

TC  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEBELİK PERİYODU BOYUNCA ÇİNKO VERİLEN KOYUNLARDA  
REDÜKTE GLUTATYON (GSH), MALONDİALDEHİT (MDA) VE NİTRİK  
OKSİT (NO) DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Arş.Gör. Onur ATAKIŞI  
Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman  
Doç. Dr. Ayla ÖZCAN

2005-KARS

TC  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEBELİK PERİYODU BOYUNCA ÇİNKO VERİLEN KOYUNLARDA  
REDÜKTE GLUTATYON (GSH), MALONDİALDEHİT (MDA) VE NİTRİK  
OKSİT (NO) DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Arş.Gör. Onur ATAKİŞİ  
Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman  
Doç. Dr. Ayla ÖZCAN

Bu Çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından Desteklenmiştir. Proje No:2004-VF-07

2005-KARS

TC  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde **Arş. Gör. Onur ATAKİŞİ** tarafından hazırlanmış olan **Gebelik Periyodu Boyunca Çinko Verilen Koyunlarda Redükte glutasyon (GSH), Malondialdehit (MDA) ve Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Araştırılması** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca da değerlendirilerek **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: **14/07/2005**

**Adı Soyadı**

**İmza**

Başkan : Prof. Dr. Necati KAYA  
Üye : Doç. Dr. Şaban MARAŞLI  
Üye : Doç. Dr. Sedat YILDIZ  
Üye : Doç. Dr. Ayla ÖZCAN  
Üye : Doç. Dr. Necati UTLU



Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
14.....07.....2005 gün ve 39/117.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>1 GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Çinko Hakkında Genel Bilgi</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Çinko Metabolizması</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1.1 Emilimi</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1.2 Taşınması ve Dokulara Alınması</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1.3 Depolanması ve Atılması</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2 Çinkonun Fizyolojik Fonksiyonları</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2.1 Çinkonun Enzimlerdeki Rolü</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2.2 Çinkonun Hormonlardaki Rolü</b>	<b>8</b>
<b>1.1.2.3 Çinkonun Bağışıklık Sistemindeki Rolü</b>	<b>8</b>
<b>1.1.2.4 Çinkonun Görme ve A Vitamini ile İlişkisi</b>	<b>9</b>
<b>1.1.2.5 Çinkonun İskelet Gelişimindeki Fonksiyonu</b>	<b>9</b>
<b>1.1.2.6 Çinkonun Derideki Fonksiyonu</b>	<b>10</b>
<b>1.1.2.7 Çinkonun Antioksidan Etkisi</b>	<b>10</b>
<b>1.1.3 Çinko Noksanlığının Neden Olduğu Bozukluklar</b>	<b>13</b>
<b>1.1.4 Çinkonun Üreme ve Gebelikteki Fonksiyonu</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Serbest Radikaller</b>	<b>16</b>
<b>1.2.1 Serbest Radikallerin Tanımı</b>	<b>16</b>
<b>1.2.2 Serbest Radikallerin Kaynakları</b>	<b>19</b>
<b>1.2.3 Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri</b>	<b>19</b>
<b>1.2.4 Serbest Radikaller ve Gebelik</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Nitrik Oksit</b>	<b>24</b>

<b>1.3.1 Nitrik Oksitin Enzimatik Olarak Sentezi</b>	<b>25</b>
<b>1.3.1.1 Uyarılabilen NOS (iNOS)</b>	<b>26</b>
<b>1.3.1.2 Endotel NOS (eNOS veya NOS III)</b>	<b>27</b>
<b>1.3.1.3 Nöronal NOS (nNOS)</b>	<b>28</b>
<b>1. 3. 2 Nitrik Oksitin Nonenzimatik Üretimi</b>	<b>30</b>
<b>1.3.3 Nitrik Oksit Vericileri</b>	<b>34</b>
<b>1.3.4 Nitrik Oksitin Etkisini İnhibe Eden Maddeler</b>	<b>38</b>
<b>1.3.4.1 Nitrik Oksit Sentetaz İnhibitörleri</b>	<b>38</b>
<b>1.3.5 Nitrik Oksitin Organizmadaki Görevleri</b>	<b>40</b>
<b>1.3.5.1 Nitrik Oksitin Üreme ve Gebelik Üzerine Etkisi</b>	<b>41</b>
<b>2. MATERYAL ve METOT</b>	<b>45</b>
<b>2.1 Materyal</b>	<b>45</b>
<b>2.1.1 Kan Örneklerinin Toplanması ve İşlenmesi</b>	<b>45</b>
<b>2.2 Metot</b>	<b>46</b>
<b>2.2.1 Analizler İçin Kullanılan Cihazlar</b>	<b>46</b>
<b>2.2.2 Analizler İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	<b>46</b>
<b>2.2.3 Tüm Kanda GSH Tayini</b>	<b>47</b>
<b>2.2.3.1 Deneyin Prensibi</b>	<b>47</b>
<b>2.2.3.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler</b>	<b>47</b>
<b>2.2.3.3 Deneyin Yapılışı</b>	<b>48</b>
<b>2.2.3.4 Sonuçların Hesaplanması</b>	<b>49</b>
<b>2.2.4 Plazmada MDA Tayini</b>	<b>49</b>
<b>2.2.4.1 Deneyin Prensibi</b>	<b>49</b>
<b>2.2.4.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler</b>	<b>49</b>

<b>2.2.4.3 Deneyin Yapılışı</b>	<b>50</b>
<b>2.2.4.4 Sonuçların Hesaplanması</b>	<b>51</b>
<b>2.2.5 Plazmada Nitrik Oksit Tayini</b>	<b>51</b>
<b>2.2.5.1 Deneyin Prensibi</b>	<b>51</b>
<b>2.2.5.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler</b>	<b>52</b>
<b>2.2.5.3 Numunelerin Deproteinize Edilmesi</b>	<b>53</b>
<b>2.2.5.4 Nitrat Analizinin Yapılışı</b>	<b>53</b>
<b>2.2.5.5 Nitrit Analizinin Yapılışı</b>	<b>54</b>
<b>2.2.5.6 Sonuçların Hesaplanması</b>	<b>55</b>
<b>2.3 İstatistiksel Analizler</b>	<b>56</b>
<b>3 BULGULAR</b>	<b>57</b>
<b>4 TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>65</b>
<b>5 ÖZET</b>	<b>72</b>
<b>6 SUMMARY</b>	<b>74</b>
<b>7 KAYNAKLAR</b>	<b>76</b>
<b>8 ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>89</b>

## Simgeler ve Kısaltmalar

<b>ACE</b>	: Angiotensin – Converting-Enzyme
<b>Ach</b>	: Asetilkolin
<b>ACTH</b>	: Adrenokortikotropik hormon
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>ClO<sub>2</sub></b>	: Hipoklorit radikali
<b>·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit radikali
<b>·O<sub>2</sub></b>	: Süperoksit radikali
<b>·OH</b>	: Hidroksil radikali
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DTNB</b>	: 5,5'-(2-ditoyobis nitrobenzoik asit)
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetra asetik asit
<b>EDRF</b>	: Endothelyum-derived relaxing factor (Endotel kökenli gevşeme faktörü)
<b>eNOS/NOS III</b>	: Endotel nitrik oksit sentetaz
<b>FAD</b>	: Flavin adenin dinükleotid
<b>FMN</b>	: Flavin mono nükleotid
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSH-R</b>	: Glutasyon redüktaz
<b>GST</b>	: Glutasyon-S-transferaz
<b>HNO<sub>2</sub></b>	: Nitröz asit
<b>HO<sub>2</sub></b>	: Hidroperoksi radikali
<b>IF-γ</b>	: İnterferon-γ
<b>IgG</b>	: İmmunglobin G
<b>IL-1</b>	: İnterlökin-1
<b>IL-10</b>	: İnterlökin-10
<b>IL-11</b>	: İnterlökin -11

<b>IL-4</b>	: İnterlökin- 4
<b>IL-8</b>	: İnterlökin- 8
<b>iNOS/NOS II</b>	: Uyarılabilen nitrik oksit sentetaz
<b>Karboksi-PTO</b>	: Karboksi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oksil
<b>L-NA</b>	: N-nitro-L-arginin
<b>L-NAME</b>	: N-nitro-L-arginin metil ester
<b>L-NIO</b>	: N-iminometil-L-ornitin
<b>L-NMMA</b>	: N-monometil L-arginin
<b>LPO</b>	: Lipit peroksidasyonu
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>mRNA</b>	: Haberci ribonükleik asit
<b>MSP</b>	: Macrophage-stimulating protein
<b>MT</b>	: Metallotiyonein
<b>NADPH</b>	: İndirgemiş nikotinamid adenin difosfat
<b>NEDD</b>	: N-(1-Naftil)etilendiamin dihidroklorür
<b>nNOS/NOS I</b>	: Nöronal nitrik oksit sentetaz
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Nitrit iyonu
<b>NOC-12</b>	: [N-etil-2-(1-etil-2-hidroksi-2-nitrozohidrazon) etilenamin]
<b>NOC-5</b>	: (3-[2-hidroksil-1-(1-metiletil)-2-nitrozohidrazino]-1-propanamin)
<b>NOC-7</b>	: [3-(2-hidroksil-1-metiletil-2-nitrozohidrazino)N-metil-1-propanamin]
<b>NOC-9</b>	: [6-(2-hidroksil-1-metiletil-2-nitrozohidrazino)-N-metil-1-ekzanamin]
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentetaz enzimi
<b>NOx</b>	: Nitrik oksit metabolitleri
<b>OONO<sup>-</sup></b>	: Peroksinitrit
<b>PMN</b>	: Polimorfmononükleer
<b>PMSG</b>	: Pregnant mare serum gonadotropin (Gebe kısırak gonadotropin serumu)
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit



### III

<b>RNT</b>	: Reaktif nitrojen türleri
<b>RO.</b>	: Alkoksil radikali
<b>RO<sub>2</sub>.</b>	: Alkil peroksi radikali
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>Gliko-SNAP-1</b>	: [N-( $\beta$ -D-glukopranosil)-N <sup>2</sup> -asetil-S-nitrozo-D,L-pensilaminamid]
<b>Gliko-SNAP-2</b>	: [N-(2-deoksi- $\alpha,\beta$ -D-glukopranos-2-)-N <sup>2</sup> -asetil-S-nitrozo-D,L-pensilaminamid]
<b>SNOG</b>	: S-nitrozoglutatyon
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SULF</b>	: Sulfanilamid
<b>TBA</b>	: Tiyobarbütirik asit
<b>TCAA</b>	: Triklorasetik asit
<b>TEP</b>	: 1,1,3,3-tetraetoksipropan
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming growth factor- $\beta$
<b>THB</b>	: Tetrahidrobiopterin
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>UVA-1</b>	: 340-400nm arasındaki ultraviyole ışın
<b>VCl<sub>3</sub></b>	: Vanadyum (III) klorür

**Grafikler Dizini****Sayfa No**

Grafik 2.1 MDA Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi	51
Grafik 2.2 Nitrat Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi	54
Grafik 2.3 Nitrit Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi	55
Grafik 3.1 Gebelik Boyunca MDA Düzeyinin Değişimi	61
Grafik 3.2 Gebelik Boyunca GSH Düzeyinin Değişimi	62
Grafik 3.3 Gebelik Boyunca NO Düzeyinin Değişimi	62
Grafik 3.4 Kuzuların Doğum Ağırlıkları (kg)	63
Grafik 3.5 Gruplarda Saptanan MDA/GSH Oranları	63
Grafik 3.6 Gebelikteki Ortalama GSH ile MDA Arasındaki Regrasyon	64

**Tablolar Dizini**

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1.1 Hayvan Türlerine Göre Çinko İhtiyaçları	2
Tablo 1.2 Bazı NO Vericilerinin Molekül Yapısı ve NO Salınım Yolları	35
Tablo 3.1 MDA Düzeyleri ( $\mu\text{mol/L}$ )	60
Tablo 3.2 GSH Düzeyleri (mg/dl)	60
Tablo 3.3 NO Düzeyleri ( $\mu\text{M}$ )	60
Tablo 3.4 Kuzuların Doğum Ağırlıkları (kg)	61
Tablo 3.5 Gruplarda Saptanan MDA/GSH Oranları	61

**Şekiller Dizini****Sayfa No**

Şekil 1.1 Ülkemizde Görülen Mineral Madde Noksanlıklarının Bölgelere Göre Dağılımı	3
Şekil 1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Çinko ile Bağlanmış Yapısı	7
Şekil 1.3 Serbest Radikallerin Lipitlerle Reaksiyonu	20
Şekil 1.4 L-Arjininden Nitrik Oksit Sentezi	26
Şekil 1.5 L- Arjininden Nitrik Oksit Sentezinin Basamakları	29
Şekil 1.6 Nitrik Oksitin İn Vivo Olarak Oluşum Mekanizması	31
Şekil 1.7 Nitrik Oksitin Salınımı ve Organizmadaki Görevleri	40
Şekil 1.8 NO'nun Üreme Üzerindeki Fonksiyonları	41
Şekil 2.1 Nitrit'ten Renkli Diazonyum Ürünün Oluşum Reaksiyonu	52

## ÖNSÖZ

Ülkelerin gelişmişlik düzeyini gösteren önemli ölçütlerden biri o ülkede yaşayan insanların yeterli ve dengeli beslenme düzeyidir. Yeterli ve dengeli beslenmede ise hayvansal kökenli besin maddelerinin yeri tartışılmayacak kadar önemlidir. Hayvansal kaynaklı besinlerin arttırılması, hayvan sayısının arttırılmasının yanında birim başına düşen verim özelliklerinin yükseltilmesiyle mümkündür.

Hayvanların verim özelliklerinin arttırılması için günümüzde çok sayıda yöntem uygulanmaktadır. Bunlar bazı mineral veya vitaminlerin yemlere ilavesi şeklinde veya hayvan ırklarının genetik ıslahı şeklinde geniş bir dağılım göstermektedir. Öte yandan hayvanların özellikle üreme ve gebelik gibi özel dönemlerde ihtiyaç duydukları iz elementlerin rasyonlarına katılması da çok başvurulan yöntemlerden bir tanesidir.

Önemli iz elementlerden biri olan ve organizmada çok önemli fonksiyonları bulunan çinko eksikliğinde iştah azalması, büyüme, gelişme ve üreme sisteminde oluşan bozukluklara bağlı olarak hayvansal üretimde önemli ölçüde ekonomik kayıplar meydana gelmektedir.

Gebelik süresince annenin çinko ihtiyacının arttığı ve gebelik periyodunda çinko ilavesinin prematüre doğum ve abort vakalarını azaltabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur. Çinkonun hayvanlarda antioksidan sistemi güçlendirdiği ve üreme fonksiyonları ile ilgili bozuklukları azalttığı yapılan deneysel çalışmalarda bildirilmektedir.

Gebelik, vücudun birçok fonksiyonları için yüksek enerji gerektiren fizyolojik bir durumdur. Uterus kütlesi ve içeriğindeki artışa paralel olarak serbest radikal türlerinde de bir artış olur. Artan serbest radikaller lipid

peroksidasyonun bir belirteci olan malondialdehit (MDA) düzeyinde artışa neden olurken antioksidan özelliğe sahip redükte glutatyon (GSH) düzeyinde bir azalmaya neden olur.

Gebelikte annenin artan metabolik fonksiyonlarından dolayı fazlaca ihtiyaç duyduğu ve antioksidan özelliğe sahip maddelerden bir tanesi de çinkodur. Çinko antioksidan özellik gösteren ve metabolizmada önemli görevleri bulunan yüzlerce enzimin aktivitesi için de gereklidir.

Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmada gebelik süresince ilave çinko verilmesinin antioksidan özellik gösteren GSH ve lipid peroksidasyon (LPO) ürünlerinden biri olan MDA düzeyleri ile kuzuların doğum ağırlıklarının nasıl etkileneceğini araştırmak amaçlandı.

Son yıllarda antioksidatif metabolizmalarla ilgili yapılan çalışmalarda dikkat çeken moleküllerden bir tanesi de nitrik oksittir. Organizmada çok farklı görevleri ve birkaç farklı formu bulunan bu molekülün dişi hayvanlarda üreme özellikleri ile gebelik dönemlerindeki etkileri konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Nitekim, NO'nun ovulasyon, implantasyon, gebelik, doğum sancıları ve doğum gibi üreme süreçlerinde önemli bir düzenleyici olduğunu ve NO metabolitlerinin gebelikte arttığını belirten bildirimler mevcuttur. Bununla birlikte organizmada NO metalotiyoneinlerde bulunan metal sülfhidril kompleksine etki ederek çinko ve bakır gibi çift değerlikli metallerin serbest bırakılmasında rol oynadığı bilinmesine rağmen çinkonun NO'ya herhangi bir etkisinin olup olmadığı henüz tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır.

Bu nedenle yapılan araştırmanın diğer bir amacı da, koyunlarda gebelikte ilave olarak verilen çinkonun NO düzeyine herhangi bir etkisinin olup olmadığı ve gebelikte yöreniz koyunlarındaki NO düzeylerinin aylara göre nasıl değişim gösterdiğini araştırmaktır.

Doktora Eğitimimin sırasında ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Doç Dr. Ayla ÖZCAN'a, eğitimim sırasında sürekli yardımlarını gördüğüm ve desteklerini hissettiğim hocamız KA Rektörü Prof. Dr. Necati KAYA'ya ve Doç Dr. şaban MARAşLI'ya, koyunların senkronizasyonuna yardımcı olan Doç. Dr. Yavuz ÖZTÜRKLER'e, tez çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet ÇİTİL, Yrd. Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN ve sevgili eşim Dr. Emine ATAKİşİ ile Anabilim dalındaki diğer arkadaşlarıma, ayrıca tez çalışmamın başlayabilmesi ve tamamlanabilmesi için maddi desteklerini gördüğüm Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına ve Aileme teşekkür etmeyi zevkli görev sayarım.

## 1 GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

### 1.1 Çinko Hakkında Genel Bilgi

Periyodik sistemin II B grubunda bulunan ve Zn ile sembolize edilen çinko metali mavimsiyah beyaz, demire göre yumuşak ve yoğunluğu demirden düşük, çift değerlikli bir katyondur. Atom numarası 30, molekül ağırlığı ise 65,37 g olan çinko doğada genellikle çinko sülfür (ZnS) olarak bulunmaktadır (28, 80, 119).

Çinkonun önceleri sadece *Aspergillus niger* adlı maya bakterisinin büyümesi için gerekli olduğu bilinmesine rağmen sonraları birçok bitki ve hayvan dokusunda da bulunduğu saptanmıştır (80, 98, 119).

Çinkonun canlılar için gerekli bir madde olduğu 1934 yılında *Bertrand* ve *Bhattacharjee* tarafından rapor edilmiştir. Keillin ve Mann 1940 yılında yapısında % 0.33 oranında çinko bulunan karbonik anhidraz enzimini izole ederek saflaştırmış, 1958 yılında *O' Dell* ve yardımcısı ise çinko eksikliğinin düzensiz kemik gelişimine ve büyüme geriliğine neden olduğu bildirmiştir. 1960 yılında da çinko eksikliğinin ruminantlarda parakeratozise neden olduğu tespit edilmiştir (4, 80).

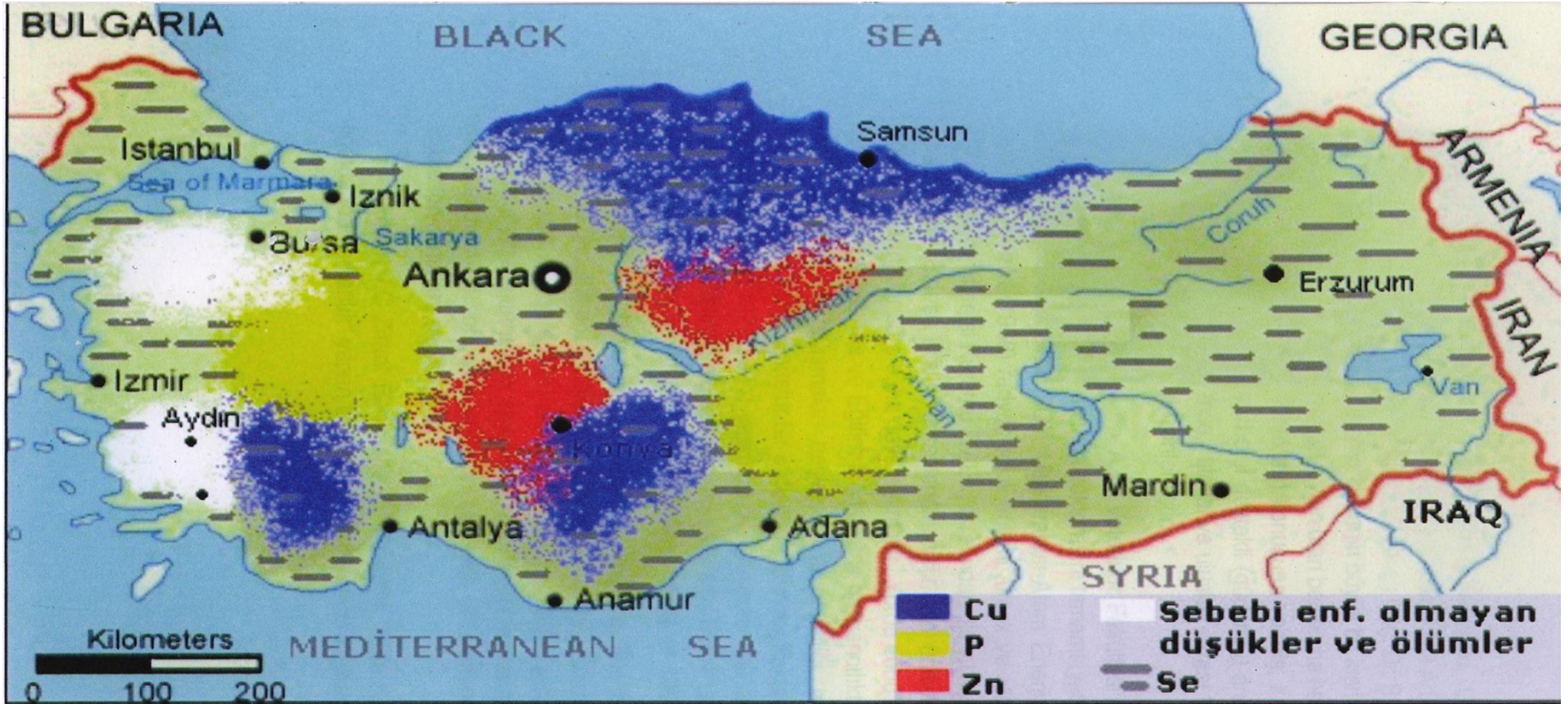
Çinko küçük ve hidrofilik yapıya sahip, biyolojik membranları pasif diffüzyonla geçemeyen ve bu nedenle de hem alınımı hem de salınımı için özel mekanizmalara gereksinim duyan bir metaldir (81). İnsan ve hayvanların büyüme, üreme, immun sistem ve antioksidan fonksiyonlarını da içeren birçok fizyolojik olay için gerekli bir madde olduğu ifade edilmektedir (69, 136).



Biyolojik önemi periyodik sistemdeki yerinden kaynaklanan çinko atomu, tam dolmuş bir d alt tabakasına ve s tabakasında iki elektrona sahiptir (119). Kimyasal elementler içinde en çok bulunan 24. elementtir. Toprakta 10-300 ppm, kuru ağırlığa göre yiyeceklerde 17-60 ppm, tahıllarda 20-30 ppm, hayvansal protein kaynaklarında 90-100 ppm ve içme sularında ise standart olarak 5 ppm oranında çinko bulunduğu kaydedilmiştir (80). İnsan vücudunda yaklaşık 2,2 g çinko bulunduğu ve çoğu iz elementlerin aksine çinkonun hayvansal organizmada homojen bir dağılım gösterdiği bildirilmektedir (39). Memeli dokusunda ortalama 10-100 µg/g yaş ağırlık (30-250 µg/g kuru ağırlık) bulunduğu ayrıca deri, saç, tüy ve yün gibi epidermal dokularda da yüksek konsantrasyonda çinko bulunduğu kaydedilmektedir (80, 119). Tablo 1.1'de değişik hayvan türlerinin çinko ihtiyaçları, Şekil 1.1'de ise ülkemizde görülen çinko, bakır ve fosfor eksikliklerinin bölgelere göre dağılımları gösterilmektedir.

Tablo 1.1 Hayvan Türlerine Göre Çinko İhtiyaçları (80).

<b>Tür</b>	<b>İhtiyaç (mg/kg)</b>
Tavuk	40
Ördek (Pekin)	60
Bıldırcın	25
Sütçü inek	30
Etçi inek	40
Hindi	40-75
Keçi	10
Koyun	20-33
At	40
Domuz	50-100



Şekil 1.1 Ülkemizde Görülen Mineral Madde Noksanlıklarının Bölgelere Göre Dağılımı (38).

### 1.1.1 Çinko Metabolizması

#### 1.1.1.1 Emilimi

Çinkonun sindirim sisteminden emilim mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber tek mideli hayvanlarda ince barsaklardan, kanatlılarda kursaktan ve ratlarda ise büyük çoğunluğunun doudenumdan emildiği kaydedilmiştir (80). Koyunlarda diyetle alınan çinkonun az bir kısmının rumende, çoğunun ince barsaktan, sığırlarda ise ağız yolu ile verilen çinkonun 1/3'ünün abamazumdan, geri kalanının da ince barsaklardan emildiği kaydedilmiştir (47, 80).

Barsak mukoza hücrelerine çinkonun girişi karaciğerde sentezlenen ve metal bağlayıcı bir protein olan metalloprotein (MT) tarafından düzenlenir. MT sentezi hem besinlerle alınan hem de plazmada bulunan çinko miktarıyla düzenlenir ve bu çinko homeostazisinin'de önemli bir rol oynar. Fitat, fibrin, kalsiyum, fosfor, bakır, kadmiyum ve krom gibi maddelerin de çinkonun emilimini azaltabileceği bildirilmektedir (59, 80). Emilimi arttıran faktörlere ise örnek olarak, kazein, karaciğer ekstraktı, mısır yağı ve kan unu gibi maddeler ile şelat yapıcı ajanlardan EDTA, sitrat, sistein, histidin, glutamik asit ve besinsel D vitamini verilebilir. Diyetteki inko içeriğinin emilimi etkileyen bir başka faktör olduğu ifade edilmektedir (38).

Düşük oranda çinko içeren diyetle beslenen dana ve ineklerde emilim oranının % 47,2-53,4 arasında olduğu, buzağı ve laktasyondaki ineklerde çinko emiliminin fizyolojik gereksinimleriyle ilişkili olduğu kaydedilmiştir. Çinko eksikliği bulunan hayvanlarda emilimin yüksek oranda olduğu, çinko noksanlığı olan danalarda emilimin % 80'e kadar ulaşabildiği, yüksek oranda çinko bulunan diyetle ise emilen miktarın azaldığı hatta % 10'a kadar düşebildiği bildirilmiştir (80).

### 1.1.1.2 Taşınması ve Dokulara Alınması

Emilimden sonra plazmaya geçen çinkonun yaklaşık üçte ikisi albumine gevşek olarak, geriye kalan kısmı ise  $\alpha$ -2 makroglobuline sıkı bir şekilde bağlanır. Amino asitlerle veya EDTA gibi maddelerle kompleks oluşturan çinkonun emiliminden sonraki metabolizmasını kompleks oluşturu maddeler etkilemektedir. Albüminle bağlanan çinko dokular tarafından kolayca alınabilmektedir. Yaklaşık % 30-40'ı karaciğer tarafından alınan ve buradan kan dolaşımına geçen çinko, çeşitli oranlarda diğer dokulara geçmektedir. Merkezi sinir sistemi ve kemiklere geçişi oldukça yavaş olmasına karşın bağlanma sıkı ve uzun sürelidir. Kemik dokusu ve kılda yer alan çinkonun kullanımı söz konusu değilken, en hızlı toplandığı ve dönüşüme uğradığı organlar pankreas, karaciğer, böbrek, dalak, hipofiz bezi, testisler ve böbrek üstü bezleridir. Dokulardaki hücrelerde yer alan çinkonun % 60-80'i hücre organellerinde (% 10-20'si çekirdekte az miktarı da mikrozom ve mitokondrilerde) bulunur. Organizmada çok geniş dağılımı olmasına rağmen depolama kapasitesi sınırlıdır ve kolayca mobilize olabilir. Bu durum kısa süreli çinkodan fakir beslenmede eksiklik belirtilerini engeller. Buna rağmen kısa zamanda yararlanılabilir duruma geçen çinko miktarı düşer ve yetersiz beslenme devam ettiği sürece 24 saat içinde plazmadaki düzeyinde de düşme görülür (80, 118).

### 1.1.1.3 Depolanması ve Atılması

Çinko canlı organizmada yaygın olarak bulunmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda çinko içeren göz (koroid ve iris) ve bazı cinsiyet organları (prostat bezi ve seminal sıvı) hariç tutulursa organizmadaki dağılımı oldukça homojendir. Saç, kemik, karaciğer, böbrek, iskelet kası, pankreas, sindirim kanalı, dalak ve kan gibi organ ve dokularda değişik oranlarda bulunduğu bildirilmektedir (39, 115).

Hayvansal organizma fazla miktarlarda kullanabileceği çinko depolarına sahip olmadığından, çinkonun besinlerle sürekli olarak yeterli miktarda alınması gerekmektedir. Sadece karaciğerdeki MT ve süperoksit dismutaz (SOD) çinko içeren depo bileşiklerdir ve gereksinim olunca buralardan kolayca mobilize olabilmektedir (11, 80).

Organizmadan çinkonun önemli bir kısmı dışkı ile, az miktarı da idrarla atılır. Dışkı ile atılan çinkonun çoğunu besinlerle alınan ve emilmeyen çinko oluştururken az bir kısmını da pankreas sıvısıyla ince barsağa ve safra salgısıyla sekum ve kolona gelen endojen kaynaklı çinko oluşturur. Mineral ilavesi ile birlikte EDTA verildiğinde idrarla atılımı artmaktadır (47, 72, 80).

### **1.1.2 Çinkonun Fizyolojik Fonksiyonları**

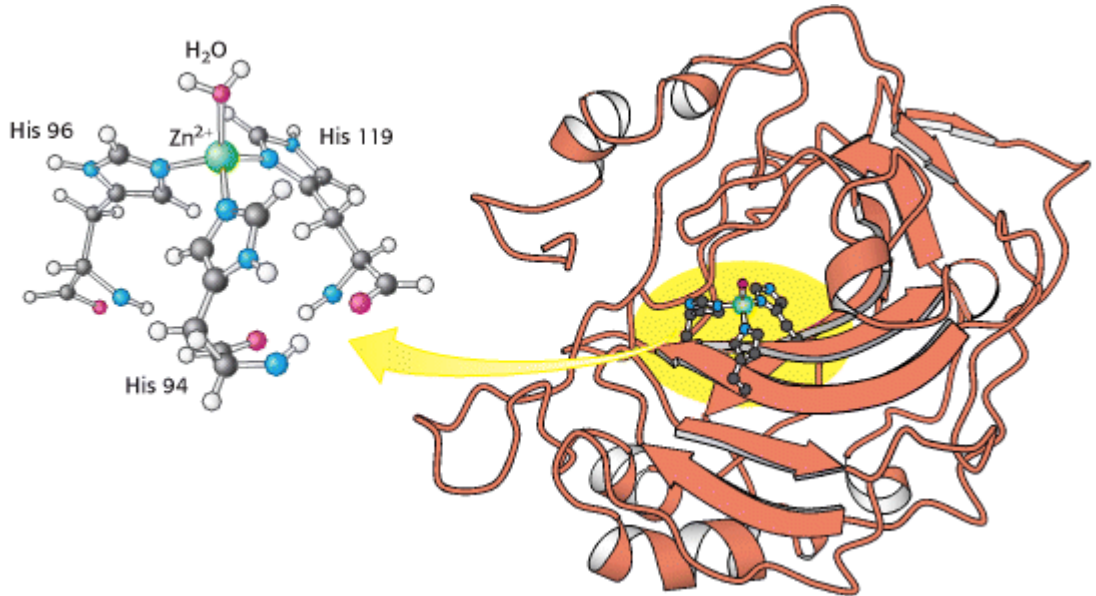
Çeşitli enzimlerin aktivasyonunda rol alan çinko; protein, karbonhidrat ve nükleik asit metabolizmalarını çeşitli düzeyde etkilemektedir. Çinko protein sentezi için gerekli olan timidin kinaz ile DNA ve RNA polimerazın aktivitesinde gerekli olduğundan hücre çoğalmasında önemli rol oynar. Ayrıca DNA sentezi ve hatta gen aktivasyonunda etkili olduğu ve çinkodan yoksun beslenen hayvanların derilerinde kollajen ve DNA sentezinin yavaşladığı bildirilmektedir (57, 71, 92, 103, 119, 124).

#### **1.1.2.1 Çinkonun Enzimlerdeki Rolü**

Çinko birçok proteinin yapısında yer aldığı gibi 300'den fazla enzimin aktivitesi için gereklidir (136). Enzimlerin bir parçası veya aktivatörü olarak rol oynar. Enzimlerin dördüncül yapıları ile hücrede DNA, RNA ve ribozomlara sıkıca bağlanarak bunların kararlılıklarını sağlar (38, 57).

Çinkonun organizmadaki işlevleri yapılarına girdikleri enzimlerin metabolizmadaki rolleriyle ilişkilidir. Eritrositlerde, midede, tükrük bezlerinde, beyinde, böbrek ve pankreas gibi çeşitli doku ve organlarda yaygın olarak bulunan karbonik anhidraz enziminin aktivitesi, çinko yetmezliği durumlarında azalır. Karbonik anhidraz aktivitelerindeki azalmanın dokuların yetmezlik süresince çinko tutma yeteneğine ve enzim sentezinin değişmesine bağlı olduğu kaydedilmiştir (4, 119).

Çinko eksikliğinde karbonik anhidraz, pankreatik karboksipeptidaz, triptofan desmolaz, malat ve glutamat dehidrogenaz, alkali fosfataz, asit fosfataz, laktat dehidrogenaz, akrozin, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz gibi enzimlerin aktivitelerinde değişimlerin meydana geldiği bildirilmektedir (2, 60, 65, 98, 134, 136). Karbonik anhidraz enziminin çinko ile bağlanmış yapısı Şekil 1.2'de gösterilmektedir



Şekil 1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Çinko ile Bağlanmış Yapısı (50).

Şiddetli çinko noksanlığında plazma alkali fosfataz, karaciğer retinal ve alkol dehidrogenaz, bağ doku ve fetal timidin kinaz, pankreatik karboksi-peptidaz A ve karaciğerde çekirdeğe bağımlı RNA polimeraz aktivitelerinin düştüğü kaydedilmiştir (119). Enzim sisteminde bulunan çinko çoğunlukla nükleik

asit, karbonhidrat metabolizması ve protein sentezinde rol oynar. Çinko noksanlığında DNA, RNA ve protein sentezi yavaşlamakta, hücre bölünmesi ve yara iyileşmesi gibi fonksiyonlar bozulmaktadır (38, 119).

### **1.1.2.2 Çinkonun Hormonlardaki Rolü**

Çinkonun hormon sentezi, depolanması, salgılanmasının yanı sıra reseptör bölgelere ve hedef organlara etkinliğinde de rolü vardır. Erkeklerde çinko noksanlığında birincil ve ikincil seks organların gelişimi ve dişilerde ise tüm üreme işlevleri olumsuz etkilenir. Erkeklerde eksikliğinde spermatogenesis ve leyding hücreleri tarafından üretilen testosteron hormonu seviyesinde düşme gözlenir. Ayrıca çinkoya bağımlı bir hormon olan adrenokortikotropik hormon (ACTH)'nin kortikosteroid sentezini uyaramadığı bildirilmektedir (63, 80).

Pankreasın  $\beta$  hücrelerinin yüksek düzeyde çinko içerdiği ve buradaki çinkonun insülin heksamerine bağlanarak insülin sentezine katıldığı, eksikliğinde hem pankreatik insülin salınımında hem de plazma insülin düzeyinde düşme gözlemlendiği kaydedilmiştir (63, 114).

### **1.1.2.3 Çinkonun Bağışıklık Sistemindeki Rolü**

Bağışıklık sisteminin bütünlüğünün sağlanmasında ayrı bir yeri olan çinkonun noksanlığında timusta küçülme, gammaglobulin ve kan dolaşımındaki lenfositlerde azalma gözlenir. Noksanlığında antikor şekillenmesi düşer ve T hücrelerinin işlevleri azalır. Doğum öncesi dönemde meydana gelen çinko noksanlığının yavruda bağışıklığın zayıflamasına, antikor oluşumu ile lenfositlerin üreme ve olgunlaşmasının yavaşlanmasına neden olduğu ve bu durumun doğum sonrası verilen çinko ile düzeltilemediği kaydedilmiştir (38, 106, 118).

#### **1.1.2.4 inkonun Görme ve A Vitamini ile İlişkisi**

A vitamininin plazmada normal konsantrasyonda bulunması, organ ve dokulara dağılımları ile ovaryum epitellerinin normal fonksiyonu için de çinko gereklidir (80). Çinko yönünden zengin bir doku olan göz korneasındaki çinkonun, çinko sisteinat monohidrat olarak bulunduğu bildirilmektedir (39). Çinko eksikliğinde retinol bağlayıcı protein sentezi yavaşladığından, A vitamini karaciğerden mobilize olamaz ve çinko eksikliği bulunan kuzularda gece körlüğü şekillenir. Alkol dehidrogenaz enziminin aktivasyonu için gerekli olan çinkonun retinolün retinale dönüşümünde rol oynamasından dolayı normal görme fonksiyonu için çok önemli olduğu belirtilmektedir (80, 119).

#### **1.1.2.5 inkonun İskelet Gelişimindeki Fonksiyonu**

Çinkonun insan ve hayvanların normal iskelet gelişiminde önemli rolünün olduğu, kemik dokusundaki çinko konsantrasyonunun diğer dokulardan yüksek olduğu kaydedilmektedir (91). Kemiklerde kalsiyum depolanmasında önemli rolü olan alkali fosfataz enziminin yapısında bulunduğundan, eksikliğinde bu enzimin aktivitesinin düştüğü bildirilmektedir (28).

Ma ve ark. (77), ratlarda yaptıkları bir çalışmada izoflavin ve çinko içeren mineral karışımı ile 45 hafta boyunca beslemenin anabolik etki gösterdiğini ve yaşlanmayla artan osteoporosis oluşumunu önlediğini bildirmişlerdir.



### **1.1.2.6 ınkonun Derideki Fonksiyonu**

Deri ve kendisine bağlı oluşumlar ınko yönünden zengin dokulardır. Derideki ınko nükleik asit ve kollajen sentezinde görev alır ve bağlayıcı destek dokunun biyosenteziyle btnlğnn korunmasında önemli roller üstlenir. Azot ve kükürt kullanımı ınko gerektirdiği için gebelikte, büyümede, yn ve sütün oluşmasında, yumurta üretiminde önemli roller oynar. Yetersizliğinde yn dökülmesi, ondülasyon ve parlaklık kaybı olur. Yönlerin döküldüğü kısımlarda deride kalınlaşma, tırnak ve boynuzda yumuşama, şişlikler ve lezyonlar şekillenir. Hayvanlarda ileri durumlarda derinin parakeratozisi klinik olarak belirgindir. Yara iyileşmesi yavaşlar kanama süresi uzar ve nonspesifik enfeksiyonlara karşı duyarlılık artar (80, 91).

### **1.1.2.7 ınkonun Antioksidan Etkisi**

Yüksek reaksiyon yeteneğine sahip moleküller olan serbest radikaller organizmada, başta lipitler olmak üzere, protein, DNA, enzim, karbonhidrat ve bunların önemli bileşiklerini etkilemektedir (3).

Serbest radikallerin organizmadaki etkisini en aza indirmek ya da ortadan kaldırmak için antioksidan maddelere gereksinim vardır. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), SOD, katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GSH-R) gibi enzimler, ınko, bakır, selenyum gibi bazı iz elementler ile vitamin A, E ve C gibi antioksidan vitaminlerin hücreleri oksidatif hasara karşı koruduğu bilinmektedir (93, 110, 137).

Biyolojik olaylarda geniş rolü olan ınkonun eksikliğinde normal hücre metabolizmasında değişimler ve doku bozukluklarının meydana geldiği bildirilmektedir (136). ınkonun önemli fonksiyonlarından birinin de membran stabilizasyonu olduğu kaydedilmiştir (57, 67). İnsan, hayvan ve hücre kültürü

modellerinde yapılan çalışmalar sonucunda, çinko eksikliğinin oksidatif hasara neden olduğu gösterilmiştir (124, 137).

Besinsel çinko eksikliğinin karaciğer mikrozomlarının LPO'na karşı duyarlılığını arttırdığı ve artan serbest radikallerin ise karaciğerdeki mikrozomal sit-p450'ye fonksiyonel ve yapısal olarak zarar verdiği bildirilmiştir (124).

Serbest radikallerin karaciğer hasarına ve siroza neden olduğu ayrıca insanlarda yapılan araştırmalarda çinkonun oksidatif strese ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmektedir. Sirozlu hastalarda yapılan çalışmada çinko düzeyinin azaldığı ve okside olmuş lipit düzeyinin ise arttığı bildirilmiştir (101, 119).

Yapısında çinko ve bakır bulunduran ve bir metalloprotein olan SOD'ın, süperoksit anyonunun katalizlenmesini sağlayarak hücrelerin korunmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir (55).

Çinkonun, DNA, protein ve lipitlerdeki demir ve bakır bağlı bölümleri işgal ederek antioksidan etkisini direkt gösterebileceği kaydedilmiştir. Bu nedenle DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında çinkonun katkısı büyüktür (90, 137). Hücre içerisinde demir birikmesi, oksidan türlerin artması ve MT düzeyinin azalmasının sekonder çinko eksikliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (137).

MT'ler yalnızca metal homeostazisini kontrol etmezler bunun yanında serbest radikal temizleyici olarak etki gösterirler. Yapısında 60-68 amino asit bulunan ve % 25-30 oranında sistein içeren MT'lerin glukokortikoid hormonlar, lipopolisakkaritler (LPS), interleukin-1 ve 6, tümör nekroz faktör ve oksidatif stres tarafından da kolayca uyarılabileceği kaydedilmiştir (57).

Buzadzich ve ark. (14), rat dokularındaki antioksidan enzim aktivitesi üzerine bakır ve çinkonun etkisini araştırdıkları çalışmalarında, kalp ve karaciğer dokularında CuZnSOD aktivitesinin arttığını ve çinkonun MT' nin sentezi üzerinden serbest radikallerin baskılanmasında önemli rol oynadığını bildirmişlerdir.

MT izoformları hücre ve nöronlarda çinko ile aktive olan, düşük molekül ağırlığına sahip, yapısında çinko bulunan moleküllerdir (15, 59, 103). MT'deki nükleofilik sülfidril gruplarının elektrophilik toksinlerle reaksiyona girerek, intrasellüler redoks potansiyelini düzenleyerek, serbest radikal temizleyicisi gibi görev yapabileceği bildirilmiştir (31, 103).

MT'lerin sadece ağır metalleri detoksifiye etmediği bunun yanında hücre ve organları da oksidatif hasara karşı koruduğu bu nedenle de MT'lerin serbest radikal temizleyicisi olarak bilindiği kaydedilmiştir (15).

MT I ve MT II genleri eksik olan fareler üzerinde yapılan bir araştırmada bu farelerin oksidatif strese karşı duyarlılığının daha fazla olduğu bildirilmiştir (70).

Aerobik nitrik oksit (NO)'in MT' lerde bulunan sülfidril gruplarıyla kompleks bileşikler oluşturabileceği ve metalsiz sülfidril gruplarının da kolayca oksitlenebileceği bildirilmektedir. NO genel olarak MT'lerde bulunan metal sülfidril kompleksine etki ederek çinko ve bakır gibi çift değerlikli metallerin serbest bırakılmasında bir rolünün olabileceği ifade edilmektedir (59).

UVA-1 ile oluşturulan radyasyonla yapılan bir çalışmada çinko klorürün LPO'nu ve nekroz sitotoksitesini azalttığı bildirilmiştir (71).

Çinko organizmada ayrıca;

- Membranlardaki sülfhidril gruplarının korunmasında,
- Prostaglandin metabolizmasında,
- Hayvanlarda glukozun yağ asitlerine dönüşümünde,
- Rumendeki mikrobiyal floranın oluşmasında,
- Beyin ve öğrenme kabiliyetinin gelişiminde önemli roller alır (69, 80).

### 1.1.3 Çinko Noksanlığının Neden Olduğu Bozukluklar

Çinko eksikliğinin ortaya çıkmasında en önemli faktör diyetle alınan miktarın düşük olmasıdır. Noksanlığı erkeklerde primer ve sekonder cinsiyet organlarının gelişimini ve spermatogenezisi olumsuz etkilerken, dişilerde kızgınlıktan doğum ve laktasyona kadar tüm üreme işlemleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Erkek danalarda, oğlaklarda ve kuzularda ise hipogonadizm şekillenmektedir. İran ve Mısır gibi ülkelerin insanlarında çinko noksanlığından dolayı hipogonadizm ile birlikte seyreden ikincil seksüel bozukluklar fazlaca görülmektedir. Çinko ilavesi normal seksüel gelişmeyi, testosteron seviyesinin yükselmesini ve sperma sayısının artmasını sağlamaktadır (38).

Çinko noksanlığının başka bir sebebi ise absorpsiyonu ile kalsiyum, demir ve bakır arasında antagonist bir etkileşim bulunmasıdır (4). Protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi reaksiyonlarda görev alan çinko, birçok enzimin yapısına katıldığı için immun sistemin güçlenmesi ve enfeksiyöz hastalıklara karşı dayanıklılık dolayısıyla immunoglobulin proteinlerinin sentezi, polimorfmononükleer (PMN) lökositler ile lenfositlerin üretim ve aktivitesiyle yakından ilgilidir. Diğer taraftan çinko noksanlığında deri hücrelerinde yenilenme durur, yangı, dermatitis ve arka bacaklar ile memelerde kolayca ülserleşen yaralar oluşur. Hücre bölünmesinin ve protein sentezinin durması büyüme ve gelişmeyi etkilemekte ve verim düşüklüğüne yol açmaktadır. Bu

durumdan özellikle iskelet sistemi etkilenmekte, yassı ve uzun kemiklerin gelişmesi durmaktadır (28,38).

#### **1.1.4 Çinkonun Üreme ve Gebelikteki Fonksiyonu**

İnsan dahil birçok hayvan türünün üreme fonksiyonunda çok özel bir yeri olan çinkonun yetersizliğinin cinsel gelişim bozukluklarına neden olduğu bildirilmektedir (109). Özellikle gebelikteki eksikliğinin normal embriyonal gelişimi, fetal büyümeyi ve gebelik süresini etkilediği kaydedilmiştir (21).

Testislerin olgunlaşması ve fertilité ile ilgili metalloenzim olan 'Angiotensin – Converting-Enzyme' (ACE)'nin yapısında da çinko bulunduğu, bu enzimin hayvanın ergenlik çağına ulaşınca kadar bulunmadığı ve cinsel olgunluğa ulaştıkça aktivitesinin artmaya başladığı bildirilmektedir (109).

Reeves ve O'Dell (99) düşük çinko içeren diyetle 26 gün besledikleri ratlarda yaptıkları bir çalışmada testislerdeki ACE enzim aktivitesinin azaldığını gözlemlemişlerdir.

Organizmaya alınan minerallerin fetus ve yavrunun sağlıklı gelişmesi verim ve dayanıklılıklarının artırılması, üremenin devam edebilmesi için gerekli olan birçok metabolik fonksiyonda görevli olduğu kaydedilmektedir (67).

A vitamininin normal kemik gelişimi, üreme, embriyonik gelişim, immun sistemin gelişimi, epitel hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması için gerekli olduğu rapor edilmektedir (89). Çinko, A vitamininin plazmada normal konsantrasyonda bulunması için gerekli olduğundan eksikliğinde A vitaminine bağlı fonksiyonlar etkilenmektedir (80).

Hayvansal protein içeriğinin düşük olduğu ayrıca besinlerin yüksek miktarda fiber ve fitat içerdiği durumlarda insanlarda çinko eksikliği ortaya çıkmaktadır. Çinko takviyesinin büyümeyi artırdığı, hastalıklara yakalanma oranını azalttığı ayrıca gebelikte annenin fizyolojik gereksinimlerin artmasından dolayı eksikliğinin yüksek bir risk oluşturabileceği ileri sürülmektedir (46).

Normal gebelik süresinde plazma ve lökosit çinko düzeyinin azaldığı, gebe olmayanlar ile kıyaslandığında ise en fazla düşüşün gebeliğin son dönemlerinde olduğu bildirilmektedir (36).

Halas ve ark. (45)'nin ratlarda yaptıkları bir çalışmada, gebelik boyunca şiddetli çinko eksikliğinin beyin gelişimini azalttığını rapor etmişlerdir.

Gebelikteki çinko eksikliği hayvanlarda ağır sonuçlara neden olur. Konuyla ilgili olarak domuzlarda yapılan bir araştırmada gebeliğin 30. gününde çinko alımı azaldığında daha fazla prematüre doğum ve abort görüldüğü tespit edilmiştir (7).

Castillo-Durán ve ark. (21), yaptıkları bir araştırmada prematüre ve düşük ağırlıklı doğan yavruların sayısının çinko takviyesi ile azaltılabileceğini gözlemlemişlerdir.

Gebelikte keçilere yeterli miktarda çinko verilmediği zaman, laktasyon periyodunda ihtiyaç artışından dolayı ciddi eksiklik belirtileri gözleendiği, 6-7 ppm çinko içeren diyet verildiğinde ise laktasyona girinceye kadar eksiklik belirtilerinin görülmediği ileri sürülmüştür. Ayrıca çinko eksikliği bulunan hayvanlarda gebelik süresinin uzaması ve güç doğum gibi olayların fazla görüldüğü bununla birlikte yavrudaki çinko emiliminin anneye ait çinko düzeyinin azalmasından etkilenmediği de bildirilmiştir (1).

## 1.2 Serbest Radikaller

### 1.2.1 Serbest Radikallerin Tanımı

Serbest radikaller; son yörüngesinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden yüksek reaksiyon yeteneğine sahip atom veya moleküllerdir. Ortaklanmamış elektron genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir (3).

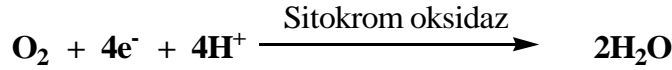
Serbest radikallerin yaklaşık 50 yıl önce biyolojik materyallerde keşfedildiği bildirilmektedir (29). Organizmanın oksijen ihtiyacının artmasıyla mitokondriyal elektron transport zincirindeki ortaklanmamış elektron çiftlerinin artışına bağlı olarak reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelir. Bunlar; süperoksit ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), alkoksil ( $\text{RO}\cdot$ ), alkil peroksi ( $\text{RO}_2\cdot$ ), hidroperoksi ( $\text{HO}_2\cdot$ ) hidrojen peroksit ( $\cdot\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve hipoklorit ( $\text{ClO}\cdot$ ) gibi reaktif moleküllerdir (55, 123). Organizmada bulunan önemli bir radikal grubu da reaktif nitrojen türlerinden (RNT) biri olan NO ve peroksinitrittir. Bu tip maddeler hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçlar ve diğer kimyasal maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir (3, 29).

Biyolojik sistemlerde elektron transferi sonucu meydana gelen serbest radikaller, elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr olup, organik ya da inorganik moleküller şeklinde bulunabilirler (3).

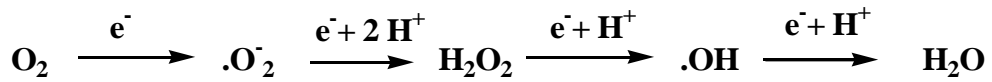
Oksijen kaynaklı serbest radikaller aerobik organizmalarda en çok solunum reaksiyonları sonucu meydana gelir. Solunum zincirindeki oksijenin % 95'i  $4\text{e}^-$  olarak suya dönüşürken (aynı sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sentezler), % 4-5'i ardışık olarak elektron kazanarak kısmi indirgenme ile ROT' a dönüşür. Bu toksik ürünler hücreye zarar vermeden antioksidanlarca mitokondrilerde metabolize edilirler (3, 58, 110, 123).

Solunum zincirindeki normal ve ROT oluşturan reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.

a- Normal Fizyolojik Reaksiyon



b- Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu



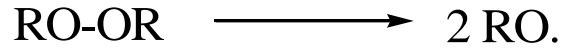
Oksidatif, ksenobiyotik, enzimatik ve nonenzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikaller, antioksidan enzimler tarafından substrat olarak kullanılırlar. ROT'nin başta lipit, protein ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elemanları ile reaksiyona girebileceği ve özellikle lipit ve proteinler üzerinde yıkıcı etki gösterebileceği bildirilmiştir (3, 58).

Ölüm riskini arttıran ve yaşlanmayı hızlandıran immun sistemin çökmesinde, merkezi sinir sisteminin dejeneratif bozukluklarında, kardiyovasküler, diyabet ve kanser gibi hastalıkların gelişiminde serbest radikallerin önemli bir rol oynadığı ve serbest radikalleri yok eden veya etkisini azaltan antioksidanların kullanılmasının yaşam süresini uzatabileceği ortaya konulmuştur (3, 29, 58).

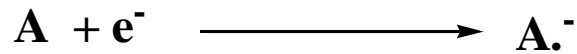
Serbest radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar;

**1. Kovalent bağların homolitik kırılması:** Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar veya yüksek sıcaklık (500-600 °C) kovalent bağlı bileşiklerdeki kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri farklı atomlar üzerinde kalırsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron bulunur. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda ise reaktif özellik gösteren zıt yüklü iyon çiftleri oluşur (3, 64, 135).

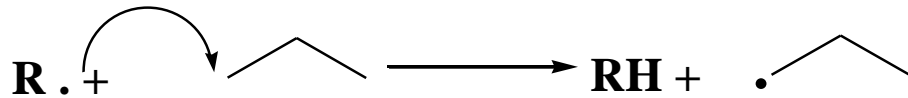




**2. Normal bir moleküle elektron transferi:** Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron bulunması radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin oksijen molekülünün tek elektron ile indirgenmesi sonucunda radikal formu olan  $\text{O}_2^-$  meydana gelir. Biyolojik sistemlerde bu mekanizma yolu ile radikal oluşumu yaygın olarak gerçekleştiğinden canlılar için oldukça önemlidir. Canlılarda çok sayıda enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle  $\text{O}_2^-$  radikalinin üretildiği bildirilmektedir (3, 64).



**3. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi:** Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalmasına bağlı radikal formu oluşur (64, 135).



### 1.2.2 Serbest Radikallerin Kaynakları

**Biyolojik Kaynaklar:** Aktive olmuş fagositler (makrofajlar vb.), antineoplastik ajanlar (doxorubicine vb.), radyasyon, alışkanlık yapan maddeler (alkol ve uyuşturucular), çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal ajanlar, sigara dumanı, solventler, aromatik hidrokarbonlar) ve stres.

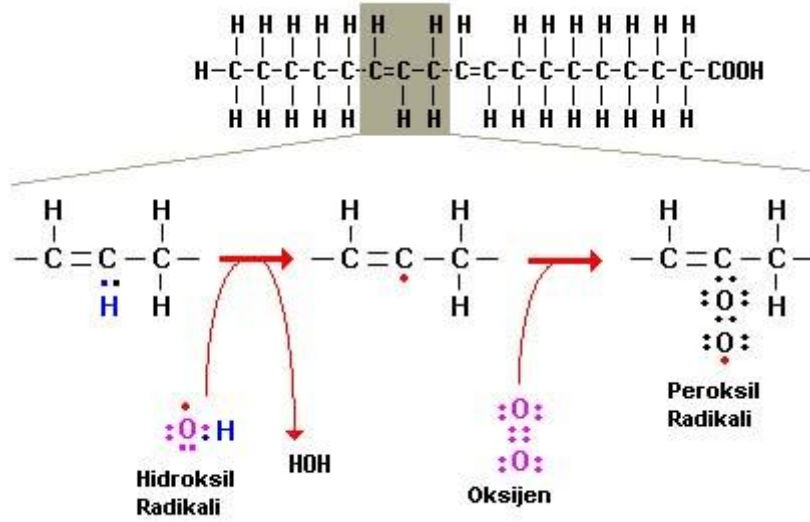
**İntrasellüler Kaynaklar:** Küçük maddelerin otooksidasyonu (tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler ve antibiyotikler), enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, triptofandioksijenaz ve hemoglobin), mitokondrial elektron transportu, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450, sitokrom b<sub>5</sub>), peroksizomlar (oksidazlar ve flavoproteinler), plazma membranı (lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz ve lipit peroksidasyonu), oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma ve intoksikasyon) (3).

### 1.2.3 Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri

Organizmada savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak şekilde serbest radikallerin üretilmesinin başta lipitler olmak üzere, protein, DNA, enzim, karbonhidrat veya bunların önemli bileşiklerini etkilemesine bağlı olarak çeşitli bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir (3, 29, 93, 110).

Hücre zarındaki yağ asitleri ve kolesteroldeki doymamış bağlar serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturur. LPO fosfolipit, glukolipit, gliserit ve steroidlerin yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidan maddeler aracılığıyla alkol, aldehit, hidroksi asit, etan, pentan gibi ürünlere yıkılmasını kapsar. LPO olaylarının potansiyel olarak yıkıcı etkileri olan zincir reaksiyonları olduğu, daha ileri peroksidasyon olaylarını başlatan serbest radikaller için devamlı bir kaynak sağladığı ve

hücre zarında geriye dönüşümsüz hasarlar meydana getirdiği bildirilmiştir (3, 58). Serbest radikallerin lipidlerle peroksidasyon reaksiyonu Şekil 1.3' de gösterilmiştir.



Şekil 1.3 Serbest Radikallerin Lipitlerle Reaksiyonu (49).

Oksidan maddeler, proteinlerde dekarboksilasyona, peptid bağlarının hidrolizine, disülfid bağları ve çapraz bağlar oluşturarak hücre için esansiyel olan Ca-ATPaz, Na/K ATPaz gibi enzimlerde fonksiyon kaybı sonucu hücre içi ve dışı iyon dağılımının bozulmasına neden olmaktadır (3, 130).

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri amino asit dizilimine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallere affinitesi yüksek olduğundan, triptofan, tirozin, fenil alanin gibi aromatik yapıli amino asitler ile metiyonin, sistin, sistein gibi kükürtlü amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden çok çabuk etkilenirler. Sonuçta özellikle sülfür ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Radikalleri oluşturan reaksiyonlar sonucu immunglobin G (IgG) ve albuminin üç boyutlu yapısı bozulduğundan normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Yangısal eklem hastalığı olan kişilerin serum proteinlerinde ve sinoviyal sıvılarında

bulunan IgG'lerinde serbest radikal oluşumuna bağlı hasarların oluşabileceği bildirilmiştir (3, 58).

İyonize edici radyasyonlarla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ardından ölüme yol açar. Sitotoksite büyük ölçüde nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA zincirinde kırılmaların yanısıra DNA polimerazın inhibisyonuna neden olur. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon kaybına ve ölümüne yol açar. Bu yüzden DNA, serbest radikal hasarından kolayca zarar görebilen önemli bir hedeftir (3).

Araştırmacılar DNA, protein ve lipitlerdeki demir ve bakır bağlı bölümleri işgal ederek antioksidan etkisini direkt gösterebildiğinden dolayı DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında çinkonun önemli bir role sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir (90, 137).

Hücre kültürü ortamında ultraviyole radyasyon ışını ile oksidatif stres oluşturularak yapılan bir çalışmada çinko klorürün LPO ve nekroz sitotoksitesini azalttığı ve DNA molekülünü koruduğu bildirilmiştir (71).

Serbest radikallerin protein metabolizması üzerinde olumsuz etkilerinin bulunması yanında karbonhidrat metabolizması üzerinde de glikolitik, ATP sentezini azaltıcı ve ATP kullanımını artırıcı yönde etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler gibi meydana gelen radikaller diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklarda önemli rol oynarlar. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve kendi aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (3, 29, 130).

#### 1.2.4 Serbest Radikaller ve Gebelik

Serbest radikallerin organizmadaki etkisini en aza indirmek ya da ortadan kaldırmak için antioksidan maddelere gereksinim vardır. GSH-Px, SOD, CAT, bazı iz elementler (Zn, Cu gibi) ile vitamin A, E ve C gibi antioksidan maddelerin hücreleri oksidatif hasara karşı koruduğu bildirilmektedir (93, 110). Çinko eksikliğinin hücre bileşenlerinde oksidatif hasara neden olduğu rapor edilmiştir (137). Yapısında çinko bulunduran bir metalloprotein olan SOD'un, süperoksit anyonunun katalize edilmesini sağlayarak hücrelerin korunmasına katkı sağladığı belirtilmiştir (55).

Küçük molekül ağırlıklı suda eriyebilir bir molekül olan GSH, genetik bilgiye ihtiyaç olmaksızın karaciğerde sentezlenebilen ve yapısında  $\gamma$ -glutamin, sistein ve glisin amino asitlerini bulunduran bir tripeptittir. Antioksidan özelliğinin yanında GSH'ın önemli başka bir fonksiyonu da detoksifikasyon reaksiyonlarında rol oynamasıdır (74, 122).

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ilave olarak kullanılan A, E ve C gibi vitaminlerin laboratuvar ve çiftlik hayvanlarında üreme fonksiyonu üzerinde etkileri olduğu bildirilmiştir (22, 54).

Gebe kadınlarda gebeliğin serbest radikal ve antioksidan sistem üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda peroksida olmuş lipidlerin genellikle plasenta kaynaklı olduğu, peroksidaz aktivitesindeki artış ile progesteron gibi üreme hormonların sentez yolları arasında bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur (53, 84).

Gebe kısıraklar üzerinde yapılan bir araştırmada, gebeliğin 6. ayı, doğumdan 2 hafta önce ve doğumdan bir ay sonrası karşılaştırıldığında total antioksidan kapasitesi ve SOD aktivitesinin arttığı, GSH-Px aktivitesinin düştüğü ve bu

durumun perinatal periyotta antioksidan sistemde meydana gelen büyük değişikliklerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (37).

Ratlarda gebeliğin 18, 20 ve 21. günlerinde karaciğer dokusunda GSH düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada, gebeliğin 20 ve 21. günlerinde gebeliğin 18. gününe göre bir azalma tespit edilirken, en fazla azalmanın kaydedildiği 20. gününde 18. gündekinin % 50'si kadar azalma olduğu bildirilmiştir (104).

Ovaryum dokularında aşırı üretilen ROT'un luteal hücrelerin plazma membranındaki LPO'nu artırdığı ve gonadotropin reseptörlerinde kayıplar meydana getirdiği ayrıca regresyon fazında korpus luteumun steroid hormon üretme kabiliyetinde de azalmaların meydana geldiği bildirilmektedir (116). ROT hasarına karşı oldukça hassas olan embriyo ve gamet hücrelerinin antioksidanlarca korunmasının gerekli olduğu (116) ve Zn-CuSOD'un da embriyoları serbest radikal hasarına karşı koruduğu ortaya konulmuştur (44).

### 1.3 Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) renksiz, küçük molekülü, yağda çözünen, yarı ömrü oldukça kısa olan ve hücre zarlarından kolaylıkla geçebilen reaksiyon yeteneği oldukça yüksek olan toksik etkili nörotransmitter bir maddedir (35, 117).

Nitrik oksitin fonksiyonları ve biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar 1988-1992 yılları arasında hız kazanmıştır. 1992 yılında yılın molekülü olarak seçilen NO, 1998 yılında Furchgott ve arkadaşlarına Nobel ödülü kazandırmıştır. Bu konu ile ilgili çalışmalar günümüzde de yoğun bir şekilde devam etmektedir (6, 100, 121).

Nitrik oksitin kimyasal özelliklerine ilişkin ilk çalışmanın 1772 yılında *Josef Priestly* tarafından yapıldığı bildirilmiş (42) ve *in vivo* olarak varlığı 1914 yılında *Sir Henry Dale* tarafından rapor edilmiştir. Sir Henry, intravenöz olarak uyguladığı asetilkolin (Ach)' in tavşan kulağında kan akımını artırdığını göstermiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar *in vitro* olarak Ach'in etkisini gözlemeye yönelmiş, ancak bir sonuç alınamamıştır. Çünkü damar *in vitro* koşullarda gevşeme yerine kasılma ile yanıt vermiştir. 1962 yılında ilk kez *Jeliffe* tarafından yapılan bir çalışmada aortun gevşeme ile yanıt verdiği belirtilmiştir (32).

Furchgott ve arkadaşı 1980'de aynı deneyi yaparak elde ettikleri bir birine zıt sonuçları değerlendirdiklerinde birisinin kan damarlarına Ach uygulandığında gevşeme yanıtı elde ettiğini, diğersinin ise dikkatsizlik sonucu endotel tabakasının sıyrılmasına ve damarın kasılmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir. Böylece Furchgott, endotelde Ach etkisi ile gevşeme yanıtı oluşturan bir maddenin varlığına işaret etmiş ve bu maddeye endotel kökenli

gevşeme faktörü (EDRF; endothelyum-derived relaxing factor) adını vermiştir (100, 128, 131, 132).

İlaç olarak kullanılan nitrogliserin, sodyum nitroprussid ve diğer nitratların organizmada kendi molekülerinden NO salıvermek suretiyle antiagregant (yatıştırıcı) ve vazodilatör etki gösterdiği bildirilmiştir (30, 35, 121).

Nitrik oksitin en güçlü vazodilatör olarak bilinen EDRF ile aynı madde olduğu 1987 yılından itibaren anlaşılmış (94), *Moncada* ve ark. 1989 yılında EDRF adı verilen maddenin NO olduğunu kanıtlamışlardır (117).

Alfred Nobel iskemik kalp hastalığına yakalandığında kendi bulduğu dinamitin ana maddesi olan nitrogliserini tedavi için kullanmıştır. Aradan 100 yıl geçtikten sonra nitrogliserinin NO gazına dönüşerek etki ettiği anlaşılabilmiştir (128).

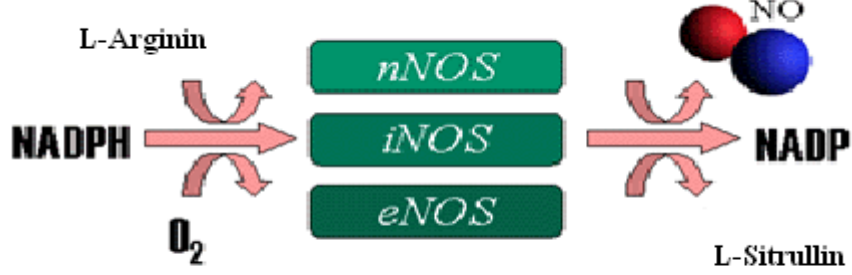
### 1.3.1 Nitrik Oksitin Enzimatik Olarak Sentezi

Vücuttan atılan nitratların kaynağı uzun süre diyet olarak kabul edilmesine rağmen; yapılan bir çalışmada, nitrattan yoksun diyetle beslenen sıçanlarda nitrat atılımının devam ettiği ortaya konulunca tek kaynağın diyet olmadığı endojen olarak da sentez edilebileceği anlaşılmıştır (132).

Paramagnetik bir serbest radikal olan NO, nitrik oksit sentetaz enziminin (NOS) (EC: 1. 14. 13. 39) L-arjinini okside ederek sitrullin oluşturması esnasında sentez edilir. Bu reaksiyon moleküler oksijen ve kofaktör olarak NADPH gerektirir. NO sentez edildikten ve işlevini yerine getirdikten sonra hızla metilen mavisi, hemoglobin ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilir ya da 10 saniye içerisinde nitrit ve nitratlara çevrilir (24, 42, 96, 111, 127).



Birçok NOS izoformu tanımlanmış olmakla birlikte üç tanesi hakkında (şekil 1.4) daha çok bilgi bulunmaktadır. Bunlar; uyarılabilen NOS (iNOS), endotel NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS)'tur (34, 41, 88, 111, 121).



Şekil 1.4 L-Arjininden Nitrik Oksit Sentezi (51).

### 1.3.1.1 Uyarılabilen NOS (iNOS)

Uyarılabilen NOS kalsiyumdan bağımsız sitokinler ve endotoksinler tarafından uyarılan ve makrofajlarda bulunan uyarılabilir NOS'dur (iNOS veya NOS II). Bu izoformunun diğerlerinden 1000 kat daha fazla NO üreten sistem olduğu belirtilmektedir (24,131).

Uyarılabilen NOS izoformu NO üretimi için tetrahydrobiopterin'e (THB) gereksinim duyar. Bu sistemde sitokinler (IL-1, TNF, IF- $\gamma$ ) ve endotoksinler tarafından oluşturulan uyarılar sonucu birkaç saat içerisinde başlayan ve günler boyu süren nanomol düzeyde NO sentezi gerçekleştirilmiş olur. Bazı hücrelerde NO sentezi IL-8, IL-10 ve TGF- $\beta$  gibi maddelerle yavaşlatılabilirken glukokortikoidlerle de iNOS sentezinin önlenebileceği bildirilmektedir (41, 111, 133). iNOS normalde hücre içinde yapısal olarak sentezlenmez, uygun bir immun uyarı aracılığı ile sentezi başlar. Diğer NOS izoformlarından farklı olarak ortamda bulunduğu sürece NO sentezler. Sitotoksik ve zararlı etkilere karşı iNOS tarafından sentezlenen NO miktarı

yüksektir. Özellikle bakteri LPS, interferon- $\gamma$  veya yüksek konsantrasyonda LPS uyarıları ile makrofajlar tarafından aşırı miktarda üretilen NO'un, bakteri, parazit ve tümör gibi yabancı hücrelerde sitostatik veya sitotoksik etki meydana getirdiği gösterilmiştir (18, 111).

### 1.3.1.2 Endotel NOS (eNOS veya NOS III)

Endotel NOS sinir ve endotel hücreleri ile endokard, miyokard ve trombositlerde sürekli bulunur ve aralıklı olarak küçük miktarlarda NO üretir. Bu enzimin kofaktörleri kalsiyum ve kalmodulindir. Ortamdaki kalsiyumun artışı kalmodulinin eNOS'a bağlanmasını uyarır ve pikomol düzeyinde NO sentezine neden olur. eNOS tarafından sentezlenen NO hücre içi ve hücreler arası iletişimde fizyolojik olarak aracılık yapar. NO üretimi kalsiyum bağlayan maddeler veya kalmodulin inhibitörleri ile inhibe edilebilir. Endotel hücrelerinde NO üretimi TNF- $\alpha$  ile uzun süreli uyarılabilirken kalsiyum antagonisti olan bradikinin ile daha kısa süreli uyarılır (34, 41, 48, 111).

Asetilkolin, histamin, serotonin, vazopressin, bradikinin, prostasiklin, vazoaktif intestinal peptid, P maddesi, kalsitonin geni ile ilişkili peptid, insülin ve katekolaminler gibi vazoaktif maddeler ve ilaçlar NO salınımına neden olur. Trombosit agregasyonu sırasında aktive edilen trombositlerin salgıladığı ATP ve ADP ile pıhtılaşma sırasında oluşan trombin de EDRF salgılanmasına neden olur. NO, endotelde  $Ca^{+2}$ 'a bağımlı bir şekilde sentez edilip salınır (18, 88, 131).

Serebrovasküler dokudaki östrojen reseptörünün aktive edilmesi eNOS aktivitesi ve protein düzeyinin artmasıyla sonuçlanır. Böylece eNOS tarafından NO üretiminin artmasının östrojenin nöroprotektif etkileriyle ilgili olabileceği belirtilmiştir (82).

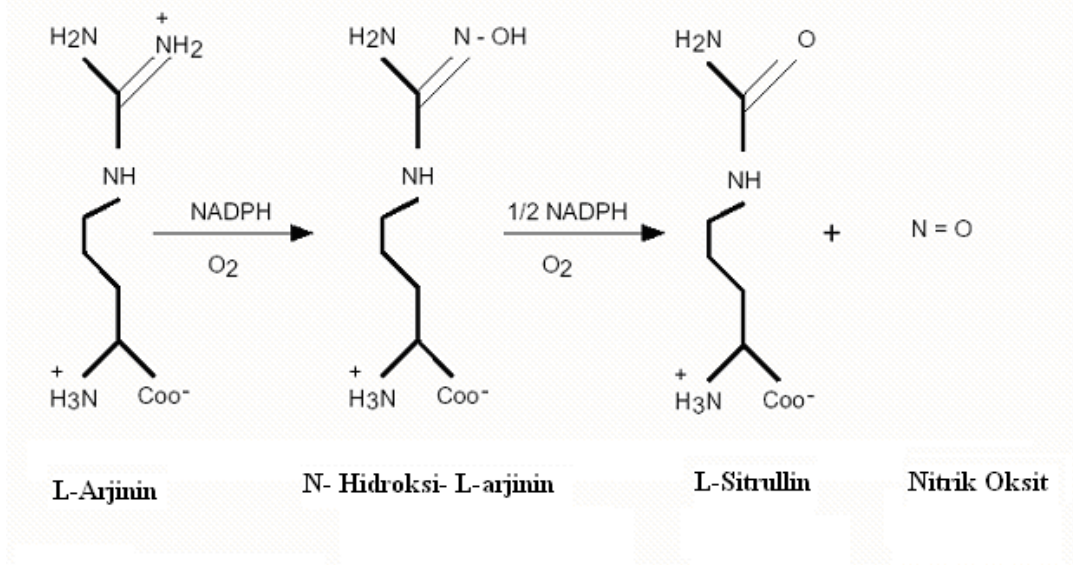
Yapılan bir çalışmada gebelik boyunca NO ve NO metabolitlerinin (NOx) arttığı ve gebelikte artan NOx düzeylerinin hem eNOS hem de mRNA ile kontrol edildiği bildirilmiştir (78).

### **1.3.1.3 Nöronal NOS (nNOS)**

Nitrik oksit serebellum ve ön beyindeki nöronlarda ve bazı otonom sinirlerin uçlarında da nNOS tarafından sentez edilip salınır. NOS'ın farklı bir izoformu olan bu enzim nöronlarda bulunduğu için nNOS veya NOS I olarak adlandırılmaktadır. Yapısal olarak endotelde bulunan eNOS veya NOS III gibi kalsiyum-kalmoduline bağımlı olduğu bildirilmektedir (35).

Nöronal NOS tarafından sentezlenen NO'nun merkezi sinir sisteminde hafıza oluşumu, denge, uyarı geçişi, koku alma gibi fonksiyonlarda nörotransmitter olarak görev aldığı kaydedilmektedir (34, 41).

Endotel NOS ve nNOS enzimlerinde katalitik mekanizma aynı olduğu halde fonksiyon açısından önemli olan bazı farklılıklar olduğu belirtilmektedir. Genel olarak katalitik mekanizma; NADPH kaynaklı elektronların FAD ve FMN aracılığı ile iNOS içeren enzimin demir içeren hem grubuna aktarılması şeklinde işler. Bu aktarım genellikle kalsiyum-kalmodulin kompleksinin ortamda bulunması ile mümkündür. Aktarılan bu elektronlar L-arjinine verililerek (şekil 1.5), NO ve sitrullin sentezi gerçekleşmiş olur (18, 111).



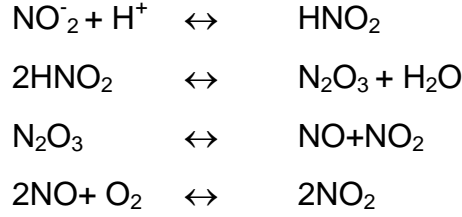
Şekil 1.5 L- Arjininden Nitrik Oksit Sentezinin Basamakları (132).

Enzimin ana substratı olan L-arjininin konsantrasyonu az ve hız sınırlayıcı faktör olarak bulunduğu durumlarda yukarıda bahsedilen elektron aktarımı NO üretiminden bağımsız olarak cereyan etmeye başlar. Elektronlar normal seyirlerini izlemelerine rağmen NO üretimi oluşmaz. Aksine süperoksit anyonu ve NO oluşumunun etkisiyle peroksinitrit ( $\text{OONO}^-$ ) oluşur. Oldukça aktif bir oksijen radikali olan  $\text{OONO}^-$ 'in öncelikle hücre zarındaki lipitleri oksitleyerek hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (6, 111, 121).

NOS kofaktör olarak THB molekülüne ihtiyaç duyar. THB eksikliğinde hidrojen peroksit ve süperoksit radikali meydana gelir. Bu radikaller ortadan kaldırılmadıkları takdirde çok hızlı bir şekilde hücre ve doku hasarına neden olurlar. eNOS ve nNOS, hücre içerisinde sürekli bulunurlar ve yapısal olarak sentezlenirler. Bunların aktiviteleri hücre içi kalsiyum artışına bağlıdır ve bu artış kalmodulin aracılığı ile NO sentezini uyarır. Bu enzimler tarafından üretilen NO miktarı düzenli ve düşük salınımlar sergiler. Hücreler arası haberci özelliğine sahip bu tür salınmanın NO'nun bir transmitter olduğu yönündeki bilgilerle uyum gösterdiği belirtilmektedir (18, 88, 111).

### 1. 3. 2 Nitrik Oksitin Nonenzimatik Üretimi

Nitrik oksit ve diğer azot oksitleri çevredeki nitritlerden oluşmaktadır. Düşük pH'da nitrit iyonu ( $\text{NO}_2^-$ ) nitroz asite ( $\text{HNO}_2$ , pKa: 3.2-3.4) ve daha sonra nitrik oksit içeren birtakım azot oksitlerine dönüşmektedir.



Yukarıdaki reaksiyonun yönü  $\text{pO}_2$ , pH, hem içeren protein varlığına ve redoks durumuna bağlı olarak değişir. İndirgenmiş ajanlar kimyasal olarak NO üretimini artırırlar. Askorbik asit ve askorbat anyonunun sulu ortamda ve geniş pH aralığında  $\text{HNO}_2$ 'nin indirgenmesini sağlayarak dehidroaskorbik asit ve NO üretimine neden olduğu kaydedilmektedir (125).



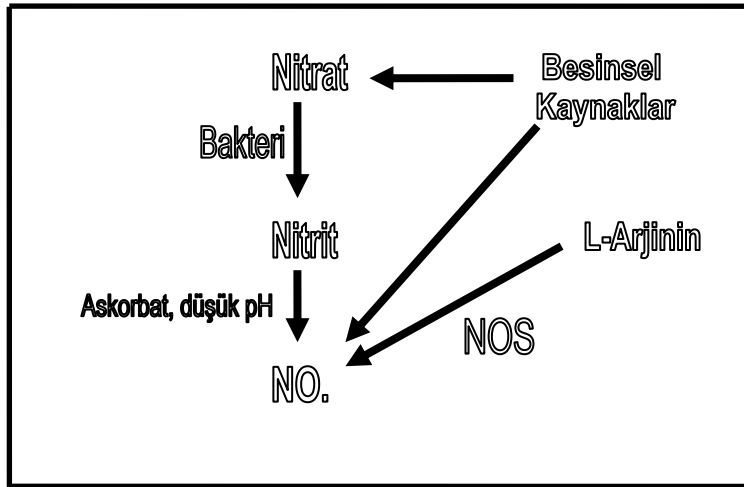
Tükrükte hem nitrit hem de nitrat bulunmaktadır. Ağız boşluğundaki bakteriler nitratın bir kısmını nitrite indirgeme yeteneğine sahiptir. Midede nitritin indirgenmesini takiben NO oluştuğu ve midedeki asit üretiminin bloke edilmesi ile NO üretiminin geniş ölçüde bozulduğu ortaya konulmuştur (125).

Aşırı miktarda nitrat alınması durumunda nitrit oluşum hızı nitrit yıkımından fazla olabilmekte ve sonuçta sindirim kanalındaki nitrit yoğunluğu artmaktadır. Et ürünlerine nitrit ilave edildiğinde, nitritlerin miyoglobin ve hemoglobin gibi renkli pigmentlerle birleşerek nitrozo-bileşikleri oluşturduğu ve böylece doğal rengin korunduğu bildirilmiştir (17, 125).

Nitrat ve nitrit sebzeler aracılığı ile de organizmaya alınmaktadır (şekil 1.6). Örneğin yeşil yapraklı sebzelerde 1000 mg/kg, salatada ise 200 mg/kg nitrat bulunduğu kaydedilmiştir (17).

Tarımda azotlu gübrelerin fazla miktarda ve kontrolsüz olarak kullanımının toprak ve sudaki azot düzeyinin sürekli olarak artmasına neden olacağı ve canlılar üzerinde olumsuz etkiler meydana getirebileceği bildirilmektedir (61, 62).

Yoğun trafik ve sigara yüksek miktarda nitrit solunmasına neden olur. Yüksek oranda  $\text{NO}_2$ 'ye maruz kalmanın akciğer kanserine neden olabileceği bildirilmesine rağmen, çevredeki miktarın insan sağlığını tehdit edebilecek kadar fazla olduğu düşünülmemektedir (125).

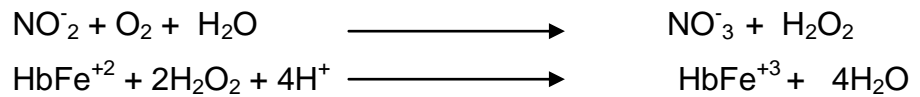


Şekil 1.6 Nitrik Oksitin İn Vivo Olarak Oluşum Mekanizması (125).

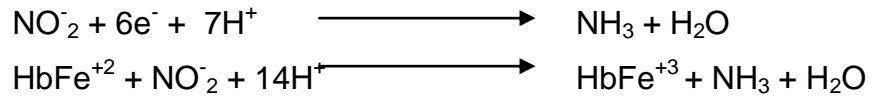
Nitritin toksik etkisi, hemoglobinin oksitlenmesini sağlayarak methemoglobine dönüştürmesi suretiyle olur. Bir molekül nitrit iki molekül hemoglobin ile birleşirse hemoglobindeki  $Fe^{+2}$  yi  $Fe^{+3}$  e dönüştürerek methemoglobin veya oksihemoglobin oluşturur (13, 17, 121, 125).

Methemoglobin oluşumu için direkt veya indirekt iki mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlardan birincisi indirekt methemoglobin bağlanması ve nitrit oksidasyonu, diğeri ise direkt hemoglobin bağlanması ve nitrit redüksiyonudur.

### 1-İndirekt methemoglobin bağlanması ve nitrit ( $NO_2^-$ ) oksidasyonu;



### 2-Direkt hemoglobin bağlanması ve nitrit ( $NO_2^-$ ) redüksiyonu;



Hemoglobinin % 20-40'ı methemoglobin'e dönüştüğünde klinik olarak anoksi belirtilerinin geliştiği ve methemoglobin düzeyi yükseldikçe bu belirtilerin arttığı bildirilmiştir (13).

Özellikle yeni doğan çocuklarda methemoglobin indirgenme kapasitesi düşük olduğundan '*blue baby syndrome*' olarak adlandırılan sendrom ortaya çıkmakta ve methemoglobin düzeyi % 50'yi aştığında gerekli tedavisi yapılmazsa koma ve ölüme neden olabilmektedir (10).

Ratlarda yapılan çalışmada nitritin, intestinal emilimi inhibe ettiği bildirilmiştir (17). Nitrit ile kanser arasında olası bir bağlantı üzerine kesin bir kanıt bulunamamasına rağmen, yüksek doz nitritin kanserin oluşmasında öncülük edebileceği, ayrıca besinsel nitrit ve nitrat düzeyi ile kanserin insidansı arasında bir korelasyon olduğu araştışıcılar tarafından rapor edilmiştir (17, 19, 43, 105).

Kaya (62)'nin yaptığı bir çalışmada rasyona deneysel olarak katılan bol miktardaki nitrit ve nitratın üreme bozukluğuna, yavru atma ve ölü doğum olaylarında da artışlara neden olduğu bildirilmiştir.



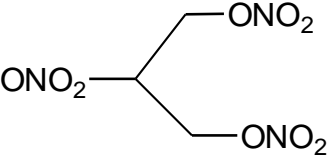
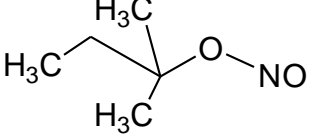
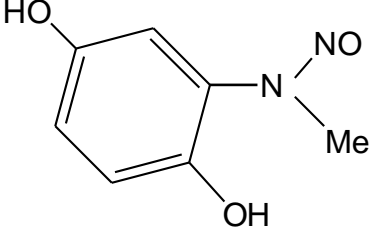
### 1.3.3 Nitrik Oksit Vericileri

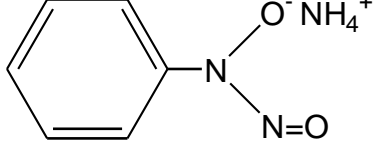
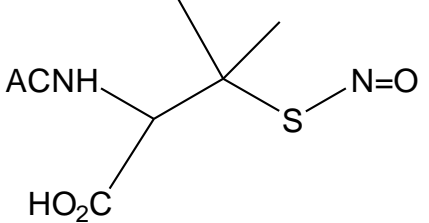
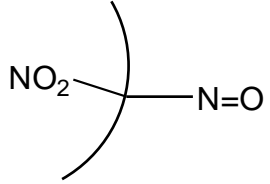
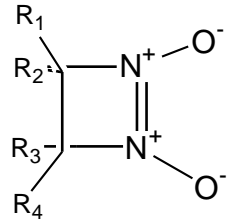
Nitrik oksit vericilerine; L-arjinin, molsidomin, dephostatin, 3, 4 dephostatin, S, S' nitrozoditiyol, gliko-SNAP-1, gliko-SNAP-2, N<sup>G</sup>-hidroksil-L-arjinin monoasetat tuzu, SNAP, S-nitrozokaptopril, SNOG, S-nitrozoglutasyon monoetil esteri, sodyum nitropurissid, streptozotosin, NOC-5, NOC-7, NOC-9, NOC-12, organik nitratlar, organik nitritler, metal-NO-kompleksleri, N-nitrozaminler, N-hidroksil nitrozaminler, nitrozoiminler, nitrozotiyoller, C-nitrozo bileşikleri, diazitin dioksitler, furoksan, benzofuroksan, oksimler, hidroksilaminler, N-hidroksiguanidinler örnek olarak verilebilir (6, 16, 121, 127).

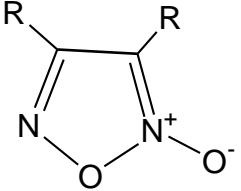
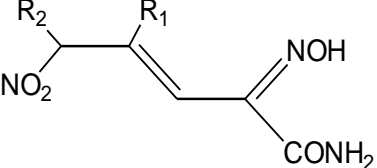
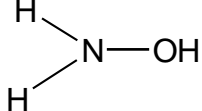
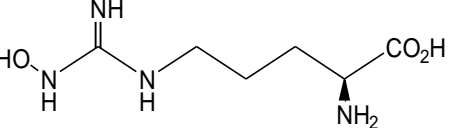
Asahi ve ark. (8) yaptıkları bir çalışmada U937 hücrelerini NO vericisi olan SNAP'la inkübe ettikleri zaman GSH-Px aktivitesinde önemli derecede azalma olduğunu tesbit etmişler ve bu aktivite kaybının endojen NO tarafından da olabileceğini bildirmişlerdir.

Bazı NO vericileri Tablo 1.2'de sunulmuştur .

Tablo 1.2 Bazı NO Vericilerinin Molekül Yapısı ve NO Salınım Yolları (121).

Adı	Molekül Yapısı	NO'nun Oluşum Yolu	
		Non-enzimatik	Enzimatik
Organik Nitratlar		Tiyol	Sit-P450, GST ve Membrana bağlı enzimler
Organik Nitritler		Hidroliz, transnitrozasyon, tiyol, ısı ve ışık	Sitozolik ve mikrozomal enzimler ksantin oksidaz
Metal-NO-kompleksleri	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Işık, tiyol, indirgen maddeler ve nükleofiller	Sit-P450 ile ilgili enzimler
N- Nitrozaminler		OH, ışık	Peroksidazlar

<p><b>N-Hidroksil Nitrozaminler</b></p>		<p>Işık, ısı</p>	<p>?</p>
<p><b>Nitrozotiyoller</b></p>		<p>Spontan, ısı, ışık</p>	<p>Bilinmeyen enzimler</p>
<p><b>C-Nitrozobileşikleri</b></p>		<p>Isı, ışık</p>	<p>?</p>
<p><b>Diazitin Dioksitler</b></p>		<p>Spontan</p>	<p>?</p>

<p><b>Furoksan, benzofuroksan</b></p>		<p>Tiyoller</p>	<p>Bilinmeyen enzimler</p>
<p><b>Oksimler</b></p>		<p>Spontan O<sub>2</sub>/Fe<sup>+3</sup>, porfirin</p>	<p>?</p>
<p><b>Hidroksilaminler</b></p>		<p>Metal iyonlarının otooksidasyonu</p>	<p>Katalaz /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></p>
<p><b>N-Hidroksiguanidinler</b></p>		<p>Oksidanlar</p>	<p>NOS, Sit-P450</p>

### 1.3.4 Nitrik Oksitin Etkisini İnhibe Eden Maddeler

Patolojik durumlarda makrofajlarda meydana gelen yüksek düzeydeki NO'nun programlanmış hücre ölümünü (apoptosis) uyardığı, sinir sisteminde hasara ve septik şoka neden olduğu kaydedilmiştir (133). Ayrıca iNOS'un inhibisyonunun NO'nun toksik etkisini önemli derecede azalttığı bunun yanında makrofajlarda bulunan TGF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-11 gibi sitokinlerin ise iNOS'un oluşumunu inhibe ettiği bildirilmektedir (126, 133).

*In vitro* olarak sentezlenen NO çok hızlı bir şekilde hedef hücrelere diffüze olur. Serbest NO bazı moleküller tarafından etkisiz hale getirilir ve işlev görmeden bloke edilir. Metilen mavisi, hemoglobin, fusidik asit ve karboksi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oksil (Karboksi-PTO) gibi moleküller örnek olarak gösterilebilir (117, 132).

Sakaguchi ve ark. (103) hücre kültüründe yaptıkları bir çalışmada çinkonun da endotoksinler tarafından üretilen NO sentezini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda bir proteinin (macrophage-stimulating protein; MSP) makrofajları uyardığı bulunmuş ve bu proteinin LPS ve IFN- $\gamma$  gibi uyarılarla oluşan iNOS'u endojen olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (133).

#### 1.3.4.1 Nitrik Oksit Sentataz İnhibitörleri

Arjinin analogları ve azot içeren bileşikler NOS'u inhibe ederler. Günümüzde yaygın olarak kullanılan arjinin analogu N-monometil L-arjinin (L-NMMA)'dir. L-NMMA NOS'u geriye dönüşümsüz olarak inhibe eder. NOS inhibitörü olarak yaygın kullanıma sahip diğer maddeler ise N-nitro-L-arjinin (L-NA),

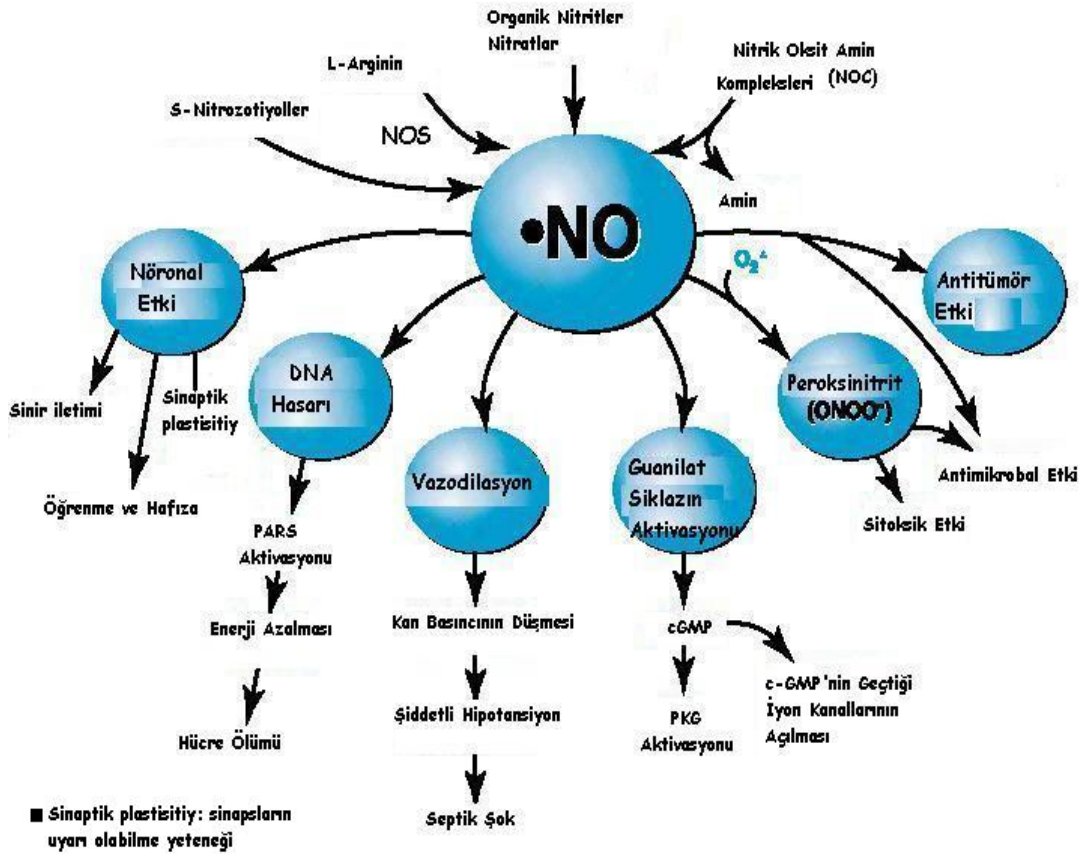
bunun metil türevi olan N-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ve N-iminometil-L-ornitin (L-NIO)'dir. Bunların *in vivo* ve *in vitro* olarak etkilerinin aynı olmasına rağmen kantitatif olarak farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (24, 117, 126).

Bu maddelerin emilimi, dağılımı ve metabolizmaları arasında çeşitli farklılıklar olduğundan NOS inhibisyonundaki etki güçleri de değişmektedir. Örneğin; L-NIO'nun NOS'u inhibe etme gücü diğerlerinin yaklaşık 5 katıdır. L-NMMA ve L-NAME oral yolla etki gösterememektedirler. Bu maddelerin NO'nun biyolojik rolünü açıklamaya yönelik çalışmalarda anahtar rol oynayabileceği bildirilmektedir (117, 126).

Azot içeren bileşikler nNOS ve iNOS'u inhibe ederler. Bu bileşiklerden en fazla kullanıma sahip olan 7-nitroindazol'dur ve nNOS için hem seçici hem de yarışmalı bir inhibitördür. Bu bileşik kardiyovasküler komplikasyonlara yol açmaksızın makrofajların aşırı NO üretiminden kaynaklanan patolojik durumlarla kullanılabilir. Difeniliodiniumklorür gibi inhibitörler de, FAD ve FMN'ye gereksinim duyan nNOS ve iNOS'un inhibisyonunda kullanılırlar (132).

### 1.3.5 Nitrik Oksitin Organizmadaki Görevleri

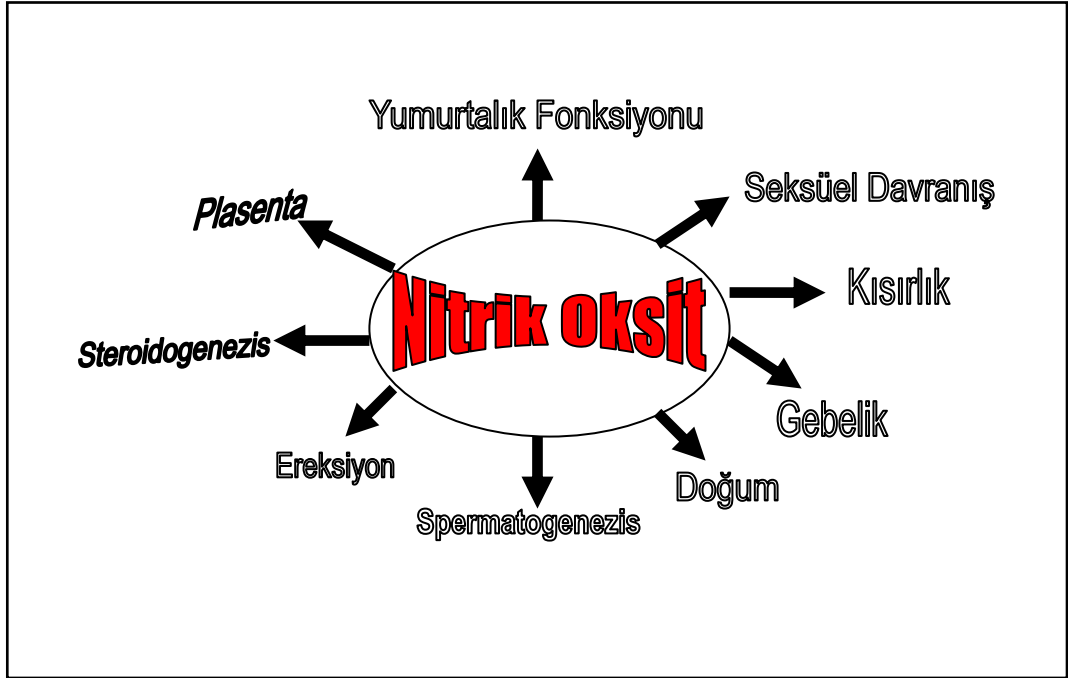
NO'nun memeli organizmasındaki bütün organ ve dokuları üzerinde, özellikle sinir sistemi ve öğrenme yeteneği (35), kalp damar sistemi (66), gastrointestinal sistem ve böbrek (40, 87), deri (125) ve üreme fonksiyonlarında (100) önemli biyolojik etkilere sahip olduğunu ortaya koyan bir çok çalışma yapılmıştır. Şekil 1.7'de bazı NO vericilerinin organizmadaki fonksiyonları gösterilmiştir.



Şekil 1.7 Nitrik Oksitin Salınımı ve Organizmadaki Görevleri (52).

### 1.3.5.1 Nitrik Oksitin Üreme ve Gebelik Üzerine Etkisi

Nitrik oksit organizmada fibroblast, epitel, düz kas, nöron, trombosit, hepatosit ve makrofaj gibi bir çok hücre tarafından üretilerek düz kas hücrelerinin tonusunu, apoptozisi, trombositlerin kümeleşmesi ve yapışmasını düzenler. Damar endotel hücrelerine nötrofil veya trombositlerin yapışmasını engelleyerek endotel hücre bariyerini ve fonksiyonunu korur. Nöronlar, kan damarları ve immün sistem hücreleri üreme organlarının önemli birer parçaları olduğu için nöronlar tarafından üretilen ve bir nörotransmitter gibi rol oynayan NO'nun üreme sistemin fizyolojisi ve biyolojisinin düzenlenmesinde önemli olduğu bildirilmiştir (100). Şekil 1.8'de NO'nun üreme üzerindeki fonksiyonları gösterilmiştir.



Şekil 1. 8 NO'nun Üreme Üzerindeki Fonksiyonları (100).



Foliküler gelişme ve ovulasyon sırasında östrojen hormonunun artışı ile doğru orantılı olarak ovaryum fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alan NO'nun sentezinin de arttığı kaydedilmiştir (100).

Ratlarda yapılan bir çalışmada NOS inhibitörlerinin periton içi verilmesi sonucu ovulasyonun inhibe edildiği gözlenmiş ve elde edilen bulgular sonucunda NO'nun ovaryum hücreleri ve damarlarında üretildiği ve ovulasyonu düzenlendiği ortaya konulmuştur (107).

Van Voorhis ve ark. (120)'nin yaptığı bir çalışmada, olgun rat ovaryumlarında iNOS ve eNOS bulunduğunu rapor etmişlerdir. eNOS'un ovaryumun kan damarlarında, iNOS'un birinci derecede granuloza hücrelerinde, ikinci derecede ovaryumun antral foliküllerinde bulunduğunu, gonadotropin ile ovaryumun uyarılması sonucu hem eNOS hem de iNOS'un aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir.

Uterus, menstürasyonda olduğu gibi gebelikte de önemli yapısal değişimlere uğrar. Çünkü NO düz kas hücrelerinin kasılmasını düzenler ve gebelikte uterusun kontraksiyonuna ve distensiyonuna neden olur (100).

Luo ve ark. (76), koyun fetuslarında gebeliğin 60, 90 ve 120. günlerinde NOS aktivitesini araştırdıkları bir çalışmada gebeliğin 60. gününde NOS aktivitesinde artış ( $p < 0,005$ ) saptadıklarını bildirmişlerdir.

Normal gebelikte, uterustaki kan akımı artar ve vasküler direnç azalır. Gebeliğin neden olduğu uterus vazodilatasyonunda NO'nun önemli rol oynadığına dair bilgiler giderek artmaktadır (75, 88).

Gebelikte endojen NO üretiminde bir artış olduğundan, çeşitli memeli türlerinde kan dolaşımındaki NO metabolitlerinin arttığı, araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (23, 27, 78).

Gebelikte NO'nun endojen metabolizmasının plazma ve idrardaki NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub> düzeylerini arttırdığı, kandaki bazal NO<sub>2</sub> düzeyinin NO<sub>3</sub> düzeyinden en az 100 kat daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeninin ise doğum periyodunda artan serbest oksijen radikalleri ve oksidatif stresin doğum sırasında değişik mekanizmalarla kontrol altına alınması olduğu kaydedilmiştir (27).

NOS enziminin insan miyometriyumunda, trofoblastlarda ve fetal membranlarda bulunduğu gösterilmiştir. NO sentezinin gebeliğin dönemlerine bağlı olarak değişiklik gösterdiği, gebelik esnasında uterusun kasılmadan sakin bir durumda kalması için NO sentezi arttırılırken, doğum başlarken uterus kontraksiyonunun gerçekleşebilmesi için sentezin azaltıldığı bildirilmiştir (27).

Sonuç olarak, gebelik vücudun birçok fonksiyonları için yüksek enerji gerektiren fizyolojik bir durumdur. Uterus kütlesi ve içeriğindeki artışa paralel olarak serbest radikal türlerinde de bir artış olur. Artan serbest radikaller LPO'nun bir belirteci olan MDA düzeyinde artışa neden olurken, antioksidan özelliğe sahip GSH düzeyinde bir azalmaya neden olur.

Gebelikte organizmada aşırı derecede üretilen serbest radikaller anne ve özellikle de yavruyu olumsuz yönde etkiler. Serbest radikallerin oluşumunu azaltmak ve zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için çeşitli antioksidan maddeler kullanılır. Gebelikte annenin artan metabolik fonksiyonlarından dolayı fazlaca ihtiyaç duyduğu ve antioksidan özelliğe sahip maddelerden bir tanesi de çinkodur. Çinko antioksidan özellik gösteren ve metabolizmada önemli görevleri bulunan yüzlerce enzimin aktivitesi için de gereklidir.

Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmada gebelik süresince ilave çinko verilmesinin antioksidan özellik gösteren GSH ve LPO ürünlerinden biri olan MDA düzeyleri ile kuzuların doğum ağırlıklarının nasıl etkileneceğini araştırmak amaçlandı.

Son yıllarda antioksidatif metabolizmalarla ilgili yapılan çalışmalarda dikkat çeken moleküllerden bir tanesi de nitrik oksittir. Organizmada çok farklı görevleri ve birkaç farklı formu bulunan bu molekülün dişi hayvanlarda üreme özellikleri ile gebelik dönemlerindeki etkileri konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Nitekim, NO'nun ovulasyon, implantasyon, gebelik, doğum sancıları ve doğum gibi üreme süreçlerinde önemli bir düzenleyici olduğu ve NO metabolitlerinin gebelikte arttığını belirten bildirimler mevcuttur. Bununla birlikte organizmadaki NO'nun metallothioneinlerde bulunan metal sülfidril kompleksine etki ederek çinko ve bakır gibi çift değerlikli metallerin serbest bırakılmasında rol oynadığı bilinmesine rağmen, çinkonun NO'ya herhangi bir etkisinin olup olmadığı henüz tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır.

Bu nedenle yapılan araştırmanın diğer bir amacı da, koyunlara gebelikte ilave olarak verilen çinkonun NO düzeyine herhangi bir etkisinin olup olmadığını ve gebelikte yöremiz koyunlarındaki NO düzeylerinin aylara göre nasıl değişim gösterdiğini araştırmaktır.

## 2 MATERYAL ve METOT

### 2.1 Materyal

Araştırma materyalini Kars'ın Arpaçay ilçesi civar köylerinden satın alınan ve Kıraç köyünde beslenen hayvanlar oluşturmuştur. Çalışmada canlı ağırlık ortalaması  $47,64 \pm 2,84$  kg, yaklaşık 3 yaşlı 25 adet koyun kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce koyunlara kulak numarası verilerek kayıt altına alındı. Çalışmada koyunların toplu bir şekilde östrüs göstermelerini sağlamak için vajinal süngerler kullanıldı. Bu amaçla koyunların vajinasına 40 mg florogeston asetat (FGA) içeren vajinal süngerler özel aparatlarla yerleştirildi. Süngerler 14. günde çıkartılarak her koyuna 400 IU gonadotropin (PMSG) kas içi enjekte edildi. Enjeksiyondan 24 saat sonra östrüs gösteren koyunları saptamak için arama koçu kondu. Östrüs gösteren 20 adet koyun deneme ve kontrol olmak üzere 10'arlı iki gruba ayrıldı.

Deneme grubundaki hayvanlara gebelik periyodu süresince (ortalama 150 gün) günlük 30 mg çinko (% 2,64'lük  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 'dan 5 ml/koyun/gün) oral yolla verildi. Kontrol grubundaki hayvanlar ise deneme süresince *ad libitum* olarak beslendi. Deneme ve kontrol grubundaki kuzuların doğum ağırlıkları tartılarak kayıt altına alındı.

#### 2.1.1 Kan Örneklerinin Toplanması ve İşlenmesi

Koyunlardan senkronizasyondan önce, tohumlandıktan otuz gün sonra ve ayda bir olmak üzere doğum yapıncaya kadar toplam altı kez kan numuneleri alındı. EDTA'lı tüplere alınan kan numunelerinden GSH tayini yapmak için bir miktarı ayrıldı. Geriye kalan numuneler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, plazmaları ayrıldı. Analizler yapılıncaya kadar plazmalar  $-50^{\circ}C$ 'de

saklandı. GSH Beutler (12), MDA Yoshioka ve ark. (134), NO düzeyleri ise Miranda ve ark. (83)'nin bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometrik olarak ölçüldü.

## **2.2 Metot**

### **2.2.1 Analizler için kullanılan cihazlar**

Mikroplak okuyucu (Molecular Devices)  
Spektrofotometre (UV-1201, Shimadzu)  
Santrifüj (Heraeus christ)  
Etüv (Nüve)  
Su banyosu (SB100, Nüve)  
Otomatik pipet (Eppendorf)  
Hassas terazi (Scaltec)  
Vorteks (Labinco)  
Derin dondurucu (So-low Environmental Equip.Co.)  
Distile su cihazı (Heidolpph, type-mono, Dest -3000)  
Manyetik karıştırıcı (Labinco-532)  
pH metre (Consort C 732)

### **2.2.2 Analizler için kullanılan kimyasal maddeler**

- 1- Metafosforik asit (Merck)
- 2- Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) (Merck)
- 3- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- 4- Sodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck)
- 5- 5,5'-(2-ditoyobis nitrobenzoik asit) (DTNB) (Sigma)
- 6- Sodyum sitrat (Merck)
- 7- Redükte glutatyon (GSH) (Merck)

- 8- Tiyobarbütirik asit (TBA) (Merck)
- 9- Triklor asetik asit (TCAA) (Merck)
- 10-Vanadyum (III) klorür ( $VCl_3$ ) (Merck)
- 11-N-(1-Naftil)etilendiamin dihidroklorür (NEDD) (Merck)
- 12-Sulfanilamid (SULF) (Lancaster)
- 13-Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- 14-Çinko sülfat ( $ZnSO_4$ ) (Merck)
- 15-1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) (Sigma)
- 16-n- Bütanol (Merck)
- 17-Hidroklorik asit (HCl) (Merck)

### 2.2.3 Tüm Kanda GSH Tayini

Tüm kandaki GSH analizi Beutler metoduna (12) göre yapıldı.

#### 2.2.3.1 Deneyin Prensibi

EDTA'lı kanın distile su ile hazırlanan hemolizatında, sülfidril (-SH) grupları taşımayan tüm proteinler çöktürücü çözeltiyle çöktürülür ve berrak sıvıda SH gruplarının DTNB (5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit ) ile oluşturduğu sarı renkli kompleks, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülür.

#### 2.2.3.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Çöktürücü Çözelti:** 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl alınarak, bir miktar distile suda çözüldü ve hacim 100 ml' ye tamamlandı.

**Fosfat Çözeltisi** (0,3 M  $Na_2HPO_4$ ): 53,4 g  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  distile suda çözülerek, hacim litreye tamamlandı.

**DTNB (Ellman's çözeltisi):** 40 mg DTNB alındı ve % 1' lik sodyum sitrat ile hacim 100 ml' ye tamamlandı.

**Sodyum Sitrat çözeltisi (%1):** 1g sodyum sitrat alınarak hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**Standart GSH Çözeltisi:** 20 mg GSH distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

### 2.2.3.3 Deneyin Yapılışı

Kör, standart ve test olarak işaretlenen tüplerden test tüpüne, EDTA'lı kandan 200 µl, standart tüpüne standart çözeltisinden 200 µl alındı. Üzerine 1,8 ml distile su (kanın hemoliz olması için) ve 3 ml çöktürücü çözelti eklendi. Kör olarak işaretlenen tüpe 800 µl distile su üzerine 1,2 ml çöktürücü çözelti pipetlendi. Tüpler karıştırıldı ve buzlu suda 5 dakika bekletilip, 3000 devirde 10' santrifüj edildi. Kör tüpü aynen alındı, standart ve test olarak işaretlenen yeni tüplere 2'şer ml süpernatant alındı. Bütün tüplere 8'er ml fosfat çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. 1 ml DTNB eklenerek 412 nm dalga boyunda köre karşı standart ve testin optik dansitesi okundu.

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
<b>EDTA'lı Kan</b>	-	-	200 µl
<b>Standart</b>		200 µl	-
<b>Distile Su</b>	2 ml	1,800 ml	1,800 ml
<b>Çöktürücü Çözelti</b>	3 ml	3 ml	3 ml
Buzlu suda 5 dakika bekletildi. Ardından 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve başka tüplere süpernatantdan 2 ml aktarıldı.			
<b>Fosfat Çözeltisi</b>	8 ml	8 ml	8 ml
Karıştırıldı			
<b>DTNB</b>	1 ml	1 ml	1 ml
412 nm'de tüplerin optik dansitleri köre karşı okundu.			

#### 2.2.3.4 Sonuçların Hesaplanması

Tüm kan GSH konsantrasyonu mg/dl olarak aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

GSH (mg/dl)= (Testin Optik Dansitesi / Standardın Optik Dansitesi) x Standardın konsantrasyonu (20 mg/dl).

#### 2.2.4 Plazmada MDA Tayini

Plazmada MDA analizi Yoshioka ve ark.'nın (134) bildirdiği yöntemle yapıldı.

##### 2.2.4.1 Deneyin Prensibi

Tiyobarbütirik asit (TBA) tepkimesinde lipit içerik, düşük pH ve TBA varlığında ısıtıldığında 535 nm'de minimum pik oluşturan stabil kırmızı-pembe renk meydana gelir. Kırmızı-pembe renk, MDA molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojenden dolayıdır. MDA'nın bir kısmı peroksidasyon sırasında, büyük çoğunluğu ortam asitleştirildikten sonra uygulanan ısıtma aşamasında LPO'nun yıkılması sonucu oluşur.

##### 2.2.4.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Triklorasetik asit (% 20):** 20 g triklorasetik asit (TCAA) distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Tiyobarbütirik asit (% 0,67):** 1,675 g tiyobarbütirik asit (TBA) distile suda çözüldü ve hacim 250 ml'ye tamamlandı.



**Standart Çözelti:** 0,494 ml 1,1,3,3-tetraetoksipropan (d: 0,92; % 97; MA: 220,3) 100 ml alkolde çözülerek, 20 mmol/L'lik stok standart çözelti hazırlandı. Bundan 0,1 ml alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve 20  $\mu$ mol/L'lik standart çözelti elde edildi. Bu çözelti ile 2,5-5-10  $\mu$ mol/L'lik dilüsyonlar hazırlanarak aşağıda açıklandığı şekilde çalışıldı. 535 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

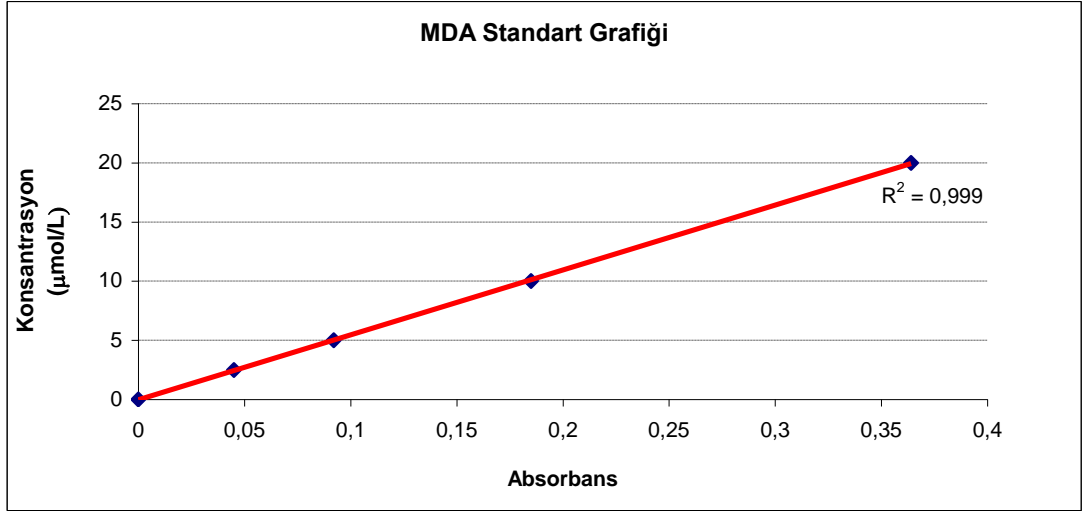
### 2.2.4.3 Deneyin Yapılışı

Test ve kör olarak işaretlenen cam deney tüpleri alındı ve test tüpüne 0.5 ml plazma pipetlendi. Kör tüpüne 3 ml ve test tüpüne 2,5 ml % 20'lik TCAA ilave edildi. Daha sonra her iki tüpe 1 ml TBA alındı ve tüpler 90°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi, soğutuldu ve üzerine 4 ml n-bütanol pipetlenerek 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra n-bütanol tabakası başka bir tüpe aktarılarak 535 nm'de köre karşı testin absorbansı spektrofotometrede okundu.

	<b>Kör</b>	<b>Test</b>
<b>Plazma</b>	-	500 $\mu$ l
<b>TCA</b>	3 ml	2.5 ml
<b>TBA</b>	1 ml	1 ml
90 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra tüpler su altında soğutuldu.		
<b>n-Bütanol</b>	4 ml	4 ml
3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.		
Oluşan tabaka ayrılarak 535 nm'de köre karşı optik dansiteler okundu.		

#### 2.2.4.4 Sonuçların Hesaplanması

Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden bakılarak bulundu.



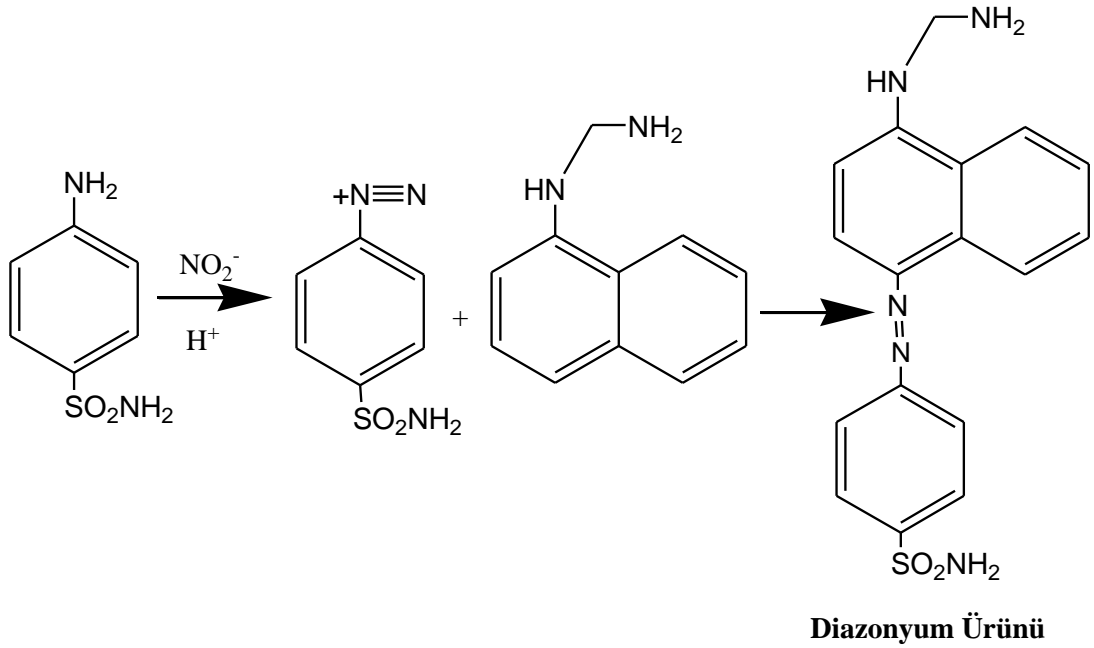
Grafik 2.1 MDA Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi

#### 2.2.5 Plazmada Nitrik Oksit Tayini

Nitrik oksit düzeyleri Miranda ve ark.'nın (83) bildirdikleri yöntemle tayin edildi.

##### 2.2.5.1 Deneyin Prensibi

Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite dönüştürülür. Nitrite sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur (Şekil 2.1). Oluşan bu renkli kompleks 540 nm' de ölçülür.



Şekil 2.1 Nitrit'ten Renkli Diazonyum Ürünün Oluşum Reaksiyonu (83).

### 2.2.5.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Çinko Sülfat (% 10):** 10 g çinko sülfat distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Sodyum Hidroksit (0,3 M):** 1,2 g sodyum hidroksit distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Vanadyum (III) Klorür (% 0,8):** 800 mg vanadyum (III) klorür 1 M HCl'de çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**1 M HCl:** 8,29 ml HCl (d: 1,19; %37; MA: 36,46) içinde bir miktar distile su bulunan bolonda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Sülfanilamid (% 2):** 2 g sülfanilamid % 5'lik HCl'de çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**NEDD (% 0,1):** 100 mg N-(1-Naftil)etilendiamine dihidroklorür distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Griess Ayıracı:** 50 ml % 0,1 NEDD ve 50 ml % 2 sülfanilamid eşit miktarda karıştırıldı.

**Stok Nitrit Çözeltisi (1 mM):** 6,9 mg  $\text{NaNO}_2$  distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Stok Nitrat Çözeltisi (1 mM):** 8,5 mg  $\text{NaNO}_3$  distile suda çözülerek hacim 100ml'ye tamamlandı.

**Çalışma Standartlarının Hazırlanması:** 1 mM'lık stok nitrit ve nitrat çözeltilerinden 200 – 100 – 50 – 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125  $\mu\text{M}$ 'lık çalışma standartları hazırlanarak nitrat ve nitrit analizlerindeki işlemler gerçekleştirildi. 540 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

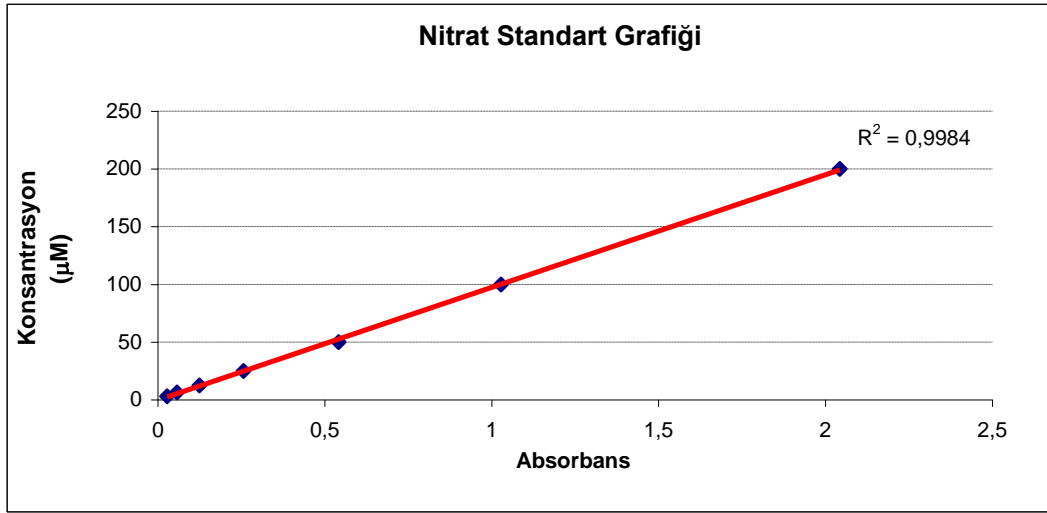
### 2.2.5.3 Numunelerin Deproteinize Edilmesi

400  $\mu\text{l}$  serumun üzerine 200  $\mu\text{l}$  0,3 M NaOH ilave edilerek vortekslendi ve 5 dakika beklendikten sonra 200  $\mu\text{l}$  % 10'luk  $\text{ZnSO}_4$  eklenerek tekrar vortekslendi. Numuneler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki berrak sıvı analiz için ayrıldı.

### 2.2.5.4 Nitrat Analizinin Yapılışı

Mikroplak kuyucuklarına 100  $\mu\text{l}$  numune pipetlendi. Tüm kuyucuklara 100  $\mu\text{l}$   $\text{VaCl}_3$  konuldu. Hemen arkasından da 100  $\mu\text{l}$  griess ayıracı pipetlendi. 30 dakika 37°C' de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanslar 540 nm dalga boyunda okundu.

	<b>Kör</b>	<b>Test</b>
<b>Distile Su</b>	100 µl	-
<b>Numune</b>	-	100 µl
<b>Vanadyum (III) Klorür</b>	100 µl	100 µl
<b>Griess Ayracı</b>	100 µl	100 µl

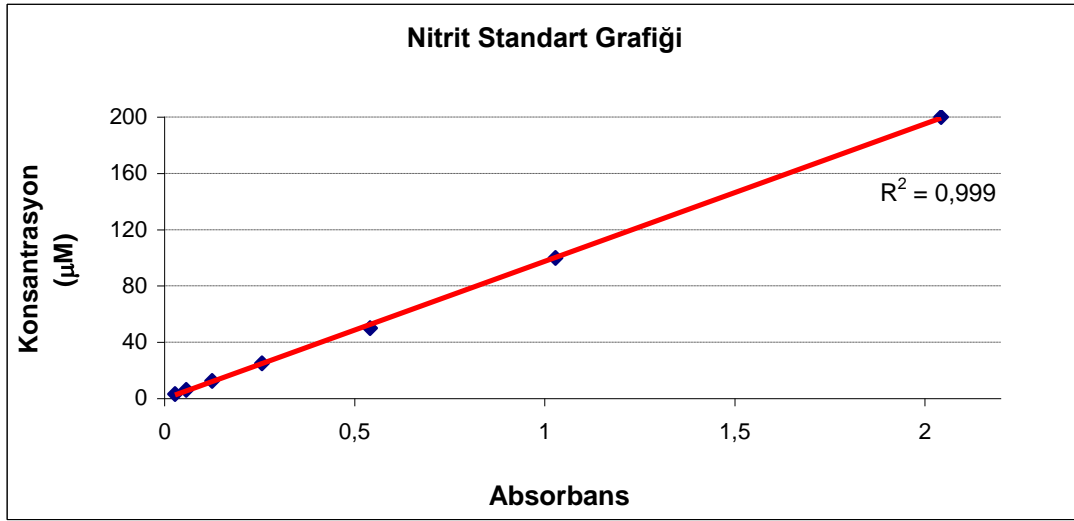


Grafik 2.2 Nitrat Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi

### 2.2.5.5 Nitrit Analizinin Yapılışı

Mikroplak kuyucuklarına 100 µl numune pipetlendi. Hemen arkasından da 100 µl griess ayracı pipetlendi. 30 dakika 37 °C'de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanslar 540 nm dalga boyunda okundu.

	Kör	Test
Distile Su	100 µl	-
Numune	-	100 µl
Griess Ayracı	100 µl	100 µl



Grafik 2.3 Nitrit Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi

### 2.2.5.6 Sonuçların Hesaplanması

Kalibrasyon eğrisine bakılarak bulunan nitrat ve nitrit konsantrasyonları toplandı ve nitrik oksit konsantrasyonu bulundu.

$$\text{Nitrik Oksit } (\mu\text{M}) = \text{Nitrat } (\mu\text{M}) + \text{Nitrit } (\mu\text{M})$$

### **2.3 İstatistiksel Analizler**

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizinde bilgisayar paket programından faydalanıldı. Gruplar arasındaki ortalama değerler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve gruplar arası farklılıklar duncan testi ile belirlendi. Sonuçlar; ortalama ( $\pm$ ) ve standart hata ( $x \pm Sx$ ) olarak verildi.

### 3 BULGULAR

Çalışmada kullanılan koyunlardan gebe kalmadan önce ve gebe kaldıktan sonra ayda bir olmak üzere doğum yapıncaya kadar kan numuneleri alındı. Her bir parametre için istatistiksel analizler hem gruplar arası hem de grup içi aylara ve gebelik öncesine göre yapıldı.

Çalışmadan elde edilen plazma MDA tam kan GSH, ve NO düzeylerine ait bulgular ve istatistiksel önemi sırası ile Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3' de, bulguların grafiksel değerlendirilmesi ise sırası ile Grafik 3.1, 3.2 ve 3.3' de gösterildi.

Deneme ve kontrol grubuna ait kuzuların doğum ağırlıkları ile MDA/GSH oranları sırasıyla, Tablo 3.4 ve 3.5'de verildi. Elde edilen bu bulguların grafiksel olarak değerlendirilmesi Grafik 3.4 ve 3.5'de, GSH ile MDA arasındaki regresyon ise Grafik 3.6'da gösterildi.

Kontrol grubu plazma MDA düzeyleri gebelik öncesi, gebeliğin 1, 2, 3, 4 ve 5. aylarında sırasıyla  $7.07 \pm 0.30$ ,  $11.55 \pm 0.25$ ,  $12.66 \pm 0.39$ ,  $11.67 \pm 0.29$ ,  $8.84 \pm 0.18$ ,  $12.0 \pm 0.41$ , deneme grubunda ise sırasıyla  $6.93 \pm 0.31$ ,  $10.44 \pm 0.46$ ,  $10.25 \pm 0.34$ ,  $9.53 \pm 0.24$ ,  $7.63 \pm 0.30$ ,  $9.39 \pm 0.61$   $\mu\text{mol/L}$  olarak belirlendi.

Kontrol grubu MDA düzeyi gebelik öncesi döneme göre gebelik periyodu boyunca önemli derecede artış ( $p < 0,001$ ) gösterdi. Kontrol grubunda gebeliğin 1, 2, 3, 4 ve 5. aylarında elde edilen MDA düzeyleri gebelik öncesine göre yüksek ( $p < 0,001$ ) bulundu. Deneme grubundaki MDA düzeyleri ise 1, 2, 3 ve 5. aylarında gebelik öncesi döneme ve gebeliğin 4. ayına göre yüksek ( $p < 0,001$ ) saptandı.



Kontrol ve deneme gruplarından elde edilen MDA düzeyleri gebelik periyodu boyunca her iki grup aylara göre karşılaştırıldığında gebeliğin 2. ayından itibaren deneme grubunda istatistiksel olarak azalma ( $p < 0,01$ ) tespit edildi.

Kontrol grubunda tam kan GSH düzeyleri gebelik öncesi, gebeliğin 1, 2, 3, 4 ve 5. ayında sırasıyla  $18.14 \pm 0.92$ ,  $8.84 \pm 0.34$ ,  $7.17 \pm 0.45$ ,  $8.25 \pm 0.42$ ,  $10.70 \pm 0.38$ ,  $10.02 \pm 0.66$ , deneme grubunda ise sırasıyla  $18.08 \pm 0.89$ ,  $10.21 \pm 0.40$ ,  $9.35 \pm 0.43$ ,  $10.06 \pm 0.38$ ,  $13.26 \pm 0.57$ ,  $12.76 \pm 0.52$  mg/dl olarak tespit edildi.

Kontrol grubundaki GSH düzeylerinde gebelik periyodu boyunca gebelik öncesi döneme göre azalma ( $p < 0,001$ ) gözlemlendi. Kontrol grubunda gebeliğin 1, 2, 3, 4 ve 5. aylarında elde edilen GSH düzeylerinin gebelik öncesi döneme göre azaldığı ( $p < 0,001$ ) tespit edildi. Deneme grubundaki GSH düzeyleri gebeliğin ilk üç ayında hem gebelik öncesi döneme göre hem de diğer aylara göre  $p < 0,001$  düzeyinde bir azalma gösterdi.

Kontrol ve deneme gruplarından elde edilen GSH düzeyleri gebelik periyodu boyunca her iki grup aylara göre karşılaştırıldığında gebeliğin 2. ayından itibaren deneme grubunda istatistiksel olarak artış ( $p < 0,01$ ) tespit edildi.

Kontrol grubunda plazma NO düzeyleri gebelik öncesi, gebeliğin 1, 2, 3, 4 ve 5. ayında sırasıyla  $12.33 \pm 0.52$ ,  $16.72 \pm 1.05$ ,  $25.08 \pm 1.4$ ,  $44.75 \pm 4.27$ ,  $18.56 \pm 1.35$ ,  $25.39 \pm 1.70$ , deneme grubunda ise sırasıyla  $12.12 \pm 0.64$ ,  $16.84 \pm 0.88$ ,  $22.50 \pm 0.98$ ,  $38.13 \pm 2.94$ ,  $16.28 \pm 0.99$ ,  $20.44 \pm 1.20$   $\mu\text{M}$  olarak tespit edildi.

Kontrol grubundaki NO düzeyleri gebeliğin 2, 3 ve 5. ayında, gebelik öncesi döneme ve gebeliğin diğer aylarına göre artış ( $p < 0,001$ ) gösterdi. Deneme grubunda ise gebeliğin 1, 2, 3 ve 5. ayında elde edilen NO düzeylerinde gebelik öncesine göre artış ( $p < 0,001$ ) tespit edildi.

Deneme ve kontrol grubundan elde edilen NO düzeyleri karşılaştırıldığında sadece gebeliğin 5. ayında deneme grubunda  $p<0,05$  düzeyinde bir azalma saptanırken, diğer aylarda istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamadı.

Deneme ve kontrol grubundaki kuzuların doğum ağırlıkları sırasıyla  $4,32 \pm 0,19$ ;  $3,34 \pm 0,29$  kg saptandı. Deneme grubundaki kuzuların doğum ağırlıklarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi ( $p<0,05$ ).

Deneme ve kontrol grubu gebelik öncesi dönemin MDA/GSH oranlarının gebelik dönemine göre düşük olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ). Gebelik dönemi MDA/GSH oranları karşılaştırıldığında ise deneme grubundaki değerlerin kontrole göre düşük olduğu saptandı ( $p<0,001$ ). Ayrıca gebelik dönemi ortalama GSH ve MDA düzeyleri arasında linear negatif bir ilişki olduğu gözlemlendi ( $R^2 = 0,4062$ ,  $p<0,001$ ).

Tablo 3.1 MDA Düzeyleri (µmol/L)

	<b>Gebelik öncesi</b> (x ± Sx)	<b>1. Ay</b> (x ± Sx)	<b>2. Ay</b> (x ± Sx)	<b>3. Ay</b> (x ± Sx)	<b>4. Ay</b> (x ± Sx)	<b>5. Ay</b> (x ± Sx)
<b>Kontrol</b> (n = 10)	7.07 ± 0.30 <sup>d</sup>	11.55 ± 0.25 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 12.66 ± 0.39 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 11.67 ± 0.29 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 8.84 ± 0.18 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 12.0 ± 0.41 <sup>ab</sup>
<b>Deneme</b> (n = 10)	6.93 ± 0.31 <sup>b</sup>	10.44 ± 0.46 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 10.25 ± 0.34 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 9.53 ± 0.24 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 7.63 ± 0.30 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 9.39 ± 0.61 <sup>a</sup>

Tablo 3.2 GSH Düzeyleri (mg/dl)

	<b>Gebelik öncesi</b> (x ± Sx)	<b>1. Ay</b> (x ± Sx)	<b>2. Ay</b> (x ± Sx)	<b>3. Ay</b> (x ± Sx)	<b>4. Ay</b> (x ± Sx)	<b>5. Ay</b> (x ± Sx)
<b>Kontrol</b> (n = 10)	18.14 ± 0.92 <sup>a</sup>	8.84 ± 0.34 <sup>dc</sup>	<sup>B</sup> 7.17 ± 0.45 <sup>d</sup>	<sup>B</sup> 8.25 ± 0.42 <sup>d</sup>	<sup>B</sup> 10.70 ± 0.38 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 10.02 ± 0.66 <sup>bc</sup>
<b>Deneme</b> (n = 10)	18.08 ± 0.89 <sup>a</sup>	10.21 ± 0.40 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 9.35 ± 0.43 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 10.06 ± 0.38 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 13.26 ± 0.57 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 12.76 ± 0.52 <sup>b</sup>

Tablo 3.3 NO Düzeyleri (µM)

	<b>Gebelik öncesi</b> (x ± Sx)	<b>1. Ay</b> (x ± Sx)	<b>2. Ay</b> (x ± Sx)	<b>3. Ay</b> (x ± Sx)	<b>4. Ay</b> (x ± Sx)	<b>5. Ay</b> (x ± Sx)
<b>Kontrol</b> (n = 10)	12.33 ± 0.52 <sup>c</sup>	16.72 ± 1.05 <sup>c</sup>	25.08 ± 1.4 <sup>b</sup>	44.75 ± 4.27 <sup>a</sup>	18.56 ± 1.35 <sup>c</sup>	<sup>X</sup> 25.39 ± 1.70 <sup>b</sup>
<b>Deneme</b> (n = 10)	12.12 ± 0.64 <sup>d</sup>	16.84 ± 0.88 <sup>c</sup>	22.50 ± 0.98 <sup>b</sup>	38.13 ± 2.94 <sup>a</sup>	16.28 ± 0.99 <sup>cd</sup>	<sup>Y</sup> 20.44 ± 1.20 <sup>bc</sup>

a,b,c,d : Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir (p<0,001)

A, B : Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir (p<0,01)

X, Y : Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir (p<0,05)

Tablo 3.4 Kuzuların Doğum Ağırlıkları (kg)

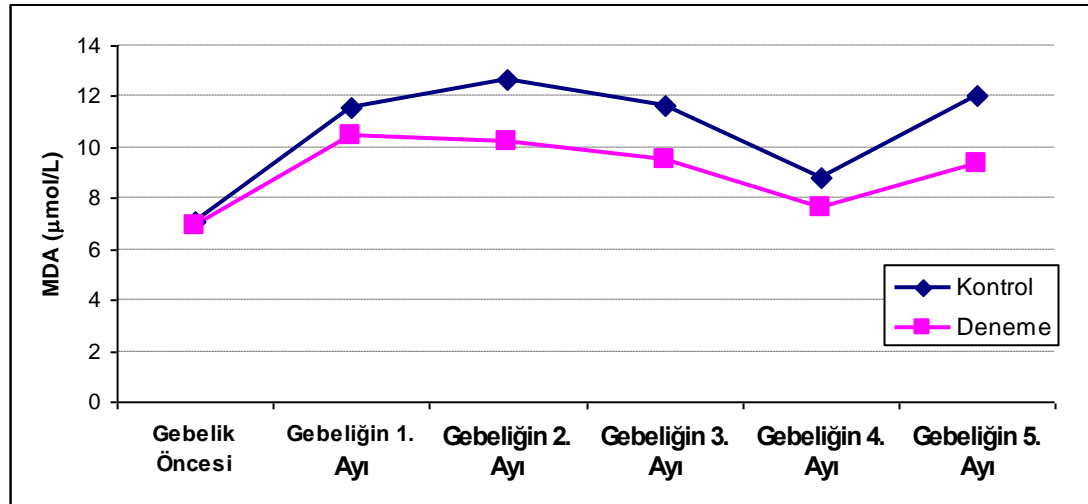
Gruplar	Ağırlık (kg) ( $\bar{x} \pm Sx$ )
Kontrol (n=10)	$3.34 \pm 0.29^b$
Deneme (n=9)	$4.32 \pm 0.19^a$

a,b: P <0,05

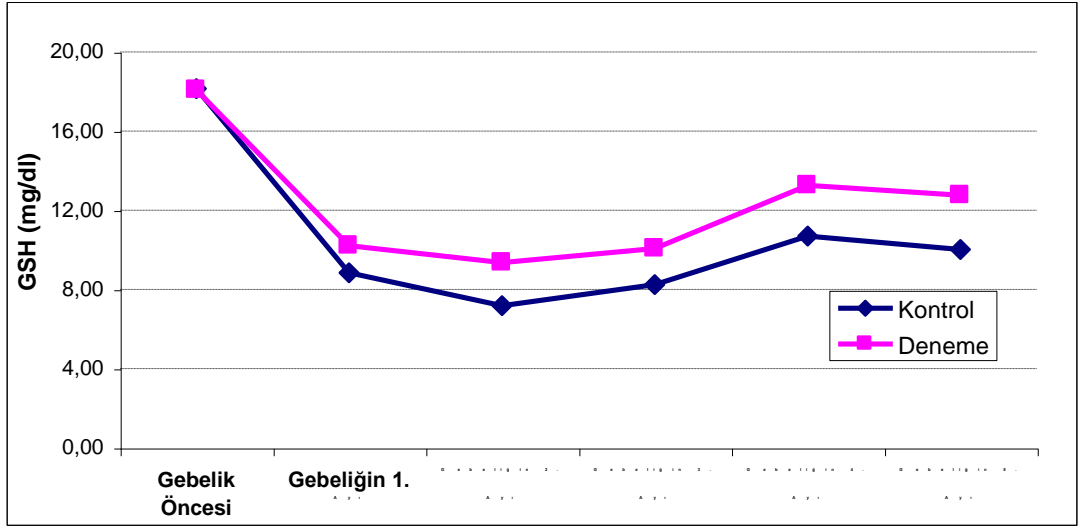
Tablo 3.5 Gruplarda Saptanan MDA/GSH Oranları

Gruplar	Dönemler	MDA/GSH Oranı ( $\bar{x} \pm Sx$ )
Kontrol	Gebelik Öncesi (n=10)	$0.40 \pm 0.085^a$
	Gebelik (n= 10)	$1.27 \pm 0.045^c$
Deneme	Gebelik Öncesi (n= 10)	$0.40 \pm 0.085^a$
	Gebelik (n= 10)	$0.86 \pm 0.06^b$

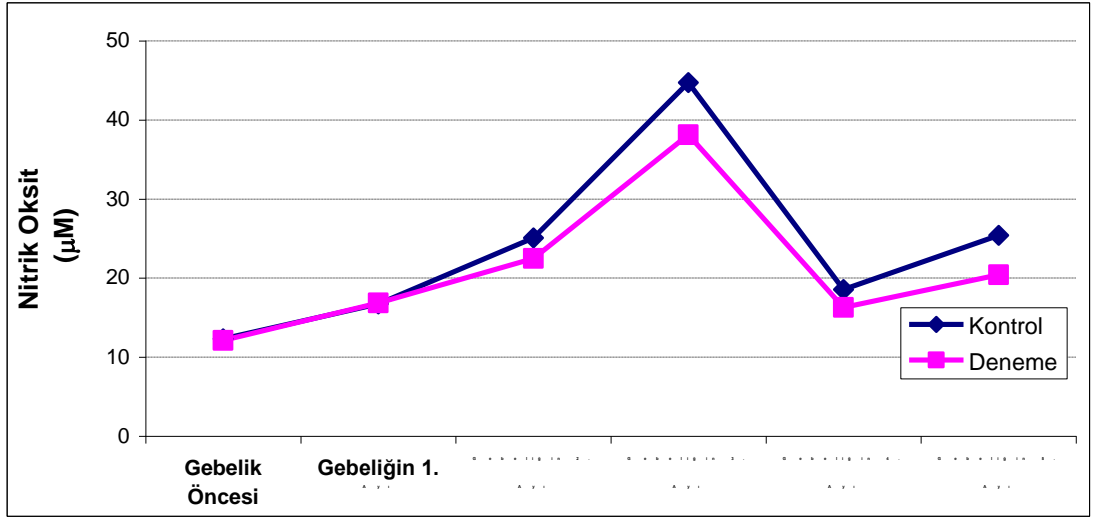
a,b,c: P<0,001



Grafik 3.1 Gebelik Boyunca MDA Düzeyinin Değişimi

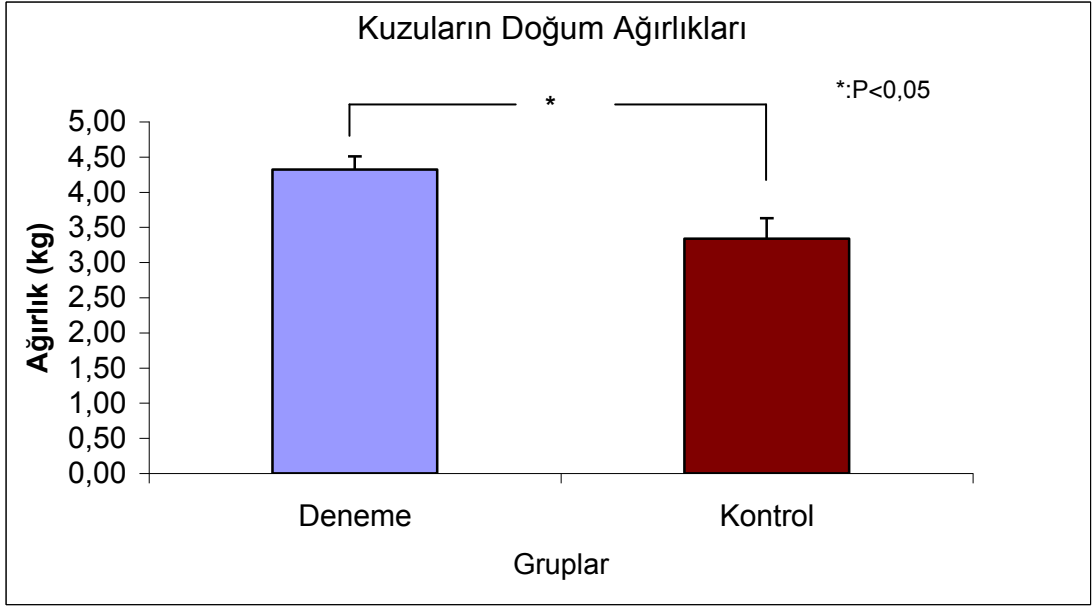


Grafik 3.2 Gebelik Boyunca GSH Düzeyinin Değişimi

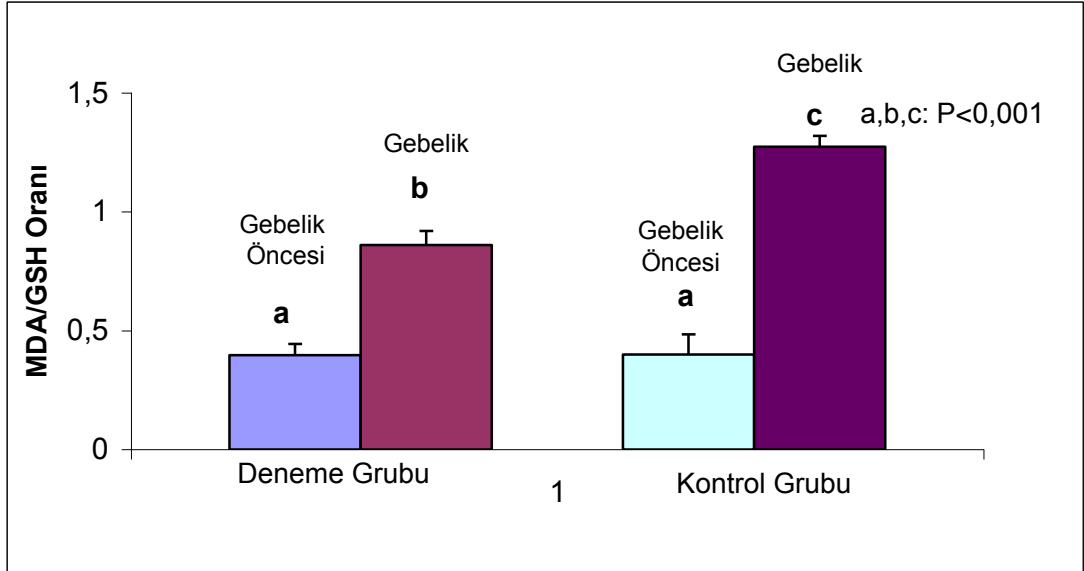


Grafik 3.3 Gebelik Boyunca NO Düzeyinin Değişimi

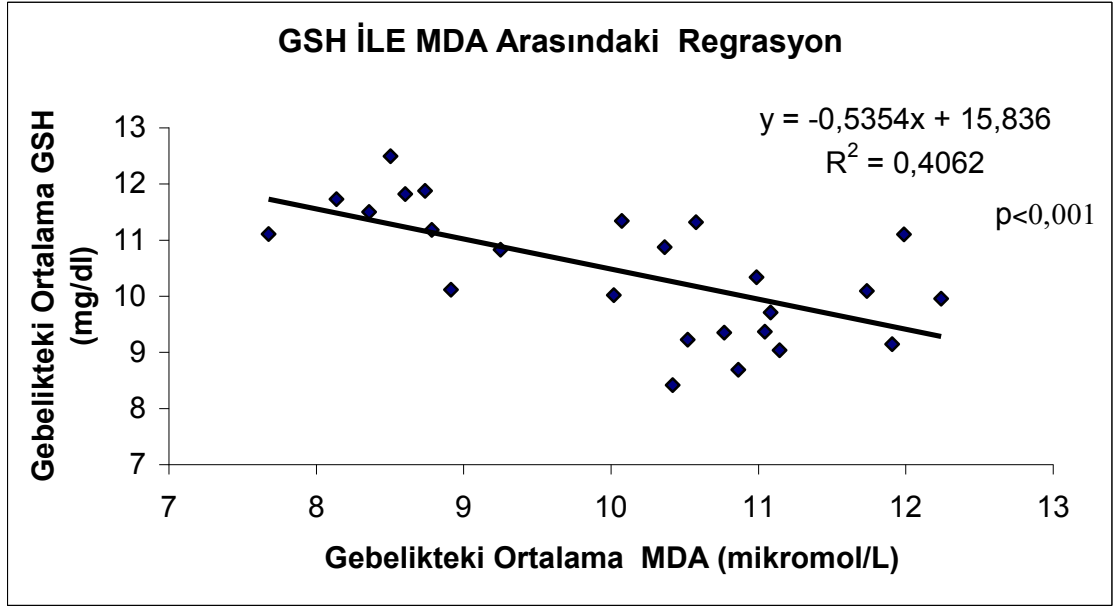
Grafik 3.4 Kuzuların Doğum Ağırlıkları (kg)



Grafik 3.5 Graplarda Saptanan MDA/GSH Oranları



Grafik 3.6 Gebelikteki Ortalama GSH ile MDA Arasındaki Regrasyon



#### 4 TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada gebelik periyodu boyunca ağız yoluyla verilen çinkonun antioksidan sistemi güçlendirerek LPO ürünlerini ve NO düzeyini azalttığı gözlemlendi. Çalışmada gebelik periyodu boyunca LPO ürünlerinden biri olan MDA düzeyinde istatistiksel olarak önemli artışların olduğu görüldü. Gebelik boyunca LPO'nun artış nedeninin tam olarak bilinmemesine rağmen (86), olası nedenler aşağıda açıklanmıştır.

Gebelik vücudun birçok fonksiyonları için yüksek enerji gerektiren fizyolojik bir durum olduğundan (68), uterus kütlesi ve içeriğindeki belirgin artışa paralel olarak oksijen ihtiyacında da bir artış meydana gelmektedir. Fazla tüketilen oksijen de ROT'un artışına neden olmaktadır (20, 84). Bu şekilde meydana gelen aşırı ROT da hücre zarındaki lipitlerle reaksiyona girerek LPO ürünlerini oluşturmaktadır (102).

Gebelikte yüksek saptanan MDA düzeyinin başka bir sebebinin de perokside olmuş lipitlerin çoğunlukla plasentada üretildiğinden dolayı kaynaklanabileceği bildirilmektedir (85, 97, 102). Spontan olarak otoprookside olabilen serum trigliseritlerin gebelik periyodu boyunca artmasının LPO ürünlerinden olan MDA düzeyini artırabileceği bildirilmektedir (53, 56,86).

Loverro ve ark. (73), insanlarda gebeliğin üçüncü döneminde ilk iki dönemine göre LPO düzeyinde önemli bir artış tespit etmişlerdir ve bu artışa gebelikteki koruyucu mekanizmaların yetersiz kalmasının neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bununla beraber başka bir çalışmada ise serbest radikal hasarına karşı plasentada Mn-Cu/ZnSOD, CAT, GSH, GSH-Px gibi enzimler ile C ve E vitaminleri gibi koruyucu mekanizmaların olduğu bildirilmiştir (85).



Sugino ve ark. (112) ratlarda yaptığı bir araştırmada LPO ürünlerinden olan MDA düzeyinin gebeliğin ortalarına kadar değişmediğini ve gebeliğin 15. gününden itibaren bir artış gösterdiğini ve bu artışın gebeliğin sonlarına kadar devam ettiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise Sugino ve ark. (112), ve Loverro ve ark. (73),'nın bildirdiklerinden farklı olarak MDA düzeyinin gebeliğin başlangıcından itibaren artış göstermeye başladığı ve bu artışın doğuma kadar devam ettiği gözlenmiştir. Bu durumun türlerin farklı olmasından dolayı kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada kontrol ve deneme gruplarında LPO'nun bir belirteci olan MDA düzeyinde gebelik süresince gebelik öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edildi. Bu sonuçlar özellikle gebelik periyodu boyunca LPO ürünlerinin arttığını ortaya koyan çalışma bulguları ile uygunluk göstermektedir (73, 112).

Deneme grubu MDA düzeyi gebeliğin 4. ayında azalma gösterirken 5. ayında tekrar artış gösterdi. Gebeliğin 4. ayındaki bu azalma hayvanın fizyolojik durumu ile ilgili olabileceği, gebeliğin 5. ayındaki artışın doğum stresinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Gebelik boyunca kontrol grubunda yüksek saptanan MDA düzeylerinin çinko ilavesi ile düşürülebileceği bu çalışmada açıkça görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar çinkonun LPO'nu azalttığı yönündeki bilgiler ile uyum göstermektedir (71, 124).

Canlılar için esansiyel bir element olan çinkonun organizmadaki en önemli fonksiyonu hücre membranlarının stabilizasyonunu sağlamasıdır (57, 67). Yapılan çalışmalarında çinko eksikliğinin hücre bileşenlerinde oksidatif hasara neden olduğu kaydedilmiştir (137). Süperoksit anyonunun katalizlemesini sağlayarak hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasına katkıda bulunan SOD'un yapısında da çinko bulunmaktadır (55).

Yapılan bir araştırmada gebeliğin yaklaşık altıncı haftasından itibaren plazma çinko konsantrasyonunun azalmaya başladığı ve doğuma kadar devam ettiği ifade edilmiştir (113). Çinko ile aktive olan MT'lerin serbest radikal temizleyici olarak etki gösterdiği, sadece ağır metalleri detoksifiye etmediği aynı zamanda hücre ve organları da oksidatif hasara karşı koruduğu bir çok araştırıcı tarafından bildirilmektedir (15, 59, 103, 124).

Yapılan çalışmada gebelik süresince MDA düzeyi artarken tam kan GSH düzeylerinin gebelik süresince istatistiksel olarak önemli olan azalma gösterdiği tespit edildi. Gebelikte ROT'un artışına paralel olarak (20, 84) artan serbest radikaller GSH tarafından etkisiz hale getirildiğinden dolayı GSH düzeyinde azalma meydana gelmektedir (122).

GSH memelilerde hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan en önemli sülfidril bileşiğidir (26, 108). Rat, hamster, domuz ve sığır ovaryumlarındaki oositin gelişmesi ve olgunlaşması sırasında GSH sentezinin ovulasyona kadar arttığı, bunun da fertilizasyonun son evrelerinde oositin korunması nedeniyle olduğu ileri sürülmüştür (26).

Al-Gubory ve ark. (5), gebeliğin 15, 40, 60, 80 ve 120. günlerinde koyunlardan toplanan korpus luteumlarda 15. gününde elde edilen GST aktivitesinin 40 ve 80. günlerine göre istatistiksel olarak çok önemli, 80 ve 128. günlerinde ise önemli derecede yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca gebeliğin 15. gününde elde edilen CuZnSOD aktivitesinin diğer günlere göre oldukça önemli, GSH-Px aktivitesinin ise önemli derecede yüksek olduğunu, GSH-R ve MnSOD aktivitesinin ise değişmediğini kaydetmişlerdir.

Aynı araştırmacılar ve elde ettikleri bulgular doğrultusunda ROT ve oksidatif strese karşı GSH'ya bağlı antioksidan enzimlerin gebeliğin erken döneminde önemli bir rol oynadığını ve gebelik süresince korpus luteumda saptadıkları

yüksek antioksidan enzim düzeylerinin sağlıklı ve aktif luteal hücrelerde sürekli üretilen ROT ile bağlantılı olabileceğini bildirmişlerdir.

Kontrol ve deneme grubundaki tüm hayvanların doğum öncesi tam kan GSH düzeyleri gebelik periyoduna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu. Çalışmadan elde edilen sonuçlar gebeliğin antioksidan konsantrasyonlarını değiştirdiğini bildirilen çalışma sonuçları ile uyum içerisindedir (5, 37, 104).

Ratlarda düşük protein içeren diyetle beslemenin antioksidan sisteme etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, düşük protein içeren diyetin yanında ilave çinko verilen grupta GSH düzeyinin kontrol grubuyla benzerlik gösterdiğini saptamışlardır (108).

Farinati ve ark. (33)'nin yaptığı çalışmada çinkonun LPO'nu inhibe ettiğini ve GSH'in kullanılabilirliğini arttırdığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada çinko verilen deneme grubunda saptanan yüksek GSH düzeyi, çinkonun GSH düzeyini arttırmasından kaynaklanabilir.

Gebelik süresince kontrol ve deneme grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında gebeliğin ikinci ayından itibaren deneme grubundan elde edilen değerlerin kontrole göre yüksek olduğu gözlemlendi. Çalışma bulgularına göre çinko ilavesinin antioksidan sistemi güçlendirdiği açıkça görülmektedir. Elde edilen bu bulgular çinkonun GSH düzeyini arttırdığını bildiren araştırma sonuçları ile uyum göstermektedir (33, 108).

Çalışmada gebelikte NO konsantrasyonunda istatistiksel olarak önemli olan artışlar saptandı. Bu artışın nedeni olarak ise gebelikte NO üretiminin artmasıyla uterusun hareketsizliğinin sağlanarak gebeliğin devamının sorunsuz şekilde sağlanması (79) olduğu ifade edilmektedir.

Gebelik plazma hacminin artması, kardiyak indeks ve uterus kan akışıyla ilişkili olan hiperdinamik durum olarak karakterize edilir. NO, vasküler

endotelde sentez edilen, gebelik boyunca vasküler basıncın düzenlenmesini ve kontrolünü sağlayan önemli bir aracı (95) olduğundan dolayı gebelik süresince NO düzeyinde değişimler meydana gelir.

Gebelikte endojen NO üretiminde bir artış olduğundan kan dolaşımındaki NO metabolitlerinin rat (23), koyun (78), domuz ve insanlarda arttığı (27) çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir.

Plasenta tarafından lokal olarak üretilen NO ve diğer RNT'nin geçiş metallere varlığında oksidatif strese neden olduğu bildirilmektedir (20). NO, genel olarak MT'lerde bulunan metal sülfidril kompleksini etkileyerek çinko gibi metallerin serbest bırakılmasına neden olduğu ve bu şekilde membranlardaki sülfidril gruplarının fonksiyon göremez hale geldiği bildirilmektedir (59).

Yang ve ark. (129) yaptıkları bir çalışmada gebeliğin son dönemlerindeki koyunlarda NO'nin bir metaboliti olan nitrat düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır.

Zhang ve ark. (138)'nin gebeliğin 30. günündeki koyunlardan elde ettiği nitrat düzeylerini  $17,4 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$  ve gebe olmayan koyunlarda ise  $6,8 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$  olarak tespit etmişlerdir. Yapılan araştırmada gebeliğin 30. gününde NO düzeyleri sırasıyla kontrol ve deneme gruplarında  $16,72 \pm 1,05 \mu\text{mol/L}$  ile  $16,84 \pm 0,88 \mu\text{mol/L}$  olarak saptandı. Çalışma bulguları Zhang ve ark (138)'nin gebe koyunlardaki NO düzeyleri ile uygunluk göstermektedir.

Gebeliğin sonunda sancı için gerekli olan kontraksiyonları sağlamak için NO üretiminin azaltılmasının gerekli olduğu bildirilmektedir (79). Kontrol ve deneme grupları gebelik süresince kendi aralarında aylara göre karşılaştırıldığında sadece gebeliğin 5. ayında deneme grubundan elde edilen NO düzeylerinin kontrole göre düşük olduğu gözlemlendi. Çalışmada elde edilen NO bulguları genel olarak ele alınıp değerlendirildiğinde NO

düzeylelerinin gebelik süresince değışiklik gösterdiği bunun yanında çinko verilen grupta ise gebeliğin sonlarına doğru düştüğü görüldü. Elde edilen bu sonuç çinkonun kontraksiyonları sağlamak için NO üretiminin azaltılmasına yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Mineral maddelerin yavru da canlı ağırlık artışı, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, verim özelliklerinin artması ve üreme fonksiyonlarının gelişmesi gibi birçok metabolik fonksiyonda önemli görevlere sahip olduğu bilinmektedir (4, 9, 68). Esansiyel bir element olan çinkonun gebelik periyodunda fötusun normal büyümesi ve gelişmesi için gerekli olduğu ve çinko eksikliğinde hayvanlarda gebelik süresinde uzama, güç doğum, zayıf bir immunité, yetersiz epitelizasyon, merkezi sinir sistemi bozuklukları ve buna bağılı olarak anomalilerin meydana geldiği kaydedilmiştir (1, 89). Çalışmada ilave çinko verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek tespit edilen yavruların canlı ağırlık bulguları, daha önce yapılan ve mineral maddelerin yavru da canlı ağırlık artışına neden olduğunu bildiren verilerle benzerlik göstermektedir (4, 25).

Gebelikte kontrol ve deneme gruplarında anneye ait antioksidan sistemde belirgin değışikler olduğu, çinko verilen deneme grubunda bu değışimlerin daha az olduğu ve çinkonun NO düzeyini özellikle gebeliğin son ayında önemli derecede düşürdüğü gözlemlendi.

Sonuç olarak gebelik süresince koyunlara oral olarak verilen çinkonun;

- Gebelik periyodu boyunca strese bağılı olarak artış gösteren MDA seviyelerini önemli derecede düşürdüğü, buna paralel olarak azalan GSH miktarını arttırarak antioksidan sistemi güçlendirebileceği,
- Gebelik süresince ve özellikle de son döneminde NO düzeylerinin aşırı artışını engelleyerek serbest radikal oluşumu azaltabileceği, bunun yanında uterus kasılmaları üzerine olan etkilerini daha düzenli hale

getirerek doğum anında oluşabilecek patolojik durumların ortadan kaldırılmasına yardımcı olabileceği,

- Yavruların doğum ağırlıklarında anlamlı artışlar sağlayarak özellikle Kars gibi soğuk iklim şartları ve yetersiz beslenme şartlarının hakim olduğu bōlgelerde yeni doğan yavruların hayatta kalma yeteneklerini arttırarak verim ōzellikleri ōzerine olumlu katkılar sağlayabileceği dōřunōlmektedir.

## 5 ÖZET

Gebelik Periyodu Boyunca Çinko Verilen Koyunlarda Redükte Glutatyon (GSH), Malondialdehit (MDA) ve Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Araştırılması

Çalışmada gebelik periyodu boyunca koyunlara çinko verilmesinin antioksidan özellik gösteren redükte glutatyon (GSH), lipid peroksidasyon ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) ve üreme fonksiyonlarının kontrolünde önemli bir rolünün olduğu belirtilen nitrik oksit (NO) düzeyleri ile kuzuların doğum ağırlıklarının nasıl etkileneceğini araştırmak amaçlandı.

Çalışmada materyal olarak canlı ağırlık ortalaması  $47,64 \pm 2,84$  kg, 3 yaşında 20 adet koyun kullanıldı. Koyunlar deneme ve kontrol olmak üzere 10'arlı iki gruba ayrıldı. Deneme grubundaki koyunlara gebelik periyodu süresince (ortalama 150 gün) her gün 30 mg çinko oral yolla verildi. Gebe kalmadan önce bir kez ve gebelik süresince her ay kan numuneleri alındı. Numunelerde tam kan GSH düzeyleri ile plazma MDA ve NO konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Gebelik süresince MDA düzeyleri artarken, GSH düzeyleri azaldı ( $p < 0,001$ ). Gebeliğin ikinci ayından itibaren çinko verilen grupta MDA düzeyleri azalırken, GSH düzeyleri artış gösterdi ( $p < 0,01$ ).

Gebelikle birlikte artmaya başlayan NO değerinin gebeliğin 3. ayında en yüksek düzeyde olduğu saptandı. Çinko verilen grupta ise NO düzeylerinin gebeliğin 5. ayında kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edildi ( $p < 0,05$ ).

Deneme ve kontrol grubu gebelik öncesi dönemin MDA/GSH oranlarının gebelik dönemine göre düşük olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ). Gebelik dönemi MDA/GSH oranları karşılaştırıldığında ise deneme grubundaki değerlerin

kontrole göre düşük olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ). Ayrıca gebelik dönemi ortalama GSH ve MDA düzeyleri arasında negatif linear bir ilişki olduğu gözlemlendi ( $R^2 = 0,4062$ ,  $p < 0,001$ ).

Deneme ve kontrol grubundaki kuzuların doğum ağırlıkları sırasıyla  $4,32 \pm 0,19$ ;  $3,34 \pm 0,29$  kg olarak saptandı. Deneme grubundaki kuzu doğum ağırlıklarının daha yüksek olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ).

Sonuç olarak; ağız yoluyla verilen çinkonun gebelik döneminde değışen antioksidan sisteminin güçlenmesine yardımcı olabileceği ve yavruların doğum ağırlıklarında anlamlı artışlar sağlayarak verim özelliklerini attırabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar Sözcükler:** Gebelik, Çinko, Redükte Glutatyon, Malondialdehit, Nitrik Oksit, Doğum Ağırlığı.



## 6 SUMMARY

### Investigation of Reduced Glutathione (GSH), Malondialdehyde (MDA) and Nitric Oxide (NO) Levels in Ewes Received Zinc During Pregnancy

This study was aimed to investigate the effect of zinc given to ewes during pregnancy on reduced glutathione (GSH) a part of antioxidant system, malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) known to have an important role in reproduction and birth weight of lambs.

The study involved 20 ewes aged up to 3 years and of  $47.64 \pm 2.84$  kg body weight on average. Animals were divided into 2 equal groups of control (n = 10) and experiment (n =10). Ewes in treatment group received zinc orally at dose rate of 30 mg/day during pregnancy (150 days). Animals in two groups were blood sampled before pregnancy and monthly after pregnancy until lambing. Whole blood GSH, plasma MDA, and NO were spectrophotometrically determined.

While MDA levels during pregnancy significantly increased, GSH levels decreased ( $p < 0.001$ ). Apart from the first month of pregnancy while MDA levels decreased and GSH levels increased ( $p < 0.01$ ) in zinc-received group.

The NO value which increases during pregnancy reached the peak level at the third month of pregnancy. In the zinc-received group, the NO levels were found to be lower than that of control group at the fifth month of pregnancy ( $p < 0.05$ ).

MDA/GSH ratios of animals in both experiment and control groups prior to the pregnancy were lower than that of measured during pregnancy. In the comparison of MDA/GSH ratios during pregnancy between these two groups

showed that the values in the control group were lower than that of experiment groups ( $p < 0.001$ ). A negative linear relation was observed between mean MDA and GSH levels during pregnancy ( $R^2 = 0.4062$ ,  $p < 0.001$ ).

The birth weights of lambs in experiment and control groups were  $4.32 \pm 0.19$  and  $3.34 \pm 0.29$  kg, respectively. The birth weights of lambs in experiment groups were found to be higher than that of control groups ( $p < 0.05$ ).

The results of this study conclude that oral administration of zinc may help to strengthen antioxidant system which changes during pregnancy and to increase productive characteristics of lambs by significantly increasing the birth weights of lambs.

**Key Words:** Pregnancy, Zinc, Reduced Glutathion, Malondialdehyde, Nitric Oxide, Birth weight.

## 7 KAYNAKLAR

- 1- Ahmed, MMM, Hamed, TFM., Barri, MES.: Variation of zinc and copper concentrations in the plasma of Nurbian goats according to physiological state, *Small Ruminant Res.*, 39: 189-193, 2001.
- 2- Akın V., Kaya N.: Safılaştırılmış insan akrozini üzerine Zn<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup> iyonlarının etkisi, *Atatürk Üniv. Tıp Bülteni*, 23 (2): 439-444, 1991.
- 3- Akkuş, İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yay., Konya. 1995.
- 4- Aksoy, G., şahin, T., Çimtay, İ., Berrin, N., Kaya, A.: Kuzularda çinko oksit uygulanmasının bazı biyokimyasal parametrelere etkisi. *Tr J Vet Anim Sci.*, 26: 85-90, 2002.
- 5- Al-Gubory, K., Bolifraud, P., Germain, G., Nicole, A., Ceballos-Bicot, I.: Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Reproduction*, 128:767-774, 2004.
- 6- Al-sadoni, H., Ferro, A.: S-nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clin Sci.*, 98:507-520, 2000.
- 7- Apgar, J., Evert, GA.: Low zinc intake affects maintenance of pregnancy in guinea pigs, *J Nutr.*, 121(2):192-200, 1991.
- 8- Asahi, M., Fuji, J., Suzuki, K., Seo, HG., Kuzuya, T., Horis, M., Tadas, M., Fuji, S., Taniguchi, N.: Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. *J Biol Chem.*, 270(36):21035-39, 1995.
- 9- Ashworh, CJ., Antipatis, C.:Micronutrient programming of development throughout gestation. *Reproduction*, 122: 527-535, 2001.
- 10- Austin Avery, A.: Infantile methemoglobinemia; reexamining the role of drinking water nitrates. *Envir Health Pers.*, 107:583-586, 1999.
- 11-Bartnikas, TB., Gitlin, JD.: Mechanisms of biosynthesis of mammalian copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem.*, 278(35): 33602-08, 2003.

- 12-Beutler, E., Duran, O., Kelley, B.M. Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.*, 61: 882-888, 1963.
- 13-Bilal, T: Besi sığırcılığında yaygın olarak kullanılan yem maddelerinde nitrat ve nitrit oranlarının saptanması ve rasyondaki nitrat miktarının kandaki  $\beta$ -karoten, A vitamini ve diğer bazı parametreler üzerine etkisinin incelenmesi, İstanbul Üniv Sağ Bil Enst., (Doktora tezi), 1994.
- 14-Buzadzich, B., Korac, B., Lazic, T., Obradovic, D.: Effect of supplementation with Cu and Zn on antioxidant enzyme activity in the rat tissues. *Food Res Int.*, 35:217-220, 2002.
- 15-Cai, L., Cherian, MG.: Zinc-metallothionein protects from DNA damage induced by radiation better glutathione and copper- or cadmium metallothioneins. *Toxicol Letters*, 136: 193-198, 2003.
- 16-Cai, T., Xian, M., Wanh. PG.: Electrochemical and peroxidase oxidation study of N-hydroxyguanidine derivatives as NO donors. *Biorganic Med Chem Letters*, 12:1507-1510, 2002.
- 17-Cammack, R, Joannou, CL., Cui, XY., Martinez, CT., Maraj, SR. Hughes, MN.: Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochim Biophys Acta*, 1411:475-488, 1999.
- 18-Canan, S.: Serebral iskemide nitrik oksitin rolü. Ondokuz Mayıs Üniv Sağ Bil Enst., (Doktora Semineri), 1999.
- 19-Cantor, KP.: Drinking water and cancer, *Cancer Causes and Control*, 8(3):297-308, 1997.
- 20-Casanueva, E., Viteri, FE.: Iron and oxidative stress in pregnancy. *J Nutr.*, 133:1700-1708, 2003.
- 21-Castillo-Durán, C., Marín, VB., Alcazar, LS., Iturralde, H., Ruz, MO.: Controlled trial of zinc supplementation in Chilean pregnant adolescents. *Nutr Res.*, 21: 715-724, 2001.
- 22-Chew, BP.: Effects of supplemental  $\beta$ -carotene and vitamin A on reproduction in swine. *J Anim Sci.*, 71:247-252, 1993.
- 23-Conrad, KP., Joffe, GM., Kruszyna, H., Kruszyna, R., Rochelle, LG., Smith, RP., Chavez, JE., Mosher, MD: Identification of increased nitric

- oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB*, 7: 566-571, 1993.
- 24-Çakmakçı, M.: Nitrik oksit, *Bilim ve Teknik*,374: 58-63, 1999.
- 25-Çımtay, İ., Şahin, T., Ölçülü, A., Aksoy, G.: Gebe koyunlarda bakır sülfat uygulanmasının koyunlar ve kuzuların kan serumlarındaki bazı mineral düzeyleri ve kuzuların doğum ağırlıkları üzerine etkileri. *Tr J Vet Anim Sci.*, 25: 921-927, 2001.
- 26-De Matos, DG, Gasparini, B., Pasqualini, SR.,Thompson, JG.: Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracelluler peroxide content. *Theriogen*, 57:1443-1451, 2002.
- 27-Diejomaoh, MFE, Omu, AE, Taher, S., Al-Busiri, N.,Fatinikun, T., Fernandes, S., Al-Othman, S.: Nitric oxide metabolites in preterm and induced labor. *Gynecol Obstest Invest.*, 56: 197-2002, 2003.
- 28-Doğan, K.: Çinkonun hayvan beslemesindeki yeri ve önemi. I. Ulusal Çinko Kongresi. Eskişehir, 25-30, 1998.
- 29-Dröge, W.: Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol Rew.*, 82: 47-95, 2002.
- 30-Durak, M., Aydoğan, S., Sarayemen, R., Çomu, MF.: Change nitric oxide concentrations of erythrocyte according to the sodium nitroprusside. *Ege Univ J Health Sci.*, 9(1):32-39, 2000.
- 31-Ebadi, M., Leuschen, MP., El Refay, H., Hamada, M., Rojas, P.: The antioxidant properties of zinc and metallohionein. *Neurochem Int.*, 29(2): 159-166,1996.
- 32-Erbaş, D.: Nitrik oksit: Fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki rolü. *Klinik Gelişim*, 11: 376-380, 1998.
- 33-Farinati, F., Cardin, R., D'inca, R., , Naccarato, R., Sturniolo, GC.: Zinc treatment prevents lipid peroxidation and increases glutathione availability in Wilson's disease.*J Lab Clin Med.* 141 (6):372-7, 2003.
- 34-Feldman, PL., Stuehr, DJ., Griffith, OW., Fukuto, JM.: Mechanisms of mammalian nitric oxide biosynthesis. In: Weisman, BA. et al. (edt):

- Biochemical, pharmacological and clinical aspects of nitric oxide. Plenum Press, New York., 14-20, 1995.
- 35-Garthwaite, J.: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system, Elsevier Sci Pub Tins., 14(2):60-67, 1991.
- 36-George, SS., Swaminathan, S., Seshadri, L.: Zinc levels in pregnancy. Int J Gynecol Obstr., 55:175-176, 1996.
- 37-Górecka, R., Kleczkowski, M., Kluciński, W., Kasztelan, R., Sitarska, E.: Changes in antioxidant components in blood of mares during pregnancy and after foaling. Bull Vet Inst Pulway, 46: 301-305, 2002.
- 38-Göksoy, K.: Çiftlik hayvanlarında beslenme hastalıkları. TDV Yay Matbaacılık işl., 101-118, Ankara, 2003.
- 39-Grahn, B H., Paterson, P G., Gottschall-Pass, K T., Zhang, Z.: Zinc and the eye. J Am Nutr., 20(2): 106–118, 2001.
- 40-Granger, JP., Alexander, BT.: Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of nitric oxide. Acta Physiol Scandinavica, 168: 161-168, 2000.
- 41-Griffith, OW.: Nitric Oxide Synthase Inhibitors: Mechanisms of Action and in Vivo Studies. In: Weism, BA. et al. (edt): Biochemical, Pharmacological and Clinical Aspects of Nitric Oxide. Plenum Press, New York, 21-36, 1995.
- 42-Groves, JT., Wang, C.: Nitric oxide synthase: Models and mechanisms. Current Opinion Chem Biol., 4:687-695, 2000.
- 43-Grudzinski, I.: Studies on the mechanism of the toxic action of sodium nitrite on intestinal absorption in rats. Arch Environ Contam Toxicol., 21(3):475-479,1991.
- 44-Hagay, ZJ., Weiss, Y., Zumsan, I., Peled-Kamar, M., Reece, EA., Eriksson, UJ., Groner, Y.: Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. Am J Obstet Gynecol., 173(4):1036-1041,1995.

- 45-Halas, ES., Eberhardt, MJ., Diers, MA., Sandstead, HH.: Learning and memory impairment in adult rats due to severe zinc deficiency during lactation, *Physiol Behav.*, 30(3): 371-381, 1983.
- 46-Hamadani, JD., Fuchs, GJ., Osendarp, SJM., Huda, SN., Grantham-McGregor, SM.: Zinc supplementation during pregnancy and effects on mental development and behavior of infants: a follow-up study, *Lancet*, 27(360):290-294, 2002.
- 47-Hambidge, K M., Krebs, N F., Miller, L.: Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: implications for the assessment of zinc status. *Am J Clin Nutr.*, 68:410-413, 1998.
- 48-Hecker, M., Fleming, I., Ayajiki, K., Busse, R.: Mechanism of Shear Stress-Dependent Endothelial Nitric Oxide Release: Cardiovascular Implications. In: Weisman, BA. et al. (ed): *Biochemical, Pharmacological and Clinical Aspects of Nitric Oxide*. Plenum Press, New York, 49-56, 1995.
- 49-[http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/misc\\_topics/radicals.html](http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/misc_topics/radicals.html).
- 50-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=stryer.figgrp.1201>.
- 51-<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/no/nos.html>.
- 52-[www.emdbiosciences.com/html/CBC/nitric\\_oxide.htm](http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/nitric_oxide.htm).
- 53-Hubel, CA., McLaughlin, MK., Evans, RW., Hauth, BA, Sims, CJ.: Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated, and decrease within 48 hours post partum. *Am J Obstet Gynecol.*,174(3):975-982,1996.
- 54-Hurley, WL., Doane, RM.: Recent developments in the roles of vitamin and minerals in reproduction. *J Dairy Sci.*, 72(3): 784-804,1989.
- 55-Hyeok, YK., Choi, S., Won, MH., Kang, TC., Kang, JH.: Oxidative modification and inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride. *Biochim Biophys Acta*, 1543: 69-76, 2000.

- 56-Ishihara, M.: Studies on lipoperoxide of normal pregnant women and of patients with toxemia of pregnancy. *Clin Chim Acta*, 1:84(1-2): 1-9, 1978.
- 57-Jourdan, E., Emonet-Piccardi, N., Didider, C., Beanai, JC., Favier, A., Richard, MJ.: Effects of cadmium and zinc on solar-simulated light-irradiated cells: potential role of zinc-metallothionein in zinc-induced geneoprotection. *Arch Biochem Biophys*, 405:170-177, 2002.
- 58-Karbownik, M., Lewinski, A., Reither, RJ.: Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *J Bioch Cell Biol.*, 33: 735-753, 2001.
- 59-Katakai, K., Liu, J., Nakajima, K., Keefer, LK., Waalkes, M.: Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc bound to MT. *Toxicol Letters*, 119: 103-108, 2001.
- 60-Kaya, N., Utlü, N., Uyanık, BS., Özcan, A.: The serum zinc and copper values of the Morkaraman and Tuj Sheep grown up in the pasture conditions an and around Kars. *Tr J Vet Anim Sci.*, 22: 399-402, 1998.
- 61-Kaya, S.: Yem ve yem ham maddeleri ile bazı biyolojik sıvılarda nitrit ve nitrat analizi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, 31(1):15-27, 1984.
- 62-Kaya, S.: Yem ve yem ham maddelerinde nitrat ve nitritler. *Ankara Üniv. Vet Fak Derg.*, 32(3):507-517, 1985.
- 63-Kechrid, Z., Bouzerna,N.: Effect of zinc deficiency on zinc and carbohydrate metabolism in genetically diabetic (C57BL/Ksj Db+/Db+) and non-diabetic original strain (C57BL/Ksj) mice. *Tr J Med Sci.*, 34: 367-373, 2004.
- 64-Kılınç, K., Kılınç, A.: Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Derg.*, 33 (2): 110-118, 2002.
- 65-Kimura, E.: Roles of zinc (II) in zinc enzymes. *Pure Appl Chem.*, 65(3): 355-359, 1993.
- 66-Kingwell, BA.: Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: Effect of training in health and cardiovascular disease. *FASEB*, 14:1685-1696, 2000.



- 67-Kurt, D., Denli, O., Kanay, Z., Güzel, C., Ceylan, K.: Diyarbakır yöresindeki Akkaraman koyunlarında kan serumunda Cu, Zn, Se ve yünde Cu, Zn düzeylerinin araştırılması. *Tr J Vet Anim Sci.*, 25: 431-436, 2001.
- 68-Ladipo, OA.: Nutrition in pregnancy: Mineral and vitamin supplements. *Am J Clin Nutr.*, 72:280-290, 2000.
- 69-Langley, A., Mangas, S.: Zinc, Report of an international meeting 12-13 September, Adelaide, 1996.
- 70-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. *J Biol Chem.*, 10:270(10): 5506-5510, 1995.
- 71-Leccia, MT., Richard, MJ, Favier, A., Beani, JC.: Zinc protects against ultraviolet A1-induced DNA damage and apoptosis in cultured human fibroblasts. *Biol Trace Element Res.*, 69: 177-190, 1999.
- 72-Liuzzi, JP., Cousins RJ.: Mammalian zinc transporters. *Ann Rev Nutr.*, 24: 151-72, 2004.
- 73-Loverro, G., Greco, P., Capuano, F., Carone, D., Cormio, G., Selvaggi, L: Lipoperoxidation and antioxidant enzymes activity in pregnancy complicated with hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 70:123–127, 1996.
- 74-Lu, SC.: Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB*, 13: 1169-1183, 1999.
- 75-Lucca, JJD, Adeagbo, ASO, Alsip, NL.: Oestrus cycle and pregnancy alter the reactivity of the rat uterine vasculature, *Human Reproduction*, 15(12): 2496-2503, 2000.
- 76-Luo, H., Cui, S., Chen, D., Liu, J., Liu, Z.: Immunohistochemical detection of iskelet-1 and neuronal nitric oxide synthase in the dorsal root ganglia (DRG) of sheep fetuses during gestation. *J Histochem Cytochem.*, 52: 797:803, 2004.
- 77-Ma, ZJ., Igarashi, A., Inagaki, M., Mitsugi, F., Yamaguchi, M.: Supplemental intake of isoflavones and zinc-containing mineral mixture

- enhances bone components in the femoral tissue of rats with increasing age, *J Health Sci.*, 46(5)363-369, 2000.
- 78-Magness, RR., Sullivan, JA., Ti, Y., Phemetton, TM., Bird, IM.: Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VI. Ovarian and pregnancy effects on eNOS and NOx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 280:1692-98, 2001.
- 79-Maul, H., Longo, M., Sade, GR., Garfield, RE.: Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des.*,9: 359-380. 21, 2003.
- 80-McDowell, LR.: Minerals in animal and human nutrition. Academic Press Inc., 265-293, 1992.
- 81-McMahon, R.J., Cousins, R.J.: Mammalian zinc transporters. *J Nutr.*, 128: 667-670, 1998.
- 82-McNeill, AM., Zhang, C., Stanczyk, FZ., Duckles, SP., Kranuse, DN.: Estrogen increases endothelial nitric oxide synthase via estrogen receptors in rat cerebral blood vessels: effect preserved after concurrent treatment with medroxyprogesterone acetate or progesterone. *Stroke*, 33:1685-1691, 2002.
- 83-Miranda, KM., Espey, MG., Wink, DA.: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biol Chem.*, 5(1): 62-71, 2001.
- 84-Mover-lev, H., Ar, A.: Changes in enzymatic antioxidant activity in pregnant rats exposed to hyperoxia or hypoxia. *Comp Biochem Physiol.*, 118(3): 353-359, 1997.
- 85-Myatt, L., Cui, X.: Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.*, 122: 369-382, 2004.
- 86-Nakai, A., Oya, A., Kobe, H., Asakura, H., Yokota, A., Koshino, T., Araki, T.: Changes in maternal lipid peroxidation levels and antioxidant enzymatic activities before and after delivery. *J Nippon Med Sch.*, 67(6): 434-439, 2000.
- 87-Navar, LG., Majid, DS.: Interactions between arterial pressure and sodium excretion. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 5(1): 64-71, 1996.

- 88-Nelson, SH., Steinsland. OS., Wang, Y., Yallampalli, C., Dong, YL., Sanchez. J.: Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circulation Res.*, 87:406-411, 2000.
- 89-Oliveros, L., Vega, V., Anzulovich, AC., Ramiez, D., Gimenez, MS.: Vitamin A deficiency modifies antioxidant defenses and essential element contents rat heart. *Nutr Res.*, 20(8): 1139-1150, 2000.
- 90-Oteiza, PI., Clegg, MS., Keen, CL.: Short-term zinc deficiency affects nuclear factor-Kb nuclear binding activity in rat testes. *J Nutr.*, 131: 21-26, 2001.
- 91-Ovesen, J., Danscher, G., Thomsen, JS., Mosekilde, L., Moller-Madsen, B.: Autometallographic tracing of zinc ions in growing bone. *J. Musculoskel Neuron Interact.*, 4(4): 428-435, 2004.
- 92-Ozan, S.: Karacabey Merinos koyunlarında yapağı dökümü ile kanda çinko bakır düzeyi arasındaki ilişkiler. *Selçuk Üniv Vet Fak Derg.*, 1: 133-142, 1985.
- 93-Ozata, M., Mergen, M., Oktenli, C., Aydin, A., Sanisoglu, SY., Bolu, E., Yilmaz, MI, Sayal, A., Isimer, A., Ozademir, IC.: Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem.*, 35: 627-631, 2002.
- 94-Özakyol, AH.: Nitrik oksit: Gastrointestinal sistem ve karaciğer. *Sendrom*, 74-78, 1998.
- 95-Pandhi, P., Saha, L., Malhotra, S.: Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in pregnant rats as a model of pre-eclampsia. *Indian J Pharmacol.*, 33:92-95, 2001.
- 96-Pernet, P., Coudray-Lucas, C., Le Broucher, L.: Is the arginine-nitric oxide pathway involved in endotoxemia-induced muscular hypercatabolism in rats? *Metabolism*, 48(2):190-93, 1999.
- 97-Poston, L., Raijmakers, MTM.: Trophoblast oxidative stres, antioxidant and pregnancy outcome. *Placenta*, 25(18):72-78, 2004.

- 98-Prasad, AS., Oberleas, D., Wolf, P., Horwitz, JP.: Studies on zinc deficiency: Changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc-deficient rats. *J Clin Invest.*, 46(4): 549- 557, 1967.
- 99-Reeves, PG., O'Dell, BL.: Zinc deficiency in rats and angiotensin-converting enzyme activity: comparative effect on lung and testis, *J Nutr.*, 118(5):622-626, 1988.
- 100- Rosselli, M, Paul, JK., Dubey, KR.: Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction*, 4(1):3-24, 1998.
- 101- Rostan, EF., DeBuys, HV., Madey, DL., Pinel, SR.: Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *Int J Dermatol.*, 41:606-611, 2002.
- 102- Sainz, RM., Reiter, RJ., Mayo, JC., Cabrera, J., Tan, DX., Qi, W., Garcia, J.: Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: Effect of pinealectomy. *J Reprod Fertil.*, 119: 143-149. 2000.
- 103- Sakaguchi, S., Lizuka, Y., Furusawa, S., Ishikawa, M., Satoh, S., Takayanagi, M.: Role of  $Zn^{+2}$  in oxidative stress caused by endotoxin challenge. *Eur J Pharmacol.*, 451: 309-316, 2002.
- 104- Sato, EF., Nakagawa, E., Hiramoto, K., Yamamasu, S., Moriyama, I., Inoue, M.: Oxidative stress promotes the regression of fetal liver hemopoiesis. *Biochem (Moscow).*, 69(1): 18-22, 2002.
- 105- Schweinsberg, F., Burkle, V.: Nitrite: a co-carcinogen?. *Cancer Res Clin Oncol.*, 109(3):200-202, 1985.
- 106- Shankar, AH., Prasad, AS.: Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection, *Am J Clin Nutr.*, 68:447-463, 1998.
- 107- Shukovski, L., Tsafri, A.: The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinol.*, 135(5): 2286-2290, 1994.
- 108- Sidhu, P., Gard, ML., Dhawan, DK.: Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats. *Nutr Host.*, XIX(6): 341-347, 2004.

- 109- Stallard, L., Reeves, PG.: Zinc deficiency in adult rats reduces the relative abundance of testis- specific angiotensin-converting enzyme mRNA. *J Nutr.*, 127: 25-29, 1997.
- 110- Stehbens, WE.: Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Exp Mol Pathol.*, 75:265-276, 2003.
- 111- Stuehr, DJ.: Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*, 1411:217-230, 1999.
- 112- Sugino, N., Nakamura, Y., Takeda, O., Ishimatsu, M., Kato, H.: Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J Reprod Fertil.*, 97(2):347-351, 1993.
- 113- Tamura, T., Goldenberg, RL.: Zinc nutrition and pregnancy outcome. *Nutr Res.*, 16(1): 139-181, 1996.
- 114- Tartler, U., Kröncke, KD., Meyer, KL., Suschek, CV.: Nitric oxide interferes with skeletal cell zinc homeostasis. *Nitric oxide: Biol Chem.*, 4(6):609-614, 2000.
- 115- Taylor, A: Measurement of zinc in clinical samples. *Ann Clin Biochem.*, 34:142- 150, 1997.
- 116- Taylor, CT.: Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 10:189-198, 2001.
- 117- Tuna, R., Çağlayan, B.: Nitrik oksit-I-Sendrom, 25-28, 1995.
- 118- Uyanık, F: Hayvanlarda Çinko metabolizması. *Erciyes Üniv Sağ Bil Derg.*, 7(1-2): 58-66, 1998.
- 119- Valle, BL.: *Zinc in Biology and Biochemistry*. Karger Publishing Company, Krieger Drive, Malabar, Florida, 1983.
- 120- Van Voorhis, BJ., Moore, K., Strijbos, PJ., Nelson, S., Baylis, SA., Grzybicki, D., Weiner, CP. : Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. *J Clin Invest.*, 96:2719–2726, 1995.
- 121- Wang, PG., Xian, M., Tang, X., Wu, X., Wen, Z., Cai, T., Janczuk, AJ.: Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev.*, 102:1091-1134, 2002.

- 122- Wang, W., Ballatori, N.: Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rew.*, 50(3): 336-355, 1999.
- 123- Wang, Y., Walsh, SW.: Placental mitochondria as a source of oxidative stress in preeclampsia. *Placenta*,19:581- 586, 1998.
- 124- Wasowicz, W., Reszka, E., Gromadzinka, J., Rydzynski, K.: The role of essential elements in oxidative stress. *Comments on Toxicol.*, 9:39-48, 2003.
- 125- Weitzberg. E., Lundberg, JON.: Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide Biol Chem.*, 2(1):1-7, 1998.
- 126- Wendy, KA., Chris, E., Cooper GK., Richard, GK.: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.*, 357:593-615, 2001.
- 127- Xian, M., Li, X., Tang, X., Chen, X., Zheng, Z., Gallian, JJ., Kreulen, DL., Wang, PG.: N-Hydroxyl derivates of guanidine based drugs as enzymatic NO donors. *Bioorganic Med Chem Letters*, 1:2377-2380, 2001.
- 128- Xu, W., Liu, L.: Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. *Recent progress in nitric oxide research. Cell Res.*, 8(4):251-258, 1998.
- 129- Yang, D., Lang, U., Greenberg, SG., Myatt, L., Clark, K.: Elevation of nitrate levels in pregnant ewes and their fetuses, *Am J Obstet Gynecol.*, 174:573-577, 1996.
- 130- Yerer, M.B., Aydoğan, S.: Oksidatif stres ve antioksidanlar. *Erciyes Üniv Sağ Bil Derg.*, 9(1):49-53, 2000.
- 131- Yılmaz, B.: Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. *Feryal Matbaacılık*, 382-397, 1999.
- 132- Yılmaz, N., Solmaz, S., Kaya, M.: Nitrik oksitin insan organizmasındaki önemi. *Arşiv*, 10: 178-188, 2001.
- 133- Yi-Qing, C., James, HF., Wang, MH.: Activation of the RON receptor tyrosine nitric oxide synthase (iNOS) expression by murine peritoneal exudate macrophages: phosphatidylinositol-3 kinases is required for

RON-mediated inhibition of iNOS expression. *Immunol.*, 161:4950-59, 1998.

- 134- Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., Mori, M.: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol.*, 135: 372-376, 1979.
- 135- Young, PR: Radicals. 2000 [www.chem.uic.edu/web1/PDF/CH10.PDF](http://www.chem.uic.edu/web1/PDF/CH10.PDF).
- 136- Yousef, MI., El Hendy, HA., El-Demerdash, F.M., Elagamy, EI.: Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicol.*, 175: 223-234, 2002.
- 137- Zago, M P., Oteiza, PI.: The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biol Med.*, 31(2): 266-274, 2001.
- 138- Zhang, L., Xiao, D., David, B., Bouslough, B.: Long-term high-altitude hypoxia increases plasma nitrate levels in pregnant ewes and their fetuses. *Am J Obstet Gynecol.*, 179:1594-1598, 1998.

## **8 ÖZGEÇMİŞ**

1974 yılında Kars'ın Arpaçay ilçesinin Kıraç Köyünde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kars'ta tamamladı. 1993 yılında girdiği Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden 1997 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. 15.10.1997 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzman olarak göreve başladı. 2001 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans Öğrenimini tamamlayarak aynı yıl Araştırma görevlisi kadrosuna atandı ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimine başladı. Evlidir.