



**SAF KODEİN VE KODEİN TUZLARININ
FARELERDE METALLOTİYONİN SENTEZİ
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ
ZÜLFİYE ÖNEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
Yrd. Doç. Dr. Emel CANPOLAT
Ocak - 2017
Her hakkı saklıdır**

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SAF KODEİN VE KODEİN TUZLARININ FARELERDE METALLOTİYONİN
SENTEZİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

ZÜLFİYE ÖNEN

**TOKAT
Ocak - 2017**

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2012/54 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

Zülfıye ÖNEN tarafından hazırlanan “**Saf Kodein ve Kodein Tuzlarının Farelerde Metallotiyonin Sentezi Üzerine Olan Etkileri**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 23 OCAK 2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Emel CANPOLAT

Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Doç.Dr. İbrahim TÜRKEKUL

Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Yrd.Doç.Dr. Hayreddin GEZEĞEN

Cumhuriyet Üniversitesi



Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

ONAY



Prof. Dr. Ebubekir ALTUNTAŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

---/---/20---

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

ZÜLFİYE ÖNEN

23 Ocak 2017

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAF KODEİN VE KODEİN TUZLARININ FARELERDE METALLOTİYONİN SENTEZİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

ZÜLFİYE ÖNEN

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. EMEL CANPOLAT

Organizmalarda strese karşı geliştirilen başlıca cevaplardan birisi, stres proteinleri olarak adlandırılan bir grup proteinin sentezlenmesidir. Metalloprotein (MT) organizmalarda strese karşı bir hücrel cevap olarak sentezlenen, önemli fizyolojik ve immün sistemi düzenleyici rollere sahip bir stres proteinidir. Bu çalışmada, morfinden daha zayıf özellikte, bağımlılık yapma dereceleri az olan, özellikle antitussif (öksürük dindirici), analjezik (ağrı kesici) ve antidiyareik (ishal önleyici) ilaçlar şeklinde sıklıkla tedavi amaçlı olarak kullanılan kodein ve kodein tuzlarının (kodein sülfat ve kodein fosfat) MT sentezi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, kodein ve kodein tuzları canlı ağırlığına göre 10 mg/kg ve 20 mg/kg olacak şekilde iki farklı dozda subkutan olarak farelere enjekte edilmiştir. Enjeksiyonlar sonrasında izole edilen doku lizatlarında (karaciğer ve böbrek) ve serum örneklerinde MT'nin varlığı anti-metalloprotein antikor (UC1MT) kullanılarak kompetitif ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Kodein ve kodein tuzlarının karaciğerde MT-1 seviyelerini her iki dozda da belirgin şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir. Her iki doz birbiri ile karşılaştırıldığında, MT sentezinde doza bağlı artışlar görülmemiştir. Kodein ve kodein tuzlarının hem böbrekte hem de serum MT-1 seviyelerinde de herhangi bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlar kodein ve kodein tuzlarının karaciğerde MT-1 sentezini uyarma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

2017, 48 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Stres Proteinleri, Metalloprotein (MT), Kodein, Kodein Sülfat, Kodein Fosfat, Kompetitif ELISA

ABSTRACT

MASTER THESIS

EFFECTS OF PURE CODEINE AND CODEINE SALTS ON METALLOTHIONEIN SYNTHESIS IN MICE

ZÜLFİYE ÖNEN

**GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOLOGY

SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. EMEL CANPOLAT

One of the main responses to stress developed by organisms is the synthesis of a group of proteins called stress proteins. Metallothionein (MT) is a stress protein synthesized in organisms as a cellular response to stress, which has important physiological and immune regulatory roles. The aim of this study is to determine the effects of codeine and codeine salts (codeine sulphate and codeine phosphate), which are weaker and less addictive than morphine and also used therapeutically as antitussive (cough reliever), analgesic (pain reliever) and antidiarrheal (diarrhea prevention) drugs on metallothionein synthesis. For this purpose, codeine and codeine salts have been subcutaneously administered to mice at two different doses, 10 mg/kg and 20 mg/kg according to live weight, respectively. The presence of MT in tissue lysates and serum samples obtained after injections was determined by competitive ELISA method using anti-metallothionein antibody (UC1MT). It has been shown that codeine and codeine salts significantly increased liver MT-1 levels at both doses. It has not been shown dose-dependent increases in MT synthesis when two different doses of codeine and codeine salts were compared to each other. Codeine and codeine salts did not cause any changes on kidney and serum MT-1 levels. The results show that the codeine and codeine salts have a potential to induce MT-1 synthesis on liver.

2017, 48 PAGES

KEYWORDS: Stress proteins, Metallothionein (MT), Codeine, Codeine Sulphate, Codein Phosphate, Competitive ELISA

ÖNSÖZ

Bu çalışmada bana destek olan, yardımını, bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen, çalışmamın her aşamasında göstermiş olduğu ilgi ve destekle birikimlerinden faydalandığım değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Emel CANPOLAT'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca laboratuvarlarının tüm imkanlarını kullanmama izin vererek mesleki anlamda tecrübe ve birikim kazanmama yardımcı olan Biyoloji Bölüm Başkanlığına ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanlığına, gerek vermiş oldukları manevi destek, gerekse yardımlarıyla emeği geçen tüm çalışma arkadaşlarıma ve değerli hocalarıma, proje süresince vermiş oldukları destek nedeniyle Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve çalışanlarına, deney hayvanlarının bakımını üstlenen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Birimi (DETAB) çalışanlarına katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Bana vermiş oldukları eğitim ve anlayışla bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme, tüm çalışmalarım süresince yapmış olduğu yardımlar, fedakarlık ve özellikle de göstermiş olduğu sabır dolayısıyla eşim Sezgin ÖNEN'e sonsuz teşekkürler.

ZÜLFİYE ÖNEN

23 Ocak 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Metallotiyonin Poteininin Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.2. MT Gen Yapısı.....	6
2.3. MT İzofomları	6
2.4. MT Sentezi	7
2.5. MT'nin Hücredeki Lokalizasyonu	9
2.6. MT'nin Dokulardaki Dağılımı	10
2.6.1. Karaciğerde ve Böbrekte Metallotiyoninler.....	10
2.6.2. Pankreasta Metallotiyoninler	12
2.6.3. Barsaklarda Metallotiyoninler	13
2.7. Metallotiyoninlerin Fonksiyonları.....	13
2.7.1. Esansiyel Metallerin Homeostazisindeki Rollerini	13
2.7.2. MT'lerin Metal Detoksifikasyonundaki Önemi	14
2.7.3. Metallotiyoninlerin Antioksidan Rolü.....	15
2.7.4. Metallotiyonin ve Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi	15
2.8. MT'nin Biyolojik Materyallerde Belirlenmesi	16
2.9. Kodein	17

	<u>Sayfa</u>
3. MATERİYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Deney Hayvanları.....	20
3.1.2. Haşhaş Alkaloidleri	20
3.1.3. Antikorlar	20
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.1.5. Kullanılan Diğer Malzemeler	21
3.1.6. Kullanılan Cihazlar	22
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar ve Solüsyonların Hazırlanması.....	23
3.2.2. Serum Örneklerinin Elde Edilmesi	24
3.2.3. Kodein ve Kodein Tuzlarının Hazırlanması ve Enjeksiyonlar	24
3.2.4. Doku İzolasyonu	25
3.2.5. Doku Lizatlarının Hazırlanması	25
3.2.6. Doku Lizatlarında Protein Miktarının Belirlenmesi	25
3.2.7. MT-UC1MT ELISA.....	26
3.2.8. Kompetitif ELISA	27
3.2.9. İstatistiksel Yöntem.....	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
6. KAYNAKLAR	39
7. ÖZGEÇMİŞ	48

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simge

Açıklama

Cu	Bakır
Zn	Çinko
Cd	Kadmiyum
Hg	Civa
Ni	Nikel
Co	Kobalt
Cr	Krom
Mg	Magnezyum
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
µg	Mikrogram
mg	Miligram
gr	Gram
kg	Kilogram
nm	Nanometre
°C	Celcius

Kısaltmalar

Açıklama

Ag	Gümüş
Au	Altın
BCA	Bicinchoninic Acid Assay
BSA	Bovine Serum Albumini
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
Cd	Kadmiyum
CdCl ₂	Kadmiyum Diklorür
CdSO ₄	Kadmiyum Sülfat
Cr	Krom
Cu	Bakır
DEA	Diethanolamin
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GR	Glukokortikoid
GRE	Glucocorticoid Response Elements
GSH	İndirgenmiş Glutasyon

Kısaltmalar

HADYEK
HCl
Hg
H₂O₂
KCl
IBD
IL
kDa
KH₂PO₄
Mg
mRNA
MgCl₂
MT
N
NaCl
Na₂CO₃
NaH₂PO₄
NaN₃
NF
Ni
rpm
SH
PNPP
TNF
ROS
UC1MT
UV
Zn

Açıklama

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Hidroklörür Asit
Civa
Hidrojenperoksit
Potasyum Klorür
Yangıya Bağlı Bağırsak Hastalığı
Interleukin
Kilodalton
Potasyum Dihidrojen Fosfat
Magnezyum
Messenger Ribonucleic Acid
Magnezyum Klorür
Metallothionein
Azot
Sodyum Klorür
Sodyum Karbonat
Sodyum Dihidrojen Fosfat
Sodyum Azit
Nörofibromatozis
Nikel
Revolutions Per Minute
Sülfidril
Para nitrofenil fosfat
Tümör Nekrosis Faktör
Reaktif Oksijen Türleri
Anti-MT Monoklonal Antikoru
Ultraviyole
Çinko

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. MT proteininin üç boyutlu yapısı, domainleri ve amino asit dizilimi	5
Şekil 2.2. MT sentezine neden olan uyaranlar	8
Şekil 2.3. Kadmiyuma bağlı böbrek hasarı oluşumu	12
Şekil 2.4. Kodeinin kimyasal yapısı	18
Şekil 2.5. Kodein fosfat ve kodein sülfatın kimyasal yapısı	19
Şekil 4.1. UC1MT antikörünün MT-1 ile olan reaktivitesi	29
Şekil 4.2. Doku lizatlarındaki toplam protein miktarını belirlemede kullanılan standart eğri	30
Şekil 4.3. Kompetitif ELISA'da farklı MT konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan eğri	31
Şekil 4.4. Kodein ve kodein tuzlarının farelerde karaciğer MT-1 seviyeleri üzerindeki etkisi	33
Şekil 4.5. Kodein ve kodein tuzlarının farelerde karaciğer MT-1 seviyeleri üzerindeki doza bağımlı (10 mg/kg ve 20 mg/kg) etkileri	33
Şekil 4.6. Kodein ve kodein tuzlarının farelerde karaciğer MT-1 seviyeleri üzerindeki doza bağımlı (10 mg/kg ve 20 mg/kg) etkileri	34
Şekil 4.7. Kodein ve kodein tuzlarının farelerde böbrek MT-1 seviyeleri üzerindeki doza bağımlı (10 mg/kg ve 20 mg/kg) etkileri	35

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 1.1. Ham afyondaki alkaloit oranları 1



1. GİRİŞ

Haşhaş (*Papaver somniferum*), farklı amaçlar için yetiştirilen fakat tıbbi amaçlı olarak da kullanılan bir bitkidir. Haşhaş bitkisinin genç kapsüllerinin (meyvalarının) özel bir bıçakla enine çizilmesi suretiyle dışarı çıkan ve hava ile temasta katılaştıran sütü afyon olarak adlandırılmaktadır. Bu şekilde elde edilen afyon, çok eski zamanlardan beri ilaç ve keyif verici madde olarak kullanılmaktadır. Afyonun bileşiminde yaklaşık % 20-25 oranında alkaloid ve buna ilaveten reçine, kauçuk, yağ, mum, müsilağ ve asitler de bulunmaktadır. Bulunuş miktarları itibarı ile morfin, kodein, tebain, papaverin, noskapin ve narsein afyondaki en önemli alkaloitlerdendir (Anonim, 2007).

Çizelge 1.1. Ham afyondaki alkaloit oranları

Alkaloit	% Sınır
Morfin	5 - 20
Kodein	1 - 5
Narsein	0.1 - 1
Nem1	5 - 30
Tebain	1 - 4
Papaverin	1 - 6
Noskapin	5 - 15

Afyondan elde edilen başta morfin olmak üzere, tebain, kodein, papaverin ve noskapin gibi alkaloitler farmakolojik ve tıbbi öneme sahip olup, yaklaşık 3500 yıldan beri analjezik (ağrı kesici) olarak kullanılmaktadır (Bernath, 1998).

Morfin şiddetli ağrıların dindirilmesinde kullanılan etkili bir analjezik olmasına rağmen, bağımlılık yapıcı bir özelliğe sahiptir. Daha önce yapılan çalışmalarda önemli bir stresör ve narkotik ajan olarak morfinin, bir stres proteini olan metalloitiyonin (MT) sentezi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Metalloitiyonin (MT) organizmalarda strese karşı bir hücresel cevap olarak sentezlenen, önemli fizyolojik ve immün sistemi düzenleyici rollere sahip bir stres proteindir (Vallae, 1995, Borghesi ve Lynes, 1996). Kadmiyum, çinko, bakır ve civa gibi ağır metaller MT'nin başlıca indükleyicileri (Hamer, 1986) olmasına rağmen, ağır metaller dışında birçok stres faktörü de MT sentezine neden olmaktadır. Serbest radikaller (Iszard ve ark., 1995), glukokortikoidler (Kelly ve ark., 1997), enflamatuar ajanlar

(Leibbrandt ve Koropatnick, 1994), sitokinler (Cousins ve Leinart, 1988, Sato ve ark., 1994), radyasyon (Shirashi ve ark., 1989, Shibuya ve ark., 1995, Jasani ve ark., 1993), aromatik hidrokarbonlar, açlık, aşırı soğuk veya sıcak, egzersiz, ve duygusal stres gibi fiziksel ve psikolojik stresörlerin de (Sasagawa ve ark., 1993, Niioka and Kojima, 1991, Arizona ve ark., 1991, Hernandez ve ark., 2000, Kondoh ve ark., 2002) belirgin şekilde MT sentezine katkıda bulundukları tespit edilmiştir.

Metallotiyonin, ağır metallere bağlanarak organizmaları metallerin toksik etkilerine karşı koruyan (Goering ve Klaassen, 1984), büyüme ve gelişme için gerekli çinko ve bakır gibi temel metaller için bir depo görevi yapan (Daston ve ark., 1991, De Lisle ve ark., 1996) ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan özelliğe sahip bir proteindir (Sato ve Bremner, 1993). Son yıllarda yapılan araştırmalarda ise, strese karşı bir cevap olarak sentezi belirgin şekilde artan ve önemli fizyolojik rolleri olan bu proteinin bu etkilerine karşılık, bağışıklık sistemi üzerinde hem olumlu ve hem de olumsuz yönde değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir (Lynes ve ark., 1990, Youn ve Lynes, 1999, Youn ve ark., 1995). MT'nin özellikle T-bağımlı antijenlere karşı humoral bağışıklığı (antikor-aracılı bağışıklık) baskıladığı ve antikor miktarını azalttığı tespit edilmiştir. T-bağımlı antijenlere karşı antikor cevabındaki bu azalmanın, hem ekzojen MT (dışarıdan verilen) hem de endojen MT (organizmanın kendisi tarafından sentezlenen) ile gerçekleştiği gözlemlenmiştir. MT proteinine karşı bir anti-MT monoklonal antikorunun (UC1MT) kullanılması durumunda, T-bağımlı antijene-spesifik antikor üretiminin belirgin şekilde arttığı görülmüştür (Lynes ve ark., 1993, Canpolat ve Lynes, 2001). Sonuç olarak, MT strese karşı üretilen ve önemli fizyolojik roller üstlenen bir stres proteini olmasına rağmen, özellikle organizmaların hastalıklara karşı savunmasında önemli rolü olan humoral bağışıklık üzerinde zararlı ve istenmeyen etkilere sahiptir.

Haşhaştan elde edilen bir alkaloit olarak morfinin MT sentezine neden olduğu ve özellikle beyin, karaciğer ve böbrek gibi organlarda MT seviyelerini belirgin şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir (Hidalgo ve ark., 1991, Florianczyk ve Stryjecka-Zimmer, 2001). Bu çalışmada ise, morfinden daha zayıf özellikte, bağımlılık yapma dereceleri az olan ve antitussif (öksürük dindirici), analjezik (ağrı kesici) ve antidiyareik (ishal önleyici) ilaçlar şeklinde (Armstrong ve Cozza, 2003, Schroeder ve Fahey, 2001)

sıklıkla tedavi amaçlı olarak kullanılan kodeinin farklı şekillerde hazırlanmış olan preparatlarının (kodein pür, kodein fosfat ve kodein sülfat) organizmalarda önemli fonksiyonlara sahip bir stres proteini olan metalotiyonin (MT) sentezi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metalloitiyonin Proteininin Yapısı ve Özellikleri

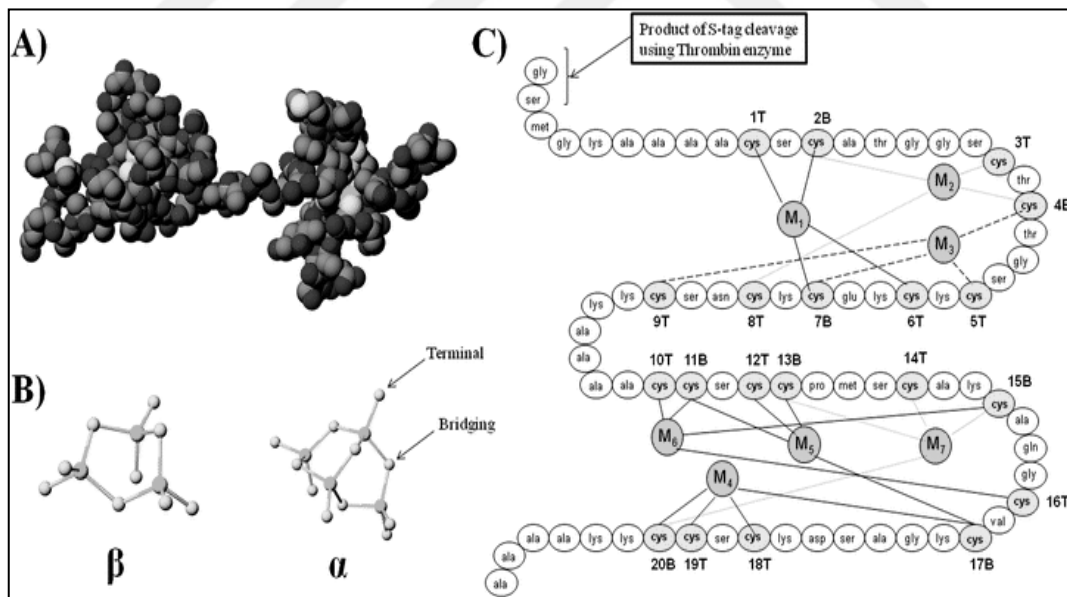
Yüksek oranda metal bağlama kapasitesine sahip bir protein olan metalloitiyonin (MT), ilk olarak 1957 yılında at böbrek dokusunda kadmiyuma (Cd) bağlı bir makromolekül olarak tespit edilmiş (Margoshes ve Vallee, 1957), daha sonra metallothionein (Kagi ve Vallee, 1960) olarak adlandırılmıştır. MT ile ilgili bilimsel araştırmalar 1950'lerde başlamış olup, biyokimya, farmakoloji, toksikoloji, patoloji ve beslenme alanlarında ve özellikle de aşağıda belirtilen model sistemler üzerinde yoğunlaşmıştır (Sato ve Kondoh, 2002, Klassen, 1999).

1. MT'i indüklediği bilinen kimyasallarla yapılan çalışmalar,
2. Yüksek konsantrasyonlardaki toksinlere karşı direnç kazandırılan hücrelerle yapılan çalışmalar,
3. MT geni ile transfekte edilen hücrelerle yapılan çalışmalar,
4. MT geni aktif (MT-transgenik) ya da inhibe (MT-null) edilen hayvanlarla yapılan çalışmalar,

MT'nin tüm hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda ve ökaryotik mikroorganizma ve bazı prokaryotlarda bulunduğu keşfedilmiştir (Harris, 2002, Nordberg, 1998, Klassen, 1999). Yapılan araştırmalarda bazal MT seviyelerinin insan, köpek, kedi ve domuzda yüksek seviyelerde bulunduğu, maymun ve koyunlarda daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu seviyeler yaş, doku tipi, beslenme ve fizyolojik faktörlere göre değişiklik göstermektedir (Tapiero ve Tew, 2003).

MT, 61-68 amino asitten oluşan ve yaklaşık 7 kDa molekül ağırlığına sahip metal bağlayıcı bir proteindir. Farklı memeli türlerinden MT'ler yapısal olarak karşılaştırıldığında, aminoasit kompozisyonlarının yüksek oranda birbirine benzer olduğu, proteinin 61-68 aminoasit içerdiği ve bu aminoasitlerin de yaklaşık üçte birinin (%30) sisteinden oluştuğu belirtilmiştir (Hamer, 1986). Türler arasında farklılık gösteren aminoasitler MT'in daha çok amino terminal bölgesinde yer almaktadır (Klassen ve Liu, 1999, Rigby ve Stillman 2004). MT'nin yapısında aromatik amino asitler ve disülfid bağları bulunmamaktadır. Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys'lerin (X ve Y sisteinsiz amino asitlerdir) varlığı ve Cys-Cys tekrarları MT'lerin önemli yapısal özelliklerinden birisidir ve çok iyi korunmuştur. Lizin, arjinin ve serin gibi amino

MT'nin üç boyutlu yapısı ilk olarak NMR ve X-ray kristalografi metoduyla keşfedilmiştir (Tapiero ve Tew, 2003, Vasak, 2005, Klassen ve Liu, 2009, Rigby ve Stillman, 2004). MT, β ve α domaini olmak üzere, benzer büyüklükte iki globüler domaininden oluşmaktadır. β domaini daha reaktif olup, amino terminal bölgesindeki 1-31 arasındaki dizilere karşılık gelir. Bu domain 9 sistein içermektedir. 3 Cd ya da Zn atomu bağlar. MT'nin α domaini (31-61. amino asitler) β domaini ile karşılaştırıldığında daha stabil olup karboksi-terminal bölgesinde bulunmaktadır. α domaini 11 sisteinden oluşmaktadır ve 4 Cd ya da Zn atomu bağlamaktadır (Furey ve ark., 1986, Hamer, 1986, Robbins ve Stout, 1992).



Şekil 2.1 MT proteininin üç boyutlu yapısı (A), domainleri (B) ve amino asit dizilimi

Metallerin MT'e bağlanması ve serbestleşmesi birbirlerini etkilemekte, ilk metalin bağlanması diğer metalin bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Metal ilk olarak

α -bölgesine, daha sonra β -bölgesine bağlanmaktadır. Proteinden metalin ayrılması ise ilk olarak β -bölgesinden daha sonra α -bölgesinden gerçekleşmektedir. Bu durum metallerin α -bölgesine daha sıkı bir şekil de bağlandığının göstergesidir.

2.2. MT Gen Yapısı

Memeli MT geni polimorfik karakterli kompleks bir yapıya sahiptir. İnsanlarda 14 farklı MT geni olup, 16. kromozom üzerindeki q13 (16q13) bölgesinde yerleşmiştir (Karin ve ark., 1984; West ve ark., 1990). İnsanlardaki 14 MT geninden sekizi tanımlanmış ve fonksiyonel olduğu gösterilmiştir.

Fare MT genleri insan MT genlerinden daha az çeşitlilik gösterir. Farede 8. kromozom üzerinde MT-I, MT-II, MT-III ve MT-IV olmak üzere dört fonksiyonel MT geni tanımlanmıştır. MT-I ve MT-II genleri farklı organ ve dokularda birçok hücre tipinde yaygın bir şekilde eksprese edilmesine rağmen, MT-III ve MT-IV'ün ekspresyonu daha doku spesifiktir (Cox ve Palmiter, 1983, Palmiter, 1987, Ebadi ve Swanson, 1987, Searle, 1987, Searle ve ark., 1984, Palmiter ve ark., 1992, Quaife ve ark., 1994).

2.3. MT İzoformları

Memelilerde MT'nin MT-1, MT-2, MT-3 ve MT-4 olmak üzere başlıca 4 izoformu tanımlanmıştır (Kissling ve Kagi, 1978). Bazı MT izoformları çoklu izoformlar şeklinde bulunur. İnsanda MT-1'in çoklu izoformları (MT-1a, MT-1b, MT-1e, MT-1f, MT-1g, MT-1h, and MT-1x) ve MT-2'nin tek bir izoformu (MT-2a) belirlenmiştir (Richards ve ark., 1984, Heguy ve ark., 1986, Schmidt ve ark., 1985, Varshney ve ark., 1986, Karin ve Richards, 1982).

MT-1 ve MT-2 en iyi çalışılan ve en fazla sentezlenen MT izoformlarıdır. Bu yüzden MT'nin başlıca izoformları olarak kabul edilirler. Bu izoformlar MT-1'deki glisinin yerine MT-2'de 11. pozisyonda aspartatın gelmesiyle birbirinden ayrılmaktadır (Huang ve ark., 1977, Kissling ve Kagi, 1978, Kagi, 1991). Bu izoformlar hemen hemen tüm dokularda eksprese edilmektedir (Hamer, 1986, Searle ve ark., 1984, Yagle ve ark., 1985, Ghoshal ve Jacob, 2001).

MT-3 MT'nin beyin-spesifik izoformu olarak karakterize edilmiştir (Palmiter ve ark., 1992). MT-3 düşük miktarda pankreas ve barsakta da bulunmaktadır (Uchida ve

ark.,1991, Ebadi ve ark., 1995). MT-3 ayrıca hem metal bağlama özellikleri ve hem de sistein kalıntılarının sayısı ve şekli itibariyle MT-1 ve MT-2'ye benzerdir.

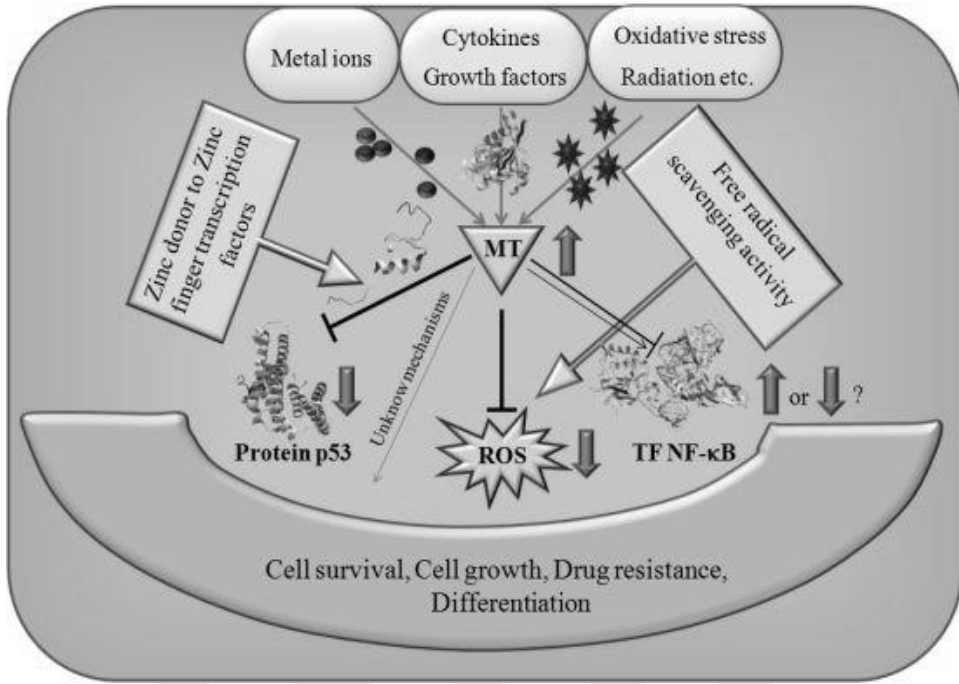
MT-4, MT-1 ve MT-2'den N- terminal bölgesinde 5. pozisyonunda glutamatın insersiyonu ile farklılık göstermektedir. MT-4 çok katlı yassı epitelden oluşan dokularda bulunmaktadır. Çinko metabolizmasını düzenleyerek çok katlı yassı epitelin farklılaşmasında rol oynamaktadır (Quaife ve ark.,1994).

MT-3 ve MT-4 izoformları daha sonra keşfedilmelerinden dolayı fonksiyonları hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. MT-1 ve MT-2'den farklı olarak ağır metaller ve MT'nin diğer indükleyicileri olan hormonlar ve lipopolisakkaritler tarafından uyarılmazlar. Sadece sentezlendikleri bölgeye spesifik sınırlı rolleri bulunmaktadır (Palmiter ve ark., 1992, Uchida ve ark., 1991). Dolayısıyla, MT'lerin biyolojik ve fizyolojik rolleri hakkında bugüne kadar ki çalışmaların çoğu MT-1 ve MT-2 izoformları üzerine odaklanmıştır.

2.4. MT Sentezi

MT sentezi ağır metaller, glukokortikoidler, oksidanlar, enflamatuar sitokinler, organik bileşikler, radyasyon ve duygusal stres gibi birçok farklı uyaran tarafından hızlı bir şekilde uyarılabilmektedir (Şekil 2.3).

Dört izoform içerisinde, MT-1 ve MT-2 hem sürekli olarak belli bir seviyede eksprese edilmekte ve hem de bu uyaranlar tarafından yüksek seviyede indüklenebilmektedir (Hamer, 1986, Kagi ve Kojima, 1987, Palmiter, 1987). MT-3 ve MT-4 izoformlarının sentezi MT-1 ve MT-2'nin indükleyicileri tarafından uyarılmamaktadır. MT'nin en yoğun şekilde sentezlendiği yerlerden birisi karaciğerdir. MT-1 ve MT-2'nin fetal karaciğerdeki seviyesi çok yüksektir. MT seviyeleri doğum sonrası dönem süresince hızlı bir şekilde azalır. Bununla birlikte, MT'nin ekspresyonu devam eder ve özellikle yetişkin dokularda çok iyi uyarılmaktadır (Andrews ve ark., 1984, Coyle ve ark., 1995, Oh ve ark., 1978). Karaciğer dışında, diğer hepatik olmayan hücreler, lenfosit, monosit, astrosit içeren dokular ve timus gibi lenfoid dokularda uygun uyarıcılar altında MT üretebilirler (Sone ve ark.,1988, Mesna ve ark., 1990, Leibbrandt ve Koropatnick, 1994, Sawada ve ark., 1994, Kramer ve ark., 1996, Coto ve ark., 1992).



Şekil 2.2 MT sentezine neden olan uyaranlar

Ağır metaller memelilerde MT'nin en yaygın ve en kuvvetli indükleyicisidir. MT'nin ağır metaller tarafından indüklenmesi ilk olarak kadmiyuma maruz bırakılan tavşanların karaciğerinde Piscator tarafından keşfedilmiştir (Piscator, 1964). Daha sonraki çalışmalarda, Zn, Cu, Cd, Hg, Ag, Au, Cr, Mg ve Ni gibi metal iyonlarına *in vivo* ya da *in vitro* maruz kalmanın da MT indüksiyonuna neden olduğu belirtilmiştir. Bu metal iyonları hem MT ile bağlanabilme ve hem de çoğu hücre ve dokularda MT sentezini indükleme özelliğine sahiptir (Brady, 1991, Hamer, 1986).

Oksidatif stres süperoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) toksik etkileri sonucunda ortaya çıkarak hücrel hasara neden olmaktadır. ROS'un toksik etkilerine karşı en önemli hücrel cevaplardan birisi, serbest radikallere duyarlı genler aracılığı ile MT'nin sentezidir. Menadion, adriamycin, bleomycin, cisplatin, paraquat ve dietil maleate gibi etkenler (Bauman ve ark., 1991, Bauman ve ark., 1992, Bauman ve ark., 1992, Bauman ve ark., 1992, Andrews, 2000) ya da X-ışınları ve UV ışınları gibi durumlar ROS oluşumuna neden olarak MT sentezine katkıda bulunurlar (Schrek ve Baeuerle, 1991).

Glukokortikoidler gibi endokrin faktörlerde memelilerde MT sentezine neden olmaktadır. Glukokortikoid hormonlarının dolaşımdaki seviyeleri kısıtlayıcı stres sonucunda (Hernandez ve ark., 2000) ve virüs enfeksiyonlarından sonra (Hermann ve ark., 1994) belirgin şekilde artmaktadır. Kısıtlayıcı stres aracılığı ile fare karaciğerinde MT-I ve MT-II sentezinin indüklenmesi, glukokortikoid hormon reseptörünün (GR) aktivasyonu ile sağlanmaktadır (Ghoshal ve ark., 1998). Glukokortikoidler MT gen düzenleyici bölgesinde bulunan GRE'ler (glucocorticoid response elements) aracılığı ile hem MT-I hem de MT-II gen ekspresyonunu artırır.

Enflamasyon ve enfeksiyon gibi farklı streslere maruz kalma, aktive olmuş T hücrelerinden ve makrofajlardan enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına neden olur. İnterleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) ve tümör nekrosis faktör- α (TNF- α) gibi enflamatuvar sitokinlerden bazılarının MT'nin güçlü indükleyicileri oldukları belirtilmiştir (Cousins ve Leinart, 1988, Grider ve ark., 1989, Sato ve ark., 1994, Andus ve ark., 1988, Cecilianı ve ark., 2002, Baumann ve ark., 1989).

MT'nin radyasyon etkisi ile indüklenmesi, radyasyonun kanser tedavisindeki potansiyel rolü nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Hem iyonize radyasyon (Koropatnick ve ark., 1989, Shirashi ve ark., 1989, Shibuya ve ark., 1995, Morcillo ve ark., 2000) hem de ultraviyole radyasyonu (Anstey ve ark., 1995, Jasani ve ark., 1993) MT sentezine neden olmaktadır. MT'nin radyasyon tarafından indüklenmesi serbest radikal oluşumu, sitokinlerin üretimi ve sinyal iletim kaskadının başlatılması gibi ikincil olaylar tarafından gerçekleşmektedir (Cai ve ark., 1999). MT'nin indüklenmesindeki temel mekanizmalardan birisi radyasyonun neden olduğu oksidatif hasardır (Stein ve ark., 1989).

2.5. MT'nin Hücredeki Lokalizasyonu

MT ilk defa karaciğerden sitoplazmik bir protein olarak izole edilmesine rağmen, aynı zamanda immünohistokimyasal metodlarla bazı hücrelerin nükleusunda da tespit edilmiştir (Ryden ve Deutsch, 1978, Bell, 1979, Panemangalore ve ark., 1983, Banerjee ve ark., 1982, Nartey ve ark., 1987). MT sentezlendikten sonra hücre içerisinde kalabileceği gibi, farklı hücresel olaylara bağlı olarak ya nükleusa ya da sitoplazmaya da lokalize olabilir. MT'nin hücre içi lokalizasyonu ile ilişkili hücresel olaylar hücre

proliferasyonu (Tsukijawa ve ark., 1991), gelişim (Nartey ve ark., 1987, Lau ve Cherian, 1998), farklılaşma (Cherian ve ark., 1999, Tsujikawa ve ark., 1994) ve tümörögenezdır (Cherian, 1994, Kondo ve ark., 1995, Zhang ve ark., 1996, Woo ve ark., 1997). MT'nin nükleus içersine translokasyonu geçici bir olay olup, hem MT'nin hem de çinkonun nükleus içindeki miktarları farklılaşmanın erken aşamalarında geçici olarak artmaktadır (Apostolava ve ark., 2000, Schmidt ve Beyersmann, 1999). İnsan fetal karaciğerinde MT hem nükleus hem de sitoplazmada bulunmasına rağmen, yetişkinlerin karaciğerinde sadece sitoplazmada bulunmaktadır (Nartey ve ark., 1987).

2.6. MT'nin Dokulardaki Dağılımı

2.6.1. Karaciğerde ve Böbrekte Metallotiyoninler

Karaciğer MT'lerin en fazla sentezlendiği organlardan birisidir. İz element ya da ağır metallerin bu organda detoksifiye edilmesi nedeniyle MT'lerin önemli roller üstlendikleri bir organ olarak tanımlanmıştır. Karaciğer savunmasında antioksidantlar, tokoferoller ve glutathione aktif rol oynamaktadır. Glutathione yapısına benzeyen ve potansiyel bir antioksidant olan MT karaciğer epitel hücrelerinin korunmasında önemli bir role sahiptir (Zhou ve ark.,2002). Karaciğerdeki MT sentezi metallerin sayısına, stres, hormon ve sitokinlerin oranına bağlıdır (Coyle ve ark.,2002, Sozmen ve ark., 2005). Karaciğer karbonhidrat metabolizmasının MT oranlarıyla değişebildiği belirtilmiştir. Glukagon, IL-1, cAMP ve çoğunlukla plazma, kemik iliği ve hepatositlerde çinko konsantrasyonunun artması karaciğer MT mRNA miktarının artmasına neden olmaktadır (Davis ve Cousins, 2000). Karaciğerde Cd'a bağlı olarak interlobüler ven ve merkezi vena etrafında MT sentezinin yükseldiği belirtilmiştir (Swiergosz-Kowalewska, 2001).

Alkol kullanımı vücutta süperoksit, hidroksil radikali, hidrojen peroksit gibi serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Kronik alkol alımının neden olduğu makroveziküler steatozis (karaciğer yağlanması), yangı ve nekroza bağlı olarak hepatosit mitokondriyonlarında ve granülsüz endoplazmik retikulumda fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. MT'ler prooksidant-antioksidant oranındaki değişiklikler sonucu ortaya çıkabilecek serbest radikalleri ortadan kaldırarak

lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve oksidatif stres sonucu ortaya çıkacak diğer fonksiyonel bozuklukları önlemektedir (Zhou ve ark.,2002). Anormal karaciğer bozukluklarında karaciğerde Cu ve MT düzeyinin artışıyla birlikte bakır tuzlarında bulunan hidrojen peroksit lipid, protein ve nükleik asitlere zarar vermektedir. Cu II içeren DNA zararlarına karşı Zn-MT birleşigi devreye girerek etkilerini azaltmaktadır. MT'lerin yetersizliği çinkonun da kullanılabilirliğini azalttığı için hasarların önüne geçilememektedir (Hahn ve ark., 2001).

MT kadmiyuma bağlı karaciğer toksisitesini önlemede ve kadmiyumun detoksifikasyonunda rol almasına rağmen, diğer taraftan böbrekte toksik etkiyi artırmaktadır. MT'e bağlanmış kadmiyum plazma dışına sızarak, karaciğerdeki depolama bölgelerinden ayrılmakta ve sonrasında böbrek tarafından alınmaktadır. Kadmiyuma bağlı böbrek toksisitesinin en önemli nedenlerinden birisi, kadmiyum-MT kompleksinin böbrekten ayrılması ve serbest kadmiyumun böbrek dokusuna salınmasıdır. MT-kadmiyum kompleksinden ayrılan serbest kadmiyum böbreğe salınır ve proksimal tübülden emilir. Bu serbest kadmiyum iyonları yeni sentezlenen metallothioneine bağlanır. Eğer böbrekteki metallothionein üretimi ve glutatyonla bağlı detoksifikasyon sistemi yeterli değilse serbest kadmiyum renal tübüllerde membran hasarına neden olur (Johri ve ark., 2010).

Hayvan deneylerinde uzun süreli kadmiyum maruziyeti veya tekrarlayan dozlarda kadmiyum-MT kompleksi kullanımı, kadmiyumun hücre membranına bağlanması, proksimal tübüllerde apoptoza neden olmakta ve idrardan kalsiyum ve protein atılımının artması ile sonuçlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda böbrekte yeterli MT sentezi olduğunda membran hasarının oluşmadığı, hayvan deneylerinde çinko kullanımının renal metallothionein yapımını artırarak kadmiyum- MT kompleksinin yol açtığı böbrek hasarını önleyebileceği gösterilmiştir (J.Liu,1996).

MT'ler ile bir kompleks yaparak oksijen serbest radikallerin kötü etkilerine karşı bu hücrelerin korunmasını sağlamaktadır (Sprietsma ve Schuitemaker, 1994).

2.6.3.Barsaklarda Metallotiyoninler

MT'ler barsaklarda çinkonun emilimi ve salınımını regüle etmektedir. Barsaklardan çinko salınımının büyük miktarda azalmasına, karaciğerde çinkonun tutulmasına, vücuttan çinko kaybının engellenmesine ve alımının artmasına neden olduğu belirtilmiştir (Philcox ve ark., 2000). Barsak lümeninde yüksek konsantrasyonda çinkonun varlığı ve açlık, mukozal hücrelerde MT sentezinin başlamasına sebep olurken, normal diyetle bulunan çinko MT sentezini etkilememektedir. Aşırı çinko içeren beslenmelerde MT çinko emilimini sınırlandırmakla birlikte çinko emilim ve konsantrasyonu normale göre daha yüksek miktarda bulunmaktadır. Barsak duvarında çinko emilimi için gerekli olan MT miktarının ne kadar olacağı hala tartışma konusudur. MT'nin bazal düzeyi, taşıyıcı proteinler (ZnT1 ile ZnT4) aracılığıyla fazla çinkoyu ya da tamamının emilimini sağlayarak ayarlamaktadır. ZnT1 dokularda geniş yayılım göstermekle birlikte, özellikle barsaklardaki mukozal ve yüzey epitel hücrelerinde bulunduğu bilinmektedir (Coyle ve ark., 2002). Yangıya bağlı barsak hastalığı (IBD); periferik monosit ve barsak makrofajlarının serbest radikallerce hasar görmeleri sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. Barsak yaralanmaları sonucu ortaya çıkan oksijene bağlı serbest radikaller MT'ler tarafından önlenmesi bakımından bu proteinlerin barsakların histolojik yapıları için ne kadar önemli olduğunu ortaya çıkarmaktadır. (Brüwer ark., 2001).

2.7. Metallotiyoninlerin Fonksiyonları

2.7.1. Esansiyel Metallerin Homeostazisindeki Roller

Apo-MT (MT'nin metal içermeyen formu), serbest sülfidril gruplarının çinkoya (Zn) olan yüksek afinitesi nedeniyle iyi bir Zn bağlayıcısıdır. Bunun yanı sıra, birtakım değişim tepkimelerinde Zn, MT'den başka proteinlere aktarılabilir. Gelişim ve protein sentezi sırasında, çeşitli enzimler ile transkripsiyon faktörleri için Zn vericisi olarak

görev yapması nedeniyle MT'in Zn homeostasisi için yaşamsal bir öneme sahip olduğuna inanılmaktadır (Klaassen ve ark., 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, GSH ve GSSG (redükte ve okside glutatyon) gibi redoks moleküllerinin de Zn bağlı MT'den (Zn-MT) Zn salınımını düzenlediğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda, tiolat ligandlarının oksidasyonu proteinden metal salınımına neden olmaktadır (Vasak, 2005). Normalden fazla MT üreten transgenik farelerin Zn eksikliğine karşı daha dirençli oldukları belirtilmiştir (Dalton ve ark. 1996).

Bakır (Cu) metali Cu/Zn süperoksit dismutaz ve sitokrom C oksidaz gibi birçok enzimin yapısal ve katalitik özellikleri için yaşamsal bir öneme sahiptir. Özellikle karaciğerde bakır birikimine neden olan Wilson hastalığını taşıyan bireyler ve hayvansal modeller üzerinde yapılan araştırmalar, MT'in karaciğerdeki en önemli Cu bağlayıcı protein olduğunu ortaya koymuştur. Bakırın yüksek dozlarında oluşan zararlı etkilere karşı MT'lerin koruyucu etki gösterdikleri belirtilmiştir. Fetusta Cu eksikliğine neden olan Menkes hastalığına sahip bireyler ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda ise MT'in yaşam süresinin uzamasına olumlu etki ettiği belirlenmiştir. Bu sayede MT'nin Cu'nun vücuttaki normal biyolojik işlevini düzenleyici rol oynadığı sonucuna varılmıştır (Klaassen ve ark., 1999, Nartey ve ark., 1987, Suzuki ve ark., 2002).

2.7.2. MT'lerin Metal Detoksifikasyonundaki Önemi

Yapılan pek çok araştırmada, metallerin toksik olmayan düşük dozlarına maruz kalmanın daha yüksek toksik dozlarına karşı bir tolerans sağladığı belirtilmiştir. Sıçanlarda düşük dozda Cd verilmesinden sonra Cd'un yüksek konsantrasyonuna karşı oluşan toleransın karaciğer MT konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu anlaşılmıştır (Klaassen ve Liu 1997). Hayvana düşük dozda verilen Cd, Zn gibi metaller MT sentezini indüklemektedir. Bazı metaller MT'lere bağlanıp sentezini artırırken, bazılarının sentezini artırdığı fakat MT ile *in vivo* olarak bağlanamadıkları belirtilmiştir. Kurşun gibi bazı metallerin ise, MT'lere bağlanma ve indüklemenin yanı sıra hücre içerisinde detoksifikasyonlarını sağlayan başka proteinlere de bağlandıkları veya sentezlerini artırdıkları bilinmektedir (Miles ve ark. 2000). Serbest haldeki çinkonun mikrozomal oksidasyonları önleyerek lipid peroksidasyonunu engellediği ve biyolojik membranların stabilitesini sağladığı bilinmektedir. MT'ler Zn ile beraber metallerin

hücre içersine alınımını azaltarak metallerin toksik etkilerini azaltabilirler (Cagen ve Klaassen 1979). Değişik metallerin toksik dozlarının kültürdeki fare hepatosit hücreleri üzerine uygulandığı bir çalışmada, en fazla indüklenmenin MT-I genlerinde gerçekleştiği izlenmiştir. Bu nedenle özellikle MT-I metal toksisitesinin önlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir (Durnam ve Palmiter 1984).

2.7.3. Metalloproteinlerin Antioksidant Rolü

Yukarıda belirtilen işlevlerine ilave olarak, MT aynı zamanda potansiyel bir antioksidan ya da serbest radikal temizleyici olarak da görev yapmaktadır. Metaller tarafından indüklenmelerinin yanı sıra MT sentezi etanol, parakuat, tert-butil hidroperoksit gibi kimyasallar, ağır egzersiz ve soğuğa maruz kalma gibi nedenlerle de artabilmektedir. MT sentezinin artmasıyla hücrelerin serbest radikal hasarına karşı duyarlılıklarının azaldığı belirtilmiştir (Ghoshal ve ark. 1998). MT'lerin hidroksil radikalleri için ilk hedef moleküller olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra *in vitro* çalışmalar MT'lerin hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve peroksit radikali ile de reaksiyona girebildikleri belirtilmiştir (Miles ve ark. 2000). HL-60 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, H₂O₂'nin MT'lerdeki tiol gruplarına karşı ilgisinin, GSH'daki sülfidril gruplarına oranla daha fazla olduğu anlaşılmaktadır (Quesada ve ark.1996). MT'deki bulunan tüm tiol grupları metallere bağlansa bile, molekülün metallere ve reaktif oksijen türevlerine karşı reaktivitesi devam etmektedir (Kondoh ve ark 2003, Min ve ark 2005, You ve ark. 2002). Irato ve ark. (2001) çalışmalarında makrofajlarda kimyasal olarak stimüle edilen süperoksit anyonu üretimine karşı Cd ile artan MT'in etkilerini araştırmış, MT indüklemesi yapılan hücrelerde süperoksit anyonunun miktarının azaldığını, bununla birlikte MT düzeyinde de azalma olduğu belirtilmiştir.

2.7.4. Metallothionein ve Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, strese karşı bir cevap olarak sentezi belirgin şekilde artan ve önemli fizyolojik rolleri olan metalloproteinin, bağışıklık sistemi üzerinde hem olumlu ve hem de olumsuz yönde değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir (Lynes ve ark., 1990, Youn ve Lynes, 1999, Youn ve ark., 1995). MT'nin özellikle T-bağımlı

antijenlere karşı humoral bağışıklığı (antikor-aracılı bağışıklık) baskıladığı ve antikor miktarını azalttığı tespit edilmiştir. T-bağımlı antijenlere karşı antikor cevabındaki bu azalmanın, hem ekzojen MT (dışarıdan verilen) hem de endojen MT (organizmanın kendisi tarafından sentezlenen) ile gerçekleştiği gözlemlenmiştir. MT proteinine karşı bir anti-MT monoklonal antikorunun (UC1MT) kullanılması durumunda, T-bağımlı antijene-spesifik antikor üretiminin belirgin şekilde arttığı görülmüştür (Lynes ve ark., 1993, Canpolat ve Lynes, 2001). Bu çalışmalardan elde edilen verilere dayanılarak, özellikle toksik maddelere maruz kalınması durumunda sentezi belirgin şekilde artan MT'nin UC1MT antikoru ile bloke edilmesinin, immün cevabı arttırmaya yönelik önemli bir terapötik hedef olduğu sonucuna varılmıştır.

2.8. MT'nin Biyolojik Materyallerde Belirlenmesi

Toksikolojik önemi nedeniyle metallerin dokularda ve diğer biyolojik materyallerde belirlemek önem taşımaktadır. Günümüzde çevre ile ilgili yapılan araştırmalarda üzerinde durulan önemli konulardan birisi, çevresel toksik maddelere maruz kalan insanlar için kullanılmak üzere zararlı olmayan tarama yöntemleri geliştirmektir. MT çevresel stresörlere ve kimyasal maddelere maruz kalma sonucunda etkin bir şekilde indüklenmektedir. Bu şekilde indüklenen MT, toksik maddelere maruziyetin belirlenmesinde faydalı bir biyomarker olarak kullanılabilir. Kan örnekleri insanlardan kolaylıkla elde edilebildiği için, periferik kan lökositleri çevresel toksiklere maruziyetin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kültürü yapılmış periferik kan lökositlerinde ağır metallerle cevap olarak belirlenebilir miktarlarda MT sentezi uyarılmaktadır (Yamada ve Koizumi, 1991, Pauwels ve ark., 1994, Sullivan et al., 1998). Kadmiyum ve çinko gibi ağır metallerin, MT seviyeleri üzerindeki etkileri insandan elde edilen periferik kan lökositlerinde flow sitometri ve mRNA analizi yöntemleri ile belirlenmiştir. İnsandan alınan kan örnekleri gittikçe artan CdCl₂ konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve MT seviyeleri bir anti-MT monoklonal antikoru kullanılarak flow sitometri ile belirlenmiştir. İnsan periferik kan lökositlerindeki MT seviyelerinde hem konsantrasyon hem de zamana bağlı artışlar tespit edilmiştir (Yurkow ve Makhijani, 1998). İnsan periferik kanı lökosit popülasyonları açısından incelendiği zaman özellikle monositlerin, CdCl₂ (3 µM) ve ZnCl₂'ye (50 µM) karşı lenfosit ve granülositlerden daha duyarlı oldukları görülmüştür.

Monositlerde CdCl_2 'nin en düşük dozlarında (0.1 μM) MT seviyelerinde belirgin artışlar tespit edilmiştir. Cd ile muamele edilen lenfositlerde de MT seviyelerinde belirgin artışlar görülmüş, fakat aynı etki Zn ile görülmemiştir (Yurkow ve DeCoste, 1999). Pil fabrikalarında kadmiyuma maruz kalan işçilerin lenfositlerinde de MT seviyelerinde artışlar tespit edilmiştir (Ganguly ve ark., 1996).

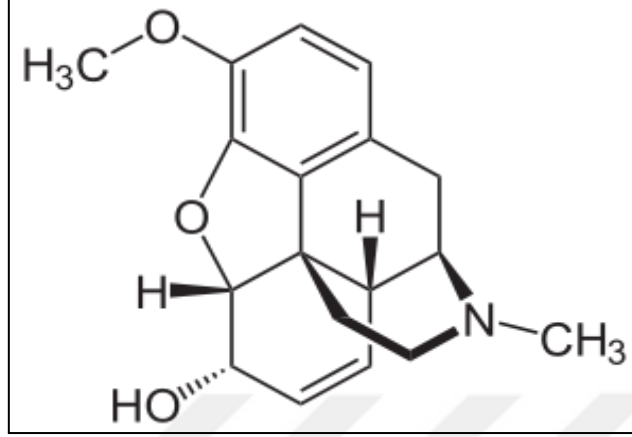
Hücrel MT seviyelerinin flow sitometrik belirlenmesi dışında, lenfositlerde MT gen ekspresyonunun ölçülmesi alternatif bir yöntem olarak görülmektedir. Sıçanların hem akut hem de kronik olarak *in vivo* CdCl_2 'e maruziyeti, karaciğer ve böbreğin yanısıra hem splenik hem de periferik lenfositlerde MT gen ekspresyonunda artışlara neden olmuştur (Cosma ve ark., 1991). MT mRNA seviyelerinde doza bağlı artışlar aynı zamanda CdSO_4 ile kültürü yapılmış periferik kan lökositlerinde de gözlemlenmiştir (Yamada ve Koizumi, 2001). Bütün bu çalışmalar ağır metale maruziyetin tespit edilmesinde MT'nin güçlü bir marker olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

MT'nin ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile MT-spesifik antikorlar kullanılarak ölçülmesi, MT'nin belirlenmesinde son yıllarda kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir. Farelerde üretilen klon E9 ve klon UC1MT gibi anti-MT monoklonal antikorları kullanılarak MT'nin biyolojik sıvılardaki (plazma ve idrar gibi) ve dokulardaki (karaciğer, beyin, böbrek) konsantrasyonlarını belirlemek mümkündür (Milnerowicz ve Bizon, 2010). MT'nin biyolojik sıvılardaki konsantrasyonunu belirlemek için iki farklı ELISA yöntemi kullanılmaktadır: kompetitif ELISA ve indirek ELISA. Monoklonal fare anti-MT antikorları ve tavşan karaciğerden izole edilen MT standartları (MT-I ve MT-II) kullanılarak her iki ELISA yöntemiyle de MT konsantrasyonu etkin bir şekilde belirlenebilmekte ve MT dokularda 0.4 ng seviyesine kadar tespit edilebilmektedir (Apostolova ve ark., 1998, Ying ve ark., 2000, Pankhurst ve ark., 2012).

2.9. Kodein

Kodein (diğer adıyla 3-metilmorfin) haşhaştan (*Papavaer somniferum*) doğal olarak elde edilebilen ya da morfinin metilasyonu ile de hazırlanabilen bir alkaloidtir. 1833

yılında Fransa’da Jean-Pierre Robiquet tarafından izole edilmiş olup, %3’lük oranı ile morfinden sonra haşhaşa en fazla bulunan alkaloidlerden birisidir (Reynolds, 1996).

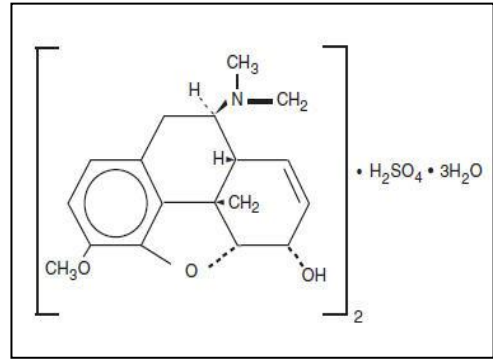
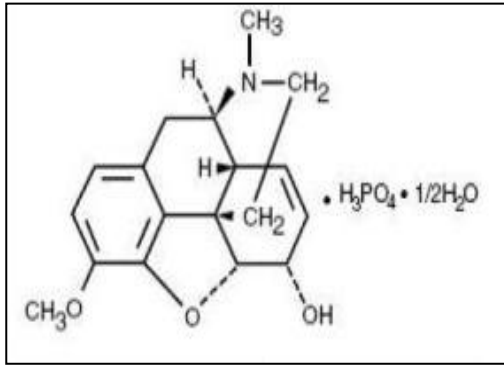


Şekil 2.4 Kodeinin kimyasal yapısı

Kimyasal yapısı $C_{18}H_{21}NO_3$, molekül ağırlığı: 299,36424 g/mol’dür. Renksiz beyaz kristaller ya da toz şeklinde bulunur. Suda %1 oranında, alkol ve kloroformda ise daha yüksek oranda erimektedir.

Kodein analjezik (ağrı kesici), antitussif (öksürük dindirici) ve antidiyareik (ishal önleyici) özellikleri nedeniyle tıpta tedavi amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Daha etkili bir analjezik olmasına rağmen, bağımlılık yapma özelliği olan morfinle karşılaştırıldığında, kodein daha zayıf analjezik etkileri olan fakat bağımlılık yapma özelliği az olan bir alkaloidtir (Armstrong ve Cozza, 2003, Schroeder ve Fahey, 2001). Bu yüzden kodein diğer ağrı kesicilere (parasetamol, aspirin ve ibuprofen gibi) katılarak daha kuvvetli etki elde etmek için de kullanılmaktadır.

Saf olarak kodein pür şeklinde elde edilen kodeine, fosfat ve sülfat eklenmesi ile kodein tuzları olarak bilinen kodein fosfat ve kodein sülfat formları elde edilmektedir. Kodein fosfat ya da sülfat vücut tarafından daha kolay absorbe edilmeleri nedeniyle tıpta tedavi amaçlı olarak (oral tablet ya da parenteral enjeksiyon şeklinde) daha fazla tercih edilmektedir.



Şekil 2.5 Kodein fosfat ve kodein sülfatın kimyasal yapısı

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada 64 adet 20-25 gr ağırlığında 8 haftalık inbred BALB-c erkek fareler kullanılmıştır. Fareler Ankara'daki Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı tarafından veteriner kontrolünde Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'na getirilmiştir. Fareler oda sıcaklığının 21°C olduğu ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusunun sağlandığı odalarda dört fareden oluşan gruplar şeklinde barındırılmış ve standart laboratuvar diyeti ve normal musluk suyu ile beslenmişlerdir. Deney hayvanları üzerinde yapılacak bütün işlemler için Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) gerekli izinler alınmıştır.

3.1.2. Haşhaş Alkaloidleri

Kodein (3-metoksi-6-hidroksi-4,5-epoksi-17-metilmorfinan-7-en), kodein sülfat ve kodein fosfat Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü'nün özel izni ve Toprak Mahsülleri Ofisi'nin aracılığı ile Afyon Bolvadin'deki Haşhaş Alkaloidleri Fabrikası'ndan satın alınmıştır.

3.1.3. Antikorlar

ELISA deneylerinde primer antikor olarak anti-MT monoklonal antikor UC1MT (Enzo Life Sciences) ve sekonder antikor olarak da alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş goat anti-mouse Ig (H+L) (Southern Biotechnology) antikor kullanılmıştır.

3.1.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
Metallotiyonin	Enzo Life Sciences
NaCl (sodyum klorür)	Sigma
KCl (potasyum klorür)	Merck
NaH ₂ PO ₄ (sodyum dihidrojen fosfat)	Merck
KH ₂ PO ₄ (potasyum dihidrojen fosfat)	Merck
Na ₂ CO ₃ (sodyum karbonat)	Merck
NaN ₃ (sodyum azit)	Sigma
MgCl ₂ (magnezyum klorür)	Merck
Diethanolamin (DEA)	Sigma
Tween 20	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Triton-X	Sigma
BSA (bovine serum albumini)	Sigma
Proteaz inhibitör tabletleri	Roche
PNPP (para nitrofenil fosfat) tabletleri	Sigma
BCA (bicinchoninic acid assay) protein kiti	Pierce

3.1.5. Kullanılan Diğer Malzemeler

Malzemenin Adı	Firma
Disseksiyon aletleri	Tıp Kim San
Vida kapaklı santrifüj tüpleri (15 ml)	Corning costar
Vida kapaklı santrifüj tüpleri (50 ml)	Corning costar
Eppendorf Tüpleri (1.5 ml)	İsolab
Fare kulak delme aleti	İnterlab
Heparinsiz hematokrit kapiler tüpler	İsolab
Steril enjektör (1 ml)	İsolab

Serolojik pipetler (5 ml)	Corning costar
Serolojik pipetler (10 ml)	Corning costar
Cam şişeler (100 ml, 500 ml, 1000 ml)	Isolab
Pipet ucu (2-10 µl)	Axygen
Pipet ucu (20-200 µl)	Axygen
Pipet ucu (1000 µl)	Axygen
96 kuyucuklu düz tabanlı mikrolakalar	Corning costar, Nunc
Otomatik pipetler (2-20 µl, 20-200 µl, 1000 µl)	Brand, Rainin
8 kanallı otomatik pipet	Brand, Rainin
Parafilm	İnterlab
ELİSA plate sealers	Pierce

3.1.6. Kullanılan Cihazlar

Malzemenin Adı	Firma
Ultra saf su cihazı	Milipore Direct-Q 3 UV
Buz makinesi	Scotsman AF80
Kaba Terazı	Acculab
Hassas terazı	Denver Instrument
Vorteks	Hettich
pH metre	Hanna HI 2211
İnkübatör	Nuaire AutoFlow NU-4750
Santrifüj	Hettich Mikro 200R
Buzdolabı	Vestel
-20°C derin dondurucu	Vestel
-80°C derin dondurucu	New Brunswick Scientific
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific
Otoklav	Hirayama HMC
Sıvı azot tankı	Locator 4 Thermolyne Dewars

3.2. YÖNTEM

Çalışmamız kodein ve kodein tuzları ile enjekte edilen farelerden alınan serum ve doku örneklerinde MT varlığının ELISA yöntemiyle tespitine dayanmaktadır. Bu amaçla, ilk aşamada farelerden elde edilen dokulardan total protein izolasyonu yapılmış, ardından izole edilen total protein içerisinde MT varlığının belirlenebilmesi için MT standartlarının kullanıldığı ELISA testi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Kullanılan Solüsyonlar ve Solüsyonların Hazırlanması

Steril salin (NaCl) solüsyonu: % 0.85'lik NaCl solüsyonu hazırlamak için, 0.85 g NaCl 100 ml distile suyla cam şişede çözdürüldükten sonra ağzı kapatılarak otoklavda steril edildi ve soğutmaya bırakıldı.

Lizis çözeltisi: İlk olarak 300 mM NaCl ve 10 mM Tris-HCl'den oluşan çözelti hazırlanarak pH 7.4'e ayarlandı. Daha sonra çözeltiye 0.5 mM MgCl₂ ve 0.5% Triton X-100 eklendi. Doku lizatları hazırlanırken her 10 ml lizat çözeltisi içerisinde 1 tane proteaz inhibitör kokteyl tableti eklenip çözdürüldü.

PBS (Phosphate Buffered Saline) solüsyonu: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄, 1.15 g Na₂HPO₄ 1 litre distile suda çözdürülüp pH 7.2'ye ayarlandı.

Yıkama çözeltisi (PBS - Tween 20 ve NaN₃): ELISA testinde yıkama işlemlerinde kullanılmak üzere, yukarıda hazırlanan PBS çözeltisine % 0.02 NaN₃ ve % 0.05 Tween 20 eklenerek hazırlandı.

Kaplama (Coating) çözeltisi: 1.57 g NaCO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₂ 1 litre distile suda çözdürülerek pH 9.6 – 9.8'e ayarlandı.

Bloklama (Blocking) çözeltisi: %2'lik BSA çözeltisi hazırlandı. Kaplama çözeltisi içerisinde %2 BSA çözdürülerek hazırlandı.

Substrat çözeltisi: 0.02 g NaN₃ ve 0.01 g MgCl₂.6H₂O bir miktar distile suda çözdürüldü ve 9.7 ml diethanolamin (DEA) eklendi. Volüm distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve pH 9.8'e ayarlandı.

Binding çözeltisi: 2.5 g BSA 1 litre PBS-Tween 20 ve NaN_3 çözeltisi içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

3.2.2. Serum Örneklerinin Elde Edilmesi

Deney hayvanlarından hem enjeksiyon öncesi hem de sonrasında göz çukuru (orbital sinüs) veninden mikrohematokrit kapiler tüpler aracılığı ile 200-300 μl kadar kan alındı. Alınan kanlar 1 saat oda sıcaklığında ardından da 1 saat 4 °C'de bekletildi. Daha sonra 4 °C'de, 3000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri tüplere aktarılarak -80°C'de test edilinceye kadar saklandı.

3.2.3. Kodein, Kodein Sülfat ve Kodein Fosfatın Hazırlanması ve Enjeksiyonlar

Farelere enjekte edilecek kodein ve kodein tuzlarının dozunu belirlemek için ilk olarak farelerin ağırlıkları belirlendi. Dozlar farelerin canlı ağırlıklarına göre 10 mg/kg ve 20 mg/kg olacak şekilde steril % 0.85'lik salin solüsyonu içerisinde hazırlandı. Enjeksiyonlar subkutan (deri altına) enjeksiyon yöntemi ile yapıldı. Aşağıda belirtilen şekilde 3 saat aralıklarla 3 kez tekrarlandı.

Grup 1: Kontrol grubu – Herhangi bir madde enjekte edilmedi.

Grup 2: Salin grubu – % 0.85'lik steril fizyolojik salin (NaCl) solüsyonu enjekte edildi.

Grup 3: Salin+Kodein Pür grubu 1 – 10 mg/kg kodein pür canlı ağırlığına göre % 0.85'lik salin solusyonu içerisinde hazırlanarak enjekte edildi.

Grup 4: Salin+Kodein Sülfat grubu 1 – 10 mg/kg kodein sülfat canlı ağırlığına göre % 0.85'lik salin solusyonu içerisinde hazırlanarak enjekte edildi.

Grup 5: Salin+Kodein Fosfat grubu 1 – 10 mg/kg kodein fosfat canlı ağırlığına göre % 0.85'lik salin solusyonu içerisinde hazırlanarak enjekte edildi.

Grup 6: Salin+Kodein Pür grubu 2 – 20 mg/kg kodein pür canlı ağırlığına göre % 0.85’lik salin solusyonu içerisinde hazırlanarak enjekte edildi.

Grup 7: Salin+Kodein Sülfat grubu 2 – 20 mg/kg kodein sülfat canlı ağırlığına göre % 0.85’lik salin solusyonu içerisinde hazırlanarak enjekte edildi.

Grup 8: Salin+Kodein Fosfat grubu 2 – 20 mg/kg kodein fosfat canlı ağırlığına göre % 0.85’lik salin solusyonu içerisinde hazırlanarak enjekte edildi.

3.2.4. Doku İzolasyonu

Deney hayvanları son enjeksiyondan 3 saat sonra eksanguinasyon yöntemi ile ötenazi yapılarak öldürüldü. Farelerden disseksiyon yöntemiyle böbrek ve karaciğer alındı. Alınan dokular etiketlenmiş eppendorf tüplerine konulduktan hemen sonra -80°C’de donduruldu.

3.2.5. Doku Lizatlarının Hazırlanması

Dokular -80°C’den çıkarıldıktan sonra buz üzerinde küçük parçalara ayrıldı. Dokular PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra eppendorf tüplerine konuldu. 1 gram doku yaklaşık 3 ml lizis çözeltisi (300 mM NaCl, 10 Mm Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mM MgCl₂, proteaz inhibitor tabletleri ve 0.5% Triton X-100) içerisinde ezildikten sonra 1 saat buz içerisinde, her 10 dakikada bir vortekslenerek inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler 4 °C, 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar eppendorf tüplerine transfer edilerek -80°C’de saklandı.

3.2.6. Doku Lizatlarında Protein Miktarının Belirlenmesi

Kodein ve kodein tuzları ile enjekte edilen farelerde MT miktarının belirlenebilmesi için, öncelikle dokulardaki toplam protein miktarının bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle toplam protein miktarını tayin edebilmek için BCA (bicinchoninic acid assay)

kiti kullanıldı. Analize başlamadan önce, daha önce hazırlanan lizatlar -80°C 'den çıkartılarak buza konuldu. Standart eğriyi oluşturmak üzere 2 mg/ml konsantrasyona sahip BSA çözeltisinden sırasıyla 1 – 0.5 - 0.25 - 0.125 - 0.062 mg/ml olacak şekilde seri dilüsyon yöntemiyle standart numuneler hazırlandı. Standartlar her aşamada vortekslendi ve tüm işlemler buz üstünde gerçekleştirildi. Buzda çözdürülen doku lizatlarının PBS çözeltisi içerisinde 1/20 dilüsyonları hazırlandı ve vortekslendi. Standart numuneler ve doku lizatları mikrolaka üzerindeki kuyucuklara (her standart ve örnek için üç kuyucuk kullanıldı) 25 µl olacak şekilde pipetlendi. 50:1 oranında Reagent A; Reagent B çözeltisi hazırlandı ve tüm kuyucuklara 200 µl eklendi. Hazırlanan mikrolakanın üzeri kapatılarak 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübatörden çıkarılan mikrolaka ELISA cihazında 562 nm'de okutuldu. Deney sonucunda standartlar için elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu ve doku lizatlarının protein konsantrasyonları belirlendi.

3.2.7. MT-UC1MT ELISA

Bu çalışmamızda dokularda MT miktarını belirlemek için bir anti-MT monoklonal antikor olan UC1MT kullanılmıştır. Bu antikorun hem deneylerimizde kullanacağımız MT ile bağlanabilirliğini test etmek, hem de optimal dilüsyonunu belirlemek amacıyla farklı MT konsantrasyonlarının ve UC1MT dilüsyonlarının kullanıldığı MT-ELISA testi yapılmıştır. Bu deneyde MT-1'in 5 µg/ml ve 10 µg/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyonu hazırlanmış ve mikrolakadaki kuyucuklara 100 µl olacak şekilde eklenmiştir. Mikrolaka 4°C 'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS (Tween 20 + NaN_3) ile yıkama işleminden sonra spesifik olmayan bağlanmayı bloke etmek için 2% BSA ile 37°C 'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda mikrolaka tekrar yıkandıktan sonra, UC1MT antikorunun seri dilüsyonları (1/160 1/5120) hazırlanarak uygun kuyucuklara eklendi ve 1 saat 37°C 'de inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra mikrolaka alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş goat anti-mouse Ig (H+L)'nin 1/500'lük dilüsyonu ile inkübe edildi. PNPP tabletleri substrat çözeltisi içerisinde çözdürüldükten sonra, her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Mikrolaka ELISA okuyucusuna konularak 405 nm'de okutuldu ve kinetik renk değişimine bağlı absorbans değerleri belirlendi.

3.2.8. Kompetitif ELISA

Bu çalışmada kompetitif ELISA, farelerden izole edilen dokularda MT miktarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Kompetitif ELISA yönteminde, MT'nin bilinen konsantrasyonlarından hazırlanan standart serileri ve MT içerdiği düşünülen numuneler (serum ve doku örnekleri) öncelikli olarak anti-MT antikoruna ile karıştırılır. Sonrasında, MT ile kaplanmış kuyucuklara bu standartlar ve numuneler eklenir ve bunların mikrolakadaki MT ile bağlanma derecelerine bakılır. Numunedeki MT miktarı ne kadar fazla olursa, antikorun mikrolakadaki MT ile bağlanması o ölçüde az olacak ve daha zayıf sinyal alınacaktır. Kompetitif ELISA için aşağıdaki yöntem (Pankhurst ve ark. tarafından kullanılan yöntem değiştirilerek) kullanılmıştır. Öncelikli olarak, mikrolakalar kaplama çözeltisi içerisinde hazırlanan 100 ng/ml MT ile kaplandı ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Mikrolaka 3 kez PBS (Tween 20 ve NaN₃) çözeltisi ile yıkandı. Bloklama aşamasında her bir kuyucuğa %2 BSA ile hazırlanan bloklama çözeltisinden 150 µl eklendi. Mikrolakanın üzeri kapatılıp 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.001 µg/ml, 0.001 µg/ml ve 0.0001 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde MT standartları hazırlandı. Doku lizatlarının konsantrasyonları da 3 mg/ml olacak şekilde ayarlandı. UC1MT antikorunun bağlama çözeltisi içerisinde 1/5000'lik dilüsyonu hazırlandı ve hem standartlara hem de örneklerle 1:1 oranında eklendi. 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bloklama aşaması tamamlandıktan sonra mikrolaka yıkandı ve hazırladığımız standart ve dokul lizatları 50 µl olacak şekilde kuyucuklara pipetlendi. 37 °C'de 1.5 saat inkübasyondan sonra goat anti-mouse Ig-AP antikorunun 1/5000 dilüsyonu bağlama çözeltisi ile hazırlanıp bütün kuyucuklara 50 µl olacak şekilde pipetlendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Son yıkama işleminden sonra 5 ml substrat çözeltisinde 1 adet PNPP tableti çözündürüldü ve her bir kuyucuğa 50 µl olacak şekilde pipetlendi. Mikrolaka oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat inkübe edildi ve renk değişimi oluşmaya başladıktan sonra 405 nm dalga boyunda okutuldu.

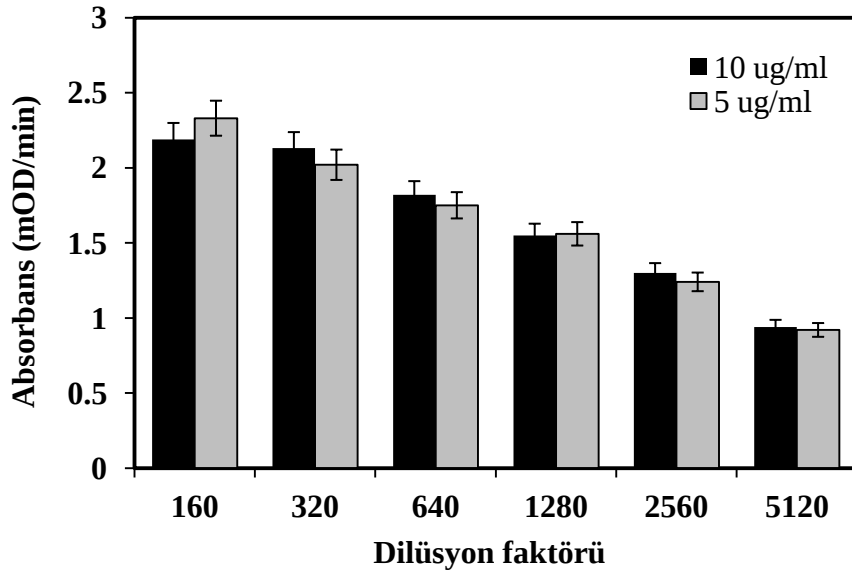
3.2.9. İstatistiksel Yöntem

İstatistikler için IBM SPSS Statistics 20 ve SigmaPlot 11.0 programları kullanılmıştır. Çalışmada gruplar arasındaki farklılık varians analizi (ANOVA) ile, farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığı ise Duncan testi ile belirlenmiştir.



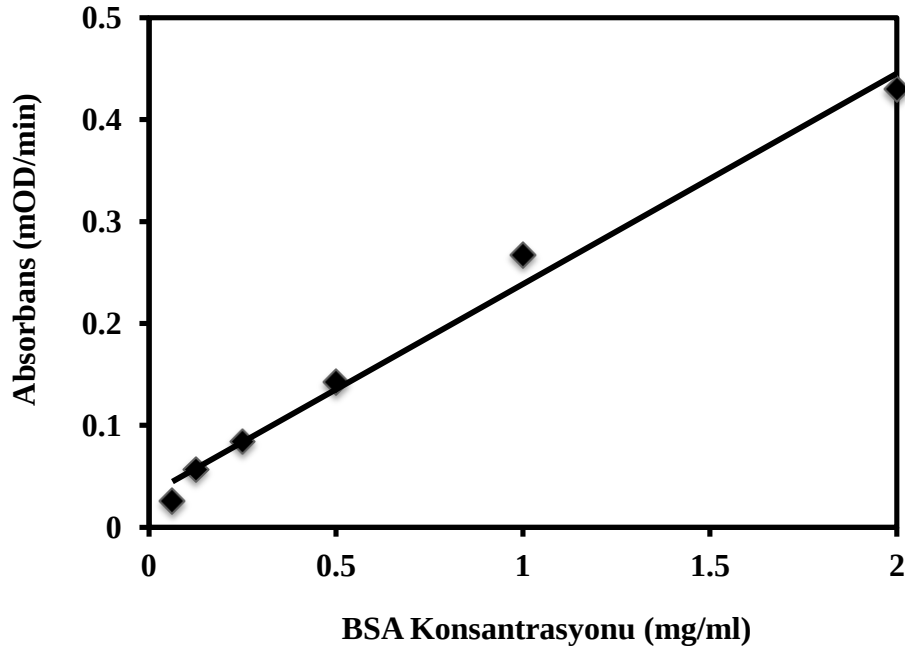
4. BULGULAR

Bu çalışmada, kodein, kodein sülfat ve kodein fosfat ile enjekte edilen farelerden alınan doku örneklerinde (karaciğer ve böbrek) MT proteininin varlığı ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir. MT'nin varlığını ELISA yöntemiyle belirlemek için UC1MT antikoru kullanılmıştır. UC1MT antikoru MT'nin özellikle en fazla sentezlenen izoformlarına (MT-1 ve MT-2) karşı spesifik bir antikor olup, bu antikor ile daha önce yapılan çalışmalarda MT'nin her iki formundan oluşan ve tavşan karaciğerinden elde edilen MT1-MT2 kullanılmıştır (Lynes ve ark., 1993). Bu MT formunun üretimden kalkması nedeniyle bu çalışmada sadece tek bir izoforma (MT-1) spesifik olarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla, UC1MT antikorunun hem deneylerimizde kullanacağımız MT-1 ile olan reaktivitesini, hem de uygun dilüsyonunu belirlemek için ilk olarak MT-ELISA deneyi yapılmıştır. Test edilen iki farklı antijen konsantrasyonuna (10 µg/ml ve 5 µg/ml MT-2) karşı UC1MT antikorunun güçlü bir reaktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 UC1MT antikorunun MT-1 ile olan reaktivitesi. İndirekt ELISA yöntemiyle iki farklı MT konsantrasyonuna karşı, anti-MT monoklonal antikor UC1MT'nin farklı dilüsyonları hazırlanarak reaktivite test edilmiştir.

MT miktarını belirleyebilmek için, kodein ve kodein tuzları ile enjekte edilen farelerden karaciğer ve böbrek dokuları izole edilmiş ve ilk olarak bu dokulardaki toplam protein miktarı BCA yöntemiyle tespit edilmiştir. Absorbans değerleri esas alınarak Şekil 4.2'de gösterilen standart eğri grafiği oluşturulmuştur.



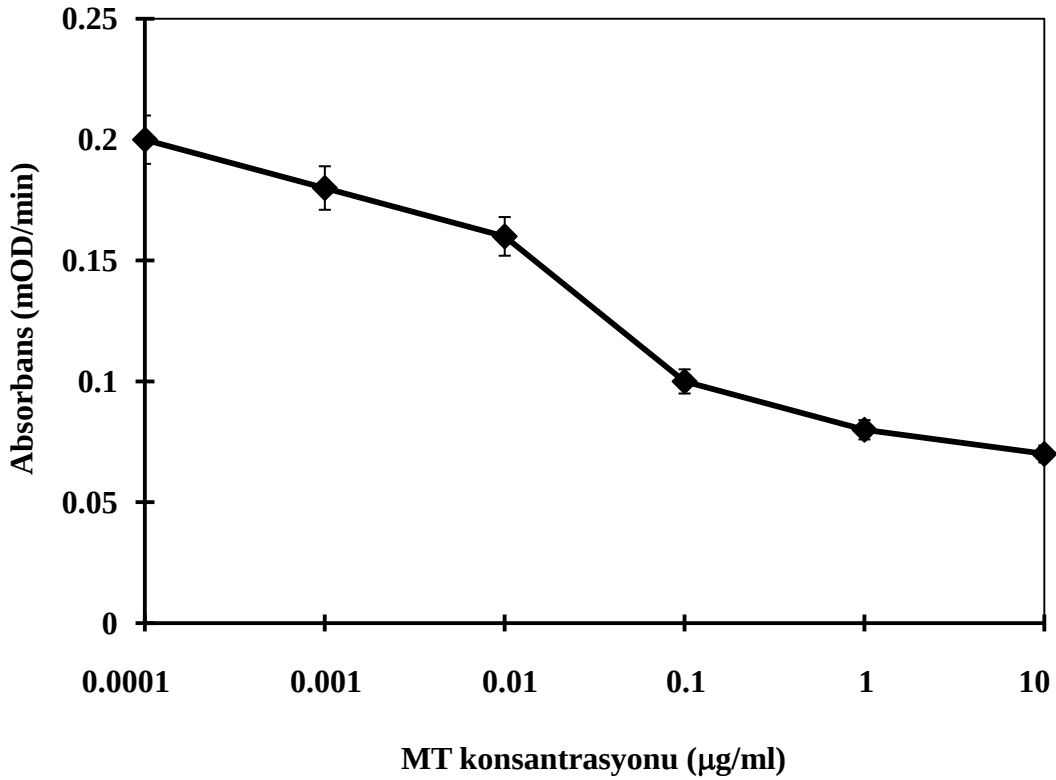
Şekil 4.2 Doku lizatlarındaki toplam protein miktarını belirlemede kullanılan standart eğri.

Yukarıdaki standart eğri kullanılarak, her bir deney hayvanı için dokulardaki protein miktarı tek tek belirlenmiştir. Yaklaşık 1 gram doku kullanılarak hazırlanan lizatlarda, toplam protein konsantrasyonunun karaciğer örnekleri için 25-45 mg/ml aralığında, böbrekler için ise 15-30 mg/ml aralığında olduğu görülmüştür. Dokulardaki toplam protein miktarı bu şekilde belirlendikten sonra, aynı doku lizatları MT konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kompetitif ELISA yöntemiyle test edilmiştir.

Kompetitif ELISA yönteminde, MT konsantrasyonunu belirlemek amacıyla hazırlanan MT standartları ve doku örnekleri ilk olarak anti-MT antikoru UC1MT ile inkübe edilmiş ve sonrasında mikroplakadaki kuyucuklara eklenen MT ile bağlanma derecesi tespit edilmiştir. Kompetitif ELISA'da, dokulardaki ya da standartlardaki MT miktarı ne

kadar fazla olursa, antikorun mikrolakadaki MT ile bağlanması o ölçüde az olacak ve daha zayıf sinyal alınacaktır.

Bu prensip doğrultusunda oluşturulan standart eğrinin bir örneği Şekil 4.3'te görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi, 0.0001 µg/ml'lik MT konsantrasyonunda, kullanılan MT miktarı az olduğu için mikrolakadaki MT ile bağlanma daha fazla olurken (0.2 mOD/min), 10 µg/ml'lik MT konsantrasyonunda UC1MT antikoruna MT'nin büyük bir kısmını bağladığı için absorbans (0.07 mOd/min) daha düşük değerde ölçülmüştür.

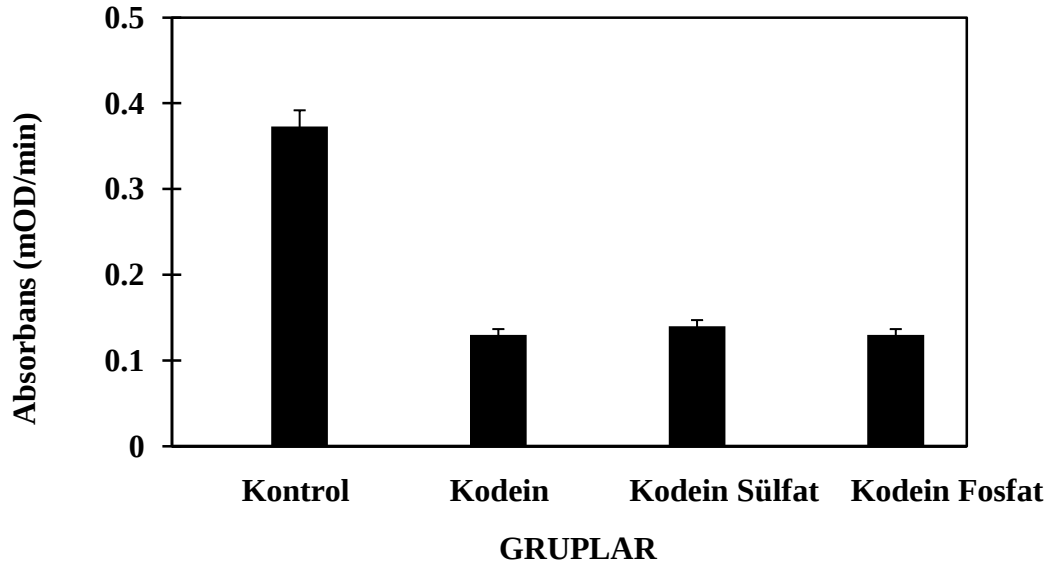


Şekil 4.3 Kompetitif ELISA'da farklı MT konsantrasyonları (0.0001-10 µg/ml) kullanılarak oluşturulan standart eğri. Her bir standart için absorbans 405 nm'de ölçülmüştür.

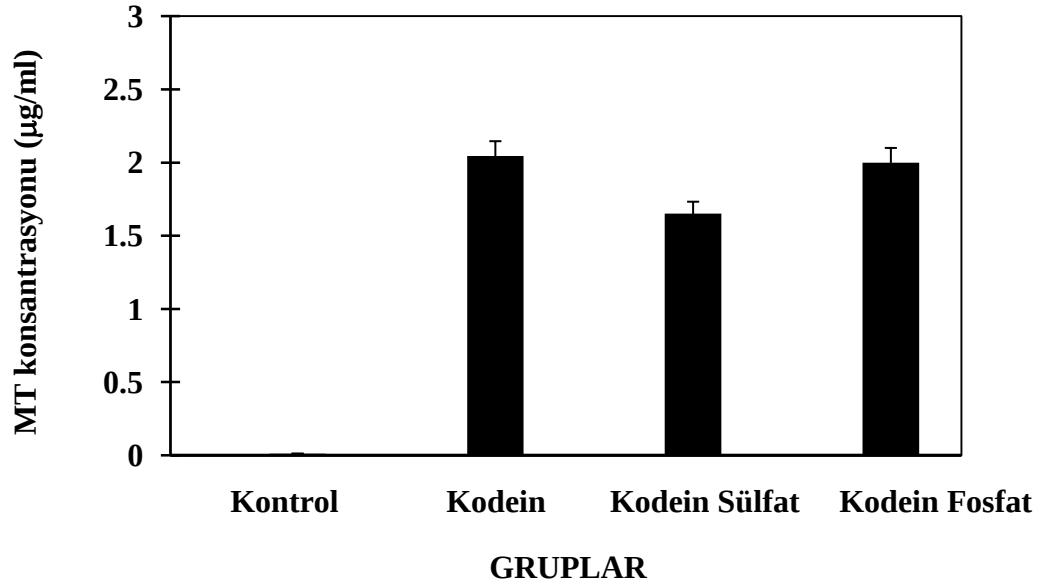
Şekil 4.3'teki standart eğri doğrultusunda, karaciğer ve böbrekte bulunan MT miktarı belirlenmiş, hem absorbans hem de konsantrasyon grafikleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. Kompetitif ELISA sonuçlarına göre, canlı ağırlığına göre 10 mg/kg

kodein ve kodein tuzları ile enjekte edilen farelerde karaciğerde sentezlenen MT-1 miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde ($p < 0.01$) artmıştır (Şekil 4.4).

A

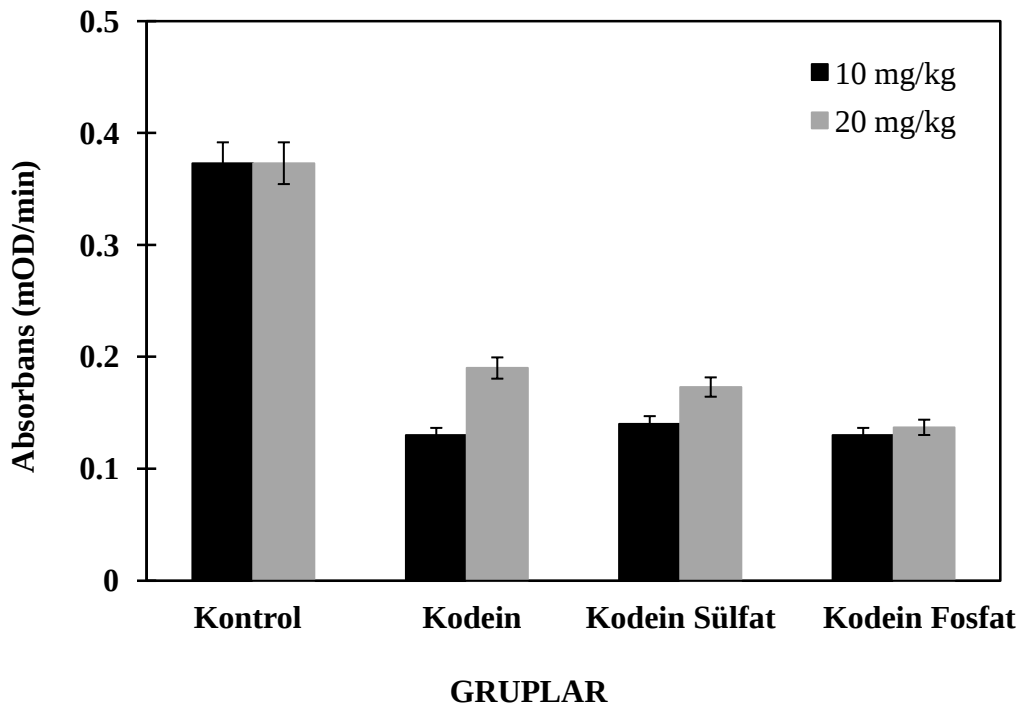


B



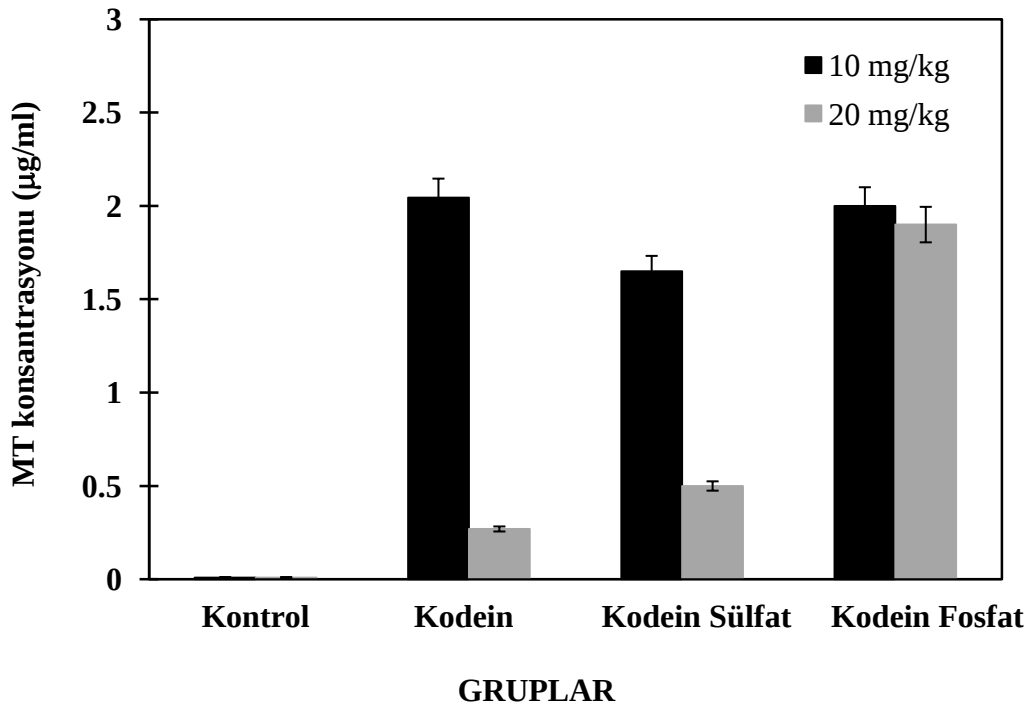
Şekil 4.4 Kodein ve kodein tuzlarının farelerde karaciğer MT-1 seviyeleri üzerindeki etkisi. MT seviyeleri kompetitif ELISA yöntemiyle belirlenmiş olup, hem absorbans (A) hem de konsantrasyon (B) grafikleri şekilde verilmiştir.

Bu çalışmada kodein ve kodein tuzlarının MT sentezi üzerindeki doza bağlı etkilerini gözlemlemek amacıyla 10 mg/kg'lık doz dışında, bazı fareler kodein, kodein sülfat ve kodein fosfatın 20 mg/kg'lık dozu ile enjekte edilmiştir. MT sentezinin doz artışına bağlı olarak belirgin bir şekilde artıp artmadığını tespit etmek amacıyla yapılan bu deneyde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 20 mg/kg'lık doz karaciğerde MT sentezini belirgin bir şekilde arttırmıştır (Şekil 4.5).



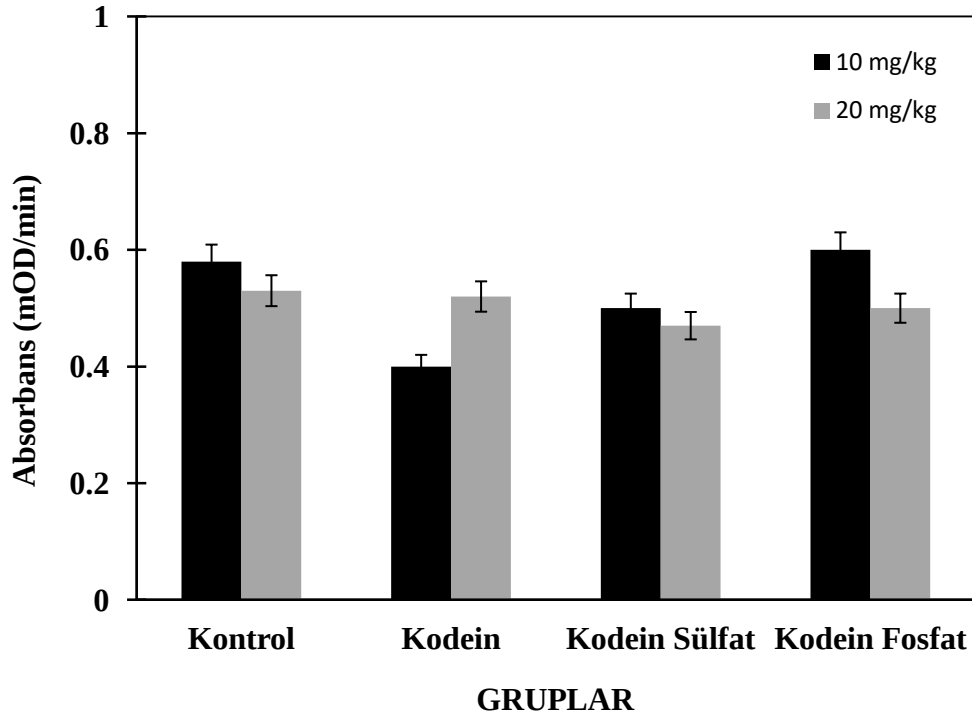
Şekil 4.5 Kodein ve kodein tuzlarının farelerde karaciğer MT-1 seviyeleri üzerindeki doza bağımlı (10 mg/kg ve 20 mg/kg) etkileri. MT seviyeleri kompetitif ELISA yöntemiyle belirlenmiş olup, absorbans değerleri şekilde verilmiştir.

Şekil 4.6'da gösterildiği gibi, 10 mg/kg'lık dozun MT sentezinde daha etkin olduğu, 20 mg/kg'lık doz kullanıldığında özellikle kodein ve kodein sülfatın enjekte edildiği gruplarda MT seviyelerinin daha da düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 Kodein ve kodein tuzlarının farelerde karaciğer MT-1 seviyeleri üzerindeki doza bağımlı (10 mg/kg ve 20 mg/kg) etkileri. MT seviyeleri kompetitif ELISA yöntemiyle belirlenmiş olup, konsantrasyon değerleri şekilde verilmiştir.

Kodein ve kodein tuzları ile enjekte edilen farelerden alınan böbreklerden lizatlar hazırlanmış ve MT konsantrasyonu aynen karaciğer lizatlarında olduğu gibi kompetitif ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Kodein ve kodein tuzlarının böbreklerde MT sentezi üzerindeki etkisi Şekil 4.6'te gösterilmiştir. Kodein, kodein sülfat ve kodein fosfat karaciğerden farklı olarak böbreklerde MT sentezinde istatistiksel olarak belirgin bir artışa neden olmamıştır. Hem 10 mg/kg hem de 20 mg/kg'lık konsantrasyonlar uygulandığında kodein ve kodein tuzlarının böbrekte MT sentezini uyarmadıkları görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Kodein ve kodein tuzlarının farelerde böbrek MT-1 seviyeleri üzerindeki doza bağımlı (10 mg/kg ve 20 mg/kg) etkileri. MT seviyeleri kompetitif ELISA yöntemiyle belirlenmiş olup, absorbans değerleri şekilde verilmiştir.

Bu çalışmada karaciğer ve böbrek dokularından hazırlanan lizatlara ilaveten, enjeksiyon öncesi ve sonrasında alınan kan örneklerinden hazırlanan serum örneklerinde de MT-1 miktarı test edilmiş, ancak tespit edilememiştir. Bunun başlıca nedeni serumun seyreltilmiş olmasıdır. Farelerden alınan yaklaşık 200-400 µl arasında değişen kan örneklerinden ancak 100-150 µl serum elde edilmiştir. Kompetitif ELISA testinde kuyucuklara yeterli miktarda serum ekleyebilmek için serum örnekleri seyreltilmiş, bundan dolayı da zaten çok küçük konsantrasyonlarda olabilecek MT miktarını test edebilmemiz mümkün olmamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alkaloitler bitkiler tarafından doğal olarak üretilen, amin yapısında, ilaç ya da ağrı kesici olarak kullanılan ve aynı zamanda bağımlılık yapıcı özellikleri olan kimyasal bileşiklerdir. Ağrı kesici olarak kullanılan alkaloitler, özellikle haşhaştan üretilen morfin ve türevleridir. Morfin, bağımlılık yapıcı bir özelliğe sahip olup şiddetli ağrıların dindirilmesinde kullanılan güçlü bir analjeziktir. Haşhaştan elde edilen diğer alkaloitlerden kodein, tebain ve noskapin ise, morfinden daha az bağımlılık yapıcı etkiye sahip olup, özellikle tıpta analjezik (ağrı kesici), antitussif (öksürük dindirici) ve antidiyareik (ishal önleyici) ilaçlar şeklinde sıklıkla tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, özellikle tedavi amaçlı olarak kullanılan kodein, kodein sülfat ve kodein fosfat gibi haşhaş alkaloitlerinin, önemli fizyolojik ve immunolojik rolleri olan metallotiyonin sentezi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu bağlamda çalışmamızda, kodein ve kodein tuzları ile enjekte edilen farelerden doku (karaciğer ve böbrek) ve serum örnekleri elde edilmiş ve MT proteininin varlığı kompetitif ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Kodein ve kodein tuzları ile enjekte edilen fareler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, hem saf kodeinin hem de kodein sülfat ve kodein fosfat tuzlarının karaciğerde MT-1 sentezini belirgin şekilde arttırdığı, ancak böbrek üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Saf kodein ve kodein tuzlarının iki farklı dozu (10 mg/kg ve 20 mg/kg) kullanıldığı zaman, 10 mg/kg'lık dozun karaciğerde MT sentezi üzerinde daha etkin olduğu, artan doza bağlı olarak karaciğer MT seviyelerinde belirgin bir artışın olmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışmamızdan elde edilen sonuçlar daha önce morfin kullanılarak sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmanın sonuçları ile de uyumludur. Hidalgo ve ark., 1991 tarafından yapılan çalışmada, sıçanlarda morfinin karaciğerde MT miktarını belirgin bir şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, üç saat arayla üç defa tekrarlanan enjeksiyonların metallotiyonin proteininin sentezlenmesi için yeterli bir zaman aralığı olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan saf kodein ve kodein tuzları da farelerde aynı zamanda aralığında, aynı etkiyi göstermiş ve karaciğerde MT sentezini belirgin şekilde arttırmıştır.

Başka bir çalışmada (Floriańczyk ve Stryjecka-Zimmer, 2001), morfinle uyuşturulmuş sıçanlardan elde edilen farklı dokularda (beyin, böbrek ve karaciğer) metallotiyonin seviyelerinin belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda, sadece kodeinin etkisi ile karaciğerde MT seviyelerinde belirgin bir artışın olduğu gözlenmiş, böbrekte ise önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Kodein ve kodein tuzlarının karaciğerde metabolize edildikten sonra atılmak üzere böbreğe geçmesi gerekli olan zaman aralığından önce deneyimiz sonlandırıldığı için, böbrek dokusundan elde edilen lizatlarda MT protein miktarı tespit edilememiştir. Kodein ve kodein tuzlarının böbrekte MT sentezi üzerinde etkisi görülme bile, karaciğer MT'nin en yoğun şekilde sentezlendiği yerlerden birisi olduğu için, kodeinin etkisi ile karaciğerde MT sentezinin artması bizim açımızdan daha anlamlıdır. Morfin güçlü bir analjezik olması nedeniyle daha fazla MT sentezini uyarabilir. Bu çalışmada kullanılan morfin türevi alkaloidler ise daha zayıf etkiye sahip olup, bu yüzden MT sentezinde morfin kadar etkili olmayabilirler.

Deney sonuçlarımızı yorumlarken dikkate almamız gereken önemli hususlardan birisi de, kompetitif ELISA testlerinde kullanılan UC1MT antikorunun MT'nin özellikle en fazla sentezlenen izoformlarına (MT-1 ve MT-2) karşı spesifik olarak üretilmiş bir antikor olmasıdır. Bu antikor ile daha önce yapılan çalışmalarda MT'nin her iki izoformundan oluşan ve tavşan karaciğerinden elde edilen MT1-MT2 karışımı antijen olarak ELISA deneylerinde kullanılmıştır (Lynes ve ark., 1993, Canpolat ve Lynes, 2001). ELISA deneylerinde MT1-MT2 karışımının antijen olarak kullanılması, daha güçlü bir bağlanmanın ve sinyalin elde edilmesi açısından avantajlıdır. Bulgular başlığı altında bahsedildiği üzere, bu MT formunun üretimden kalkması nedeniyle çalışmamızda projenin imkanları doğrultusunda sadece tek bir izoforma (MT-1) spesifik olarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Diğer izoform olan MT-2 üzerinde kodein ve kodein tuzlarının etkisini test etmemiz ve karşılaştırmamız mümkün olmamıştır. Dolayısıyla dokular MT-2 sentezi açısından test edildikleri zaman farklılıklar ortaya çıkabilir. Bundan dolayı ileriki çalışmalarımızda, kodein ve kodein tuzlarının MT-2 seviyeleri üzerindeki etkilerine de ayrıca bakılacaktır.

Sonuç olarak, kodein karaciğerde MT sentezini belirgin bir şekilde artırmaktadır. Kodein analjezik (ağrı kesici), antitussif (öksürük dindirici) ve antidiyareik (ishal

önleyici) özellikleri nedeniyle tıpta tedavi amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kodein morfinle karşılaştırıldığında, daha zayıf analjezik etkileri olan fakat bağımlılık yapma özelliği az olan bir alkaloidtir (Armstrong ve Cozza, 2003, Schroeder ve Fahey, 2001). Bu yüzden kodein diğer ağrı kesicilere (parasetamol, aspirin ve ibuprofen gibi) katılarak daha kuvvetli etki elde etmek için de kullanılmaktadır. Saf kodeine fosfat ve sülfat eklenmesi ile kodein tuzları olarak bilinen kodein fosfat ve kodein sülfat formları elde edilmektedir. Kodein fosfat ya da sülfat vücut tarafından daha kolay absorbe edilmeleri nedeniyle tıpta tedavi amaçlı olarak (oral tablet ya da parenteral enjeksiyon şeklinde) daha fazla tercih edilmektedir. Bu çalışmamızda saf kodeinin ve kodein tuzlarının karaciğerde MT sentezini artırdığı tespit edilmiştir. Bundan sonraki çalışmamızda ise, kodeinin bağışıklık sistemi üzerinde ve özellikle antikor cevabı üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

Morfinin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerine yönelik birçok çalışma yapılmasına rağmen (Lockwood ve ark., 1994), günlük hayatta sıklıkla karşılabileceğimiz hastalıklar için yaygın kullanımı olan kodeinin bağışık yanıt ve özellikle de antikor cevabı üzerindeki etkileri konusunda kayda değer bir çalışma yapılmamıştır. Özellikle tıpta tedavi amaçlı olarak morfinden daha fazla kullanımı olan kodeinin organizmalarda enfeksiyonlara ve ekstraselüler (hücre dışı) patojenlere karşı yanıtta önemli rolleri olan humoral bağışık yanıt üzerindeki etkilerini *in vivo* olarak belirlemeye ve antikor cevabında ortaya çıkabilecek değişiklikleri tespit etmeye çalışacağız. Kodeinin organizmalarda antikor üretimini nasıl etkilendiğinin bilinmesi kodein içeren ilaçların daha dikkatli ve bilinçli kullanılması adına bu alanda değerli veriler sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Andrews, G.K., Adamson, E.D., and Gedamu, L., 1984. The ontogeny of expression of murine MT: comparison with the alpha fetoprotein gene. *Devel. Biol*, 103, 294-303.
- Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol*, 59, 95-104.
- Andus, T., Gieger, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Tran-Thi, T.A., Decker, K., Heinrich, P.C., 1988. Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures. *Eur. J. Biochem*, 173, 287-293
- Anstey, A., Marks, R., Long, C., 1996. *In vivo* photoinduction of metallothionein in human skin by ultraviolet irradiation. *J. Pathol*, 178, 84-88.
- Anonim 2007. Uy  st  r  c   (psikotrop) maddeler – kriminalistik [http:// www.nuveforum.net/875-kriminoloji/23035-uyusturucu-psikotrop-maddeler-kriminali - page2](http://www.nuveforum.net/875-kriminoloji/23035-uyusturucu-psikotrop-maddeler-kriminali-page2) (02.02.10).
- Apostolova, M., Nachev, C., Koleva, M., Bontchev, P.R. ve Kehaiov, I., 1998. New competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of metallothionein in tissue and sera. *Talanta*, 46, 325-333.
- Armstrong SC and Cozza KL., 2003. Pharmacokinetic drug interactions of morphine, codeine, and their derivatives: theory and clinical reality, Part II. *Psychosomatics*, 44, 515 - 520.
- Arizona, K., Tanahe, A., Ariyoshi, T., and Moriyama, M., 1991. Induction of metallothionein by emotional stress. In: *Metallothionein in Biology and Medicine*. C.D. Klaassen and Suzuki, K. (ed.) CRC Press. pp. 271-282.
- Baumann, H., Prowse, K.R., Marinkovic, S., Won, K.A., Jahreis, G.P., 1989. Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann. N Y Acad. Sci*, 557, 280-296.
- Bauman, J.W., Liu, J., Liu, Y.P., and Klaassen, C.D., 1991. Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 110, 347-354.
- Bauman, J.W., Liu, Y.P., Andrews, G.K., and Klaassen, C.D., 1992a. Examination of potential mechanisms of metallothionein induction by diethyl maleate. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 117, 26-232.
- Bauman, J.W., Madhu, C., McKim, J.M., Liu, Y. and Klaassen, C.D., 1992b. Induction of hepatic metallothionein by paraquat. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 117, 233-241.
- Bauman, J.W., McKim, J.M., Liu, J., and Klaassen, C.D., 1992c. Induction of metallothionein by diethyl maleate. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 114, 188-196.
- Bernath, J., 1998. *Poppy: Genus Papaver*, Harwood Academic Publishers. *Pharmacology*, 11, 101-113.

- Borghesi, L.A., and Lynes, M.A., 1996. Stress proteins as agents of immunological change:some lessons from metallothionein. *Cell Stress & Chaperones*, 1(2), 99-108.
- Brady, F.O., 1991. Induction of metallothionein in rats. *Methods in Enzymol*, 205, 559-567.
- Brüwer, M., Schmid, K.W., Metz, K.A., Krieglstein, C.F., Senninger, N., Schürmann,G., 2001. Increased Expression of Metallothionein in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Research.*, 50, 289–293.
- Canpolat, E and Lynes, M., 2001. In vivo manipulation of endogenous metallothionein with a monoclonal antibody enhances a T-dependent humoral immune response. *Tox. Sci.* 62, 61-70.
- Cagen, S.Z., Klaassen, C.D. , 1979. Protection of carbonn metallothionein. *Toxicology and Applied. Pharmacology*, 51, 107-116.
- Cai,Lu., Satoh, M., Tohyama, C., Cherian, M.G., 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology*, 132, 85-98.
- Ceciliani, F., Giordano, A., Spagnolo, V., 2002. The systemic reaction during inflammation: acute-phase proteins. *Protein Pept. Lett*, 9, 211-223.
- Chrian, M.G., GOYER R.A. 1978. Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.*, 23:1-10.
- Cherian M.G., Howell S.B., Imura N., Klassen C.D., 1994. Contemporary Issues in Toxicology: Role of Metallothionein in Carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 317,1-3
- Coto, J.A., Hadden, E.M., Sauro, M., Zorn, N., and Hadden, J.W., 1992. Interleukin 1 regulates secretion of zinc-thymulin by human thymic epithelial cells and its action on T-lymphocyte proliferation and nuclear protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7752-7756.
- Cox, D. R., Palmiter, R. D.,1983. The metallothionein-I gene maps to mouse chromosome 8: implications for human Menkes' disease. *Human Genetics*, 64,61–64
- Coyle, P., Philcoxa, J.C., Careya, L.C., Rofea, A.M., 2002. Metallothionein: The Multipurpose Protein CMLS, *Cell. Mol. Life Sci*, 59, 627–647.
- Cousins, R.J., and Leinart, A.S., 1988. Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin-1. *Fasep J.*, 2, 2884-2890.
- Davis S. R., Cousins R.J., 2000. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *The Journal of Nutrition*.130(5); 1085-1088.
- Dalton, T.P.,Palmiter, R.D., Andrews, G.K., 1994. Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Res*, 22, 5016-5023.
- De Lisle, R.C., Sarras, M.P., Hidalgo, J., and Andrews, G.K., 1996. Metallothionein is a component of exocrine pancreas secretion: implications for zinc homeostasis. *Am. J. Physiol.* 271, C1103-C1110.

- Durnam, D.M., Hoffman, J.S., Quaife, C.J., Benditt, A.P., Chen, H.Y., Brinster, R.L., Palmiter, R.D., 1984. Induction of mouse metallothionein-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 1053-1056.
- Daston, G.P., Overmann, G.J., Taubeneck, M.W., Lehman-McKeeman, L.D., Rogers, J.M., and Keen, C.L., 1991. The role of metallothionein induction and altered zinc status in maternally mediated developmental toxicity: comparison of the effects of urethane and styrene in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110, 450-463.
- Ebadi, M., and Swanson, S., 1987. Characterization of metallothionein-like protein in rat brain. In: *Metallothionein II. Experientia, Suppl.* 52, 289-291
- Ebadi, M., Iversen, P.L., Hao, R., Cerutis, D.R., Rojas, P., Happe, H.K., Murrin, L.C., and Pfeiffer, R.F., 1995. Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem. Int.* 27, 1-22
- Florianczyk, B., Stryjecka-Zimmer, M., 2001. Induction of metallothioneins by ethanol and morphine. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med* 56: 183-187.
- Furey, W., Robbins, A., Clancy, L., Winge, D., Wang, B., and Stout, C., 1986. Crystal structure of Cd, Zn-metallothionein. *Science*, 231, 704-710.
- Goering, P.L., and Klaassen, C.D., 1984. Tolerance to cadmium-induced hepatotoxicity following cadmium pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74(3), 308-13.
- Ghoshal, K., Wang, Y., Sheridan, J.F., and Jacob, S.T., 1998. Metallothionein induction in response to restraint stress: transcriptional control, adaptation to stress, and role of glucocorticoid. *J. Biol. Chem.* 273, 27904-27910.
- Grider, A., Kato, K.J., Klein, P.A., and Cousins, R.J., 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay for human metallothionein: correlation of induction with infection. *J. Lab. Clin. Med.* 113, 221-228.
- Ganguly J., Cheng W., Massimiliano T., 1996. Thermodynamics of aluminosilicate garnet solid solution: new experimental data, an optimized model, and thermometric applications, 126(1), 137-15
- Hamer, D.H. 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 913-951.
- Hahn, S.H., Yoo, O.J., Gahl, W.A., 2001. Effect of Metal Ions on the Stability of Metallothionein in the Degradation by Cellular Fractions *in vitro*. *Experimental and Molecular Medicine*, 33, 32-36.
- Harris, E. D., 2002. Cellular transporters for zinc. *Nutrition Reviews*, 60(4), 121-124.
- Heguy, A., West, A., Richards, R.I., and Karin, M., 1986. Structure and tissue-specific expression of the human metallothionein IB gene. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 2149-2157.
- Hernandez, J., Carrasco, J., Belloso, E., Giralt, M., Bluethmann, D., Lee, K., Andrews, G.K., and Hidalgo, J., 2000. Metallothionein induction by restraint stress: role of glucocorticoids and IL-6. *Cytokine*, 12, 791-796.
- Hermann, G., Tovar, C.A., Beck, F.M., Sheridan, J.F., 1994. Kinetics of glucocorticoid response to restraint stress and/or experimental influenza viral infection in two

- inbred strains of mice. Modulates mononuclear cell trafficking during an experimental influenza viral infection. *J. Neuroimmunol*, 49, 25-33.
- Hidalgo, J., Giralt, M., Garvey, J.S., Armario, A., 1991. Effect of morphine administration on rat liver metallothionein and zinc metabolism. *J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics*, 259(1), 274-278.
- Huang, I.Y., Yoshida, A., Tsunoo, H., and Nakajima, H., 1977. Mouse liver metallothioneins. Complete amino acid sequence of metallothionein-I. *J. Biol. Chem*, 252, 8217-8221.
- Iszard, M. B., Liu, J., Klaassen, C.D., 1995. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicology*, 104, 25-33.
- Irato, P., Piccinni, Albergoni, V., 2001. Relationship between metallothionein and metal contents in red-blooded and white-blooded antarctic teleosts. *Polar Biol*, 23(5),383-391.
- Jasani, B., Anstey, A., Marks, R., Lond, C.C., Pearse, A.D., 1993. Wild type p53 and metallothionein are expressed simultaneously in UV irradiated skin: a possible link to photocarcinogenesis. *J. Invest. Dermatol*, 101, 422-428.
- Johri N, Jacquillet G, Unwin R., 2010. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals*, 23(5),783-92.
- Kagi, J.H.R., and Vallee, B.L., 1960. Metallothionein: a cadmium-and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem*, 235, 3460-3465.
- Kagi, J.H.R. and Kojima, Y., 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Exp. Supp*, 52, 25-61.
- Kagi, J.H.R. and Schaffer, A.,1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27, 8509-8515.
- Kagi, J.H.,1991. Overview of metallothionein. *Meth. Enzymol*. 205, 613-626.
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R.I., Krauter, P., Westphal, H.M., 1984. Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene *Nature*, 308, 513-519.
- Karin, M and Richards, R.I.,1982. Human metallothionein genes-primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature*, 229, 797-802.
- Kissling, M.M., and Kagi, J.H.R., 1978. Amino acid sequence of human metallothioneins. In: *Experientia*, Kagi, J.H.R., and Nordberg, M (eds), Birkhauser, Basel, Suppl, 34, 145-151.
- Klassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*,39, 267- 294.
- Klassen, C.D., Liu, J., Diwan B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 215-220.
- Kelly, E.J., Sandgren, E.P., Brinster, R.I., and Palmiter, R.D., 1997. A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 94, 10045-10050.

- Kim, B.J., Kim, Y.H., Kim, S., Kim, J.W., Koh, J.Y., Oh, S.H., Lee, M.K., Kim, K.W., Lee, M.S., 2000. Zinc as a paracrine Effector in Pancreatic Islet Cell Death. *Diabetes*, 49, 367–372.
- Kondo, Y., Rusnak, J.M., Hoyt, D.G., Settineri, C.E., Pitt, B.R., LAZO, J.S., 1995. Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol. Pharmacol*, 52, 195- 201.
- Kondoh, M., Tsukahara, R., Kuronaga, M., Higashimoto, M., Takiguchi, M., and Sato, M., 2002. Enhancement of MT synthesis by leptin in fasted mice. *Life Sci.* 71, 2425-2433.
- Koropatnick, J., Leibbrand, M., Cherian, M.G., 1989. Organ-specific metallothionein induction in mice by X-irradiation. *Radiat. Res.* 119, 356-365.
- Kramer, K.K., Liu, J., Choudhuri, S., Klaassen, C.D., 1996. Induction of metallothionein mRNA and protein in murine astrocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136(1), 94-100.
- Leibbrandt, M., and Koropatnick, J., 1994. Activation of human monocytes with lipopolysaccharide induces metallothionein expression and is diminished by zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 124, 72-81.
- Lynes, M.A., Garvey, J.S., Lawrence, D.A., 1990. Extracellular metallothionein effects on lymphocyte activities. *Mol. Immunol*, 27, 211-219.
- Lynes, M.A., Borghesi, L.A., Youn, J., Olson, E.A., 1993. Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein I. Metallothionein effects on antibody production. *Toxicology*, 85, 161-177.
- Liu, J., Klaassen, C.D., 1996. Absorption and distribution of cadmium in metallothionein-I transgenic mice. *Fundam Appl Toxicol*, 29, 294–300.
- Margoshes, M., Vallee, B.L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 813-814.
- Mesna, O.J., Steffensen, I-L., Melhuus, A., Hjertholm, H., Heier, H.E., and Andersen, R.A., 1990. Induction of metallothionein production by zinc in human mononuclear cells. *Gen. Pharmacol*, 21(6), 909-917.
- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., Rodilla, V., 2000. Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (1), 35-70.
- Minamide, T., Shimizu, M., Tanaka, H., Okazaki, Y., Cherian, M.G., 1999. Metallothionein does not Protect Mouse Endocrine Cells from Damage Induced by Alloxan. *Injection Toxicology*, 132, 33–41.
- Milnerowicz, H. and Bizon, A., 2010. Determination of metallothionein in biological fluids using enzyme-linked immunoassay with commercial antibody. *Acta Biochimica Polonica*, 57 (1), 99-104.
- Morcillo, M., Rucandio, M.I., Santamaria, J., 2000. Effect of gamma irradiation on liver metallothionein synthesis and lipid peroxidation in rats. *Cell Mol. Biol*, 46, 435-444.

- Nartey, N.O., Frei, J.V., Cherian, M.G., 1987. Hepatic copper and metallothionein distribution in Wilson's disease hepatolenticular degeneration. *Laboratory Investigation*, 57 (4), 397-401.
- Nordberg, M., 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, 46, 243-254.
- Niioka, T., Kojima, Y., 1991. Studies on induction of zinc metallothionein by sensory and psychological stresses in rat liver In: *Metallothionein in Biology and Medicine*. C.D. Klaassen, and K.T. Suzuki (Ed.) CRC Press. pp. 265-270.
- Oh, S.H., Dlagen, J.T., Whanger, P.D., and Weswig, P.H., 1978, Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Amer. J. Physiol.* 234, E282-E285.
- Ohly, P., Dohle, C., Abel, J., Seissler, J., Gleichmann, H., 2000. Zinc Sulphate Induces Metallothionein in Pancreatic Islets of mice and Protects Against Diabetes Induced by Multiple Low Doses of Streptozotocin. *Diabetologia*, 43, 1020–1030.
- Palmiter, R.D., 1987. Molecular biology of metallothionein gene expression. In: *Metallothionein II. Experientia Supplementum*. J. Kagi and Y. Kojima (eds) Birkhauser Verlag, Basel. pp.63-80.
- Palmiter, R.D., Findley, S.D., Whitmore, T.E., and Durnam, D.M., 1992. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 6333-6338.
- Panemangalore M., Benerje D., Onasaka S., 1983. Changes in the intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development. *Developmental Biology*, 97(1), 95–102
- Pankhurst, M. W., Gell, D.A., Butler, C.W., Kirkcaldie, M.T.K., West, A.K. ve Chung, R.S., 2012. Metallothionein (MT) -I and MT-II expression are induced and cause zinc sequestration in the liver after brain injury. *PLoS ONE*, 7 (2), 1-7.
- Philcox, J.C., Sturkenboom, M., Coyle P., Rofe, A.M., 2000. Metallothionein in Mice Reduces Intestinal Zinc Loss during Acute Endotoxin Inflammation, but not during Starvation or Dietary Zinc Restriction. *J. Nutr.* 130, 1901–1909.
- Piscator, M., 1964. On cadmium in normal human kidneys together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium exposed rabbits. *Nord. Hyg. Tidskr.* 45, 76-82.
- Quesada, A.R., Byrnes, R.W., Krezoski, S.O., Petering, D.H., 1996. Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc metallothionein and other sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 334 (2), 241-250.
- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P., and Palmiter, R.D., 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*, 33, 7250-7259.
- Reynolds, J.E.F., 1996. Martindale The Complete Drug Reference. 31 st Edn. UK. The Royal Pharmaceutical Publications Department. 27(1), 90-4.

- Richards, R.I., Heguy, A., and Karin, M., 1984. Structural and functional analysis of the human metallothionein-IA gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell*, 37, 263-272.
- Rigby, K.E., Stillman, M.J., 2004. Structural studies of metal-free metallothionein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 1271-1278.
- Robbins, A.H., and Stout, C.D., 1992. Crystal structure of metallothionein, cysteine stereochemistry in the crystal structure of Cd, Zn-metallothionein. In: *Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins, Phytochelatins and Metal-thiolate Complexes*. 31- 54.
- Sato, M., Bremner, I., 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biology Medicine*. 14, 325-337.
- Sato, M., Sasaki, M., and Hojo, H., 1994. Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in rat tissues. *Int. J. Immunopharmacol*, 16, 187-195.
- Sato, M., Kondoh, M., 2002. Recent Studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals, 196, 9-22.
- Sawada, J., Kikuchi, Y., Shibutani, M., Mitsumori, K., Inoue, K., Kasahara, T., 1994. Induction of metallothionein in astrocytes by cytokines and heavy metals. *Biol. Signals*, 3, 157-168.
- Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ., 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Annals of Diagnostic Pathology*, 17, 229-59.
- Searle, S. R., 1987. *Linear Models for Unbalanced Data*. J. Wiley & Sons, New York. *Biometrical Journal*, 31, 3
- Schreck R., Rieber P., Baeuerle, P., 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J.*, 10(8), 2247-2258.
- Schroeder K, Fahey, T., 2001. Over-the-counter medications for acute cough in children and adults in ambulatory settings. *Cochrane Database Syst Rev*: CD001831.
- Shibuya, K., Satoh, M., Muraoka, M., Watanabe, Y., Oida, M., Shimizu, H., 1995. Induction of metallothionein synthesis in transplanted murine tumors by X irradiation. *Radiat. Res.* 143, 54-57.
- Shiraishi, N., Yamamoto, H., Hiraki, Y., 1989. Elevation in metallothionein messenger RNA in rat tissues after exposure to X-irradiation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98, 501-506.
- Schmidt, C.J., Jubier, M.F., and Hamer, D.H., 1985. Structure and expression of two human metallothionein-I isoform genes and a related pseudogene. *J. Biol. Chem.* 260, 7731-7737.
- Sone, T., Koizumi, S., and Kimura, M., 1988. Cadmium-induced synthesis of metallothioneins in human monocytes and monocytes. *Chem. Biol. Interact.* 66 (1-2), 61-70.

- Stein, B., Rahmsdorf, H.J., Steffen, A., Litfin, M., Herrlich, P., 1989. UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol. Cell Biol.* 9, 5169-5181.
- Sprietsma, J.E., Schuitemaker, G.E., 1994. Diabetes can be Prevented by Reducing Insulin Production. *Med Hypotheses*, 42, 15– 23.
- Sutherland, D.E.K., ve Stillman, M.J., 2011. The “magic numbers” of metallothionein. *Metallomics*. 3, 444-463.
- Suzuki K. T., Someya A., Komada Y., Ogra Y., 2002. Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88, 173–182.
- Swiergosz, R., Kowalewska, R., 2001. Cadmium Distribution and Toxicity in Tissues of Small Rodents. *Microscopy Research and Technique*, 55, 208–222.
- Tapiero H, Tew KD., 2003. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother*, 57(9), 399-411.
- Tomita, T., 2000. Metallothionein in Pancreatic Endocrine Neoplasms. *Mod. Pathol*, 13, 389–395.
- Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, 1999. Retinal ischemia reperfusion injury attenuated by blocjing of adhesion molecules of vascular endothelium. *IOVS*, 40, 1183-1190.
- Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. and Tomanaga, M., 1991. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer’s disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7, 337-347.
- Vasak, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19, 13–17.
- Vallee, B.L., 1995. The function of metallothionein. *Neurochem. Int*, 27, 23-33., A, Tandon j., Crowe A., 1986. Synthesis and structural studies of tin(II) complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. *Polyhedron*, 5, I(3), 1986, 739–742
- West, A.K., Stallings, R., Hildebrand, C.E., Chiu, R., Karin, M., and Richards, R.I., 1990. Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13. *Genomics*, 8, 513-518.
- Woo, E.S., Lazo, J.S., 1997. Nucleocytoplasmic functionality of metallothionein. *Cancer Res*, 57, 4236-4241.
- Yagle, M.K. and Palmiter, R.D., 1985. Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol*, 5, 291-294.
- Yamada H., Koizumi S., 1991. Metallothionein induction in human peripheral blood lymphocytes by heavy metals. *Chemico-Biological Interactions*, 78(3) 347-354
- Yurkow E.J., Makhijani P.R., 1998. Flow cytometric determination of metallothionein levels in human peripheral blood lymphocytes: utility in environmental exposure assessment. *J Toxicol Environ Health, A* 54, 445–457

- Youn, J., Borghesi, L.A., Olson, E.A., Lynes, M.A., 1995. Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. II. Effects on macrophage functions. *J. Toxicol. Environ. Health*, 45, 397-413.
- Youn, J., and Lynes, M.A., 1999. Metallothionein-induced suppression of cytotoxic T lymphocyte function: an important immunoregulatory control. *Toxicol. Sci.* 52, 199 -208.
- Yang, J., Cherian, M.G., 1994. Protective effects of metallothionein o streptozotocin induced diabetes in rats. *Life Sciences*,55(1), 43-51.
- Zheng, H., Liu, J., Liu, Y., Klasseen, C.D., 1996. Hepatocytes from metallothionein-I and II knock-out mice are sensitive to cadmium- and tertbutylhydroperoxide-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett*,87, 139- 145.
- Zhou, Z., Sun, X, Kang, Y.J.,2002. Metallothionein Protection against Alcoholic Liver Injury through Inhibition of Oxidative Stres. *Exp. Biol. Med*, 227, 214–222.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Zülfiye ÖNEN

Doğum Tarihi ve Yeri: 06.06.1977, SAMSUN

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

e-mail: furkan5255@mynet.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2004
Lise	Samsun Kavak Yaşar Doğu Lisesi	1994

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-	Trabzon Halk Sağlığı Laboratuvarı Tüberküloz Birimi	Biyolog
2008-2010	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyolog
2004-2008	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi	Hemşire
1998-2004	Samsun On Dokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi	Hemşire