çinko eksik diyet farelerin böbrek dokusunda hem MT, hem de çinko düzeylerini azaltırken, çinko desteği böbrek dokusunda özellikle korteks proksimal tübüllerinde MT düzeylerinde yükselmeyle sonuçlandı (Szczurek ve ark 2009). Bu sonuçlar çinko uygulamasının MT sentezi aracılığıyla böbrek korteks proksimal tüp hücrelerinde hücre hasarını önleyebileceğini göstermektedir. Burada özellikle vurgulanması gereken sonuç; Szczurek ve ark (2009)'ın yukarıda sunulan raporu çinko ve MT'nin böbreklerin özellikle korteks kısmında lokalize olduğunun ortaya konulmasıdır. Gerçekleştirilen bir başka çalışmada; çinko takviyesi alan diyabetik sıçanların böbrek dokusundaki çinko ve MT düzeylerinin yüksek bulunduğu, bu yüksekliğin özellikle böbrek tübüllerinde yoğunlaştığı bildirilmiştir (Ozcelik ve ark 2012). Bahsedilen çalışmada sonuç olarak çinkonun diyabetik sıçanlarda ortaya çıkan oksidatif stresi MT sentezini uyararak önleyebileceği gösterilmiştir. Benzer bir sonuç Tang ve ark (2010) tarafından bildirilmiştir. Diyabetik hayvanların böbreklerindeki oksidatif hasarın önlenmesinde çinko desteği ve MT sentezinin etkisini araştırmak için gerçekleştirilen çalışmada, diyabetin başlangıcından üç ay sonra çinko desteğinin diyabet kaynaklı böbrek oksidatif hasarını önemli ölçüde azalttığı ortaya konulmuştur. Çinko desteği aynı zamanda renal tübüler hücrelerde MT sentezinde artışa da yol açmıştır. Bahsedilen çalışmada çinkonun diyabetik hayvanların böbreklerinde renal patolojik değişiklikleri MT sentezini uyararak azaltabileceği sonucuna varılmıştır (Tang ve ark 2010). Sıçanlarda seyreltilmiş uranyumun (DU) yol açtığı akut toksisiteye karşı çinko uygulaması böbrek dokusundaki lipid peroksidasyonunu, MT sentezini uyararak

önlemiştir (Hao ve ark 2012). MT'lerin özellikle karaciğer ve böbreklerdeki kadmiyum toksisitesine karşı rolü daha çok çalışılmıştır. Kadmiyumla uyarılan kronik böbrek toksistesinde böbrek dokusunda meydana gelen lipid peroksidasyonunun önlenmesinde MT'lerin önemli fonksiyon gördüğü kabul edilir (Sabolic ve ark 2010). Indomethacin'in (toksisite çalışmalarında kullanılan Non-Steroidal Anti-İnflamatuar İlaç), sıçan böbrek dokusunda oksidatif strese ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir. Farklı olarak indomethacinle uyarılan böbrek lipid peroksidasyonunda çinkonun koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada, çinko uygulamasının indomethacinle uyarılan böbrek lipid peroksidasyonunu önlediği, ancak çinkonun bu etkisine MT'lerin aracılık etmeyebileceği Varghese ve ark (2009)'ın tarafından rapor edilmiştir. Civa toksisitesinde detoksifikasyon ve metal homeostazın düzenlenmesinde MT'lerin rolü iyi tanımlanmıştır (Peixoto ve ark 2007). Genç hayvanların yetişkinlere oranla toksikantlara karşı daha duyarlı olduğundan yola çıkılarak, civa ile uyarılan böbrek toksisitesinde MT ile sağlanan koruma mekanizmasında çinkonun rolü araştırılmıştır. Çinko uygulanan sıçanlarda karaciğer ve böbrekte doğrudan MT artışı olduğu, civanın neden olduğu böbrek toksisitesinde çinko uygulamasının MT sentezini uyararak renal toksisiteyi azalttığı sonucuna varılmıştır (Peixoto ve ark 2007). Benzin buharına maruz bırakılan sıçanlarda oluşan böbrek doku hasarında çinkonun MT sentezini uyararak koruyucu etkiye yol açtığının ortaya konulması (Grebic ve ark 2007), böbrek dokusunda çinko ile MT ilişkisinde ilginç bir örnek olarak sunulabilir. Gentamisin enjeksiyonuyla sıçanlarda oluşturulan böbrek yetmezliği ve proksimal tübül nekrozunda çinko uygulamasının böbrek dokusunun korteks bölümündeki MT içeriğinde bir artışa yol açmasının yanı sıra, hem böbrek yetmezliğinin, hem de tübüler nekrozun önlendiğinin bildirilmesi (Yang ve ark 1994) bizim çinko uygulamasıyla korteks dokusunda elde ettiğimiz artmış MT düzeylerini destekleyen oldukça önemli bir rapordur. Diyabet oluşturulan farelerde 5mg/kg çinko sülfat uygulaması diyabetin neden olduğu böbrek fonksiyonlarındaki bozulmayı önledi. Aynı zamanda çinko uygulaması diyabetik olan ve olmayan hayvanlarda böbrek dokusu ile tüp hücrelerinde MT sentezinde artışa yol açtı. Çinko eksikliği ise hayvanlarda oksidatif hasarda artışa yol açarken, MT sentezinde baskılanmayla sonuçlandı (Li ve ark 2013). Bahsedilen çalışmanın sonuçları çinkonun böbrek dokusunda ve tüp hücrelerinde MT sentezininin önemli bir uyaranı olduğunu

göstermesinin yanı sıra, çalışmamızda 5 mg/kg çinko sülfat uygulaması sonucu korteks dokusunda elde ettiğimiz artmış MT düzeyleriyle de kuvvetli bir uyum gösterir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada böbrek dokusunda çinko uygulanan İ/R grubunun dışında kalan grupların güçlü boyanmayla karakterize MT düzeyleri çinko uygulanmayan İ/R grubu da dahil olmak üzere birbirinden farklı değildi. Çinkonun böbrek dokusunda MT sentezinin kuvvetli bir uyarıcısı olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Hao ve ark 2012; Li ve ark 2013; Ozcelik ve ark 2012; Yang ve ark 1994). Çinko uygulanmayan İ/R grubunda böbrek korteksinde MT düzeylerinde bir artış olmaması, veya çinko uygulanmış İ/R grubunda, çinko desteği almayan İ/R grubuna oranla yüksek MT düzeylerinin elde edilmesi yukarıda raporları sunulan literatür bilgilerle uyumlu, beklenen bir sonuç gibi kabul edilebilir.

4.2.2. Böbrek Medulla Bölümündeki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması

Gerçekleştirdiğimiz araştırmada, çalışma gruplarının tamamında böbrek medullasındaki MT içeriği yönünden anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Çalışmamızın medulla kısmıyla ilgili bu bölümünde çinko uygulaması yaptığımız böbrek İ/R grubunda da MT içeriği diğer gruplardan farklı değildi. Bu sonuç ilginçtir, zira biz çinko uygulaması yaptığımız aynı grubun korteks dokusunda artmış MT düzeyleri elde etmemize karşın, aynı hayvanlardan elde ettiğimiz medulla kısmında MT düzeyleri çinko uygulamasından etkilenmedi. Fizyolojik olarak nefronların %80'e yakın bir kısmı böbrek korteksinde bulunmaktadır (Guyton 1996**).** Bu nedenle korteks dokusunda elde ettiğimiz artmış MT içeriğinin, medulla kısmında elde edilememesi iki kısım arasındaki nefron sayılarından kaynaklanabilir. Ancak daha da önemlisi MT'ler ve MT sentezini uyaran çinkonun öncelikle böbrek korteksi içinde lokalize olmasından da (Szczurek ve ark 2009) kaynaklanabilir. Zaten Yang ve ark (1994)'da böbrek yetmezliği ve proksimal tübül nekrozu oluşturulmuş sıçanlarda çinko uygulamasının böbrek korteksinde MT içeriğinde artışa yol açtığını göstermişlerdir. Çinkonun böbrek korteksinde MT sentezinde artışa yol açtığını bildiren raporların (Szczurek ve ark 2009; Yang ve ark 1994) sonuçları da, çalışmamızdaki sonuçlarla

uyumludur. Çalışmamızın böbrek dokusuyla ilgili olarak çinko uygulamasıyla elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak, çinkonun böbrek dokusundaki asıl etki alanın korteks kısmı olduğunu, böbrek medullasının en azından MT senteziyle ilişkili olarak çinkodan etkilenmediğini söyleyebiliriz.

4.3. Kalp Dokusundaki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması

Kalp preperatlarında pozitif boyanmış hücre sayısı oldukça azdı (total ortalama 0,06 ± 0,04) ve boyanmada renk yoğunluğu farkı yoktu. Bu nedenle bu dokuda renk yoğunluğu gözönünde bulundurulmaksızın belirlenmiş alanda çalışma gruplarının total MT pozitif hücreleri karşılaştırıldı. Çalışma gruplarının tamamında metallotionin düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Diyabetik farelerde diyete çinko ilavesinin kardiyak koruma sağladığı bildirilmiştir (Sun ve ark 2014). Kardiyak koruyucu olayın temelinde çinkonun insulin benzeri etki göstermesinden kaynaklanan iki mekanizmanın önemli olduğu kabul edilir (Yoshikawa ve ark 2001). Her iki olayın esası çinkonun insülin sinyali üzerine olan etkisiyle açıklanabilir (Keller 2004; Sun ve ark 2014). Bunlardan birincisi; çinko bağımlı bir molekül olan, insulin-responsive aminopeptidase (IRAP), insülin hedef dokuları olarak yağ ve kas dokusunda tanımlanmış ve karekterize edilmiştir (Keller 2004). Çinko bağımlı bu molekül (IRAP) glukoz taşıyıcısı 4 (GLUT 4) seviyelerinin korunması için gereklidir (Keller 2004). Ezaki (1989) çinkonun GLUT'un hücre yüzeyine geçişini uyardığını, bunun da hücre içerisine glukoz girişinin artışıyla sonuçlandığını, böylece kan glukoz düzeylerinin azaldığını göstermiştir.

İnsülin sinyal yoluna ait çinkonun ileri bir hedef molekülü (Glikojen sentaz kinaz-3β) GSK-3β'dır (Sun ve ark 2014). Bu molekülün özellikle tip II diabetik hastalarda düzeyi ve aktivitesi artar (Ilouz ve ark 2002). Artan GSK-3β düzeyleri tip II diabetik hastalarda bozulmuş glikojen düzeyi ve insülin direncine yol açar (Ilouz ve ark 2002). Çinko glikojen sentaz kinaz-3β (GSK-3 β)'yı inhibe ederek ve hücre içine glukoz alımını artırarak kan glukozunu azaltır (Ilouz ve ark 2002). Çinkonun diyabetik insan ve hayvanlarda kalp fonksiyonlarını koruyucu etkisi sonuç olarak glukoz metabolizmasıyla ilişkilidir (Xue ve ark 2012). Özellikle diaybetik farelerde

çinkonun kardiyak koruyucu etkisinin daha temelinde MT sentezini uyarmasının önemli olduğu Sun ve ark (2014) tarafından gösterilmiştir. Çinkonun diyabetik sıçanlarda bozulan kalp fonksiyonlarını düzeltici etkisinde MT sentezini uyarıcı etkisinin temel bir mekanizma olabileceği Cong ve ark (2014) tarafından da rapor edilmiştir. Li ve ark (2013) da benzer şekilde çinkonun diyabetik hayvanlarda kalp koruyucu etkisinde MT sentezinin uyarılması ve glukoz metabolizmasındaki artışın önemli olduğunu bildirmiştir. Ancak aynı zamanda kalp dokusunda ortaya çıkan lipid peroksidasyonunun çinkonun MT sentezini artırarak önlemesinin de bu olayda önemli olduğuna dikkat çekilmiştir (Li ve ark 2013). Konuyla ilgili gerçekleştirilen çalışmaların daha çok diyabette ortaya çıkan kalp fonksiyonlarındaki bozulmanın önlenmesinde çinko- MT ilişkisine odaklandığı gözlenmektedir. Diyabet dışında çinkonun kalp dokusundaki olası etkilerini araştıran az sayıda çalışma vardır. İzole hipotermik kalp preparatlarında çinko uygulamasının laktat dehidrogenaz enzimini etkilemesine rağmen yine de kalp fonksiyonları üzerinde koruyucu etkiye sahip olabileceği ileri sürülmüştür (Powell ve ark 1995). Kalp iskemi-reperfüzyon hasarında çinko da dahil olmak üzere antioksidan enzim kofaktörleri olan eser elementlerin doku hasarını önleyebileceği gösterilmiştir (Pucheu ve ark 1995). Miyokard iskemi-reperfüzyonunda ortaya çıkan doku hasarının önlenmesinde çinkonun önemli olabileceği (Xu ve Zhou 2013), çinkonun bu etkisindeki temel olayın sitokin kaynaklı MT sentezindeki artıştan kaynaklanabileceği Itoh ve Kimura (2007) tarafından rapor edilmiştir. Karagulova ve ark (2007) kalp iskemi-repefüzyonunda ortaya çıkan doku hasarının önlenmesinde çinko uygulamasının klinikte de önemine dikkat çekerken, çinkonun iskemik kalp dokusundaki lipid peroksidayonunu önleyici etkisine MT sentezinde artış aracılık etmektedir (Kang 1999). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada iskemik kalp dokusunda metallotionin düzeyleri çinko uygulamasından etkilenmedi. Yaptığımız med-line taramalarda kalp iskemi-reperfüzyonunda çinko uygulamasının MT üzerindeki etkisini araştırdığımız çalışmamızı bire bir karşılaştırabileceğimiz bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak kalp dokusunda ortaya çıkan doku hasarının çinko uygulamasıyla önlenebileceğini (Karagulova ve ark 2007; Powell ve ark 1995; Pucheu ve ark 1995; Xu ve Zhou 2013) ileri süren raporların yanı sıra, çinkonun kalp dokusundaki hasarı önleyici etkisine MT sentezindeki artışın aracılık edebileceğinin de gösterilmesi (Itoh ve Kimura 2007; Kang 1999) çalışmamızda elde ettiğimiz

sonuçlarla uyumlu değildir. Muhtemelen elde ettiğimiz sonuç çinko dozu, uygulama süresi ve/veya kalp iskemi-reperfüzyon süresiyle ilişkili olabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, iskemi-reperfüzyon modeli oluşturulmuş sıçan testis, böbrek ve kalp dokularında çinko uygulamasının antioksidan bir protein olan MT seviyelerini nasıl etkilediğinin araştırılması amaçlanmıştır. Gerçekleştirdiğimiz çalışmanın sonuçları dokular bazında ayrı ayrı değerlendirildiğinde;

1.Araştırmamızın testis dokusuyla ilgili bölümünde çinko uygulaması İ/R grubunda (T/Zn-İ/R) MT düzeylerinde artışla sonuçlandı. Testis dokusunda oluşturulan iskemi/reperfüzyonda MT düzeylerinin çinko uygulamasından nasıl etkilendiğine dair medline taramalarda herhangi bir yayına rastlayamadık. Çinko uygulanan İ/R grubunda (T/Zn-İ/R) elde ettiğimiz artmış MT düzeylerinin muhtemelen bu konudaki ilk çalışma olduğu sonuç olarak söylenebilir.

2. Çalışmamızda böbrek korteks bölümündeki en yüksek MT düzeyleri çinko uygulanan İ/R grubunda elde edildi. Özellikle MT'ler ve MT sentezini uyaran çinkonun böbrek korteksi içinde lokalize olduğunun bilinmesi, bir çok araştırıcı tarafından çinkonun böbrek dokusunda ve tüp hücrelerinde MT sentezinin önemli bir uyaranı olduğunun rapor edilmesi korteks dokusunda çinko uygulamasıyla elde ettiğimiz artmış MT düzeyleriyle kuvvetli bir uyum gösterir.

3.Korteks dokusunda elde ettiğimiz artmış MT düzeylerine karşın, böbrek medullasındaki MT düzeyleri çinko uygulanmasından etkilenmedi. Çalışmamızın bu kısmıyla ilgili vurgulamamız gereken en önemli husus; çinkonun böbrek dokusundaki asıl etki alanın korteks kısmı olduğu, böbrek medullasının en azından MT senteziyle ilişkili olarak çinkodan etkilenmediğidir.

4.Kalp dokusunun iskemi-reperfüzyonuyla ilgili araştırmamızın sonuçları değerlendirildiğinde, çinko uygulanmış veya uygulanmamış iskemik kalp dokularının MT düzeyleri birbirinden farklı değildi. Konuyla ilgili benzer çalışmalarda iskemik kalp dokusunda ortaya çıkan doku hasarının çinko uygulamasıyla önlenebileceği ve çinkonun bu etkisine kalp dokusundaki MT sentezindeki bir artışın aracılık edebileceğine dikkat çekilmektedir. Bu yönüyle kalp dokusunda elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgilerle uyumlu değildir. Ancak bahsedilen raporlar çalışmamızı

bire bir karşılaştırabileceğimiz araştırmalar şeklinde de değildi. Muhtemelen elde ettiğimiz sonuç çinko dozu, uygulama süresi ve/veya kalp iskemi-reperfüzyon süresiyle ilişkili olabilir.

5.Gerçekleştiridiğimiz çalışmanın sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde; iskemik testis ve böbrek korteksinde çinko uygulamasının MT sentezinin güçlü bir uyaranı olarak ortaya çıktığını, ancak iskemik kalp ve böbrek medullasının çinko uygulanmasından etkilenmediğini sonuç olarak söyleyebiliriz.

Bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda iskemik dokularda farklı doz ve sürelerde çinko uygulamasının MT düzeyleri üzerindeki etkilerinin ortaya konulması, iskemik dokulardaki histolojik değişikliklerin ayrıntılı olarak incelenmesi ve lipid peroksidasyonuyla ilgili parametrelerin de değerlendirilmesini konunun daha iyi anlaşılabilmesi açısından önerebiliriz.

6. KAYNAKLAR

Abel J, de Ruiter N: Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. Toxicology letters. 1989, 47(2):191-196.

Aimo L, Cherr GN, Oteiza PI: Low extracellular zinc increases neuronal oxidant production through nadph oxidase and nitric oxide synthase activation. Free radical biology & medicine. 2010, 48(12):1577-1587.

Amara S, Abdelmelek H, Garrel C, Guiraud P, Douki T, Ravanat JL, Favier A, Sakly M, Ben Rhouma K: Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. The Journal of reproduction and development. 2008, 54(2):129-134.

Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A: Zinc through the three domains of life. Journal of proteome research. 2006, 5(11):3173-3178.

Andreini C, Bertini I: A bioinformatics view of zinc enzymes. Journal of inorganic biochemistry. 2012, 111:150-156.

Arcasoy A: Çinko ve çinko eksikliği. Ankara Thalassemia Derneği Yayınları. 2001, 2.Baskı: 1-23.

Ardalan MR, Estakhri R, Hajipour B, Ansarin K, Asl NA, Nasirizade MR, Azar AN, Ghorbanihaghjou A, Vatankhah AM, Esmaili HA: Erythropoietin ameliorates oxidative stress and tissue injury following renal ischemia/reperfusion in rat kidney and lung. Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre. 2013, 22(1):70-74.

Baltaci AK, Mogulkoc R: Leptin and zinc relation: In regulation of food intake and immunity. Indian journal of endocrinology and metabolism. 2012, 16(Suppl 3):S611-616.

Baltaci AK, Mogulkoc R, Ozturk A: Testosterone and zinc supplementation in castrated rats: Effects on plasma leptin levels and relation with LH, FSH and testosterone. Life sciences. 2006, 78(7):746-752.

Baltaci AK, Sunar F, Mogulkoc R, Acar M, Toy H: The effect of zinc deficiency and zinc supplementation on element levels in the bone tissue of ovariectomized rats: histopathologic changes. Archives of physiology and biochemistry. 2014, 120(2):80-85.

Baltaci AK, Sunar F, Mogulkoc R, Oztekin E: The effects of zinc deficiency and supplementation on lipid peroxidation in bone tissue of ovariectomized rats. Toxicology. 2004, 203(1-3):77-82.

Bao B, Prasad AS, Beck FW, Godmere M: Zinc modulates mRNA levels of cytokines. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2003, 285(5):E1095-1102.

Barada JH, Weingarten JL, Cromie WJ: Testicular salvage and age-related delay in the presentation of testicular torsion. The Journal of urology. 1989, 142(3):746-748.

Baud L, Ardaillou R: Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. British medical bulletin. 1993, 49(3):621-629.

Bediz CS, Baltaci AK, Mogulkoc R: Both zinc deficiency and supplementation affect plasma melatonin levels in rats. Acta physiologica Hungarica. 2003, 90(4):335-339.

Begum NA, Kobayashi M, Moriwaki Y, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T: Mycobacterium bovis BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. Genomics. 2002, 80(6):630-645.

Bell SG, Vallee BL: The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. Chembiochem : a European journal of chemical biology. 2009, 10(1):55-62.

Belviranli M, Gokbel H, Okudan N, Buyukbas S: Effects of grape seed polyphenols on oxidative damage in liver tissue of acutely and chronically exercised rats. Phytotherapy research : PTR. 2013, 27(5):672-677.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M: Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life sciences. 1999, 65(18-19):1865-1874.

Bicer M, Gunay M, Baltaci AK, Uney K, Mogulkoc R, Akil M: Effect of zinc supplementation on lipid peroxidation and lactate levels in rats with diabetes induced by streptozotocin and subjected to acute swimming exercise. Bratislavske lekarske listy. 2012, 113(4):199-205.

Bonda E, Wlostowski T, Krasowska A: Testicular toxicity induced by dietary cadmium is associated with decreased testicular zinc and increased hepatic and renal metallothionein and zinc in the bank vole (Clethrionomys glareolus). Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine. 2004, 17(6):615-624.

Boys JA, Toledo AH, Anaya-Prado R, Lopez-Neblina F, Toledo-Pereyra LH: Effects of dantrolene on ischemia-reperfusion injury in animal models: a review of outcomes in heart, brain, liver, and kidney. Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research. 2010, 58(7):875-882.

Bozym RA, Thompson RB, Stoddard AK, Fierke CA: Measuring picomolar intracellular exchangeable zinc in PC-12 cells using a ratiometric fluorescence biosensor. ACS chemical biology. 2006, 1(2):103-111.

Cai L, Klein JB, Kang YJ: Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage. The Journal of biological chemistry. 2000, 275(50):38957-38960.

Cakmak I, Kalayci M, Ekiz H, Braund HJ, Kilinc Y, Yilmaz A: Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: A NATO-science for stability project. Field Crops Research 1999, 60:175-188.

Cao J, Bobo JA, Liuzzi JP, Cousins RJ: Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. Journal of leukocyte biology. 2001, 70(4):559-566.

Chandra RK: Excessive intake of zinc impairs immune responses. JAMA : the journal of the American Medical Association. 1984, 252(11):1443-1446.

Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. British medical bulletin. 1993, 49(3):481-493.

Chen WQ, Cheng YY, Zhao XL, Li ST, Hou Y, Hong Y: Effects of zinc on the induction of metallothionein isoforms in hippocampus in stress rats. Experimental biology and medicine. 2006, 231(9):1564-1568.

Chen YT, Tsai TH, Yang CC, Sun CK, Chang LT, Chen HH, Chang CL, Sung PH, Zhen YY, Leu S and others: Exendin-4 and sitagliptin protect kidney from ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. Journal of translational medicine. 2013, 11:270.

Cherian MG, Apostolova MD: Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. Cellular and molecular biology. 2000, 46(2):347-356.

Cong W, Zhao T, Zhu Z, Huang B, Ma W, Wang Y, Tan Y, Chakrabarti S, Li X, Jin L and others: Metallothionein prevents cardiac pathological changes in diabetes by modulating nitration and inactivation of cardiac ATP synthase. The Journal of nutritional biochemistry. 2014, 25(4):463-474.

Cortese MM, Suschek CV, Wetzel W, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V: Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. Free radical biology & medicine. 2008, 44(12):2002-2012.

Cousins RJ: Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. Physiological reviews. 1985, 65(2):238-309.

Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM: Metallothionein: the multipurpose protein. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2002, 59(4):627-647.

Cui J, Li Z, Qian LB, Gao Q, Wang J, Xue M, Lou XE, Bruce IC, Xia Q, Wang HP: Reducing the oxidative stress mediates the cardioprotection of bicyclol against ischemia-reperfusion injury in rats. Journal of Zhejiang University Science B. 2013, 14(6):487-495.

Dittmer PJ, Miranda JG, Gorski JA, Palmer AE: Genetically encoded sensors to elucidate spatial distribution of cellular zinc. The Journal of biological chemistry. 2009, 284(24):16289-16297.

Eltzschig HK, Collard CD: Vascular ischaemia and reperfusion injury. British medical bulletin. 2004, 70:71-86.

Ergur BU, Kiray M, Pekcetin C, Bagriyanik HA, Erbil G: Protective effect of erythropoietin pretreatment in testicular ischemia-reperfusion injury in rats. Journal of pediatric surgery. 2008, 43(4):722-728.

Ezaki O: IIb group metal ions (Zn2+, Cd2+, Hg2+) stimulate glucose transport activity by post-insulin receptor kinase mechanism in rat adipocytes. The Journal of biological chemistry. 1989, 264(27):16118-16122.

Foster M, Samman S: Zinc and redox signaling: perturbations associated with cardiovascular disease and diabetes mellitus. Antioxidants & redox signaling. 2010, 13(10):1549-1573.

Freake HC, Govoni KE, Guda K, Huang C, Zinn SA: Actions and interactions of thyroid hormone and zinc status in growing rats. The Journal of nutrition. 2001, 131(4):1135-1141.

Giles NM, Giles GI, Holley JE, Gutowski NJ, Jacob C: Targeting oxidative stress-related diseases: organochalcogen catalysts as redox sensitizers. Biochemical pharmacology. 2003, 66(10):2021-2028.

Giordano FJ: Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. The Journal of clinical investigation. 2005, 115(3):500-508.

Gonzalez-Iglesias H, Alvarez L, Garcia M, Petrash C, Sanz-Medel A, Coca-Prados M: Metallothioneins (MTs) in the human eye: a perspective article on the zinc-MT redox cycle. Metallomics : integrated biometal science. 2014, 6(2):201-208.

Gormus ZI, Ergene N, Toy H, Baltaci AK, Mogulkoc R: Preventive role of magnesium on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury-an experimental study. Biological trace element research. 2009, 127(2):183-189.

Grace PA: Ischaemia-reperfusion injury. The British journal of surgery. 1994, 81(5):637-647.

Grebic D, Jakovac H, Mrakovcic-Sutic I, Tomac J, Bulog A, Micovic V, Radosevic-Stasic B: Short-term exposure of mice to gasoline vapor increases the metallothionein expression in the brain, lungs and kidney. Histology and histopathology. 2007, 22(6):593-601.

Guimaraes SB, Aragao AA, Santos JM, Kimura Ode S, Barbosa PH, Vasconcelos PR: Oxidative stress induced by torsion of the spermatic cord in young rats. Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia. 2007, 22(1):30-33.

Gutteridge JM: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical chemistry. 1995, 41(12 Pt 2):1819-1828.

Gutteridge JM, Halliwell B: Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. Biochemical and biophysical research communications. 2010, 393(4):561-564.

Guyton AC: Tıbbi Fizyoloji (Textbook of Medical Physiology). 9.Baskı. Çavuşoğlu, H (çeviri editörü) İstanbul, Yüce Yayınevi, 318-319. 1996.

Hadden JW: Thymic endocrinology. Annals of the New York Academy of Sciences. 1998, 840:352-358.

Halliwell B: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. The American journal of medicine. 1991, 91(3C):14S-22S.

Halliwell B, Gutteridge JM: The antioxidants of human extracellular fluids. Archives of biochemistry and biophysics. 1990, 280(1):1-8.

Hao Y, Ren J, Liu J, Luo S, Ma T, Li R, Su Y: The protective role of zinc against acute toxicity of depleted uranium in rats. Basic & clinical pharmacology & toxicology. 2012, 111(6):402-410.

Henriksen EJ, Kinnick TR, Teachey MK, O'Keefe MP, Ring D, Johnson KW, Harrison SD: Modulation of muscle insulin resistance by selective inhibition of GSK-3 in Zucker diabetic fatty rats. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2003, 284(5):E892-900.

Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasak M: Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. Brain research bulletin. 2001, 55(2):133-145.

Igarashi A, Yamaguchi M: Increase in bone protein components with healing rat fractures: enhancement by zinc treatment. International journal of molecular medicine. 1999, 4(6):615-620.

Ilouz R, Kaidanovich O, Gurwitz D, Eldar-Finkelman H: Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by bivalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc. Biochemical and biophysical research communications. 2002, 295(1):102-106.

Inafuku H, Kuniyoshi Y, Yamashiro S, Arakaki K, Nagano T, Morishima Y, Kise Y: Determination of Oxidative Stress and Cardiac Dysfunction after Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat earts. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2013, 19:186–194.

Islam MS, Loots du T: Diabetes, metallothionein, and zinc interactions: a review. BioFactors. 2007, 29(4):203-212.

Itoh N, Kimura T: [Cytokine-induced metallothionein expression and modulation of cytokine expression by metallothionein]. Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. 2007, 127(4):685-694.

Jansen J, Karges W, Rink L: Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms. The Journal of nutritional biochemistry. 2009, 20(6):399-417.

Kalyanaraman B: Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. Redox Biology 2013:244–257.

Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S: Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2014.

Kang YJ: The antioxidant function of metallothionein in the heart. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine. 1999, 222(3):263-273.
Kang YJ: Metallothionein redox cycle and function. Experimental biology and medicine. 2006, 231(9):1459-1467.
Kang YJ, Li Y, Sun X, Sun X: Antiapoptotic effect and inhibition of ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in metallothionein-overexpressing transgenic mice. The American journal of pathology. 2003, 163(4):1579-1586.
Karagulova G, Yue Y, Moreyra A, Boutjdir M, Korichneva I: Protective role of intracellular zinc in myocardial ischemia/reperfusion is associated with preservation of protein kinase C isoforms. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2007, 321(2):517-525.
Kehrer JP: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical reviews in toxicology. 1993, 23(1):21-48.
Keller SR: Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes. Biological & pharmaceutical bulletin. 2004, 27(6):761-764.
Kelly EJ, Quaife CJ, Froelick GJ, Palmiter RD: Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. The Journal of nutrition. 1996, 126(7):1782-1790.
Kheradmand F, Nourmohammadi I, Modarressi MH, Firoozrai M, Ahmadi-Faghih MA: Differential gene-expression of metallothionein 1M and 1G in response to zinc in sertoli TM4 cells. Iranian biomedical journal. 2010, 14(1-2):9-15.
Korthuis RJ, Granger DN: Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. Clinical cardiology. 1993, 16(4 Suppl 1):I19-26.
Kraus A, Roth HP, Kirchgessner M: Supplementation with vitamin C, vitamin E or beta-carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats. The Journal of nutrition. 1997, 127(7):1290-1296.
Lazo JS, Kondo Y, Dellapiazza D, Michalska AE, Choo KH, Pitt BR: Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. The Journal of biological chemistry. 1995, 270(10):5506-5510.
Lefebvre D, Beckers F, Ketelslegers JM, Thissen JP: Zinc regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I), growth hormone receptor (GHR) and binding protein (GHBP) gene expression in rat cultured hepatocytes. Molecular and cellular endocrinology. 1998, 138(1-2):127-136.
Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR: Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. Human reproduction. 1996, 11(11):2465-2467.
Li B, Tan Y, Sun W, Fu Y, Miao L, Cai L: The role of zinc in the prevention of diabetic cardiomyopathy and nephropathy. Toxicology mechanisms and methods. 2013, 23(1):27-33.
Li X, Chen H, Epstein PN: Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species. The Journal of biological chemistry. 2004, 279(1):765-771.
Liuzzi JP, Cousins RJ: Mammalian zinc transporters. Annual review of nutrition. 2004, 24:151-172.
Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, Ganz T, Cousins RJ: Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005, 102(19):6843-6848.
Maremanda KP, Khan S, Jena G: Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. Biochemical and biophysical research communications. 2014, 445(3):591-596.
McCormick CC: Induction and accumulation of metallothionein in liver and pancreas of chicks given oral zinc: a tissue comparison. The Journal of nutrition. 1984, 114(1):191-203.
Moleirinho A, Carneiro J, Matthiesen R, Silva RM, Amorim A, Azevedo L: Gains, losses and changes of function after gene duplication: study of the metallothionein family. PloS one. 2011, 6(4):e18487.
Nakamura T, Nishiyama S, Futagoishi-Suginohara Y, Matsuda I, Higashi A: Mild to moderate zinc deficiency in short children: effect of zinc supplementation on linear growth velocity. The Journal of pediatrics. 1993, 123(1):65-69.
Oleske JM, Westphal ML, Shore S, Gorden D, Bogden JD, Nahmias A: Zinc therapy of depressed cellular immunity in acrodermatitis enteropathica. Its correction. American journal of diseases of children. 1979, 133(9):915-918.

Onosaka S, Tetsuchikawahara N, Min KS: Paradigm shift in zinc: metal pathology. The Tohoku journal of experimental medicine. 2002, 196(1):1-7.
Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S: Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. Metabolism: clinical and experimental. 1999, 48(11):1414-1417.
Oteiza PI: Zinc and the modulation of redox homeostasis. Free radical biology & medicine. 2012, 53(9):1748-1759.
Oteiza PL, Olin KL, Fraga CG, Keen CL: Oxidant defense systems in testes from zinc-deficient rats. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine. 1996, 213(1):85-91.
Ovesen J, Moller-Madsen B, Thomsen JS, Danscher G, Mosekilde L: The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats. Bone. 2001, 29(6):565-570.
Ozcelik D, Naziroglu M, Tuncdemir M, Celik O, Ozturk M, Flores-Arce MF: Zinc supplementation attenuates metallothionein and oxidative stress changes in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Biological trace element research. 2012, 150(1-3):342-349.
Ozer Sehirli A, Sener G, Ercan F: Protective effects of pycnogenol against ischemia reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. Renal failure. 2009, 31(8):690-697.
Ozturk A, Baltaci AK, Bediz CS, Mogulkoc R, Gungor S: Effects of zinc and melatonin deficiency on testicular tissue of rats. Biological trace element research. 2003, 96(1-3):255-262.
Ozturk A, Baltaci AK, Mogulkoc R, Oztekin E, Kul A: The effects of zinc deficiency and testosterone supplementation on leptin levels in castrated rats and their relation with LH, FSH and testosterone. Neuro endocrinology letters. 2005, 26(5):548-554.
Ozturk H, Ozturk H, Terzi EH, Ozgen U, Duran A, Uygun I: Protective effects of rosmarinic acid against renal ischaemia/reperfusion injury in rats. JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association. 2014, 64(3):260-265.
Parke DV, Sapota A: Chemical toxicity and reactive oxygen species. International journal of occupational medicine and environmental health. 1996, 9(4):331-340.
Parlakpinar H, Sahna E, Acet A, Mizrak B, Polat A: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on myocardial ischemia-reperfusion-induced apoptotic cell death. Toxicology. 2005, 209(1):1-14.
Patockova J, Marhol P, Tumova E, Krsiak M, Rokyta R, Stipek S, Crkovska J, Andel M: Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca. 2003, 52(1):131-135.
Peixoto NC, Serafim MA, Flores EM, Bebianno MJ, Pereira ME: Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. Life sciences. 2007, 81(16):1264-1271.
Penckofer S, Schwertz D, Florczak K: Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and pro-oxidants. The Journal of cardiovascular nursing. 2002, 16(2):68-85.
Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH: Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research. 2009, 22(1):46-55.
Pirev E, Calles C, Schroeder P, Sies H, Kroncke KD: Ultraviolet-A irradiation but not ultraviolet-B or infrared-A irradiation leads to a disturbed zinc homeostasis in cells. Free radical biology & medicine. 2008, 45(1):86-91.
Powell SR, Aiuto L, Hall D, Tortolani AJ: Zinc supplementation enhances the effectiveness of St. Thomas' Hospital No. 2 cardioplegic solution in an in vitro model of hypothermic cardiac arrest. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 1995, 110(6):1642-1648.
Prasad AS: Clinical manifestations of zinc deficiency. Annual review of nutrition. 1985, 5:341-363.
Prasad K, Kalra J, Chan WP, Chaudhary AK: Effect of oxygen free radicals on cardiovascular function at organ and cellular levels. American heart journal. 1989, 117(6):1196-1202.
Pucheu S, Coudray C, Tresallet N, Favier A, de Leiris J: Effect of dietary antioxidant trace element supply on cardiac tolerance to ischemia-reperfusion in the rat. Journal of molecular and cellular cardiology. 1995, 27(10):2303-2314.
Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M: Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. International journal of environmental health research. 2014, 24(4):378-399.
Ripa S, Ripa R: [Zinc and the growth hormone system]. Minerva medica. 1996, 87(1-2):25-31.

Ruttkay-Nedecky B, Nejdl L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R: The role of metallothionein in oxidative stress. International journal of molecular sciences. 2013, 14(3):6044-6066.

Sabolic I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM: Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine. 2010, 23(5):897-926.

Sağır M: N-vivo Sıçanda Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Nekrozunda Losartan, Kaptopril ve Anjiotensin II Tip 2 Reseptör Agonistinin Etkileri (CGP42112A). İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi. 2013, Uzmanlık Tezi.

Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Cremaschi G, Goldman CG, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J: Zinc status and immune system relationship: a review. Biological trace element research. 2000, 76(3):193-205.

Schweigel-Rontgen M: The families of zinc (SLC30 and SLC39) and copper (SLC31) transporters. Current topics in membranes. 2014, 73:321-355.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK: Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. Circulation research. 2002, 91(5):406-413.

Sun W, Miao X, Zhou S, Zhang L, Epstein PN, Mellen N, Zheng Y, Fu Y, Wang Y, Cai L: Zinc rescue of Akt2 gene deletion-linked murine cardiac dysfunction and pathological changes is metallothionein-dependent. Journal of molecular and cellular cardiology. 2014, 74C:88-97.

Sunar F, Gormus ZI, Baltaci AK, Mogulkoc R: The effect of low dose zinc supplementation to serum estrogen and progesterone levels in post-menopausal women. Biological trace element research. 2008, 126 Suppl 1:S11-14.

Szczurek EI, Bjornsson CS, Noto AD, Taylor CG: Renal metallothionein responds rapidly and site specifically to zinc repletion in growing rats. Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements. 2009, 23(3):176-182.

Şener G, Yeğen ÇB: İskemi Reperfüzyon Hasarı. Klinink Gelisim. 2009, 22(3):5.

Tang Y, Yang Q, Lu J, Zhang X, Suen D, Tan Y, Jin L, Xiao J, Xie R, Rane M and others: Zinc supplementation partially prevents renal pathological changes in diabetic rats. The Journal of nutritional biochemistry. 2010, 21(3):237-246.

Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M: A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. World journal of surgical oncology. 2011, 9:54.

Tran CD, Butler RN, Howarth GS, Philcox JC, Rofe AM, Coyle P: Regional distribution and localization of zinc and metallothionein in the intestine of rats fed diets differing in zinc content. Scandinavian journal of gastroenterology. 1999, 34(7):689-695.

Turner TT, Lysiak JJ: Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction. Journal of Andrology. 2008, 29:5.

Valentine RA, Jackson KA, Christie GR, Mathers JC, Taylor PM, Ford D: ZnT5 variant B is a bidirectional zinc transporter and mediates zinc uptake in human intestinal Caco-2 cells. The Journal of biological chemistry. 2007, 282(19):14389-14393.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology. 2007, 39(1):44-84.

Vallee BL, Falchuk KH: The biochemical basis of zinc physiology. Physiological reviews. 1993, 73(1):79-118.

Varghese J, Faith M, Jacob M: Zinc prevents indomethacin-induced renal damage in rats by ameliorating oxidative stress and mitochondrial dysfunction. European journal of pharmacology. 2009, 614(1-3):114-121.

Vasak M: Advances in metallothionein structure and functions. Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements. 2005, 19(1):13-17.

Villarreal L, Tio L, Capdevila M, Atrian S: Comparative metal binding and genomic analysis of the avian (chicken) and mammalian metallothionein. The FEBS journal. 2006, 273(3):523-535.

Vinten-Johansen J: Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. Cardiovascular research. 2004, 61(3):481-497.

Weight SC, Bell PR, Nicholson ML: Renal ischaemia--reperfusion injury. The British journal of surgery. 1996, 83(2):162-170.

Wellinghausen N, Kirchner H, Rink L: The immunobiology of zinc. Immunology today. 1997, 18(11):519-521.
Wilhelm J: Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. Acta Universitatis Carolinae Medica Monographia. 1990, 137:1-53.
Wong WY, Flik G, Groenen PM, Swinkels DW, Thomas CM, Copius-Peereboom JH, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP: The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. Reproductive toxicology. 2001, 15(2):131-136.
Woods JR, Jr., Plessinger MA, Miller RK: Vitamins C and E: missing links in preventing preterm premature rupture of membranes? American journal of obstetrics and gynecology. 2001, 185(1):5-10.
Xu Z, Zhou J: Zinc and myocardial ischemia/reperfusion injury. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine. 2013, 26(6):863-878.
Xue W, Liu Y, Zhao J, Cai L, Li X, Feng W: Activation of HIF-1 by metallothionein contributes to cardiac protection in the diabetic heart. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2012, 302(12):H2528-2535.
Yağmurdur H, Başar H: Ekstremite Cerrahisinde Turnike Uygulamasına Bağlı İskemi-Reperfüzyon Hasar ve Anestezik Yaklaşımm. TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi. 2007, 6(1-2).
Yamaguchi M, Gao YH, Ma ZJ: Synergistic effect of genistein and zinc on bone components in the femoral-metaphyseal tissues of female rats. Journal of bone and mineral metabolism. 2000, 18(2):77-83.
Yamaguchi M, Ozaki K, Suketa Y: Alteration in bone metabolism with increasing age: effects of zinc and vitamin D3 in aged rats. Journal of pharmacobio-dynamics. 1989, 12(2):67-73.
Yang CL, Du XH, Zhao JH, Chen W, Han YX: Zinc-induced metallothionein synthesis could protect from gentamicin nephrotoxicity in suspended proximal tubules of rats. Renal failure. 1994, 16(1):61-69.
Yang J, Cherian MG: Protective effects of metallothionein on streptozotocin-induced diabetes in rats. Life sciences. 1994, 55(1):43-51.
Yildiz H, Durmus AS, Simsek H, Yaman I: Effects of sildenafil citrate on torsion/detorsion-induced changes in red blood cell and plasma lipid peroxidation, antioxidants, and blood hematology of male rats. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology. 2011, 159(2):359-363.
Yoshikawa Y, Ueda E, Miyake H, Sakurai H, Kojima Y: Insulinomimetic bis(maltolato)zinc(II) complex: blood glucose normalizing effect in KK-A(y) mice with type 2 diabetes mellitus. Biochemical and biophysical research communications. 2001, 281(5):1190-1193.
Zago MP, Oteiza PI: The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. Free radical biology & medicine. 2001, 31(2):266–274.
Zago MP, Verstraeten SV, Oteiza PI: Zinc in the prevention of Fe2+-initiated lipid and protein oxidation. Biological research. 2000, 33(2):143-150.
Zimmerman BJ, Granger DN: Reperfusion injury. The Surgical clinics of North America. 1992, 72(1):65-83.

7. ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İskemi - Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçan Böbrek, Testis ve Kalp Dokularında Çinko Sülfat Uygulamasının Metallotionin Düzeyleri Üzerine Etkisi

Betül YAZĞAN

Fizyoloji Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ / KONYA, 2014

Danışman

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI

Metallotioninler, hücre içi çinko dengesinin düzenlenmesi ve fizyolojik etkilerine aracılık etmelerinin yanı sıra güçlü antioksidan etkileriyle de dikkat çeken proteinlerdir. Bu çalışmanın amacı da sıçanlarda testis, böbrek ve kalp iskemi-reperfüzyon hasarında çinko uygulamasının metallotioin düzeylerini nasıl etkilediğinin araştırılmasıdır.

Çalışma üç ayrı projede kullanılan 94 adet Wistar-Albino cinsi erişkin erkek sıçanlardan elde edilen testis, böbrek ve kalp dokuları üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma protokolü Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi "Canlı Hayvan Kullanılmayacak Araştırmalar İçin Etik Kurul Raporu" etik kurulu tarafından onaylandı.

Deney Hayvanları: 1.Testis çalışma grupları: Kontrol (T-Kont.), Sham (T-Sh.), İskemi/Reperfüzyon (T-İ/R.) ve çinko uygulanan İskemi /Reperfüzyon (T/Zn-İ/R). 2.Böbrek çalışma grupları: Kontrol (B-Kont.), Sham (B-Sh), İskemi/Reperfüzyon (B-İ/R) ve çinko uygulanan İskemi /Reperfüzyon (B/Zn-İ/R). 3.Kalp çalışma grupları: Kontrol (K-Kont), Kalp İskemi/Reperfüzyon (K-İ/R) ve çinko uygulanan İskemi /Reperfüzyon (K/Zn-İ/R) olmak üzere toplam 11 gruba ayrıldı. Sham ile testis, böbrek ve kalp Iskemi-reperfüzyon uygulamaları genel anestezi altında yapıldı. Çinko İ/R gruplarına ise 21 gün süreyle sıçan başına 5 mg/kg gün periton içi (i.p.) çinko sülfat verildi. Uygulamaların bitiminde tüm hayvanlar dekapite edilerek testis, böbrek ve kalp dokuları alındı. Bahsedilen dokularda Rat metallotionin antikoru ile immünohistokimyasal boyama prosedürleri gerçekleştirildi. Boyanan preperatlar fotoğraflandı ve metallotionin boyanmış hücreler ışık mikroskobunda sayılarak yüzdeleri hesaplandı.

Testis ve böbrek doku örneklerinde çinko desteği metallotionin boyanmış hücre sayılarını diğer gruplara oranla önemli şekilde arttırdı ($p<0.05$). Kalp doku örneklerinde ise grupların metallotionin düzeyleri arasında amlamlı bir farklılık elde edilmedi.

Çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular çinko uygulamasının özellikle böbrek ve testis iskemi reperfüzyonunda metallotionin sentezini uyararak antioksidan aktiviteyi artırıcı etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Çinko; Metallotionin; İskemi/ Reperfüzyon Hasarı; Oksidatif Stres; Antioksidan.

8. SUMMARY

The Effect of Zinc Sulphate Supplementation on the Metallothionein Levels in Rat Kidney, Testes and Heart Tissue Which Applied Ischemia-Reperfusion.

Metallothioneins, as well as mediating physiological effects and intracellular zinc balance and attracting attention are proteins with potent antioxidant. The aim of the present study was to search how zinc sulphate supplementation affects metallothionein levels testes, kidney and heart ischemia-reperfusion damage in rats.

Study was performed on the testes, kidney and heart tissue which obtain from 3 different Project, total 94 Wistar-Albino type adults male rats. Experimental protocols were approved by Selcuk University, Veterinary School, Ethics Committee.

Animals groups for testes: Control (T-Cont.), Sham (T-Sh.), ischemia /reperfusion (T-I/R.) and Zinc supplemented ischemia /reperfusion (T/Zn-I/R), for kidney: Control (K-Cont.), Sham (K-Sh), ischemia/reperfusion (K-I/R), Zinc supplemented ischemia/reperfusion (K/Zn-I/R), for heart: Control (H-Cont), Heart ischemia/reperfusion (H-I/R) and Zinc supplemented ischemia/reperfusion (H/Zn-I/R) which totally were 11 groups. Sham and testes, kidney and heart ischemia/reperfusion groups were performed under general anesthesia. For Zinc I/R groups, zinc supplemented 5 mg/kg/day for 3 week by intraperitoneally. After supplementations all were decapited and testes, heart and kidney tissues taken. In mentioned tissue immunohistochemical staining procedures were conducted by rat metallothionein antibody. The stained preparations were photographed and metallothionein stained cells counted by light microscope and calculated the percentage of stained cells.

In the testes and kidney tissues, zinc supplementation has increased metallothionein stained cell number compared to the other groups ($p<0.05$). However, in the heart tissue, metallothionein levels were not different among the groups.

The results of present study show that zinc supplementation induces MT synthesis especially in kidney and testes ischemia-reperfusion and may have antioxidant activity by stimulating the synthesis metallothionein.

Key Words: Zinc; Metallothionein; Ischemia/Reperfusion damage; Oxidative Stress; Antioxidant.

10. ÖZGEÇMİŞ

25.11.1975 yılında Diyarbakır-Silvan'da doğdu. İlköğretim ve Lise eğitimini Diyarbakır'da tamamladı. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldu. 2010 yılında Tıpta Uzmanlık Sınavı'nı kazanarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Bölümü'nde Tıpta Uzmanlık Eğitimine başladı. İngilizce bilmektedir. Evli ve üç çocuk annesidir.