

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ MASTER (YÜKSEK LİSANS) PROGRAMI

**LİPOLİSAKKARİT İLE UYARILMIŞ NATURAL KİLLER (NK)
AKTİVİTESİNE ÇİNKO EKSİKLİĞİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Deniz ERBAŞ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Turgut İMİR

ANKARA-1994

TEŐEKKÖR

Çalıőmalarımızda deneysel çinko eksikliği yaratarak çok büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Prof.Dr.Naci Bor'a, danışmanım Prof.Dr.Turgut İmir'e ve araő tıma görevlisi Güler Öztürk'e teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1953 yılında İzmir'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Manisa'da, Lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. A.İ.T.İ.A. Diş hekimliği Fakültesini 1978 yılında bitirdikten sonra 2 yıl süre ile S.S.Y.B Yaşlılar Huzurevinde çalıştı. 1980-1981 yıllarında askerlik görevini tamamladıktan sonra 1981 yılında Gazi Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesine Fizyoloji Araştırma Görevlisi olarak başladı. 1986 yılında Fizyolojide doktorasını, 1988 yılında Doçentliğini tamamladı. Halen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında Öğretim Üyesi olarak çalışmaktadır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I - GENEL BİLGİLER	1
Ia- Çinko Metabolizması	1
Ib- Çinko Eksikliği	2
Ic- Çinko - İmmün Sistem İlişkisi	5
Id- Natural Killer (NK) ve Lymphokine Activated Killer Cell (LAK) Hücrelerinin Özellikleri	5
Ie- NK Sitotoksitesi Ölçüm Yöntemi	6
II - MATERYAL ve YÖNTEM	7
IIa- Materyal	7
IIa ₁ - Cam ve Plastik Gereçler	7
IIa ₂ - Reaktifler	7
IIa ₃ - Kullanılan Cihazlar	8
IIa ₄ - Kullanılan Tampon ve Besiyerlerinin Bileşimleri Çinko Ölçümündeki Stok Solüsyonlar	8
IIa ₅ - Çinko Standart Solüsyonu	9
IIa ₆ - Fosfat Tamponu (PBS)	9
IIb - YÖNTEM	10
IIb ₁ - Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanı	10
IIb ₂ - Çinko Tayini	10

IIb ₃ - Effektör Hücrelerin Hazırlanması	10
IIb ₄ - Mıya Hücrelerinin Hedef Hücre Olarak Hazırlanması	11
IIb ₅ - Sitotoksisite Deneyi.....	12
IIb ₆ - Sitotoksisite Hesabı	12
II - BULGULAR	13
IV - TARTIŞMA ve SONUÇ	15
V - ÖZET	17
VI - SUMMARY	18
VII - KAYNAKLAR	19

I- GENEL BİLGİLER

Çinko (Zn) nun insan sağlığındaki önemi ile ilgili ilk yayın 1963 de yapılmıştır (43). Tek bir gıdanın eksikliğinin sağlanması ile immün cevaplar üzerine olan etkileri bugün daha iyi anlaşılabilen ve Zn eksikliğinde insanda ve deney hayvanlarında konakçının savunma mekanizmasında hızla yetersizliğe neden olduğu çalışmalarla ortaya konulabilmektedir (15).

Ratlarda normal Zn plazma konsantrasyonu 16-20 $\mu\text{mol/l}$, insanda ise 12-16 $\mu\text{mol/l}$ dir.

Plazmada α_2 -makroglobulin ve albumin'e ağırlıklı olarak bağlanan Zn'nun çok az bir kısmı da düşük moleküler ağırlıklı maddelere bağlanır (7, 30, 50). Plazmada serbest halde çok az olup, hücre içinde de proteine bağlı bulunur (36, 47). Hücre içinde metallothionein proteini ile kompleks halde bulunur. Ancak metallothionein'e bağlı Zn'nun yarı ömrü kısadır. Metallothionein tüm organizmada Zn metabolizmasını karaciğer ve bağırsaktaki etkisi ile düzenlemektedir (16).

Zn yüzden fazla enzimde bir bileşeni yada ko faktörü olarak yer alır. Bu enzimlerden bazıları oksidoredüktaz, Transferaz, Hidrolaz, liyaz, izomeraz, ligazlardır (8).

Ia- ÇINKO METABOLİZMASI

Yetişkin normal bir şahısta 1.5-2 g civarında çinko bulunmakta ve bu Fe^{++} den sonra en çok bulunan iyon özelliğini sağlamaktadır. Bunun çoğu kaslarda, kemikte ve az olarsakta karaciğerdedir. %0.1'i de plazmada bulunur. Böbrek, retina ve prostat'ta da bulunmaktadır. Kısa süreli eksikliklerde kemik ve kaslardaki miktar fazla değişmemektedir.

Çinko emilimi en çok duodenumdan, az miktarlarda da ileum ve jejunumdan olmaktadır. Metallothionein çinko absorpsiyonu ve atılımında önemli rol oynamaktadır.

Plazmadaki çinkonun büyük bir kısmı albumine bağlanır. α_2 -makroglobulin, transferrin, seruloplazmin, haptoglobuline de bir kısmı bağlanabilmektedir. Histidin, glutamin, treonin, sistein ve lizin de çinkoya bağlanma özelliği taşıyan aminoasitlerdir.

Diyet çinkosunun yaklaşık %20-30'u emilir. Hayvansal gıdalarla alınan çinko daha fazladır. Sindirim sisteminden günde 1-2 mg, idrarla 0.5 mg çinko kaybı meydana gelmektedir. Günlük ihtiyaç ise 10-15 mg olup hamilelikte ve emziren annede bu ihtiyaç daha fazladır (40).

1b- ÇİNKO EKSKLİĞİ

Çinko eksikliğine ilişkin patolojiler, yaş, seks, süre ve şiddete bağlı olarak değişiklikler gösterir. Bu eksikliğe ilişkin patolojileri Swenerton ve Hurley 1968'de açıklamışlardır (48).

Ratlarda plazma Zn konsantrasyonu düşse bile kemik, pankreas, ince barsak mukozası bölgelerinin dışında doku düzeyinde Zn azalması kısa süre içinde görülmez. Çinko eksik diyet almından 2-4 gün sonra ratlar gıda alımlarını azaltmaktadır. Kısa süre sonra da trombosit, T-lenfosit, keratinosit fonksiyonlarında azalma meydana gelmektedir. Çinko eksikliğine bağlı gelişen patolojik olaylar ve süreleri Tablo 1'de gösterilmiştir (6).

Tablo 1 : Zn eksikliğine bağlı gelişen patolojik olaylar

	Diyet eksikliğinden sonra gelişme süresi	Diyete konduktan sonra geridönüş
Düşük plazma Zn seviyesi	12 saat	1 gün yada az
Azalan gıda alımını	3-4 gün	4-5 saat
Azalan ağırlık	4 gün	1 gün
Hemostaz depresyonu	4 gün	4 saat
Yetersiz koagülasyon	7 gün	3-7 günden az
Deri lezyonları	10-14 gün	2-3 gün
Azalan immün fonksiyonları	12 gün	4 gün
Eritrosit ozmotik fragilitesi	21 gün	1 gün
Nöropati ve hiperaljezi	25 gün	4 gün

Çinko eksikliği olan ratlarda eritrosit membran fragilitesi artmaktadır. Diyete Zn ilavesi ile bu durum ortadan kalkarken, *In vitro* eklenmesi bir etki yaratmamaktadır (38).

Çinko eksikliği bulunan ratlarda kanama zamanı uzamaktadır. Bunun Ca^{++} kanallarındaki defekten kaynaklandığı kabul edilmektedir (27).

Çinko eksikliğinde timus gelişiminde azalma, dalak kütleğinde azalma, dolaşımdaki lenfosit sayısında azalma meydana gelmektedir (33). Makrofaj fonksiyonlarında azalır, nötrofil kemotaksisi yetersizleşir (22). Damarlarda bradikinin ve prostasikline bağlı oluşan vazodilatasyon azalır, damardışına albumin hareketi artar (9, 31).

Beyin ve periferik sinir fonksiyonları Zn eksikliğinde bozulmaktadır (37).

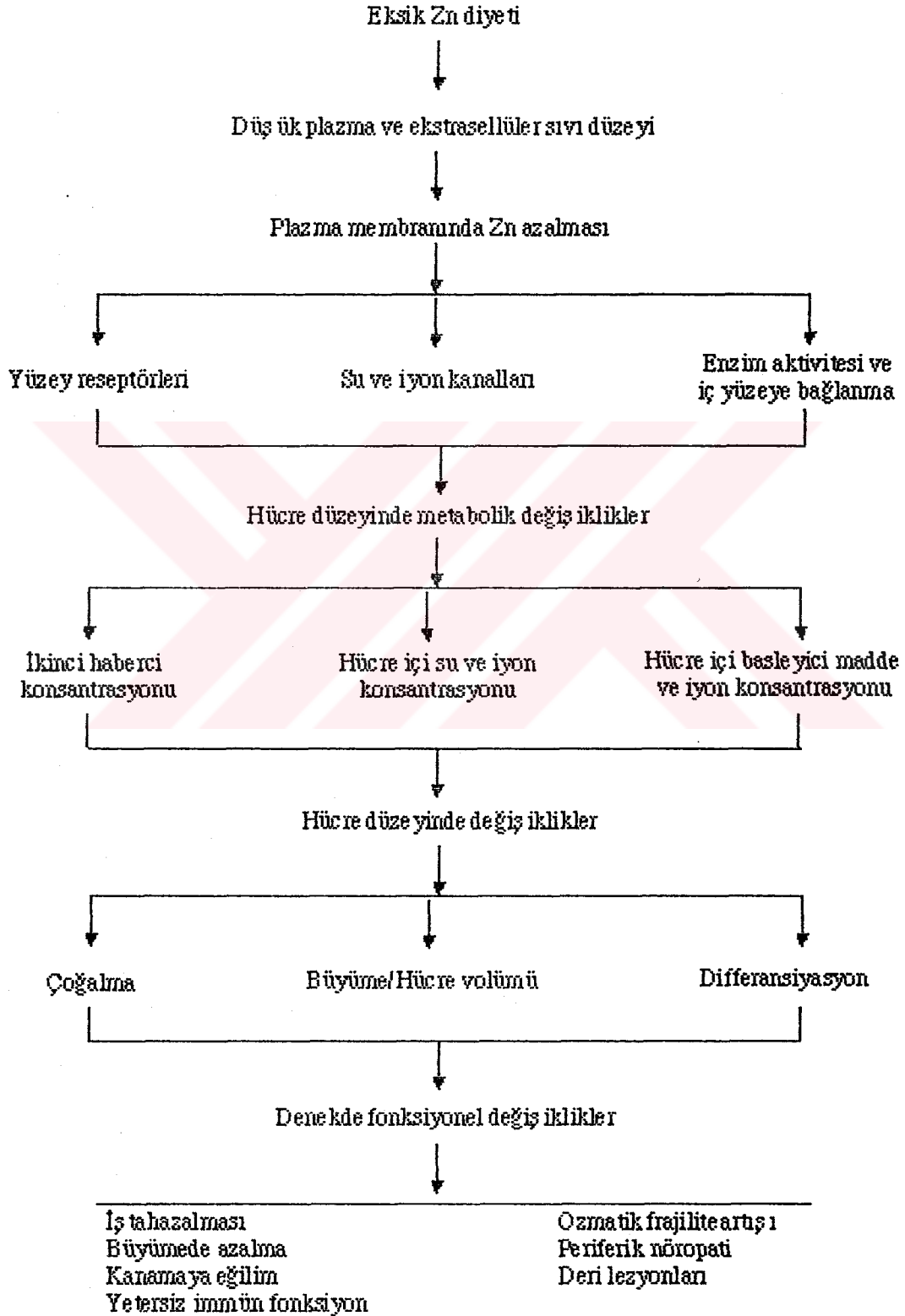
Çinko eksikliği pek çok nedene bağlı olarak gelişebilmektedir. Tahıl ürünlerinin çok miktarda yendiği popülasyonlarda, tahılların fitat ve fosfat içeriyor oluşu Zn emilimini azaltmaktadır (10).

Malabsorpsiyonda, idrarla fazla atılımda, yanıklarda, şeker hastalarında, protein eksikliklerinde, sirozlu hastalarda çinko eksikliği meydana gelebilmektedir (42).

Akrodermatitis enteropatika ve orak hücre anemisinde çinko eksikliği meydana gelmektedir (26).

Diyette alınan Zn eksikliği durumunda meydana gelen olaylar zinciri Tablo 2 de gösterilmiştir(6)

Tablo 2 : Diyetle alınan Zn eksikliğinde meydana gelen olaylar.



1c- ÇİNKO - İMMÜN SİSTEM İLİŞKİSİ

Çinko eser element olarak normal hücresel fonksiyonları ve çoğalma için gerekli bir maddedir. Çinko eksikliğinin epitel, gastrointestinal mukoza hücreleri ve lenfosit çoğalmasına olan etkileri pek çok çalışma ile belirlenmiştir (29). Çinko eksikliğinin immün sistem üzerine olan zararlı etkisi T ve B hücre mitojenite azalması, T helper hücre yetersizliği, Natural Killer (NK) hücre fonksiyonlarının depresyonu şeklindedir (5, 17, 25). Kansersiz hastalarda da serum Zn düzeyleri düşük bulunmuştur (13). Kanseri olgularında immün sistemin ve daha da önemlisi NK hücrelerinin önemi dikkate alınacak olursa Zn'un bu fonksiyondaki rolü daha iyi anlaşılacaktır. İdrarla Zn atılımı fazla olduğunda fitohemaglutinine T hücre cevabı azalmaktadır. Oral yoldan verilen Zn, bu yetersizliği gidermektedir (1). Zn eksikliği NK aktivitesini de düşürmekte ve azalmış NK aktivitesi çeşitli kanser olgularında tesbit edilmiş bulunmaktadır (32).

Yukarıda belirtilenlerin tersine, Zn'un diyetle fazla alınımı zararlı etkide bulunmaktadır. Normal günlük alınması gerekli miktarın (15 mg) 20 katını alan şahıslarda polimorfo nuklear lökosit ve lenfosit fonksiyonlarında azalma meydana gelmektedir. Bu olaydan, değişen lipoprotein düzeyleri sorumlu tutulmaktadır (11).

Çinko ve immün fonksiyonlar arasındaki ilişki, ilk olarak A46 otozomal resesif mutant gen taşıyan Friesian soyu Danimarka sığırlarında ve deneysel çinko eksikliği oluşturanlar sığırlarda timik aplazinin birbirine benzer olduğunun gözlenmesi ile ortaya konulmuştur. Bu sığırlarda çinko malabsorpsiyonu konjenital olarak geçmekte ve lenfoid organlarda atrofi, serum timus faktörü (FTS) üretiminde azalma, fitohemaglutinin (PHA) ile uyarılmış lenfosit cevabında düşme, T hücrelerine bağlı antijenik cevapta IgM, ve IgG antikor cevabında azalma, allerjik reaksiyonlar, Natural Killer hücreleri ve sitotoksik T lenfositlerine bağlı tümör sitotoksitesinde azalmalar görülmektedir. İnsanda da çinko eksikliği anormal lökosit kemotaksisi, çeşitli allerjik reaksiyonlar ve T hücre mitojenezinde düşüşe neden olmaktadır (40).

1d - NATURAL KİLLER (NK) ve LYMPHOKİNE ACTIVATED KİLER CELL (LAK) HÜCRELERİNİN ÖZELLİKLERİ

NK hücreleri iri azurofilik granülleri ve diğer lenfositlerden daha büyük olmaları nedeni ile iri granüllü lenfosit (LGL) olarak da tanımlanmaktadır (14). Özellikle intrasellüler enfeksiyonlara ve tümör hücrelerine karşı etkili hücrelerdir (14). Sitokinler ve bakteriyel ürünlerin NK hücre aktivasyonlarına etkisi üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. IL-2 bunların arasında en önemlisidir. Bununla uyarılan NK hücreleri LAK haline geçmektedir. Böyle aktive olan NK hücrelerinin lizis fonksiyonu artar. İnterferonlarda NK aktivitesini artırıcı etkide bulunmaktadır (41). Stafilokokkal enterotoksin -B (SEB) ve lipopolisakkaridlerde (LPS) NK sitotoksitesini artırıcı etkidedir (14).

NK hücrelerinin hedef hücrelerini aralarında bir sensitizasyon olmaksızın tanımaları önemli özelliklerini teşkil eder (40).

NK hücreleride kemik iliğindeki stem cellerden köken almaktadır (28). Doğurunda en yüksek seviyede olup, yaşlandıkça sayıları azalmaktadır.

Prostaglandinler, kortikosteroidler ve lipoksijenaz inhibitörleri NK aktivitesini baskılayıcı etkide bulunurlar. Lateks, siliken ve zafadeks gibi inert partiküllerde sitolitik etkiyi azaltıcı etkide bulunurlar (45, 46).

1e - NK SİTOTOKSİSİTESİ ÖLÇÜM YÖNTEMİ

Sitotoksite ölçümünde en sık kullanılan yöntem Cr^{51} ile işaretli hedef hücrelerde radyoizotop salınım metodudur. Ancak çeşitli zorlukları nedeni ile bu yöntem alternatif daha basit ve kısa sürede yanıt veren yöntemlerin kullanımı yapılmaktadır.

Çalışmada kullanılan "Doğal antikandidial İndeks Yöntemi" bu şekilde alternatif metod olup kısa süreli ve ekonomiktir. bu yöntemle elde edilen sonuçlar da Cr^{51} ile elde edilenlerle paralellik göstermektedir (39).

II- MATERYAL VE YÖNTEM**IIa - Materyal :****IIa₁ - Cam ve Plastik Gereçler :**

- a- Pastör pipeti
- b- Petri kusu
- c- Disposable tüpler (steril)
- d- Dereceli pipetler
- e- Thoma lamı
- f- V tabanlı mikrotitrasyon plak (sterilen G :B)
- g- Düz tabanlı mikrotitrasyon plak (microtesp II falcon)
- h- Steril disposable plastik enjektör ve iğne

IIa₂ - B- Reaktifler :

- a- Lenfosit ayırma solüsyonu : Histopaque 1077 (Sigma)
- b- Fötal Calf Serum (FCS) (Sigma)
- c- Fostal tamponü (PBS) (Laboratuvarda hazırlandı)
- d- Kristal viyole boyası
- e- Lugol stok solüsyonu
- f- Tween 20 (Sigma)
- g- Trypan Blue (%0.2 lik solüsyon)
- h- Saburo dektroz ağar
- ı- Gliserol solüsyonu (%5 lik)
- i- Çinko tozu
- j- Hidroklorik asit
- k- Lipopolisakkarit (Sigma) (100 µg/ml)

IIIa₃ - C- Kullanılan Cihazlar :

- a- Perkin - Elmer Model 103 atomik absorpsiyon spektrofotometresi
- b- soğutmalı santrifüj
- c- Karbondioksit ve hava bağlanabilir 131 ve nem ayarlı etüv
- d- Vorteks
- e- Binoküler mikroskop
- f- Santrifüj
- g- Makas ve penset
- h- Çelik süzgeç
- i- Otomatik mikropipetler
- j- Multi - scan spektrofotometre
- k- Çeşitli tampon hazırlamada kullanılan maddeler
- l- Çinko eksik diyet
- m- Steril box'lar.

IIIa₄ - D- Kullanılan Tampon ve Besiyerlerinin Bileşimleri Çinko Ölçümündeki Stok Solüsyonlar :

Çinko stok solüsyonu (0.500 g/l Zn) : 0.5 g Çinko metal veya tozu deiyonize su ile 1-1 dilüe edilmiş hidroklorik asit (HCl)'in minimum miktarları ile çözülerek 1 l deiyonize su ile dilüe edildi.

IIa₅ - Çinko Standart Solüsyonu :

Kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması için gerekli olan standart çözeltiler uygun sulandırılmalar yapılarak hazırlandı. Sulandırma işlemi için % 5 lik gliserol kullanılarak 25, 50, 75, 100, 200 µg/dl standart çözeltiler hazırlandı.

Çinko eksik Diyet Bileşimi

- Sodyum kazeinat	200 g/kg
- Glukoz	636.5 g/kg
- Mısır özü yağı	100 g/kg
- Selüloz	30 g/kg

- Tuz karışımı*

- Vitaminkarışımı**

* **Tuz Karışımı (g/kg)** : Ca CO₃, 9.94; Mg SO₄, 1.65; NaCl, 5.54; K₂ HPO₄, 10.68; Ca (H₂PO₄), 2.49; KI, 0.026; Mn SO₄. 4H₂O , 0.008; Cu SO₄. 15 H₂O , 0.009; CaCl₂. 6 H₂O , 0.002; ferik sitrat (% 16.7 Fe⁺⁺⁺) 0.91.

** **Vitamin karışımı (mg/kg)** : Biotin, 4; Vitamin B₁₂, 20; Ca-pantothenat 16; kolin klorid, 1500; folik asit, 0.5; niasin, 2.5; pridoksin - HCl, 4; riboflavin, 6; tiamin - HCl, 10; Vitamin A, 20; Vitamin E, 220; menadiun, 0.3.

IIa₆ - Fosfat Tamponu (PBS) :

1 lt için; NaCl, 8 g; KCl, 0.2 g; Na₂(HPO₄). 12 H₂O , 2.87 g; KH₂PO₄, 0.2 g tartularak de iyonize su içinde çözüldü ve pH 7.2'ye ayarlandı.

Kristal Viyole boyası :

a- Kristal viyole 2 g

Alkol (% 95 lik) 20 g

b- Amonyum okzalat 0.8 g

Distile su 80 ml

Lugol stok boyası :

Iyot 5 g

Potasyum İyodür 10 g

Distile su 100 ml

Kullanımdan önce 1 : 15 sulandırılır.

IIb - Yöntem**IIb₁ - Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanı :**

Ağırlıkları 60-65 g arasında değişen 20 adet 35-40 günlük erkek ratlar kullanıldı. Deney grubunu oluşturan 10 rat, çinkodan eksik diyet ile ve deiyonize su ile beslendi. Sulara çinko bulaşmasını engellemek için polietilen şişelerdeki su ile beslendi ve distile su ile yıkanmış çelik kafesler kullanıldı. Deneklere 21 gün diyet uygulandı. Kontrol grubunu oluşturan ratlara 84 mg/kg çinko içeren diyet ve normal su verildi. Ratlar normal bir yem yeme olanağı ile beslendiler.

IIb₂ - Çinko Tayini : "Perkin - Elmer Model -103" atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile plazmada çinko tayini yapıldı. Standart çözeltiler stok çinko çözeltisinden uygun sulandırmalar yapılarak hazırlandı. Sulandırma işlemleri için % 5 lik gliserol kullanıldı. 0.25; 0.50; 0.75; 1.0 µg/ml'lik standart çözeltiler hazırlandı. Heparinli enjektör ile alınan kan santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Plazma örnekleri dilbe edilme ksizin çinko tayinleri yapıldı.

IIb₃ - Effektör Hücrelerin Hazırlanması :

- 1- Rat, servikal dialokasyon ile öldürüldü
- 2- Dalak steril box ortamında çıkarıldı.
- 3- PBS konulmuş petri kutusunda 2 parçaya ayrıldı.
- 4- İğne yada makas uc u ile yavaş ça dalak zarından ayrıldı ve hücreler PBS içine çıkartıldı.
- 5- Enjektör ile püskürtme iş le mi yapıldı (yapışmış lenfositler birbirinden ayrıldı).
- 6- Çelik süzgeç ile süzüldü
- 7- Plastik tüb içine konulan Histopaque üzerine yavaş ça yayıldı.
- 8- 350 g'le +21°C de 35 dk santrifüje edildi.

9- Buffy - Coat tabakası pastör pipeti ile toplandı.

10- Toplanan hücreler 100 g, +4°C de 20 dk ve 550 g'de tekrar 10 dk olmak üzere 2 kez RPMI ile yıkandı.

11. Süpernatant atıldı ve hücreler 1-2 ml FCS ile kaplanmış petri kutusuna (120 mm çaplı) yayıldı (Monositlerin yapışması sağlanarak hücrelerden ayrılması için).

12- 37°C de % 5 CO₂, % 95 nem içeren etüvde 1 saat inkübe edildi.

13- Petri kutusunun yüzeyindeki yapışmayan hücreler pastör pipeti ile toplandı. Giemsa boyasıyla boyandı ve monosit % si belirlendi. Genel olarak % 98 lenfosit olduğu gözlemlendi.

14- 550 g'de +4°C de 10 dk RPMI ile yıkandı.

15- Hücreler, 100 µg/ml Lipopolisakkarit ile 18 saat inkübe edildi.

16- Hücreler 550 g'de 10 dk 2 kez PBS ile yıkandı.

17- Tripan blue ile (1:1 oranında) Thoma lamında canlılık yüzdesi hesaplandı.

18- Yalnızca %85-95 canlılık gösteren hücreler dene yde kullanıldı.

19- Hücreler 10⁷/ml olacak şekilde ayarlandı.

11b₄ - Maya Hücrelerinin Hedef Hücre Olarak Hazırlanması

1- *Candida stellatoidea* suş u, sabura dekoagara pasaj edildi.

2- 24 saatlik kültürden 15-20 koloni alınıp tüpün içinde ,PBS ile kanıştırıldı.

3- Üzerine 3 ml kristal viole boyası konulup vortex ile kuvvetle kanıştırıldı.

4- 700 g'de 10dk santrifüje edildi.

5- Süpernatant atıldı, vortex ile kanıştırılarak süspansiyon haline getirildi.

6- 5 ml PBS konularak 700 g'de santrifüje edildi.

7- Süpernatant atıldı ve *Candida* sedimenti vortex ile süspansiyon hazırlandı.

8- 2 ml lugol solüsyonu (1:15 stok solüsyon) konulup vortex ile kanıştırıldı.

9- 700 g'de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı.

10- 3 kez 700 g'de 5 er dk PBS ile yıkandı.

11- Süpernatant atıldı, Candida hücreleri 1 ml PBS içinde süspansiyon haline getirildi.

12- Thoma lamında sayıldı.

13- Maya hücreleri 10^7 /ml olacak şekilde ayarlandı.

IIb₅ - Sitotoksisite Deneği

Bu deney için V tabanlı mikrotitrasyon plakları kullanıldı.

1- İlk sıranın ilk üç çukuruna (spontan salınımı için) 100 µl PBS ve 100 µl hedef hücre kondu.

2- Maksimum salınım için 100 µl Tween 20 ve 100 µl hedef hücre konuldu. Tween 20 deterjan etkisi ile Candida hücrelerinin yapılarını bozarak hücre içeriğinin (boyanın) dışarı çıkışını sağlar.

3- Hedef / Effektör (E/H) hücreler değişik oranlarda hazırlandı ve her oran için 3 kez çalışıldı.

a- Çukurlara 1×10^6 lenfosit konuldu H/E oranı 1:1 oldu

b- Diğer 3 çukura 3×10^5 lenfosit konuldu, H/E oranı 1:0.3'e ayarlandı. Bu çukurlara 100 µl Candida süspansiyonu (1×10^6) eklendi.

4- Plak 40 g'le 5 dk santrifüje edildi.

5- 37°C de, %5 CO₂, %95 nem içeren etüvde 1.5 saat inkübe edildi.

6- İnkübasyon sonunda plak 40 g'le 3 dk santrifüj edildi.

7- Her çukurdaki süpernatandan 100 µl alınıp düz tabanlı mikrotitrasyon plakına konuldu.

8- Oluşan rengin absorbans değeri (optik dansite : OD) 595 nm'lik filtre ile multi scan spektrofotometrede değerlendirildi.

9- Her bir parametre için (maksimal, spontan) okunan değerlerin ortalaması alındı.

IIb₆ - Sitotoksisite Hesabı

Doğal antikondidial etki aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ sitotoksisite} = \frac{\text{Deneyin OD} - \text{Spontan salınım OD}}{\text{Max salınım OD} - \text{Spontan salınım OD}} \times 100$$

Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde "student t testi" uygulandı. Bulgular ortalaması (\bar{X}) ± standart (SD) hata şeklinde verildi.

III - BULGULAR

Normal diyet ile beslenen kontrol grubu ratlar beslenme süresince sağlıklı, parlak beyaz tüylü, iş tah ve aktiviteleri normal idi. Vücut ağırlıkları normal düzeylerde arttı. Deneye başlandığında 65 ± 5.2 g olan ağırlıkları, 21. günde 180 ± 18.2 g olmuş tur.

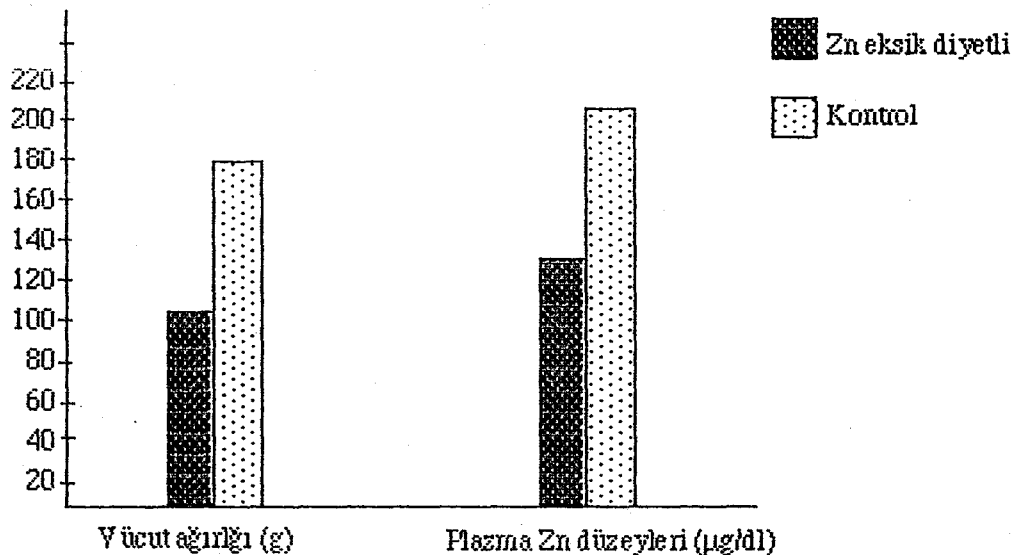
Çinko eksik diyet ile beslenen grupta, bu eksikliğe bağlı tipik belirtiler gözlenmiştir. İlk haftadan başlayarak, durgunluk ve iş tahsızlık, tüy dökülmesi, tüy renk ve parlaklığında değişim ve matlaşma, ikinci hafta ortasında sulu dışkı ve büyümede duruklama, 3. haftada davranış anormallikleri gözlemlendi. Vücut ağırlıkları diyete başlamadan önce 61 ± 5 g iken 21. günde 108 ± 8.4 g bulundu.

Bu bulgulara göre vücut ağırlıklarının normal beslenene göre, çinko eksik diyet ile beslenenlerde % 66.6 daha az olduğu gözlemlendi. Fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P < 0.001$). Plazma çinko değerleride, çinko eksik diyet ile beslenenlerde istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu ($P < 0.001$) Tablo 3, Şekil 1.

Tablo 3 : Vücut ağırlıkları ve plazma çinko değerleri

	n	Çinko eksik diyeti	Normal beslenen
Ağırlık (g)	10	108 ± 8.4	180 ± 18.2 P < 0.001
Plazma çinko düzeyleri ($\mu\text{g/dl}$)	10	131.7 ± 8.8	206 ± 17.7 P < 0.001

Şekil - 1 : Vücut ağırlıkları ve plazma çinko değerleri



Lipopolisakkarit ile uyarılan NK hücrelerinde litik aktivite çinko eksik diyet grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir ($P < 0.001$). Tablo 4, Şekil 2.

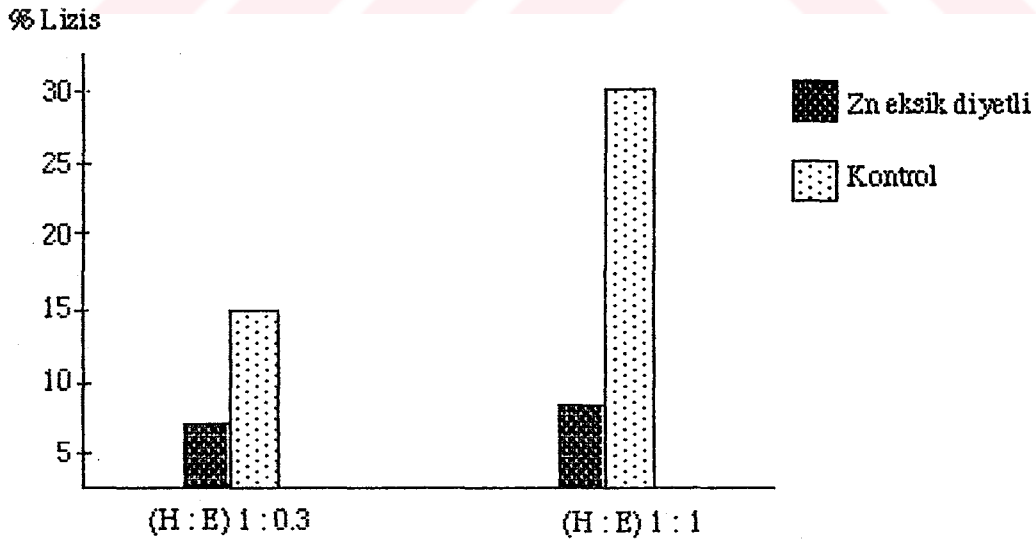
Tablo 4 : Lipopolisakkarit ile uyarılan NK hücrelerinde litik aktivite

(% sitotoksisite olarak).

	n	Zn eksik diyet	Normal grup
LPS ile uyarılmış (H:E) 1:1	10	9.5 ± 4.3	32.5 ± 3.5 $P < 0.001$
LPS ile uyarılmış (H:E) 1:0.3	10	4.6 ± 1.5	17.2 ± 4.5 $P < 0.001$

H:E (Hedef : Effektör)

Şekil - 2 : Lipopolisakkarit ile uyarılan NK hücrelerinde litik aktivite



IV - TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanda 14 eser elementin sağlık için gerekli olduğu düşünölmektedir. Demir, çinko, bakır, mangan, iyot, selenyum, krom, molibden'in gerekli olduğu gösterilmiştir. Kobalt, vanadium, fluor, silikon, nikel bazı hayvanlarda gerekli iken, insanda gerekli olmadığı gösterilmiştir (20, 44).

Son yıllarda eser elementlerle ilgili çalışmalar daha iyi anlaşılmasına karşın, yeterli düzeyde değildir. 1960'lerden sonra atomik absorpsiyon spektrofotometresinin geliştirilmesi ile doku ve vücut sıvılarında bunların tesbiti mümkün hale gelmiştir (51).

Invitro kültür koşullarında çinko eksikliğinin oluşturulması, çinkonun tüm hücre gruplarının proliferasyonu, diferansiyasyonu ve aktiviteleri üzerine etki mekanizmalarının incelenmesinde büyük yararlar sağlamaktadır. Çinko eksikliğinin oluşturulmasında EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik Asit) ve OP (1, 10 Orthophenanthroline) gibi çeşitli şelat yapıcı ajanlar kullanılmaktadır. Kültür ortamına OP eklenmesi NK aktivitesini önemli ölçüde inhibe etmektedir. Bu etki çinko ilavesi ile ortadan kaldırılmaktadır (2). B ve T hücrelerinin mitojenezi üzerine in vitro çinko eksikliğinin etkileri incelenmiş olup, pek çok hücre grubunda da inhibisyona neden olduğu ortaya konulmuştur.

Eser elementlerden çinko, demir ve selenyum insan ve hayvanda immün sistem üzerine önemli etkilerde bulunmaktadır. Çinko eksikliğinde makrofaj fonksiyonları ve nötrofil kemotaksisi azalmaktadır. Çinko eksikliğinin olduğu pekçok hastalık da (ince barsak sendromu, orak hücre anemisi, malnütrisyon hastalarında, parenteral beslenenlerde v.b.). T hücrelerinin çoğalması ve diferansiyasyonu bozulmaktadır (18, 19). İlk kez acrodermatitis enteropethica'lı çocuklarda çinko eksikliği, timus atrofi, lenfatik hipoplazi, lenfopeni, hipozinkemi, enfeksiyonlara yakalanma şansının artışı, timus kökenli immünitenin azlığı ile birlikte tesbit edilmiştir (3). Çinko eksikliğine bağlı oluşan bu belirtiler çinko verilii ile kısmen düzelmektedir (49).

NK hücreleri viral enfeksiyon, kanser ve metastazlara karşı önemli rol oynayan hücrelerdir. Bu etkide rol oynayan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Bu konuda çinkonun rolü de tartışmalıdır (12, 49). Çinko eksikliğinin NK aktivitesini düşürdüğu Öztürk tarafından gösterilmiştir (40).

Çinko eksikliğine makrofajlar, T lenfositleri, ve NK'lar hassas yapılardır (19, 21, 40). NK'lar üzerindeki etki daha çok sekonder niteliktedir. IL-2 gibi NK'ları aktive eden faktörlerin sayımındaki bozukluk NK aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Lipopolisakkarit (LPS) ile inkübe edilen monosit ve lenfositler de IL-2 ile meydana gelen aktivasyonu önlemektedir. Bunda PGE'lerin rolü olduğu bildirilmektedir (23). Timulin'de bir timik hormon olup çinko ile bağlı iken aktiftir. Çinko eksikliğinde aktivitesi azalan bu hormonun NK aktivitesi üzerinde iyileştirici rolü

vardır (4). Eksikliğinde ise NK aktivitesinde azalma meydana gelmektedir (24, 40). Orak hücre anemili şahıslarda düş en NK aktivitesinin ise baş lıca çinko eksikliğinden kaynaklandığı bildirilmektedir (49).

Çinko ve NK hücre aktivitesi ilişkisine ait çalışmalar azdır. Ayrıca in vivo deneysel olarak oluş turulan Zn eksikliğinde NK aktivitesinin primer olarak nasıl etkilendiğine ilişkin bilgiler bulunmamakta sadece bazı hastahklardaki oluş an çinko eksikliğindeki NK aktivite lerinin değ iş imleri hakkında bilgiler verilmektedir. Buda NK aktivite değ iş iminin primer mi yoksa sekonder olarak meydana geldiği sorusunu doğ urmaktadır (40).

Çalış mamızda LPS'nin NK aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve bu etkide çinkonun rolü araştırılmış tır. LPS'nin NK hücre aktivitesini uyardığı pek çok çalış ma ile ortaya konulmuş tur (34, 35). Çinko'nun bu etkiye hangi yönde devreye girdiği ise literatürde yoktur. Bu çerçevede deneysel olarak ratlarda Zn eksikliği yaratılmış ve NK hücrelerinin LPS uyanımına yanıtı araştırılmış tır. Deneklerin serum çinko düzeyleri, kontrollarda $206 \pm 17.7 \mu\text{g/dl}$, çinko eksik deneklerde ise $131.7 \pm 8.8 \mu\text{g/dl}$ bulunmuş tur. LPS ile uyanılan NK aktivite leri ise çinko eksik diyetli deneklerde oldukça düşük bulunmuş tur.

Bu sonuçlarda bize in vivo olarak sadece Zn'ya bağı lı oluş turulan eksiklik durumunda NK aktivitesinin (40) ve LPS ile uyanılmış NK aktivitesinin primer yönde azalmaya neden olacağını göstermiş tır.

Y - ÖZET

Zn organizmadaki pek çok enzimde fonksiyon gören önemli bir eser elementtir. Eksik Zn diyeti ile beslenen ratların metabolik aktivitelerinde önemli değişiklikler olmakta, immünolojik reaksiyonlarda rol alan hücrelerin çoğalması ve aktiviteleri değişikliğe uğramaktadır.

NK hücreleri Large Granular Lymphocyte (LGL) denilen enfeksiyon ve tümör hücrelerine karşı vücut savunmasında önemli rol oynayan lenfositlerdendir. Çalışmalar bu hücrelerin aktive olduklarında daha etkili bir savunma yaptıklarını ve sitokinler (IL-2) ve çeşitli bakteriel ürünlerle (LPS) bu uyarımın meydana geldiğini göstermiştir.

Çalışmada 4-5 haftalık ratlar diyete alınmış, kontrol grubundaki 10 rat 84 mg/kg çinko içeren diyetle beslenirken, çinko eksik grupta 1.6-2.8 ppm'den daha az çinko içeren 10 rat kullanılmıştır.

21 gün sonunda elde edilen bulgulara göre normal grupta LPS ile uyarılan NK aktivitesi % 9.5 ± 4.3 ve plazma çinko değerleri 131.7 ± 8.8 µg/dl bulunurken, kontrol grubunda bu değerler sırası ile % 32.5 ± 3.5 ve 206 ± 17.7 bulunmuştur.

Sonuç olarak Lipopolisakkarit ile uyarılmış NK hücrelerinin Zn eksik ortamda aktivitelerinin önemli bir ölçüde azaldığı gösterilmiştir ($p < 0.001$). Buda çinkonun eser element olarak vücut savunmasındaki önemini göstermektedir.

VI - SUMMARY

Zinc is a trace element functioning in many enzymes. In zinc deficient fed rats metabolic activities and proliferation and activities of the cells functioning in host defense are changed.

NK cells are the subpopulation of lymphoid cells termed Large Granular Lymphocytes (LGL) and functioning at the host defense against infection and tumor cells. Recent reports indicated that NK cells are more effective in activated form in which stimulated by cytokines (IL-2) and bacterial products.

In this study, rats aged 4-5 weeks, were fed with ad-libitum and zinc deficient diet. Ten rats were fed Ad Libitum (84 ppm Zn) and termed controls. Other ten rats were fed with zinc deficient diet (1.6-2.8 ppm Zn) and termed experimental group.

At the end of period (21 days), LPS stimulated NK cell activity and plasma zinc concentrations in experimental group were $\% 9.5 \pm 4.3$ and $131.7 \pm 8.8 \mu\text{g/dl}$ respectively and in control group they were $\% 32.5 \pm 3.5$ and $206 \pm 17.7 \mu\text{g/dl}$ respectively.

As a result it has been shown that in zinc deficient rats, NK cell activity stimulated by LPS were decreased significantly ($p < 0.001$). It means that zinc as a trace element is very important in host defense.

VII - KAYNAKLAR

1. Allen, I.J., Bell, E., Oken, M.M., Mc Clain, C.J., Levine A.S., Morley, E.J., Association between urinary Zinc excretion and lymphocyte dysfunction in patients, with lung cancer, *Am. J. Med.*, 79, 209-15, (1985).
2. Allen, JI., Ferri, R.T., Mc Clain, C.J., Kay, N.E., Alterations in human natural killer cell activity deficiency, *J Lab Clin Med.*, 102, 577-89, (1983).
3. Antoniou, L.D., Shalhoub, R.J., Zinc - induced enhancement of lymphocyte function and viability in chronic uremia, *Nephron*, 40, 13-21, (1985).
4. Bardos, P., Beach, JF., Modulation of mouse natural killer cell activity by serum thymic factor, *Scand. J Immunol*, 12, 321-5, (1982).
5. Beach, R.S., Gershwin, M.E., Hurley, L.S., Gastrointestinal zinc deprivation in mice persistence of immunodeficiency for three generations, *Science*, 218, 469-71, (1978).
6. Bettger, W.J., O'Dell, B.L., Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells, *J Nutr. Biochem.*, 4, 194-207, (1993).
7. Bloxam, P.C., Tan, J.C.Y., Parkinson, C.E., Non-protein bound zinc concentration in human plasma and amniotic fluid measured by ultrafiltration. *Clin Chem. Acta.*, 144, 81-93, (1984).
8. Bray, T.M., Bettger, W.J., The physiological role of zinc as an antioxidant, *Free Rad. Biol. Med.*, 8, 281-91, (1990).
9. Browning, J.D., Reeves, P.G., O'Dell, B.L., Zinc deficiency in rats reduces the vasodilation response to bradykinin and prostacyclin, *J Nutr.*, 117, 690-95, (1987).
10. Bunker, V.W., Hinks, L.J., Stansfield, M.F., Lawson, M.S., Clayton, B.E., Metabolic balance studies for zinc and copper in housebound elderly people and relationship between zinc balance and leucocyte zinc concentrations, *Am. J. Clin. Nutr.*, 46, 353-9, (1987).
11. Chandra, R.K., Excessive intake of zinc impairs immune responses, *Clin. Invest.*, 252 (11), 1443-6, (1984).
12. Chandra, R.K., Nutrition and immunity, *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 1087-107, (1991).
13. Chuapil, M., Effect of zinc on cells and biomembranes *Med Clin North Am.*, 60, 799-812, (1986).

14. Conti, P., Dempsey, R.A., Rede, M., Barbacane, R.C., Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin -1 alpha, beta, tumour necrosis factor and interleukin -6. effect of IL-1receptor antagonist. *Immunology*, 73, 450-6, (1991).
15. Cook - Mills, J.M., Wirth, J.J., Fraker, P.J., Possible roles for zinc in destruction of *Trypanosoma cruzi* by toxic oxygen metabolites produced by mononuclear phagocytes, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 262, 111-121, (1990).
16. Cousins, R.J., Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc : special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev.*, 65, 238-309, (1985).
17. Cunningham - Rundles, S., Cunningham - Rundles, C., Dupont, B, Good, R.A., Zinc induced activation of human B-Lymphocytes, *Clin Immunol Immunopathol*, 16, 115-22, (1980).
18. Doud, P.S., Kellehes, J., Guillou, P.J., T-Lymphocyte subsets and interleukin-2 production in zinc deficient rats, *Br. J. Nutr.*, 55, 59-69, (1986).
19. Duchateau, J., Delesperse, G., Vereecke, P., Influence of oral zinc supplementation on the lymphocyte response to mitogens of normal subjects, *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 88-93, (1981).
20. Dunlap, W.M., Anemia and neutropenic caused by copper deficiency, *Ann. Intern Med.*, 80, 470-74, (1974).
21. Ercan, M.T., Bor, N.M., Phagocytosis by macrophages in zinc deficient rats, *Nucl. Med. Biol.*, 18, 765-8, (1991).
22. Fenton, M.R., Burke, J.P., Miller, M.L., Tursi, F.D., The effect of a zinc deficient diet on the enzymatic activity of rat neutrophils, *Nutr. Rep. Intl.*, 22, 323-28, (1980).
23. Ferraris, V.A., De Rubertis, F.R., Hudson, R.H., Release of prostaglandin by mitogen and antigen stimulated leucocytes in culture, *J. Clin. Invest.*, 54, 378-86, (1974).
24. Fosmire, G.J., Zinc toxicity, *Am. J. Clin. Nutr.*, 51, 225-7, (1990).
25. Fraker, P.J., De Pasquale - Jardieu, P., Zwiclele, Cm., Luecke, R.W., Regeneration of T cell helper function in zinc deficient adult mice, *Proc. Natr. Acad Sci, USA*, 75, 5660-4, (1978).
26. Good, R.A., Lorenz, E., Nutrition, immunity, aging and cancer, *Nutr. Rev.*, 46, 62-67, (1988).
27. Gordon, P.R., O'Dell, B.L., Rat platelet aggregation impaired by short-term zinc deficiency, *J. Nutr.*, 110, 2125-29, (1980).

28. Hackett, J., Kumar, V., Bennett, M., Origin and differentiation of natural killer cells. 1. Characteristics of a transplantable natural killer cell precursor, *J. Immunol*, 134, 3731-37, (1985).
29. Halsted, J.A., Ronagby, H.A., Abadi, P., Zinc deficiency in man the shiraz experiment, *Am. J. Med.*, 53, 277-84, (1972).
30. Harris, W.R., Keen, C.L., Calculations of the distribution of zinc in a computer model of human serum, *J. Nutr.*, 119, 1677-82, (1982).
31. Hennig, B., Wang, Y., Ramasamy, S., Mc Clain, C.J., Effect of zinc deficiency on in vitro endothelial barrier function, *J. Nutr.*, 6, 1242-7, (1992).
32. Herberman, R.B., Ortaldo, J.R., Natural Killer cells their role in defense against disease, *Science*, 214, 24-6, (1951).
33. Keen, C.L., Gershwin, M.E., Zinc deficiency and immune function, *Ann. Rev. Nutr.*, 10, 415-31, (1990).
34. Linder mann, R.A., Ailber, F., Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomyces temcomitans*, *Arch. oral Biol*, 34, 459-63, (1989).
35. Linder mann, R.A., Bacterial activation of human natural killer cells role of cell surface lipopolysaccharide, *Infect. Immun*, 56, 56, 1301-8, (1988).
36. Magneson, G.R., Pwathingal, J.M., Ray, W.J. The concentrations of free Mg^{+2} and free Zn^{+2} in equine blood plasma, *J. Biol. Chem.*, 262, 11140-48, (1987).
37. O'Dell, B.L., Becker, J.K., Emery, M.P., Browning, J.D., Production and reversal of the neuromuscular pathology and related signs of zinc deficiency in guinea pigs, *J. Nutr.*, 119, 196-201, (1989).
38. O'Dell, B.L., Browning, J.D., Reeves, P.G., Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes, *J. Nutr.*, 117, 1883-89, (1987).
39. Önder, M., Bozkurt, M., Gürer, M.A., Gülekon, A., Sezgin, P., İmir T., Naturel killer Cellular cytotoxicity in Behçet's disease, *J. Dermatology, Yayında.*
40. Öztürk, G., Deneysel çinko eksikliğinin doğal öldürücü (natural killer) lenfositler üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, G.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, (1993).

41. Pestka, S., Samuel, C.E., Interferons and their actions *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 727-30, (1987).
42. Prasad, A.S., Clinical, biochemical, and nutritional spectrum of zinc deficiency in human subjects; an update. *Nutr. Rev.*, 41, 197-208, (1983).
43. Prasad, A.S., discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53 (2), 403-12, (1991).
44. Schwartz, K., Recent dietary trace element research, exemplified by tin, fluorine and silicon, *Fed. Proc.*, 33, 1748-51, (1974).
45. Sibbitt, W.L., Imir, T., Bankhurst, A.D., Reversible inhibition of LAK cell activity by lipoxygenase pathway inhibitors, *Int. J. Cancer.*, 38, 517-8, (1986).
46. Sibbitt, W.L., Imir, T., Bankhurst, A.D., Inert particles inhibit NK cell function invitro, *cell Immunol.*, 97, 146-154, (1986).
47. Simons, T.J.B., Intracellular free zinc and zinc buffering in human red blood cells, *J. Membrane Biol.*, 123, 63-71, (1991).
48. Swenerton, H., Hurley, L.S., Severe zinc deficiency, in male and female rats, *J. Nutr.*, 95, 8-18, (1968).
49. Tapanoglou, E., Prasad, A.S., Hill, G., Brewer, G.J., Kaplan, J., Decreased natural killer cell activity in patients with zinc deficiency with sickle cell disease, *J. Lab Clin Med.*, 105, 19-22, (1985).
50. Whitehouse, R.C., Prasad, A.S., Cossack Z.T., Determination of ultrafilterable zinc in plasma by flameless atomic absorption spectrophotometry, *Clin Chem*, 29, 1974-77, (1983).
51. Zanzonico, P., Fernandes, G., Good, R.A., The differential sensitivity of T-cell and B-cell mitogenesis to in vitro zinc deficiency, *Cell. Immunol* 60, 203-211, (1981).

Tezin Konusu: Deneysel olarak oluşturulan çinko eksikliğinde Natural Killer (NK) hücre aktivitesi.

Öğrencinin adı-soyadı: Deniz ERBAŞ

Tez Yöneticisi: Prof.Dr.Turgut İmir

Anabilim Dalı: Mikrobiyoloji, İmmünoloji Yüksek Lisans Programı

Yılı: 1994

Tezin Statüsü: Yüksek Lisans

ÖZET

Zn organizmadaki pek çok enzimde fonksiyon gören önemli bir eser elementtir. Eksik Zn diyeti ile beslenen ratların metabolik aktivitelerinde önemli değişiklikler olmakta, immünolojik reaksiyonlarda rol alan hücrelerin çoğalması ve aktiviteleri değişikliğe uğramaktadır.

NK hücreleri Large Granular Lymphocyte (LGL) denilen enfeksiyon ve tümör hücrelerine karşı vücut savunmasında önemli rol oynayan lenfositlerdir. Çalışmalar bu hücrelerin aktive olduklarında daha etkili bir savunma yaptıklarını ve sitokinler (IL-2) ve çeşitli bakteriel ürünlerle (LPS) bu uyarımın meydana geldiğini göstermiştir.

Çalışmada 4-5 haftalık ratlar diyetle alınmış, kontrol grubundaki 10 rat 84 mg/kg çinko içeren diyetle beslenirken, çinko eksik grupta 1.6-2.8 ppm'den daha az çinko içeren 10 rat kullanılmıştır.

21 gün sonunda elde edilen bulgulara göre normal grupta LPS ile uyarılan NK aktivitesi % 9.5 ± 4.3 ve plazma çinko değerleri 131.7 ± 8.8 µg/dl bulunurken, kontrol grubunda bu değerler sırası ile % 32.5 ± 3.5 ve 206 ± 17.7 bulunmuştur.

Sonuç olarak Lipopolisakarit ile uyarılmış NK hücrelerinin Zn eksik ortamda aktivitelerinin önemli bir ölçüde azaldığı gösterilmiştir ($p < 0.001$). Buda çinkonun eser element olarak vücut savunmasındaki önemini göstermektedir.

Tezin Konusu: Natural Killer(NK) activity in experimentally zinc deficient animals

Öğrencinin adı-soyadı: Deniz ERBAŞ

Tez Yöneticisi: Prof.Dr.Turgut İMİR

Anabilim Dalı: Mikrobiyoloji, İmmünoloji Yüksek Lisans programı

Yılı: 1994

Tezin Statüsü: Yüksek Lisans

SUMMARY

Zinc is a trace element functioning in many enzymes. In zinc deficient fed rats metabolic activities and proliferation and activities of the cells functioning in host defense are changed.

NK cells are the subpopulation of lymphoid cells termed Large Granular Lymphocytes (LGL) and functioning at the host defense against infection and tumor cells. Recent reports indicated that NK cells are more effective in activated form in which stimulated by cytokines (IL-2) and bacterial products.

In this study, rats aged 45 weeks, were fed with ad-libitum and zinc deficient diet. Ten rats were fed Ad Libitum (84 ppm Zn) and termed controls. Other ten rats were fed with zinc deficient diet (1.6-2.8 ppm Zn) and termed experimental group.

At the end of period (21 days), LPS stimulated NK cell activity and plasma zinc concentrations in experimental group were 9.5 ± 4.3 and 131.7 ± 8.8 $\mu\text{g/dl}$ respectively and in control group they were 32.5 ± 3.5 and 206 ± 17.7 $\mu\text{g/dl}$ respectively.

As a result it has been shown that in zinc deficient rats, NK cell activity stimulated by LPS were decreased significantly ($p < 0.001$). It means that zinc as a trace element is very important in host defense.