

Sülfür İçeren Antioksidanların Kurşuna Maruz Kalmış Ratlarda Karaciğer, Böbrek ve Beyin Malondialdehit ve Katalaz Düzeylerine Antioksidan Etkileri

EFFECTS OF SULFUR-CONTAINING ANTIOXIDANTS ON MALONDIALDEHYDE AND CATALASE LEVELS OF LIVER, KIDNEY AND BRAIN IN LEAD-EXPOSED RATS

Emrah ÇAYLAK,^a İhsan HALİFEOĞLU^b

^aBiyokimya ve Klinik Biyokimya AD, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi,
^bBiyokimya, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, ELAZIĞ

Özet

Amaç: Kurşun, endüstride yaygın olarak kullanılmasından dolayı büyük bir çevresel problem oluşturmaktadır. İnsan ve hayvanlar üzerine etkileriyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Deneysel çalışmalarda sülfür içeren antioksidanların kurşunun zararlı etkilerine karşı yararlı olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda kurşun asetat ile oksidatif stres oluşturulan ratlarda, sülfür içeren bazı bileşiklerin antioksidan etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmada kurşun asetat ile sülfür içeren antioksidanlar [L-metionin, lipoik asit (LA), N-asetilsistein (NAC), L-homosistein (L-Hcy)] verilen ratlarda oksidatif stres parametreleri [tam kanda Hb; karaciğer, böbrek ve beyinde malondialdehit (MDA) ile katalaz (CAT)] ölçüldü.

Bulgular: Kontrol grubuna göre kurşun grubunda Hb seviyeleri anlamlı düşük ($p < 0.01$); MDA düzeyi ise yüksek bulundu. Kurşun grubuna göre kurşun-metionin, kurşun-LA gruplarında Hb anlamlı yüksek ($p < 0.05$), tüm dokularda kurşun-NAC grubu MDA düzeyleri anlamlı düşük; kurşun grubunda karaciğer CAT ($p < 0.05$) aktiviteleri anlamlı yüksek sonuç verdi. Böbrek CAT aktiviteleri kurşun-NAC ($p < 0.05$) ve kurşun-Hcy ($p < 0.01$) gruplarında kurşun grubuna göre önemli derecede düşük tespit edildi.

Sonuç: Bu bulgular ışığında, kurşunun uyardığı oksidatif stresin sülfür içeren bileşikler tarafından azaltıldığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kurşun; metionin; lipoik asit; asetilsistein; homosistein

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007, 27:1-8

Abstract

Objective: Lead causes a great environmental problem because it is widely used in the industry. Several studies focusing on its effects on human and animals were carried out. Sulphur containing antioxidants were observed to have beneficial effects against lead's detrimental properties in experimental studies. The aim of our study was to evaluate the antioxidant effects of some sulphur-containing compounds in rats where oxidative stress was induced by lead acetate.

Material and Methods: Oxidative stress parameters were determined (Hb in whole blood, MDA and CAT in liver, kidney and brain) in rats following the administration of lead and sulphur containing antioxidants [L-methionine, lipoic acid (LA), N-acetylcysteine (NAC), L-homocysteine (L-Hcy)].

Results: In the lead group Hb levels were determined to be significantly low ($p < 0.01$) whereas MDA levels were higher compared to controls. Hb levels in lead-methionine and lead-LA groups were significantly lower compared to lead group ($p < 0.05$). MDA levels of lead-NAC group were reduced in all tissues compared to lead group whereas there was an increase over control values in liver CAT activities ($p < 0.05$) in lead-LA group. Kidney CAT activities were significantly low in lead-NAC ($p < 0.05$), and lead-Hcy ($p < 0.01$) groups compared to lead group.

Conclusion: It is believed that oxidative stress induced by lead is reduced by sulphur-containing compounds.

Key Words: Lead; methionine; thioctic acid; acetylcysteine; homocysteine

Kurşun endüstride yaygın olarak kullanılmakta; insan ve hayvanlarda fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal bozukluklara neden olmaktadır. Kurşun zehirlenmesinin me-

kanizması prooksidan/antioksidan dengesinin bozulmasından kaynaklanmakta ve bu durumu kurşun dokularda lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik moleküller ile etkileşerek oksidatif hasar sonucunda meydana çıkarmaktadır. Daha önceki çalışmalarda oksidatif hasarın, kurşunun dokularda indirekt olarak reaktif oksijen türlerinin artışına neden olması sonucu hücre membranları ile etkileşime girerek lipid peroksidasyonunu başlatması ve hücrelerdeki sülfidriilli antioksidan savunma sis-

Geliş Tarihi/Received: 05.08.2006 Kabul Tarihi/Accepted: 30.10.2006

Yazışma Adresi/Correspondence: Emrah ÇAYLAK
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD, ELAZIĞ
emrahcaylak@hotmail.com

Copyright © 2007 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007, 27

temlerini tüketmesi, eritrositlerde hem sentezi ve Hb sentezini inhibe etmesi ile gerçekleştirdiği belirtilmiştir.¹⁻³

Kurşun maruziyetine bağlı olarak prooksidan/antioksidan dengenin bozulması ile hücrelerde meydana gelen oksidatif stresin antioksidanlar aracılığı ile düzeltilmesine ilişkin çok sayıda çalışma mevcuttur. Bundan dolayı; sülfür-içeren antioksidanların kurşun zehirlenmesinin tedavisinde/önlenmesinde etkili bir bileşen olabileceklerine inanmaktayız.

Metiyonin, hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan ve detoksifikasyonda hayati bir rol oynayan glutatyon için prekürsör bir amino asit olarak davranmaktadır.^{4,5} Ayrıca, metiyoninin kurşunla şelasyon yaparak, onu dokulardan uzaklaştırdığı da gösterilmiştir.⁶ LA, trikarboksilik asit döngüsünde yer alan pirüvat ve α -ketoglutarat dehidrojenaz multienzim kompleksinin bir ko-enzimi; şelatör, serbest radikal tutucu etkili ve antioksidanları yenileme özelliğine sahiptir.^{7,8} NAC, glutatyon sentezini arttırarak hücre içi reaktif oksijen türlerinin yakalanmasını sağlayarak kurşuna bağlı oksidatif strese karşı koymaktadır.⁹ Ayrıca, NAC'ın da kurşuna karşı şelatör özelliği bulunmaktadır.¹⁰ Hcy, yüksek konsantrasyonlarda ateroskleroz ve vasküler hastalıklara karşı bağımsız bir risk faktörü olarak bilinen, metiyonin demetilasyonu ile ortaya çıkan bir tiyol formudur.¹¹ Buna rağmen; bazı yazarlara göre Hcy, mikromolar konsantrasyonlarda moleküler yapısında bulunan sülfür grubu ile antioksidan özellik de göstermektedir.¹²

Bu çalışmada kurşun maruziyeti ile değişen oksidatif stres parametreleri ile dokulardaki antioksidan enzim aktiviteleri üzerine sülfür-içeren antioksidanların yararlarını araştırmayı hedefledik. Lipid peroksidasyonu göstergesi olarak MDA'yı ve oksidatif stresin durumu için de eritrositlerde Hb ile dokularda CAT aktivitelerini tespit ettik. Bu çalışmanın diğer bir amacı ise aterogenez aracılığı ile kalp-damar hastalıklarını indüklediği bilinen Hcy'nin kurşun maruziyetine karşı antioksidan bir özelliğinin olup olmadığının incelenmesidir.

Gereç ve Yöntemler

Kimyasallar: Kurşun asetat ve NAC, Merck (Darmstadt, Germany) firmasından, diğer kimyasal maddeler ise Sigma (St. Louis, MO, USA) firmasından sağlandı.

Hayvanlar: Çalışma kapsamına alınan, ağırlıkları 150-200 gram arasında değişen 60 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat, Fırat Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Birimi (FÜTDAM)'nden temin edilmiştir. Hayvanlar çalışmada Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı sonrasında kullanılmıştır. Ratlar aynı ünite de 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ve sıcaklık (20-22°C) kontrolü olan odalarda çelik kafesler içinde; 6 hafta boyunca standart rat yemi ile beslenmiştir.

Deney planı: Denekler rastgele 6 gruba ayrılarak, çalışma grupları oluşturulmuştur. İlk hafta tüm gruplara hiçbir işlem yapılmadan ortama alışmaları sağlanmıştır. Grup 1 (n= 10) kontrol grubu olup, bu gruba 6 hafta boyunca sadece standart yem ve içme suyu verilmiştir. Grup 2 (n= 10)'ye son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat içeren su verilmiştir. Grup 3 (n= 10)'e son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat ve 100 mg/kg/gün olacak şekilde L-metiyonin içeren su verilmiştir. Grup 4 (n= 8)'e son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat içeren su ve 25 mg/kg/gün olacak şekilde α -LA (1:1 oranında etanol: serum fizyolojik karışımında çözülmüş olarak) periton içi verilmiştir. Deney bitimine yakın 10 rattan 2'si enjeksiyona bağlı peritonitten ölmüş ve bu grupta denek sayısı 8 adet kalmıştır. Grup 5 (n= 10)'e son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat ve 800 mg/kg/gün olacak şekilde NAC içeren su verilmiştir. Grup 6 (n= 10)'ya son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat ve 50 mg/kg/gün olacak şekilde L-Hcy içeren su verilmiştir.

Deneysel uygulamadan sonra bütün gruplardaki ratlardan dekapitasyon sonrası kanlar alınarak; kurşun içermeyen antikoagülsüz tüplere (6 mL) konulmuştur. Daha sonra ratların çalışmada kullanılacak olan karaciğer, böbrek ve beyin doku-

ları çıkarılarak; serum fizyolojikle yıkanıp, alüminyum folyolara sarıldı. Hemolizatlar hazırlandı. Doku ve kan örnekleri derin dondurucuda -20°C'de çalışma gününe kadar muhafaza edilmiştir (7 günden daha az).

Ölçümler

Hb ölçümü: Tam kanda Hb konsantrasyonları siyanomethemoglobin metodu ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.¹³ Kan örnekleri (20 µL) Hb ölçümü için 5 mL Drabkin çözeltisi ile (%0.1 sodyum bikarbonat, %0.005 potasyum siyanit ve %0.02 potasyum ferrisiyanit) karıştırıldı. Hb standardı Sigma (St. Louis, MO, USA) firmasından satın alındı.

Doku MDA konsantrasyonlarının ölçümü: MDA düzeyleri Satoh ve Yagi'den modifiye edilen yöntemle Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikler (TBARS) olarak ölçülmüştür.^{14,15} Kısaca; 0.3 mL dokulardan elde edilen homojenatlardan hazırlanan süpernatant, 2.4 mL 1/12 N H₂SO₄ ile santifüj tüpüne konularak iyice karıştırıldı. Daha sonra 0.3 mL %10 (%v/v) fosfotungstik asit tüpe eklenerek, 5 dk. oda ısısında bekletilerek 3.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, sedimente 1.5 mL su eklendi. Tekrar santrifüj yapılarak, süpernatant tekrar atıldı. Sedimente 4.0 mL su ile yeni hazırlanmış 1 mL tiyobarbitürik asit (TBA) ayırıcı [1:1 (v/v) %0.67 TBA ve glasiyal asetik asit] katılarak, iyice karıştırıldı ve 1 saat boyunca kaynar su banyosuna bırakıldı. Suyun soğutulmasından sonra, kalan kromojen 3.0 mL n-butil alkol eklenip iyice sallanarak ekstrakte edildi. Organik faz 10 dk. 3000 rpm'de santrifüj edildikten sonra 530 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Absorbans değeri 1,1,3,3- tetraetoksipropan (SIGMA) ile çizilen standart eğrisi kullanılarak, dokulara ait MDA seviyeleri mmol/mg protein olarak bulundu.

Doku CAT aktivitelerinin tespiti: Dokulardan elde edilen homojenatlardan alınan süpernatantlarda 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Bu yöntemde, hidrojen peroksidin 240 nm'de reaksiyon karışımı içinde bulunan CAT tarafından azaltılması ölçülür.¹⁶

Protein ölçümü: Protein konsantrasyonları MDA ve CAT analizi için kullanılan 1 mL homojenat alınıp karaciğer, böbrek ve beyin için Lowry metodu ile sıgır serum albumini standart olarak kullanılarak gerçekleştirildi.¹⁷ Her örneğin MDA seviyeleri mmol/mg protein olarak, CAT aktiviteleri U/mg protein olarak düzeltildi.

İstatistiksel analizleri

Sonuçlar ortalama ± SD (standart sapma) olarak ifade edildi. Sonuçların analizi One-way varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanılarak SPSS paket programı ile gerçekleştirildi. Gruplar arası anlam farkı, p küçük 0.05 değerleri alınarak gerçekleştirildi.

Sonuçlar

Hb düzeyleri: Tablo 1'de kontrol, tek başına kurşun ve antioksidanlarla birlikte kurşun verilen gruplardaki eritrosit Hb konsantrasyonları verilmiştir. Beş hafta boyunca kurşun verilen gruptaki Hb düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (p< 0.01). Kurşunla birlikte NAC ve Hcy verilen grupta da benzer şekilde anlamlı bir düşüş yaşanmıştır (p< 0.01). Diğer taraftan metiyonin ve LA verilen gruplarda ise hafif derecede bir düşme tespit edilmiştir. NAC ve Hcy verilmesinin kurşunun azalttığı Hb düzeylerine etkisinin olmamasına rağmen; metiyonin ve LA verilmesi kurşun grubuna göre Hb düzeylerini arttırmıştır (p< 0.01).

Tablo 1. Hb düzeyleri.

Gruplar	n	Hb düzeyi (gr/dL)
Kontrol	10	16.52 ± 1.72
Kurşun	10	12.71 ± 1.16 ^a
Kurşun-metiyonin	10	15.65 ± 2.54 ^c
Kurşun-lipoik asit	8	16.51 ± 1.22 ^c
Kurşun-asetilsistein	10	13.58 ± 1.55 ^a
Kurşun-homosistein	10	13.15 ± 1.64 ^a

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

^a: p< 0.01 (kontrolle göre); ^c: p< 0.01 (kurşun grubuna göre).

Doku MDA konsantrasyonları: Tablo 2 tüm gruplardaki karaciğer, böbrek ve beyin dokularına ait MDA düzeylerini göstermektedir. Beş hafta boyunca tek başına kurşun verilen hayvanlarda böbrek ve beyindeki MDA düzeyleri kontrol grubu değerlerinden önemli oranda yüksekti ($p < 0.01$). Kurşunla birlikte NAC verilmesi karaciğer ve böbrek dokularına ait MDA seviyelerinin kurşun grubunun değerlerinden, daha düşük çıkmasına neden olmuştur ($p < 0.05$). Diğer taraftan, kurşuna maruz kalan ratlara NAC ve Hcy verilmesi de yine kurşun grubu değerlerine göre MDA konsantrasyonlarını düşük çıkartmıştır ($p < 0.01$).

Dokulara ait CAT aktiviteleri: Tablo 3'te dokulara ait CAT aktiviteleri gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre böbrek CAT seviyesi kurşun grubunda önemli yüksek ($p < 0.01$); diğer dokularda ise hafif olarak yükselmiş bulundu. Diğer taraftan, kurşunla birlikte Hcy ($p < 0.01$) ve NAC ($p < 0.05$) verilen gruba ait böbrek CAT seviyeleri ise kurşun grubuna göre önemli düşük olarak tespit edildi. Beyinde kurşun-Hcy grubuna ait CAT seviyelerinde kurşun ve kontrol grubuna göre önemli oranda yükselme gözlemlendi ($p < 0.01$). Kurşunla birlikte antioksidan olarak koruyucu amaçlı verilen metiyonin tüm dokularda tek başına kurşun verilen gruba göre hafif derecede düşük CAT düzeylerinin çıkmasına neden oldu. Benzer olarak, NAC verilmesi de karaciğer ve beyin dokularında ölçülen CAT seviyelerinin düşmesine yol açtı. Koruyucu amaçlı LA verilmesi böbrek ve beyinde yine önemli olmayan düşük sonuçların alınmasıyla sonuçlandı.

Tablo 2. Doku MDA konsantrasyonları (mmol/mg protein).

Gruplar	n	Karaciğer	Böbrek	Beyin
Kontrol	10	0.76 ± 0.18	1.31 ± 0.30	2.60 ± 0.71
Kurşun	10	0.88 ± 0.29	2.51 ± 0.79 ^a	4.41 ± 1.25 ^a
Kurşun-metiyonin	10	0.86 ± 0.33	2.04 ± 0.68	3.42 ± 0.91
Kurşun-lipoik asit	8	0.99 ± 0.25	2.55 ± 0.48 ^a	5.03 ± 0.74 ^a
Kurşun-asetilsistein	10	0.47 ± 0.16 ^d	1.54 ± 0.56 ^d	2.70 ± 1.12 ^c
Kurşun-homosistein	10	0.82 ± 0.17	2.07 ± 0.81	2.36 ± 0.71 ^c

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

^a: $p < 0.01$; ^b: $p < 0.05$ (kontrole göre); ^c: $p < 0.01$; ^d: $p < 0.05$ (kurşun grubuna göre).

Tablo 3. Doku CAT aktiviteleri (U/mg protein).

Gruplar	n	Karaciğer	Böbrek	Beyin
Kontrol	10	2542 ± 461	2902 ± 533	3429 ± 236
Kurşun	10	3082 ± 632	3603 ± 478 ^a	3464 ± 453
Kurşun-metiyonin	10	2636 ± 658	3202 ± 427	3462 ± 440
Kurşun-lipoik asit	8	3320 ± 93	3380 ± 137	3228 ± 134
Kurşun-asetilsistein	10	2655 ± 621	2988 ± 258 ^d	3431 ± 429
Kurşun-homosistein	10	3188 ± 626	2684 ± 610 ^c	4096 ± 273 ^{a,c}

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

^a: $p < 0.01$; ^b: $p < 0.05$ (kontrole göre); ^c: $p < 0.01$; ^d: $p < 0.05$ (kurşun grubuna göre).

Tartışma

Kurşun, birçok ülkede endüstride yaygın olarak kullanılmasından dolayı geniş ölçüde yayılarak; çevresel bir problem teşkil etmektedir. Pil, akümülatör, boya, pigment, plastik, seramik sanayi, dökümhane ve kaynak işlerinde çalışanlar için önemli birer mesleki tehdit oluşturmaktadır. Kurşun biyolojik sistem ve hücrelere indirekt olarak oksidatif etkiler yapmaktadır. Kurşun maruziyetine bağlı olarak eritrositler ve dokular ciddi oksidatif hasara uğrarlar. Kurşun özellikle hematolojik sistemi, hem sentezi ve Hb sentezini önleyerek etkilemektedir. Ayrıca, kurşun eritrositlerin yaşam sürelerini ve morfolojik yapılarını da değiştirmektedir.¹⁸ Diğer taraftan, eritrositler kan dolaşımında yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kaldıkları, membranlarının lipid peroksidasyonuna duyarlı olduğu, yapılarında bulunan Hb'nin kolayca otooksidasyona uğraması ve yaşam süreleri boyunca tamir kapasitelerinin sınırlı olması nedeniyle oksidatif hasara karşı oldukça duyarlıdır.¹⁹

Çalışmamızda kurşunla birlikte sülfür içeren bazı antioksidan bileşikler verildi ve dokularda oksidatif stres parametreleri ile antioksidan kapasitesinin araştırılması amaçlandı.

Hb sentezinin kesintiye uğraması ve kurşun iyonları ile doğrudan membranlarının zarar görmesi sonucunda kurşun zehirlenmesine bağlı olarak en başta anemi ortaya çıkmaktadır.^{20,21} Çalışmamızda 5 hafta boyunca suları ile oral olarak kurşun asetat verilmesi eritrositler üzerine toksik etki yaparak Hb konsantrasyonlarında önemli bir düşüşe neden olmuştur. Bu sonuçlar Solliway ve ark. ile Machartova ve ark.'nın kurşuna maruz kalmış işçi-

lerde buldukları Hb seviyeleri ve eritrosit sayıları ile uyumludur.^{23,24} Benzer şekilde kurşuna maruz bırakılan ratların tam kanlarında da Hb düzeylerindeki düşme bildirilmiştir.^{24,25}

İn vivo kurşunla uyarılan lipid peroksidasyonu MDA gibi aldehidik son ürünlerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Artmış bu lipid peroksidasyonunun 2 mekanizma ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. İlk olarak, kurşunun peroksidatif aktivitesi delta-aminolevülinik asidin (ALA) uyardığı reaktif oksijen türevlerinin etkisine bağlanabilir. Kurşunun hem sentezinde yer alan delta-aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) enzimin aktivitesini önleyerek, peroksidatif aktiviteyi ve reaktif oksijen türevlerinin üretimini arttırdığı yaygın olarak bilinmektedir.²⁶ İkinci olarak ise, indirekt aktivite ile kurşun hücre membranlarının komponentlerine bağlanarak ve hücrelerin reaktif oksijen türevlerine duyarlılığını ya da antioksidan savunma sistemlerini de değiştirebilir.²⁷ Patra ve ark. 4 hafta boyunca 1 mg/kg periton içi kurşun asetat verdiklerinde karaciğer ve beyinde MDA seviyelerinin önemli; böbrekte ise hafif bir yükselmeye neden olduğunu tespit etmişlerdir.⁶ Beşinci hafta hiçbir uygulama yapmadıkları ratlara verdikleri askorbik asit ve α -tokoferole bağlı olarak karaciğer ve beyin dokularındaki MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre önemli düşme; böbrek dokularında ise kurşun grubuna göre önemli düşme tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada verdikleri metiyonin ise karaciğer ve beyinde yine önemli düşme; böbrek ve beyinde ise hafif derecede düşmeye neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda kurşuna bağlı olarak istatistiksel olarak önemli yükselmiş doku MDA düzeyleri yukarıdaki ile daha önce yapılmış diğer çalışmalarla da aynı doğrultudadır.^{28,29}

Kurşun zehirlenmesinde, kurşuna bağlı olarak artan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), singlet oksijen ve hidroksil radikali (HO^{\cdot}) şu etkiler ile meydana gelmektedir:

a) Kurşunla Hb'nin methemoglobine dönüşmesinin arttırılması,

b) ALAD enziminin aktivitesinin engellenmesi sonucunda ortamda ALA'nın birikmesi.³⁰ CAT, H_2O_2 'yi suya dönüştürerek hücreleri zararlı etkilerinden korumaktadır.

Bu çalışmada, kurşuna maruz bırakılan gruba ait böbrek dokusu CAT aktiviteleri önemli ve diğer dokularınki ise hafif olarak yükselmiştir. Deneysel ve klinik çalışmalar sonucunda kurşunu maruz kalan hayvanlar ve işçilerde kurşunun CAT üzerine etkileri farklı sonuçlar vermiştir. Sivaprasad ve ark. 5 hafta boyunca 2000 ppm kurşun asetatı oral olarak verip, 6. hafta izotonik tuzlu su verdikleri ratların karaciğer ve böbrek dokularında CAT aktivitelerinin düştüğünü tespit etmişlerdir.^{28,29} Patra ve ark. yukarıdaki bahsedilen çalışmalarında askorbik aside bağlı olarak karaciğer ve beyin dokularındaki CAT aktivitelerinde kontrol grubuna göre önemli yükselme; böbrek dokularında ise kurşun grubuna göre önemli yükselme tespit etmişlerdir.⁶ Aynı çalışmada verdikleri α -tokoferolün ise kontrol grubu değerlerine göre hafif derecede bir yükselme meydana getirdiğini; metiyonin ise karaciğer ve beyinde yine hafifçe yükselme; böbrekte ise hafif derecede düşmeye neden olduğunu göstermişlerdir. Daha önceki araştırmacılar tarafından bu durum; yükselmiş CAT aktivitelerinin hücrelerde kurşun tarafından arttırılan reaktif oksijen türevlerinin cevaben ya da azalan CAT aktivitelerinin ise kurşunun azalttığı bağırsaklardan demir emilimi veya önlediği hem biyosentezi nedeniyle gerçekleştiği şeklinde açıklanmıştır.^{31,32}

Chiba ve ark.nın kan konsantrasyonları 10 $\mu g/100$ mL'nin altında, 10 ila 20 $\mu g/100$ mL arasında ve 20 $\mu g/100$ mL'nin üzerinde şeklinde gruplandırarak kurşuna maruz kalmış işçiler üzerinde yaptıkları çalışmada CAT aktiviteleri en son grupta ilk gruba nazaran önemli yüksek olarak ölçülmüştür.³³ Gurer-Orhan ve ark. ise kurşuna maruz kalmış akü fabrikası işçileri ile sağlıklı bireyler arasında yaptıkları analizlerde eritrosit CAT aktivitelerini önemli yüksek bulmuşlardır.³⁴ CAT aktivitelerinde olan yükselmeyi kurşuna bağlı olarak artmış H_2O_2 düzeylerine karşı eritrositlerin göstermiş olduğu bir savunma mekanizması olarak açıklamışlardır.

Çalışmamızda kurşunla birlikte koruyucu antioksidan olarak verilen metiyonin düşük moleküler ağırlığa sahip ve yapısında sülfür içeren esansiyel bir amino asittir. Her ne kadar kurşun zehirlenmesindeki koruyucu etkisi in vivo olarak reaktif oksijen türevle-

rini azaltan GSH sentezi için gerekli sisteine dönüşmesi olsa da tam olarak etki mekanizması bilinmemektedir.³⁵ Metiyoninin yapısında sülfür grubu taşıması nedeniyle kurşun ile şelat oluşturabilme yeteneği de bulunmaktadır.³⁶ Çalışmamızda tek başına kurşun verilen grup ile karşılaştırıldığında; koruyucu amaçlı kurşunla birlikte metiyonin verilen gruba ait Hb seviyeleri önemli yüksek, doku MDA seviyeleri ise hafif düşük olarak bulunmuştur. Öte yandan; karaciğer, böbrek ve beyin CAT düzeyleri ise yine kurşun grubuna göre hafif derecede düşmüş olarak tespit edilmiştir. CAT seviyelerindeki önemli olmayan düşme daha önce yapılan çalışmalarla tam olarak uyuşmamaktadır. Muhtemelen bu durum daha önceki çalışmalarda son haftada kurşunun kesilmesi ve sadece antioksidan bileşiklerin verilmesi; çalışmamızda ise sürekli kurşuna ratların maruz bırakılması nedeniyle gerçekleşmiştir.

Mitokondrilerin birçok multienzim komplekslerinin kofaktörü olan LA'nın kurşunun toksik etkilerine karşı antioksidan potansiyeli olduğu bilinmektedir. *In vivo* olarak LA yapısında iki serbest sülfhidril grubu taşıyan dihidrolipoik aside (DHLA) dönüşmektedir. LA ve DHLA;

a) Bazı reaktif oksijen türevlerini tutabilir,

b) Radikal veya inaktif formlarından GSH ve vitamin A ve E gibi antioksidanları tekrar aktif hale dönüştürebilir,

c) Bazı metallere karşı şelasyon aktivitesine sahiptir.

Ayrıca hücrelerin kaybettikleri GSH düzeylerinin karşılanmasında milimolar miktarlarda NAC gerekirken; benzer etkiyi mikromolar düzeylerde karşılaması nedeniyle NAC'a göre daha üstün olduğu da ileri sürülmüştür.⁸ Bunun yanı sıra LA kan-beyin engelini de kolayca geçebilmektedir.³⁷ Bu çalışmada, kurşunla birlikte oksidatif etkilerinin önlenmesi için LA verilmesi eritrositlerin azalan Hb konsantrasyonlarını önemli yükseltmiş, dokulara ait MDA seviyelerini ise kurşun grubuna göre yükseltmiştir. MDA seviyelerindeki bu yükselme muhtemelen LA grubundaki ratların peritonite bağlı ölümleri ve enjeksiyona bağlı stresleri nedeniyle gerçekleşmiştir. Karaciğer CAT aktivitelerini kurşun grubuna göre hafif derecede yükseltirken; böbrek ve beyinde azaltmıştır.

Böylece böbrek ve beyinde antioksidan etkisini göstermiş, karaciğerde ise muhtemelen kurşunun CAT enziminin yapısında yer alan hem sentezini azaltması sonucu tam olarak etki gösterememiştir.

NAC da oksidatif stresin etkilerini azaltmak için kullanılan sülfürlü antioksidanlardan biridir. Birçok araştırmacı reaktif oksijen türevlerini tutan hücre içi glutatyon seviyelerini sentezini stimüle ederek ve kurşunla şelat oluşturarak NAC'ın kurşun zehirlenmesinde yararlı olduğunu göstermişlerdir.^{10,38} Bu çalışmada, tek başına kurşun verilen gruba göre NAC'ın birlikte verildiği grupta, doku MDA seviyeleri ile böbrek CAT aktivitelerinin önemli oranda azaldığını tespit ettik. Hb seviyeleri hafif derecede yükselirken, karaciğer ve beyindeki CAT seviyeleri ise azalmıştır. Tüm bu olumlu etkileri kurşuna maruziyet esnasında NAC'ın çalışmamızda kullanılan diğer antioksidanlara göre daha fazla şelat oluşturabilme yeteneğinden kaynaklandığı kanaatindeyiz.

Hayvan ve insanlarda Hcy'nin metiyoninin demetilasyonu ile oluşan sülfürlü bir formu olduğu gösterilmiştir. Hcy, *in vivo* konsantrasyonu düşük olduğu zaman metiyonine veya sisteine dönüştürülebilir. Hiperhomosisteinemi ise ateroskleroz ve aterosklerotik damar hastalıkları için bağımsız bir risk faktörüdür.³⁹ Zappacosta ve ark. Hcy'nin önemli miktarda H₂O₂ üretmediğini (1 mol H₂O₂ üretimi için 4000 mol Hcy gerekir) ileri sürmüştür.⁴⁰ Aynı çalışmada, yüksek derecede okside olabilen sırasıyla 'luminol ve dihidrodaminin' hipoklorit ve peroksinitrit tarafından 'aminoftaley' ve 'rodamine' oksidasyonunu engelleyerek ya da ferrilmyoglobini metmyoglobine dönüşümünü artırarak antioksidan bir etki sergilediğini de belirtmişlerdir. Hücresel ve kimyasal sistemlerde mikromolar konsantrasyonlarda prooksidan etki yerine antioksidan etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.^{12,40} Her ne kadar birçok yazar prooksidatif etkileri nedeniyle Hcy'nin kalp-damar hastalıkları ile ilişkisinin olduğunu ileri sürseler de, muhtemelen kurşun zehirlenmesinin tedavisinde kullanılan D-penisilamine yapısal olarak benzerliğinden dolayı kurşunla şelat oluşturabilme yeteneği göstermektedir. D-penisilamine olan yapısal benzerliği daha önceki çalışmalarda belirtilmiş-

tır.^{41,42} Ayrıca bizim düşüncemize göre; Hcy'nin yapısında yer alan sülfür grubu ağır metallerle şelat oluşturarak vücuttan atılımlarını da arttırmaktadır. Çalışmamızda koruyucu olarak Hcy verilen grupta kurşun grubuna göre beyin MDA seviyeleri ile böbrek CAT aktiviteleri önemli, diğer dokularda MDA seviyeleri hafif oranda düşmüştür. Eritrosit Hb seviyeleri, karaciğer CAT aktiviteleri hafif ve beyin CAT aktiviteleri ise önemli olarak yükselmiştir. Hcy'den daha iyi bir verim alınabilmesi için doz-antioksidan etki ilişkisinin yeni çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

Sonuç

Yukarıdaki sonuçlar ışığında kurşun maruziyeti esnasında sülfür içeren amino asitlerin diyetlere eklenmesi ile kurşuna bağlı oluşan oksidatif zararların en aza indirilebileceği ortaya konulmuştur. Öte yandan; Hcy de lipid peroksidasyonun önlenmesinde ve doku CAT enzim indüksiyonda etkili bulunmuştur.

Teşekkür

Doku CAT aktivitelerinin ölçülmesinde yardımlarından dolayı Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı asistanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Dr. Emrah ÇAYLAK Üniversitesi Bilimsel Araştırma Kurumu (FÜBAP) tarafından 801 no.lu proje ile tez için desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Hermes-Lima M, Pereira B, Bechara EJ. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* 1991;21:1085-90.
- Sandhir R, Julka D, Gill KD. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol Toxicol* 1994;74:66-71.
- Warren MJ, Cooper JB, Wood SP, Shoolingin-Jordan PM. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Trends Biochem Sci* 1998;23:217-21.
- Reed, DJ, Orrenius S. The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;77:1257-64.
- Reed DJ. Glutathione: Toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:603-31.
- Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK. Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 2001;162:81-8.
- Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J* 1990;4:3224-33.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995;19:227-50.
- Ercal N, Treeratphan P, Lutz P, Hammond TC, Matthews RH. N-acetylcysteine protects Chinese hamster ovary (CHO) cells from lead-induced oxidative stress. *Toxicology* 1996;108:57-64.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989;6:593-7.
- Refsum H, Ueland PM. Recent data are not in conflict with homocysteine as a cardiovascular risk factor. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:533-9.
- Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Giardina B, De Sole P. Effect of homocysteine on polymorphonuclear leukocyte activity and luminol-dependent chemiluminescence. *Luminescence* 2000;15:257-60.
- Leong WI, Bowlus CL, Tallkvist J, Lonnerdal B. DMT1 and FPN1 expression during infancy: Developmental regulation of iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:1153-61.
- Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978;90:37-43.
- Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol* 1984;105:328-31.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- Leggett RW. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ. Health Perspect* 1993;101:598-616.
- Rice-Evans C. Iron-mediated oxidative stress and erythrocytes. In: Harris JR, ed. *Blood Cell Biochemistry*. 1st ed. New York: Plenum Press; 1990. p.429-53.
- Waldron HA. The anaemia of lead poisoning: A review. *Br J Ind Med* 1966;23:83-100.
- Sugawara E, Nakamura K, Miyake T, Fukumura A, Seki Y. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *Br J Ind Med* 1991;48:239-42.
- Solliway BM, Schaffer A, Pratt H, Yannai S. Effects of exposure to lead on selected biochemical and hematological variables. *Pharmacol Toxicol* 1996;78:18-22.
- Machartova V, Racek J, Kohout J, Senft V, Trefil L. Effect of antioxidant therapy on indicators of free radical activity in workers at risk of lead exposure. *Vnitr Lek* 2000;46:444-6.
- El-Missiry MA. Prophylactic effect of melatonin on lead-induced inhibition of heme biosynthesis and deterioration of antioxidant systems in male rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2000;14:57-62.
- Gurer H, Ozgunes H, Neal R, Spitz DR, Ercal N. Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology* 1998;128:181-9.

26. Ribarov SR, Benov LC. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1981;640:721-6.
27. Lawton LJ, Donaldson WE. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res* 1991;28:83-97.
28. Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Nutr Biochem* 2004;15:18-23.
29. Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney. *Arch Toxicol* 2002;76:437-41.
30. Bechara EJ. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:841-51.
31. Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad AR. Effect of lead on lipid peroxidation of the hepatic subcellular organelles of developing chick embryos. *Biochem Int* 1992;27:803-9.
32. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med* 2000;29:927-45.
33. Chiba M, Shinohara A, Matsushita K, Watanabe H, Inaba Y. Indices of lead-exposure in blood and urine of lead-exposed workers and concentrations of major and trace elements and activities of SOD, GSH-Px and catalase in their blood. *Tohoku J Exp Med* 1996;178:49-62.
34. Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgunes H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology* 2004;195:147-54.
35. Kalia K, Flora SJ. Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *J Occup Health* 2005;47:1-21.
36. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev* 2002;7:22-44.
37. Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, et al. Alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1996;717:184-8.
38. Ottenwalder H, Simon P. Differential effect of N-acetylcysteine on excretion of the metals Hg, Cd, Pb and Au. *Arch Toxicol* 1987;60:401-2.
39. Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:385-9.
40. Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, et al. Is homocysteine a pro-oxidant? *Free Radic Res* 2001;35:499-505.
41. Kang AH, Trelstad RL. A collagen defect in homocystinuria. *J Clin Invest* 1973;52:2571-8.
42. Zhou J, Moller J, Danielsen CC, et al. Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1470-6.