

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Fizyoloji Anabilim Dalı

ÇİNKONUN ERİTROSİT MEMBRAN AKIŞKANLIĞINA
ETKİSİ

T177/1-1

Abdurrahman ŞERME T

Akdeniz Üniversitesi
Rektörlük Kütüphanesi
Demirbaş No. 4387

Doktora Tezi
Antalya 1986

İ Ç İ N D E K İ L E R

- Giriş 1 - 2
- Genel Bilgiler 3 - 13
- Gereç ve Yöntemler 14 - 23
- Bulgular 24 - 44
- Tartışma 45 - 50
- Özet 51 - 52
- Kaynaklar 53 - 63

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde yapılmasını arzulayan ve bu konuda gerekli koşulları sağlayan Sayın Hocam Prof.Dr.Rüknettin TANALP'a ve Cerrahi Araştırma Merkezinin olanaklarından yararlanmama izin veren Değerli Hocam Sayın Prof.Dr.Naci BOR'a minnet duygularımı arz ederim.

Doktora öğrenimim süresince ve tezimin hazırlanmasında devamlı ilgi, eleştiri ve önerileri ile bana yol gösterip yardımcı olan Rehber Hocam Sayın Prof.Dr.Gülşen ÖNER'e minnet ve şükran duygularımı saygılarımla arz ederim.

Tezimin yazılmasında emeği geçen Anabilim Dalımız Sekreteri Sayın Leman AKSARAY'a ve Bilim Dalımızdaki tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

G İ R İ Ő

İnsan vücudunda demirden sonra en çok bulunan iz element çinkodur (23).Metabolik fonksiyonlarla ilişkisi yoğun araştırmalara konu olmuş ve 80' den fazla metalo-enzimin aktivitesi için gerekli olduğu gösterilmiş (86) olan çinkonun, bilinen metalo-enzimlerden bağımsız fizyolojik görevleri de olduğu düşünölmektedir (11).

Çinko eksikliğinin en önemli bulgularından birisi demir tedavisine dirençli anemidir(1). Özellikle eritrosit fragilitésinin çok artmış olduğu bu hastalarda in vitro olarak ortama çinko ilavesi ile fragilitenin düzelmesi çinko ile eritrosit membranı arasındaki yakın ilişkiyi göstermektedir.

Çinkonun membranın makromolekülleri ile ilişkiye girerek alışkanlığını etkilediğine ve dolayısıyla membran aracılığı ile olan hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde (8,9,11) rol aldığına inanılır. Çinkonun biolojik membranları stabilize ettiği ve çeşitli maddelere karşı geçirgenliğini değiştirttiği (13,23,70) bildirilmiştir.Membranın yapısal bir komponenti olan çinkonun eksikliğinde, membran bütönlüğünün bozulması kaçınılmaz sonuçtur.

Çinko eksikliğinde eritrosit membran akışkanlığında gözlenen değişikliklere benzer bozukluklar lipid metabolizması ile ilgili patolojik hallerde ve karaciğer hastalarının eritrositlerinde de gözlenmektedir(71-76). Çinko ile Lipid metabolizmasının yakın

ilişkisi dikkate alındığında, çinkonun eritrosit membran akışkanlığına etkisinin membran lipidleri üzerinden olabileceği düşünülebilir, ancak membran lipid kompozisyonuna çinkonun etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bilindiği gibi eritrosit membran akışkanlığındaki bozulmaya frajilite artışı eşlik eder. Çinko eksikliğinde frajilite artışı ile karakterize aneminin mevcudiyeti, çinkosuzluğun sebep olduğu membran akışkanlık bozukluğunun sonucu olabileceği sorusu yanıt beklemektedir.

Bu nedenle çalışmamızda deneysel çinko eksikliği oluşturduğumuz sıçanlarda eritrosit membran akışkanlığı ölçüldü ve gözlenen bozulmanın çinko tedavisine bağlı olarak düzelmesi ile de membran akışkanlığına çinkonun etkili olduğu kanıtlandı.

GENEL BİLGİLER

A-Hücre Membranı

Hücreyi çevreleyen membranın yapısı ve fonksiyonlarını açıklamak için çeşitli membran modelleri önerilmişse de bunlar arasında en çok taraftar bulan ve bugün de önemini koruyan model Singer ve Nicolson tarafından önerilen sıvı mozaik membran modelidir (91). Bu modele göre hücre membranı, çift katlı lipid tabakası ve bu lipid matriks içinde gelişigüzel dizilmiş globüler proteinlerden meydana gelmiştir.

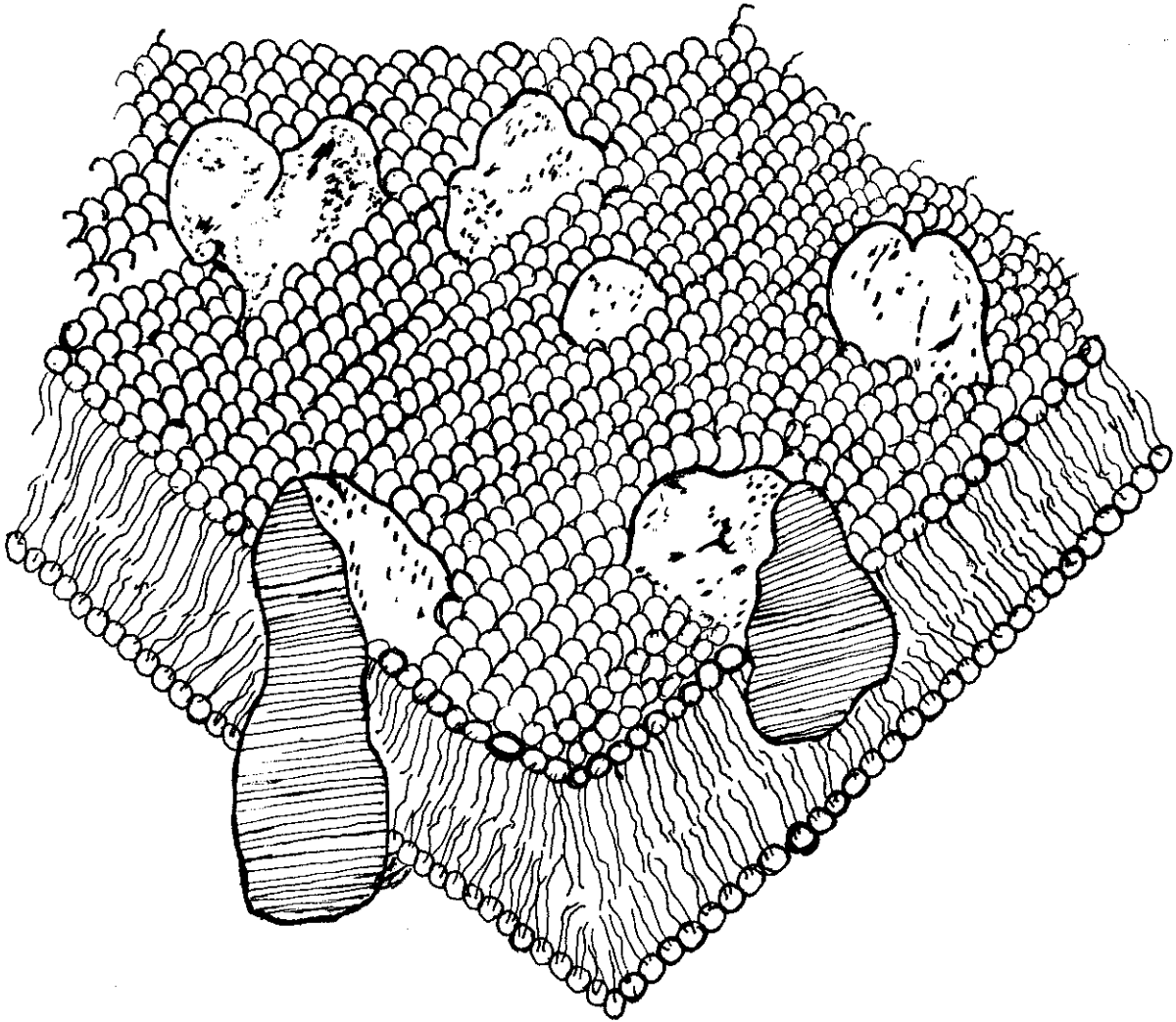
Lipidlerin çoğunluğunu fosfolipidler oluşturur. Fosfolipid moleküllerinin baş kısmını oluşturan fosfatlar pozitif olarak yüklenmiştir (39). Suda çözünebilen bu hidrofilik uçlar membranın dış ve stoplazmik yüzeyine yönelmişlerdir (29). Molekülün kuyruk kısmı iki yağ asidi zinciri içerir ve suda çözünmez. Bu hidrofobik uçlar membranın sudan fakir olan iç kısmında toplanır (Şekil 1).

Prokaryotlarda membran lipidleri sadece fosfolipidlerden meydana geldiği halde ökaryotlarda hücre membranları kolesterol de içerir (16,39). Kolesterol muhtemelen her iki lipid tabakası arasında dengeli bir şekilde dağılmıştır (33).

Kolesterol ve fosfolipidler arasındaki etkileşme, membranın yüzeyine yakın molekülleri hareketsizliğe zorlar. Karşıt olarak

membranın hidrofobik merkezine yakın moleküllerin hareket özgürlükleri artar. Böylece Chapman'ın isimlendirdiği gibi orta kısımda akışkan bir durum "an intermediate fluid state" oluşur (91).

Singer membran proteinlerini integral ve periferel proteinler olarak iki gruba ayırmıştır (91). İntegral proteinlerin bazıları membranın dış yüzeyinden iç yüzeyine kadar uzanmakta diğerleri ise sadece bir yüzeyde görülmektedir (Şekil 1).



Şekil 1: Sıvı Mozaik Membran Modeli.

Protein moleküllerinin yüksüz hidrofobik kısımları membranın içine, yüklü hidrofilik kısımları dış ve iç yüzeyine gelecek şekilde yerleşmiştir (39). Periferel proteinler membrana zayıf bir şekilde bağlı oldukları halde integral proteinler membrana sıkıca bağlıdır (91).

Membran proteinleri fonksiyonlarına göre beş gruba ayrılabilir (39):

- 1- Yapısal proteinler,
- 2- İyonların aktif olarak taşınmasını sağlayan proteinler,
- 3- İyonlar için pasif kanalları oluşturanlar,
- 4- Reseptör olarak görev yapan proteinler ve
- 5- Membran yüzeyinde reaksiyonları katalizleyen enzimler.

Biyolojik membranların protein yapısı ve enzim içeriği hücreden hücreye farklılık gösterir. Membranda bazı proteinler lateral olarak hareket ederler. Bu hareketler gelişigüzel değildir, muhtemelen mikroflament veya mikrotübüller ile kontrol edilirler (5,39).

Çalışmamızda eritrosit membranını incelendiği için eritrosit membranının yapısı ve özellikleri üzerinde daha fazla durulmuştur. İnsan eritrosit membranı % 52 protein, % 40 lipid ve % 8 karbohidrat içerir. Lipidlerin % 54'ü fosfolipid, % 43'ü kolesterol ve % 3'ü glikolipidlerden oluşur (101).

Eritrosit membranının integral proteinlerinden glikoforin A ve komponent a (band 3) ayrıntıları ile bilinmektedir. Glikoforin A eritrosit membranının başlıca glikoproteinidir ve % 40 protein, % 60 karbohidrat içerir (95). Membranı bütün kalınlığına kateder. Karboksi terminali membranın stoplazmik yüzeyine, N-ter-

minali dış yüzeyine yönelmiştir. N-terminaline bağlanan oligosakkarit zincirleri A,B,M,N kan grubu antiijenlerini ve membran sialik asidinin büyük bir kısmını içerir. Sialik asit membrana negatif yük kazandırır ve böylece eritrosit aglütinasyonunu önler (26,101). Komponent a total membran proteininin 1/4'ünü oluşturur. Anyonlar ve D-glukozun kolaylaştırılmış diffüzyonu için kanal olarak fonksiyon yaptığı indirekt kanıtlarla gösterilmiştir (17, 68).

Periferel proteinlerden spektrin, iki değerli katyonlar özellikle kalsiyum ile suda çözünmeyen fibrilli bir yapı oluşturur. Membran iskeletinin başlıca proteinidir (67). Aktin ile birlikte ağ örgüsü şeklinde eritrosit membranının iç yüzeyinde bulunur. Bu ağ örgüsü glikofarin A ve band 3 proteinlerinin stoplazmik uçlarına bağlanır ve membranı stabilize eder (95). Spektrin Mg^{++} ATP ile fosforile olur. Spektrin-aktin kompleksi eritrosit şeklinin korunmasında önemlidir (101). Spektrin yapısını bozan ajanlar eritrositlerin küresel şekle dönmesine neden olur (51). Kalıtsal sferositozis, elliptositozis ve orak hücreli (sickle cell) gibi hemolitik anemilerde spektrin-aktin kompleksinin fonksiyon ve yapısının kusurlu olduğu gösterilmiştir (26).

Eritrosit membranına bağlı olan ve ATP kullanan enzimler: Bunlar arasında en önemlileri adenil-siklaz, protein kinazlar ve ATP ase'lerdir (90). Protein kinazlar ATP ile membran proteinlerini fosforile eder (101). Fosforilasyon eritrositlerin deforme olma yeteneğini ve şeklini etkiler (68). Sickle cell anemide protein kinaz aktivitesi azaldığı için orak şekilli eritrosit, RES kapillerlerinde takılır ve parçalanır (71,101).

Membran fosfolipidlerinin çoğunluğunu lesitin, sfingomiyelin, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin teşkil eder. Bu fosfolipid grupları membranın iki yanına asimetrik olarak dağılmıştır. Bu asimetrinin fonksiyonel önemi yeterince bilinmiyor (87). Fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin daha çok iç lamelde, lesitin ve sfingomiyelin dış lamelde yerleşmiştir. Membran lipidlerinin küçük bir bölümünü oluşturan glikolipidler ise dış lamelde yer alır (29, 39, 101).

Fosfolipidlerdeki yağ asitlerinin yaklaşık olarak yarısı doymuş, diğer yarısı doymamıştır (65). Fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin daha çok doymamış yağ asitlerini içerir. Lesitin kısa zincirli doymuş yağ asitlerinden, sfingomiyelin ise uzun zincirli yağ asitlerinden zengindir (82, 97). Membranın diğer lipidi olan kolesterol, membran akışkanlığında anahtar role sahiptir (33, 74). Membran kolesterol içeriğinin artışı ve kolesterol/fosfolipid oranının (C/P) büyümesi akışkanlığın azalmasına yol açar (33, 65, 74). Şüphesiz ki membran akışkanlık özelliğinin tek belirleyicisi C/P oranı değildir. Akışkanlık, fosfolipid yağ asidi zincirlerinin uzunluğu ve doymamış çift bağların sayısından da etkilenmektedir (16, 97). Doymuş yağ asitlerinden zengin olan membranlarda akışkanlık azaldığı halde doymamış yağ asitleri daha çok olanlarda membran akışkanlığı artmaktadır (76). Ayrıca, membran sfingomiyelin ve lesitin düzeyleri de akışkanlığı etkilemektedir. Sfingomiyelin/lesitin oranının büyümesi halinde membran akışkanlığı azalır (101).

B-Membran Lipid Kompozisyonunun Korunması

Plazma lipoproteinlerindeki kolesterol ve fosfolipid hücrelerle ilişkiye girer (47). Bu ilişki, kolesterol ve fosfolipid sentezi için gerekli enzimatik sistemden yoksun olan eritrositler yönünden çok önemlidir (27). Eritrosit membranında bulunan serbest

kolesterol ve fosfolipidler plazma lipoproteinlerindeki karşılıkları ile değiş-tokuş edilir (50). Bu değişimin sonucu olarak, membranın kolesterol, fosfolipid ve yağ asidi komponentleri, plazmadaki lipid bileşimine benzemeye meyleder (25,27,47,52). Eritrosit membranına kolesterol girişi düşük dansiteli lipoproteinde (LDL) bulunan serbest kolesterolün yoğunluğuna bağlıdır ve aralarında doğru bir ilişkinin bulunduğu gösterilmiştir (50). Lesitin-kolesterol ağiltransferaz (LCAT) yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ile birlikte plazmadaki serbest kolesterolü esterleştirek eritrosit membranına kolesterol girişini azaltır ve bunun sonucu olarak LCAT-HDL sistemi eritrosit membranından kolesterolü uzaklaştırarak plazmadaki serbest kolesterolün eritrosit membranında birikmesini önlemiş olur (47,69,72,75).

Plazma lipoproteinlerindeki kompozisyon değişiklikleri eritrosit membranına yansımaktadır ve membranın total fosfolipid düzeyi genellikle değişmediği halde kolesterol miktarı artmaktadır (71,74,75,76). Bu nedenle plazma kolesterol düzeyi ve komponentlerinde değişiklik yapan patolojik durumlardan eritrosit membranının doğrudan etkilenmesi tabii bir beklentidir. Nitekim bunun doğruluğu klinikte plazma lipid kompozisyonuna etkili çeşitli hastalıklarda eritrosit membran bozukluğu ve beraberinde hemolitik aneminin bulunuşu ile gösterilmiştir (71,72,74).

Kan lipidlerine etki eden faktörler arasında lipid metabolizması ile ilgili organların fonksiyonel bozukluğu, hormonlar, ilaçlar ve diyet yer almaktadır (82,98).

Parankimal karaciğer hastalığında eritrosit membranının kompozisyonu değişir (71). Bunun sonucu olarak eritrositlerin şekli

bozular. Yayma kan preparatlarında "spur" mahmuz ve "target" hedef hücreler görülür (73-76). Spur hücrelerde fosfolipid bileşimi değişmediği halde target hücrelerde lesitin düzeyi artmıştır. Her iki durumda da membranın kolesterol miktarı ve C/P oranı yükseldiği için akışkanlığı azdır (71,72,73,76). Kalıtsal LCAT eksikliğinde de eritrositler target hücre şekline dönmüştür (72). Membranın kolesterol ve lesitin içeriğinde artış vardır. Akışkanlık C/P oranındaki yükselmeye bağlı olarak azalmıştır (34,101). Abetalipoproteinemia'da eritrositler spur hücrevi andırır. Ancak membran kolesterolü normal veya hafifçe artmış olduğu halde lesitin miktarında azalma, sfingomiyelinde artış vardır. Membran akışkanlığı azalmıştır (72,74,75,101).

Diyet, plazma lipid bileşimini değiştirdiği için membran akışkanlığına dolaylı olarak etkili bir başka faktördür. Kolesterooldan zengin diyetle beslenen tavşan, kobay ve köpeklerin, eritrosit membranında C/P oranının artışı ve akışkanlığının azaldığı gösterilmiştir (28). Doymuş yağ asitleri oranı yüksek diyetle beslenen sığıanlarda eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (37). Obezlerde membran C/P oranınının değişmediğini ileri süren yayınlar dikkate alındığında membran akışkanlığı diyetten etkilenmemektedir.

İlaçların membran akışkanlığına etkisi: Psikotrop ilaçlar (chloropromazine gibi), alkol, lokal anestetikler (prokain) membran akışkanlığını azalttığı halde (40), insülin arttırıcı yönde etki gösterir (18). Köpeklerde troid bezinin çıkarılması halinde eritrosit membranında kolesterol artışına bağlı olarak akışkanlığın azaldığı belirtilmiştir (40). Troid hormon eksikliği hiperkolesterolemi yaparak (65) diyet gibi dolaylı olarak membran akışkanlığına etki etmektedir.

C- Çinkonun Membran Akışkanlığına Etkisi

Hücre membranına etki eden faktörlerden birisinin de çinko olduğu sayısız çalışma (11,12,13,21,23) ile gösterilmiştir. Çinkonun membranı stabilize edici etkisini, membran proteinlerinin sülfidril grupları ile çinkonun birleşerek stabil merkaptidler oluşturması şeklinde açıklıyanlar (23) yanında membranda fosfolipidlerin fosfat kısmına ve sialik asidin karboksil gruplarına çinkonun bağlanarak membranların stabilizasyonu ve akışkanlığını değiştirdiğini bildirenler de vardır (11).

Plazma membranına bağlı çeşitli enzimler membran bütünlüğünü ve fonksiyonunu kontrol ederler. Bu enzimlerden bazılarının çinkodan etkilendiği gösterilmiştir (11, 21, 23, 44, 60, 66). Eritrosit membranındaki Ca^{++} -ATPase çok düşük düzeyde çinko iyonları ile in vitro olarak inhibe olmaktadır (60). Karaciğer hücresinde adenil-siklazın çinko ile inhibe edildiği ve glukagon ile stimüle olan cAMP üretiminin baskılandığı rapor edilmiştir (67). Ekstraselüler çinko düzeyinin artması ile lökosit Na^{+} - K^{+} ATPase aktivitesinin yükseldiği, karşıt olarak serebral Na^{+} - K^{+} ATPase aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (21, 23, 44).

Karaciğer lizozomlarından B glukorinidaz salıverilmesi ve mast hücrelerinden histamin açığa çıkışının çinko ile önlendiği (11,21) ayrıca lökosit lizozomlarından enzimlerin açığa çıkışının çinko ile baskılandığı bilinmektedir (24). Ekstraselüler çinko düzeyindeki artış peroksidatif streslere karşı membran bütünlüğünü korur (96). Karbon tetraklorüre bağlı karaciğer hücre membran peroksidasyonunun çinko ile önlendiği rapor edilmiştir (96). Nitekim bu iyonun eksikliğinde lipid peroksidasyon artışına bağlı olarak membran bütünlüğünün bozulduğu ve geçirgenliğinin değiştiği ileri sü-

rülmüştür (21). Bunun yanında peroksidaz, onda rolü olan membran superoxide dismutase enzim aktivitesinin çinko eksikliğinden ziyade bakır iyonlarından etkilendiği de bilinenler arasındadır (12).

Eritrosit membranı önemli miktarda çinko içerir ($68 \pm 6 \mu\text{g/g}$). Yetersiz çinko alan sıçanlarda eritrosit membran çinkosu azalmakta buna karşın ozmotik frajilitesi artmaktadır (6,13). Ayrıca in vitro olarak oksidatif ajanlara karşı eritrositlerin hemoliz olma eğiliminde artış olduğu ve çinko eksikliğinin giderilmesi ile düzeldiği gösterilmiştir (22). Diyetle fazla çinko alınması, normal eritrositlerin ozmotik hemolize karşı direncini yükseltir (1,11).

Chvapil çinkonun membran üzerindeki etkilerini aşağıdaki şekilde açıklamıştır (23).

1- Çinko membran bütünlüğünü kontrol eden enzimlerle ilişkiye girmektedir.

2- Membranın proteinleri ile etkileşerek konformasyonlarını ve lipidlerin akışkanlığını değiştirerek enzim-substrat ilişkisini etkilemektedir.

3- Bakır, demir gibi metaller ile katalizlenen lipid peroksidasyonunu önlemektedir.

Bir başka olasılıkta çinkonun lipoprotein metabolizmasını etkileyerek plazma lipid kompozisyonunu ve buna bağlı olarak hücre membranlarında lipid bileşimini değiştirebilmesidir. Ancak literatürde bunu doğrudan gösteren bir çalışma mevcut değildir. Bununla birlikte çinkonun kolesterol metabolizmasına etkisi konusunda çelişkili olmakla birlikte pekçok yayın vardır. Bazı araştırmacılar diyet çinkosundaki değişikliğin sıçanlarda serum total kolesterol ve HDL-kolesterol (HDL-K) düzeylerini değiştirmedeğini bildirirken (57,62), Hooper ve arkadaşları insanda oral çinko uygulamasının

serum HDL-K miktarını azalttığı ve total kolesterol düzeyini de-
ğiştirmediğini göstermiştir (45). Diğer yandan çinkonun lipid meta-
bolizması üzerine olumlu etkisini savunan araştırıcılar, çinko
eksikliği bulunan sıçanlarda serum HDL-K konsantrasyonunun azaldığı-
nı ve serum çinko düzeyi ile HDL-K arasında doğrudan pozitif bir
ilişkinin bulunduğunu rapor etmişlerdir (55,57,79).

Klevay'a göre diyet çinko oranındaki artış, serum total ko-
lesterol düzeyinin yükselmesine neden olmaktadır (56). Son zamanlar-
da, plazma serbest kolesterolünün düzenlenmesinde önemli rolü olan
LCAT aktivitesinin çinko eksikliğinde azaldığı gösterilmiştir (62).

Öyle görülüyorki çinko, etki mekanizması tam olarak açıkla-
namamış olsa bile plazma kolesterol düzeyini anlamlı şekilde değiş-
tirmektedir. Eritrosit membran kolesterolünün plazma kolesterol
düzeyinin kontrolü altında olduğu dikkate alınınca, çinkonun plazma
kolesterol değerlerini dolayısıyla membran kolesterolünü etkiliye-
bileceği ortaya çıkmaktadır.

D- Membran Akışkanlığının Eritrosit Fonksiyonlarına Etkisi:

Çeşitli nedenlerle hücrelerin membran akışkanlığının değiş-
mesi genellikle fonksiyonlarını etkiler (59,97 ,104). Özellikle
eritrosit akışkanlığının azalması hücrenin deforme olabilme yete-
neğini azaltır (92 ,93). Böylece kapiller damarlardan geçiş
zorlaşır. Bu tip eritrositlerde hücre içi pH ve 2,3-Difosfogliserat
düzeyi normal olduğu için hemoglobinin oksijene ilgisi değişmez
fakat membranın lipid tabakasından oksijen diffüzyonu gleştiğin-
den dokulara oksijen salıverilmesi azalır (94).

Membranda bulunan proteinlerin, enzimlerin ve taşıyıcıların
aktivitesi de akışkanlığa bağlıdır (28,33). Membrana bağlı $Na^+ - K^+$
ATPase; elektrolit gradienti, su akımının düzenlenmesi ve hücre

hacminin korunması gibi önemli fonksiyonlara hizmet eder (39,104) Eritrosit membranında kolesterol artışı ile (akışkanlığın azalması) $Na^+ - K^+$ ATPase aktivitesinin azaldığı ve hücre içinde sodyumun biriktiği birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (28,52,76). Eritrosit içine glukozun girişi ve anyonların iletimi ile görevli olan band 3 protein aktivitesinin membran kolesterol/fosfolipid oranının büyümesi (akışkanlığının azalması) halinde azaldığı bildirilmiştir (17,68).

Bilinenler özetlenecek olursa membran akışkanlığının azalması eritrosit fonksiyonlarını olumsuz yönde etkiler. Çinkonun membran bütünlüğünün korunmasındaki stabilizan önemi çok iyi bilinmektedir, ancak mekanizması bilinmemektedir.

Çinkonun membran akışkanlığında anahtar role sahip eritrosit membran kolesterolü üzerine etki ederek membran akışkanlığını değiştirmesi ve bu şekilde membranı stabilize etmesi muhtemel görüldüğünden bu çalışmada deneysel çinko eksikliği oluşturulan sıçanlarda membran akışkanlığına çinkonun etkisi incelenmiş ve sonuçlar tartışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hacettepe Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde yapılan bu deneysel çalışmada ağırlıkları 80-90 g. arasında değişen 28 adet bir aylık erkek Swiss albino sıçanlar kullanıldı.

7 şerlik 4 gruba ayrılan hayvanlar her kafeste tek hayvan olacak şekilde paslanmaz çelik kafeslere konuldu.

I. grubu oluşturan 7 sıçan 4 haftalık deney süresince yeterli çinko içeren yem ve musluk suyu ile beslendi.

II. gruptaki 7 hayvanın çinkosu yeterli yemden, çinko eksikliği yapılan hayvanların yediği miktarda yemelerine ve istedikleri kadar su almalarına izin verildi (Beslenmesi kısıtlı izokalorik diyetle beslenen grup).

III. grupta bulunan 7 sıçanın 4 hafta süre ile 2 ppm çinko içeren yem ve deionize sudan istedikleri kadar almalarına olanak tanındı (çinkosu eksik grup).

IV. gruptaki hayvanlar III. gruptakiler gibi beslendiler ancak 3. ve 4. haftada intragastrik 23 mg/kg/gün çinko verilerek tedaviye alındılar.

Bütün hayvanların ağırlık değişikliği haftalık ölçümlerle izlendi. 4. haftanın sonunda 24 saatlik açlığı takiben hayvanlar 30 mg/kg Nembutal ile uyutuldu. Çinkodan arındırılmış enjektör ve iğneler kullanılarak kardiyak ponksiyonla kan örnekleri alındı ve

sağ femurları analiz için çıkarıldı.

Femur yumuşak dokularından temizlendikten sonra uzunluğuna eksenini boyunca ikiye ayrılıp ilik deionize su ile uzaklaştırıldı. 70°C de sabit ağırlığa ulaşınca kadar kurutuldu. 100 mg kuru kemik 3 ml asit karışımında (1 hacim % 70 perklorik asit : 2 hacim % 30 H₂O₂) 70°C de berraklaşınca kadar eritildi. Deionize su ile dilue edildi. Kemik çözeltilisinin içerdiği çinko miktarı aynı şekilde dilue edilen asit karışımına (kör) karşı atomik absorpsiyon spektrometresinde okundu (Perkin Elmer 103 Model).

Alınan kan örnekleri hematolojik parametreler, eritrosit membran izolasyonu ve serum analizleri için kullanıldı. Serumlar kullanılıncaya kadar -20°C de bekletildi.

Eritrosit Sayımı

Eritrosit sulandırma pipetinin 0,5 çizgisine kadar çekilen kan 101 çizgisine gelecek şekilde serum fizyolojik ile dilue edildi. Kanın homojen olarak dağılması sağlandıktan sonra bir damla dilue kan Toma sayım kamerasına yerleştirildi ve ışık mikroskopunda sayıldı.

Hematokrit Tayini

Heparinli kapiller tüplerin yaklaşık 3/4'ü kan örnekleri ile dolduruldu ve boş kısmının ucu ısıtılarak kapatıldı. Tüpler 10.000 r.p.m'de beş dakika santrifüj edildikten sonra aletin özel kalasından % hematokrit değerleri okundu.

Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV)

Aşağıda belirtilen formüle göre kanın hematokrit değeri ile eritrosit sayısından hesaplandı.

$$MCV = \frac{1000 \text{ ml. kanda eritrosit hacmi (Hematokrit} \times 10)}{\text{Eritrosit sayısı (mm}^3 \text{de milyon)}}$$

Ortalama Eritrosit Hemoglobin Değeri (MCH)

Kan örneklerinin hemoglobin değeri ile eritrosit sayısından aşağıdaki formüle göre belirlendi.

$$\text{MCH} : \frac{\text{1 litre kanda hemoglobin değeri (g.olarak)}}{\text{Eritrosit sayısı (mm}^3\text{'de milyon)}}$$

Hemoglobin Düzeyinin Ölçülmesi

Kan hemoglobin düzeyi siyanomethemoglobin yöntemi ile belirlendi (35). 20 µl kana 5 ml Drabkin çözeltisi eklendi. Tüpler birkaç kez baş aşağı çevrilerek kanın hemoliz olması sağlandı. Böylece hemoglobin siyanomethemoglobin'e dönüştü. İçinde 5 ml Drabkin çözeltisi bulunan bir diğer deney tüpüne 20 ul standart hemoglobin çözeltisi konuldu ve karışım sağlandı. Tüpler 5' bekletildikten sonra 540 nm dalga boyunda kör'e karşı spektrofotometrede (coleman 6/20 model) optik absorbansları belirlendi.

Ozmotik Frajilite Tayini

Hayvanlardan alınan heparinli kan örneklerine bekletilmeksizin ozmotik frajilite testi uygulandı. Bu amaç için Guest yöntemi kullanıldı, Yöntem, eritrositlerin değişik konsantrasyonlarda tamponlanmış NaCl çözeltilerinde inkübe edilmesi ve sağlam kalan hücrelerin dibe çöktürülmesinden sonra üst sıvıda hemoglobin miktarının ölçülmesi ilkesine dayanır.

Kullanılan Reaktifler

a) Tamponlu % 10'luk stok NaCl çözeltisi: 90 g. NaCl, 13.66 g. Na₂HPO₄ ve 2,43 g. NaH₂PO₄.2H₂O bir miktar distile suda eritildi ve hacim distile su 1 litreye tamamlandı. pH 7.4'e ayarlandı. Kullanılacağı zaman % 1 olacak şekilde seyreltildi.

b) Drabkin çözeltisi: 1 g. NaHCO₃' 50 mg potasyum siyanid, 290 mg potasyum ferrisiyanid bir miktar distile su ile eritildi ve

200 ml'ye tamamlandı.

c) Standart hemoglobin çözeltisi: 60 mg hemoglobin distile su içinde eritildi ve final hacim 200 ml'ye tamamlandı. % 15 mg hemoglobin içeren bu çözelti standart hemoglobin çözeltisi olarak kullanıldı.

Deneyin Uygulanışı : Değişik konsantrasyonlarda 10 ml NaCl çözeltisi içeren ve aşağıda gösterildiği şekilde hazırlanan 16 deney tüpünün herbirine 20 ul kan konuldu. Parafilm ile kapatılan tüpler bir kaç kez yavaşça alt-üst edilerek eritrositlerin homojen şekilde dağılması sağlandı. Tüpler 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Beş dakika süreyle 2000 r.p.m'de santrifüj edilerek sağlam kalan eritrositler çöktürüldü. Her birinden 4 ml. üst sıvı alındı ve içinde 1 ml Drabkin çözeltisi bulunan tüplere aktarıldı. Karışım 30 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede kör ve standarda karşı 540 nm dalga boyunda optik absorbasları belirlendi. Aşağıdaki iki eşitlikten yararlanarak hemoglobin düzeyleri ve değişik NaCl konsantrasyonlarında % hemoliz değerleri hesaplandı.

Değişik Konsantrasyonlarda NaCl Çözeltilerinin Hazırlanması:

Tüp No	%1 NaCl	Distile Su	% Konsantrasyon
1	2,0 ml	8.0 ml	0,20
2	2.4 ml	7.6 ml	0,24
3	2.8 ml	7.2 ml	0,28
4	3.2 ml	6.8 ml	0,32
5	3.6 ml	6.4 ml	0,36
6	4.0 ml	6.0 ml	0,46
7	4,4 ml	5.6 ml	0,44
8	4.8 ml	5.2 ml	0,48
9	5.2 ml	4.8 ml	0,52
10	5.6 ml	4.4 ml	0,56
11	6.0 ml	4.0 ml	0,60
12	6.4 ml	3.6 ml	0,64
13	6.8 ml	3.2 ml	0,68
14	7.2 ml	2.8 ml	0,72
15	7.6 ml	2.4 ml	0,76
16	8.0 ml	2.0 ml	0,80

1- Üst sıvıda hemoglobin değeri (g/dL): $\frac{\text{Örneğin optik dansitesi}}{\text{Standart optik dansitesi}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$

2- % Hemoliz Değeri : $\frac{\text{Üst sıvıdaki hemoglobin değeri (g/dL)}}{\text{Kan örneğinin hemoglobin miktarı (g/dL)}}$

Fosfolipid Tayini

Serumda ve eritrosit membran ekstraktlarında fosfolipid miktarı Baur ve arkadaşlarının yöntemi ile belirlendi (7). Prensipte:

Fosfolipidler organik solvent ile ekstrakte edilir. Ekstrakt uçurularak kurutulur. Ca içeren nitrik asit ile organik materyal sindirilir (kalsiyum pirofosfat oluşumunu ve fosfor kaybını önler). Nitrik asit ısıtılarak tamamen uçurulur. Geride kalan materyal TCA-askorbik asit karışımı ile eritilir. Fosfat ile mavi renk oluşması için molibdat ve arsenit eklenir.

Reaktifler

- 1- Standart Fosfat Çözeltisi : KH_2PO_4 100°C de kurutuldu. 438,1 mg distile suda eritildi ve 100 ml'ye tamamlandı. 1 mg/ml. fosfor içeren bu çözeltiden 5 ml alındı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Böylece 0,05 mg/ml fosfor içeren çalışma standardı hazırlanmış oldu.
- 2- Askorbik asit-TCA: 10 g. triklor asetik asit ve 2 g askorbik asit distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 3- % 1 Amonyum Molibdat: 1 g amonyum molibdat distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 4- Arsenit-sitrat Çözeltisi: 20 g trisodyum sitrat dihidrat ve 20 g susuz sodyum arsenit distile suda eritildi. 20 ml glasiyal asetik asit eklendi ve su ile 1 litreye tamamlandı.
- 5- Ekstraksiyon karışımı: 3 hacim absolü alkol ile 1 hacim eter karıştırıldı.
- 6- Nitrik asit-Kalsiyum çözeltisi: 30 mg kalsiyum karbonat 1 litre konsantre nitrik asit içinde eritildi.
- 7- Antibombing granül: Cam granüller nitrik asit içinde kaynatıldı ve distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanıldı.

Yöntemin Uygulanışı

50 µl serum bulunan tüplere 2 ml ekstraksiyon karışımı konuldu. Karışımı sağlamak için vortekslendi. Tüpler iki dakika bekletildikten sonra kuvvetle santrifüj edildi. 1 ml üst sıvı 25 x 150 mm'lik tüp içine aktarıldı ve uçuruldu. İçinde 50 ul çalışma standardı ve 50 ul deionize su bulunan (kör) tüpler hazırlandı. Her tüpe birkaç antibombing granül ve 2 ml nitrik asit kalsiyum çözeltisi konuldu. Tüpler ısıtıldı ve asit tamamen uçuruldu. Sonra tüpler soğutuldu. 1 ml askorbik asit-TCA ilave edilip karıştırıldı. Üzerine 0,5 ml amonyum molibdat ve 1 ml arsenit-sitrat çözeltileri konuldu. Karışım sağlandıktan sonra 15 dakika bekletildi. 700 nm dalga boyunda kör ve standarda karşı spektrofotometrede okundu.

Hesaplama: 0,05 ml serum 2 ml ekstraksiyon karışımı ile dilue edildiği için eşitlikten elde edilen sonuç 2.05 ile çarpılır. Bulunan değer inorganik fosforu gösterir. Fosfolipide çevirmek için 25 katsayısı ile çarpılır.

Fosfolipid (mg/dL) : $\frac{\text{Örnek Abs.}}{\text{Std. Abs.}} \times \text{std. konsantrasyonu} \times 2,05 \times 25$

Total Kolesterol Tayini

Serumda total kolesterol düzeyi enzimatik yöntemle (43) belirlendi. Denejde kullanılan enzimler ve kimyasal maddeler sigma firmasından sağlandı.

Reaktifler

a) Kolesterol enzimatik belirteci : 6 mmol/L phenol, 1,6 mmol/L 4-Aminoantipyrine, 4000 ünite/L peroksidaz, 120 ünite/L kolesterol esteraz, 150 ünite/L kolesterol oksidaz olacak şekilde fosfat tamponu içinde çözüldü.

b) % 200 mg kolesterol standardı: Sigma firmasından alındı.

Deneğin Uygulanışı

Deney tüplerinin herbirine 0,02 ml serum, standart olarak işaretli tüplere 0,02 ml kolesterol standardı ve kör olarak belirtilen tüpe 0,02 ml saf su konuldu. Daha sonra herbirine 0,5 ml kolesterol enzimatik belirteci eklendi. Tüpler 37°C de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her birine 2 ml serum fizyolojik konuldu. 515 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı optik absorbanları okundu. Serum kolesterol düzeyleri aşağıdaki eşitlikten hesaplandı.

$$\text{Serum Kolesterol (mg/dL)} : \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times 200$$

HDL-Kolesterol Ölçümü

Serumda HDL-Kolesterol tayini total kolesterol ölçümünde olduğu gibi enzimatik yöntemle (43) yapıldı. İçinde 0,1 ml serum bulunan herbir deney tüpüne 0,3 ml serum fizyolojik konuldu ve karıştırıldı. Üzerine 9 mmol/L fosfotungustik asit ve 2 mol/L MgCl_2 içeren çözeltilerden 0,05 ml eklendi ve karıştırıldı. Böylece HDL dışındaki lipoproteinler çöktürüldü. 2000 r.p.m'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıda kolesterol tayini daha önce açıklandığı şekilde yapıldı ve elde edilen sonuçlar dilüsyon faktörü ile çarpıldı.

Protein Miktarı Tayini

Serumda ve eritrosit membran süspansiyonunda protein düzeyi Lowry yöntemi ile ölçüldü (3).

Reaktifler

1- A Çözeltilisi: % 2 Na_2CO_3 , % 0,4 NaOH % 0,16 sodyum tartarat, % 1 sodyum dedosilsülfat.

2- B çözeltisi: % 4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

3- C çözeltisi: 100 ml A çözeltisi 1 ml. B çözeltisi

4- 2 N Fenol karışımı.

Deneyin Uygulanışı

0,1 ml serum, serum fizyolojik ile 10 ml'ye tamamlandı ve karıştırıldı. Bu karışımdan 0,1 ml diğer bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0,2 ml distile su konuldu. Daha sonra 2 ml C reaktifi eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Bu işlemin sonunda 0,3 ml D reaktifi ilave edildi ve kuvvetle çalkalandı. Spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Formülden hesaplanan sonuç dilüsyon faktörü ile çarpıldı.

Protein Miktarı (g/dL): $\frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{Standart konsantrasyonu (g/dL)}$

Eritrosit Membranının Elde Edilmesi

Eritrosit membranı Dodge ve arkadaşlarının yöntemi ile elde edildi (34). Bu amaçla kan örnekleri 2280 x g'de beş dakika oda ısısında santrifüj edildi ve plazma uzaklaştırıldı. Eritrositler üç kez serum fizyolojik ile yıkandı. 1 ml paket eritrosit alındı. Üzerine 1 ml distile su konuldu ve vortekslendi. Böylece eritrositlerin hemoliz olması sağlandı. Hemolizat 4°C de ve 20.000 x g de 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı aspire edilerek uzaklaştırıldı. Palet üzerine 10 ml'si 8.0 olan Tris-HCL konuldu ve vortekslendi. 20.000 x g de tekrar 15 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi 6 kez tekrarlandı. Bu işlemin sonunda üst sıvıdan alınan örnekte hemoglobin tayini yapıldı. Hemoglobinin bulunmayışı ile yıkama işlemine son verildi. Her bir tüpteki pelet (eritrosit membranı :ghost) 2 ml serum fizyolojik içinde süspansiy-

yon haline getirildi. Bu süspansiyondan 0,1 ml örnek alındı ve Lowry yöntemi ile protein miktarı tayin edildi.

Eritrosit Membranından Lipidlerin Elde Edilmesi

Bu amaç için Rose ve Oklander'ın yöntemi kullanıldı (25). 1 ml membran süspansiyonuna 9 ml ekstraksiyon karışımı (7 hacim kloroform, 11 hacim izopropanol) konuldu ve vortekslendi. 2000 r.p.m'de beş dakika santrifüj edildi. Üstteki lipid fazı pastör pipeti ile aspire edilerek bir başka tüpe aktarıldı. Altta kalan fazın üzerine tekrar 2 ml ekstraksiyon karışımı konuldu ve vortekslendi. Santrifüjlemeden sonra üst faz alındı ve bir önceki tüpe ilave edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Ekstrakte edilen materyal tamamen uçuruldu. Daha sonra üzerine 1 ml izopropanol konuldu ve vortekslendi. Böylece elde edilen lipid ekstraktındaki fosfolipid ve kolesterol daha önce açıklanan enzimatik yöntemlerle ölçüldü.

Elde edilen ve hesapla bulunan sonuçların değerlendirilmesinde Student'un "t" testinden yararlanıldı.

BULGULAR

1- Hayvanların Genel Görünümü

Kontrol grubunu oluşturan sıçanların 4 haftalık sürede büyüme ve gelişmelerinin, iştah ve aktivitelerinin normal olmasına karşın beslenmesi kısıtlanmış II. gruptaki hayvanların sürekli aç kalmalarına bağlı hiperaktivite, sinirlilik ve kilo artışında gerilik dikkati çekti.

Deionize su ve çinkosu yetersiz yem ile beslenen III. gruptaki sıçanlarda iştah ve aktivite kaybı I. haftanın sonunda açıkça görülmeye başladı. Çinko eksikliğinin kardinal belirtilerinden birisi olan anorexia nedeni ile hayvanların günlük besin almalarında anlamlı azalış II. haftada ortaya çıktı. Tüylerin parlaklığını kaybetmesi ve kaba bir görünüm almasına ek olarak tüy dökülmesinin artması da genel görünümünde değişikliğe neden oldu.

Çinko eksikliği belirtileri ortaya çıktıktan sonra 15 gün 23 mg/kg çinkonun oral yolla verilmesi ile genel durumda gözlenen bu değişikliklerin kaybolması, bunların çinko eksikliğine bağlı bulgular olduğunun kanıtı olarak kabul edildi.

İştah Değişikliği

Kontrol grubu sıçanların istedikleri kadar çinkosu yeterli yem ve su almalarına karşı II. gruptaki hayvanların kısıtlı beslenmesinin nedeni, çinko eksikliğinde iştah azalışına bağlı az kalori al-

manın etkileri ile az çinko almanın etkilerini ayırtetmek içindir. Böylece çinkodan eksik hayvanlarla eşdeğer kalori alan II. kontrol grubunun sonuçları, iştah azlığına bağlı az kalori alınmasının sebep olduğu değişiklikleri gösterir.

Alınan Günlük Besin Miktarı (II. ve III. Grup)

I. hafta	9.65 ± 1.64 g/gün
II. hafta	6.76 ± 1.92 g/gün
III. hafta	10.32 ± 1.57 g/gün
IV. hafta	7.49 ± 1.12 g/gün

Ağırlık Değişiklikleri

Kontrol grubunda 4 haftalık gözlem süresinin sonunda hayvanların ağırlığı başlangıç ağırlığının % 144 ± 51'ine ulaştı. Beslenmeleri kısıtlanmış II. kontrol grubundaki hayvanların ağırlık artışı % 79 ± 18 ve çinkosu az diyetle beslenen sıçanların ağırlık artışı ise % 38 ± 13 idi. Az besin almanın sebep olduğu ağırlık değişikliği, I. gruptaki sıçanların sonuçları ile karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ($P < 0,01$). İzokalorik diyet fakat yetersiz çinko alan III. grupta ağırlık çok anlamlı azalış gösterdi ($P < 0,001$). 15 günlük oral çinko tedavisi ağırlık artışındaki geriliği normale çevirdi ve hayvanlar 4.haftanın sonunda başlangıç ağırlığının % 104 ± 26'ine ulaştı. Diyete çinko ilavesi iştah artışına ve dolayısıyla fazla besin alınmasına neden olduğundan son 15 gün içinde hayvanlardaki anlamlı ağırlık artışı, hem alınan çinko hemde kalori artışına bağlı idi.

2- femur Çinko Düzeyi

I. kontrol grubundaki sıçanların ortalama femur çinkosu 263.01 ± 54.8 µg/g kuru ağırlık iken beslenmesi kısıtlı ve sürekli aç kalan hayvanların femur çinkosunda istatistiki anlamı olmamakla

birlikte artışı olduğu dikkati çekti (304.95 ± 61.11 ug/g kuru ağırlık). 4. hafta çinkosu yetersiz diyet ve deionize su alan III. grup hayvanların ortalama femur çinkosunun 192.98 ± 19.98 ug/g kuru ağırlık olduğu bulundu. Her iki kontrol grubunun femur çinko düzeyleri ile karşılaştırıldığında, bu grubun femur çinkosundaki azalış çok anlamlı idi ($P < 0,001$). Bu bulgu çalışmamızda deneysel çinko eksikliğinin kanıtı olarak kabul edildi.

Çinko eksikliği oluşturulan sıçanların 15 gün intragastrik çinko ile tedavisi femur çinkosunu normal düzeye döndürdü ve bu grubun ortalama femur çinko düzeyi 253.8 ± 18.1 ug/g kuru ağırlık bulundu.

3- Hematolojik Parametreler

a) Alyuvar Sayısı : Kontrol grubu sıçanların alyuvar sayısı $7.99 \pm 0.32 \times 10^6/\text{mm}^3$ ve kısıtlı beslenen II. grupta $7.89 \pm 0.4 \times 10^6/\text{mm}^3$ olarak belirlendi. Çinko eksikliği eritrosit sayısında anlamlı azalışa neden oldu ve alyuvar sayısı III. grupta $7.29 \pm 0.34 \times 10^6/\text{mm}^3$ olarak saptandı ($P < 0,01$). Bu azalış çinko tedavisi ile tekrar normal değere yükseldi ($7.87 \pm 0.32 \times 10^6/\text{mm}^3$).

b) Hemoglobin Düzeyi: Tablo 1 de görüldüğü gibi 16.97 ± 1.43 g/dL olan kontrol grubu hemoglobin değerine kısıtlı besin alınmasının önemli bir etkisi olmadı 16.88 ± 0.25 g/dL. Buna karşı yetersiz çinko alınması ile ortalama hemoglobin düzeyinin anlamlı şekilde baskılandığı 14.77 ± 0.38 g/dL, ($P < 0,01$) ve diyetle çinko ilavesinin hemoglobin düzeylerinde saptanan azalışı normale yaklaştırdığı gözlemlendi 16.18 ± 0.61 g/dL. Ancak tedavi grubunda hemoglobin düzeyi artmış olmasına rağmen hala kontrol değerlerinin anlamlı olarak altında idi ($P < 0,01$).

c) Hemotokrit Değeri : Kontrol grubunda hematokrit değeri % 54.14 \pm 2.37 ve az besin alan II. grupta % 53.14 \pm 2.74 olarak belirlendi. Yetersiz inko alınması ile hematokrit % 58.14 \pm 4.67 değerine yükseldi ($P < 0,001$). ve bu artış intragastrik çinko tedavisi ile tekrar normal düzeye indi (% 54.43 \pm 2.51).

d) Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV): Kontrol grubunda ortalama eritrosit hacmi 68.89 \pm 3.46 fL ve kısıtlı beslenen sıçanlarda 67.39 \pm 2.94 fL olduğu halde diyetten çinkonun çıkarılması ile ortalama eritrosit hacmi 79.25 \pm 8.0 fL'ye yükseldi ($P < 0,01$). Çinkonun yerine konulması ile ortalama eritrosit hacmi tekrar normal değerine döndü (69.18 \pm 3.5 fL).

e) Ortalama Eritrosit Hemoglobini (MCH): Kontrol grubunda 21.23 \pm 1.04 pg ve kısıtlı beslenen II.grupta 21.41 \pm 0.71 pg olan ortalama eritrosit hemoglobin değerinin çinko eksikliği bulunan sıçanlarda anlamlı olarak düşük olduğu dikkati çekti 20.29 \pm 1.36 pg, ($P < 0,01$). Bu azalmanın çinko tedavisi ile kontrol değerlerine yaklaştığı saptandı (20.86 \pm 1.15 pg).

Eritrosit Membranının Ozmotik Frajilitesi

% 0.44 NaCl özeltisinde 37⁰C de 30 dakika inkübe edilen kontrol grubu eritrositlerinde % 25 \pm 3 oranında hemoliz görüldü. Beslenmesi kısıtlanan II.grupta aynı tuz konsantrasyonunda gözlenen hemoliz değeri % 28 \pm 4 idi. Çinko eksikliği oluşturulan sıçanlardan alınan eritrositlerin membran frajilitesi bariz bir şekilde artmış olduğu ve % 0.44 tuz çözeltisinde hemoliz değerinin : 61 \pm 7 olduğu dikkati çekti. Her iki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu hemoliz değerinin çok önemli olduğu belirlendi ($P < 0,001$). 15 günlük çinko tedavisi membran frajilitesini tekrar normale çevirdi ve % 0.44 NaCl çözeltisinde hemoliz olan eritrosit miktarı % 24 \pm 5'i bulundu.

Eritrosit Membran Komponentleri

a) Membran Proteini : Kontrol grubu sıçanların 1 ml eritrosit paketinden elde edilen membran protein miktarı 5.71 ± 0.58 mg idi. Kısıtlı beslenmenin membran proteininde anlamlı olmayan bir azalışa 4.91 ± 0.6 mg/ml karşın, az çinko alınması membran protein miktarında önemli azalış yaptı (4.1 ± 0.38 mg/ml, $P < 0,01$). Ancak bu azalış çinko tedavisi ile tekrar normale yakın düzeylere çıktı (4.96 ± 0.51 mg/ml).

b) Membran Kolesterolü : Eritrosit membranının kolesterol düzeyi kontrol grubunda 1.303 ± 0.084 mg/ml ve kısıtlı beslenen II. grupta 1.329 ± 0.103 mg/ml olduğu halde çinko eksikliği bulunan sıçanlarda 1.442 ± 0.076 mg/ml'ye yükseldiği görüldü ($P < 0,02$)- (Şekil: 5) Çinko tedavisi eritrosit membran kolesterolünün normal düzeye dönmesini sağladı (1.289 ± 0.091 mg/ml).

c) Membran Fosfolipid Düzeyi : Eritrosit membran fosfolipidlerinin total düzeyi bütün gruplarda birbirine yakın değerler gösterdi ve aralarında önemli bir farklılık bulunmadı. Kontrol grubunda 3.474 ± 0.233 mg/ml kısıtlı beslenen kontrol grubunda 3.516 ± 0.272 mg/ml, çinko eksikliği grubunda $3.385 \pm 0,243$ ve tedavi grubunda 3.423 ± 0.144 mg/ml idi. (Şekil: 5)

Membranın Kolesterol/Fosfolipid Oranı

Kontrol grubu sıçanların eritrositlerinde $0.776 \pm 0,065$ olarak hesaplanan membran kolesterol/fosfolipid oranı az besin alan II. kontrol grubunda 0.772 ± 0.057 olduğu halde çinko eksikliği bulunan sıçanlarda bu oran belirgin olarak yüksek bulundu (0.881 ± 0.44 , $P < 0,001$). Çinko ile tedavi edilen sıçanlarda membranın kolesterol fosfolipid oranı her iki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık göstermedi (0.779 ± 0.028).

Membranın Protein/Lipid Oranı

Çinkodan eksik diyetle beslenen sıçanlarda eritrosit membranı protein lipid oranının değiştiği ve diğer üç grubun değerlerinden anlamlı olarak düşük olduğu saptandı (0.851 ± 0.070 , $P < 0,01$). Bu oran kontrol grubunda 1.096 ± 0.162 , II. grupta 1.017 ± 0.126 ve tedavi grubunda 1.051 ± 0.085 olarak hesaplandı.

Serum Lipid Düzeyleri

a) Total Kolesterol : Kontrol grubunda 71.00 ± 10.64 mg/dL olarak belirlenen serum total kolesterol miktarı, kısıtlı beslenen sıçanlarda 59.55 ± 17.44 mg/dL düzeyine indi ($P < 0,01$). Çinkodan eksik diyetle beslenen sıçanlarda serum total kolesterolünde gözlenen azalma anlamlı bulunmadı (63.17 ± 9.03 mg/dL , $P > 0,05$). Çinko ile tedavi edilen grupta kolesterol düzeyi 61.98 ± 10.83 mg/dL olarak belirlendi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark anlamlı bulunmadı ($P > 0,05$). belirlendi

b) Yüksek Dansiteli Lipoprotein-Kolesterolü (HDL-K) : Serum HDL-Kolesterolü kontrol grubunda 44.44 ± 6.28 mg/dL, az besin alan sıçanlarda 41.90 ± 10.53 mg/dL olmasına karşın, izokalorik fakat yetersiz çinko alan III. grupta 32.37 ± 4.95 mg/dL düzeyine indi ($P < 0,05$). Çinko tedavisi serum HDL-Kolesterolündeki azalmayı düzeltti (40.63 ± 6.51 mg/dL).

c) Total Fosfolipid : Serum fosfolipid düzeylerinde gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmadı. Kontrol grubunda 163.57 ± 27.91 mg/dL, II. grupta 156.77 ± 27.70 mg/dL, III.grupta 170.00 ± 31.93 mg/dL ve tedavi grubunda 155.00 ± 40.46 mg/dL olarak saptandı.

Serum Protein Düzeyi

Kontrol grubunda 7.14 ± 0.54 g/dL ve II. grupta 7.11 ± 0.45 g/dL olduğu halde çinko eksikliği bulunan sıçanlarda 5.88 ± 0.77 g/dL olarak belirlendi ($P < 0,01$). Çinko tedavisi ile serum protein düzeyi kontrol değerlerine ulaştı (6.92 ± 0.32 g/dL).

Tablo 1 : Cinkonun Kan Parametrelerine Etkisi

GRUPLAR	Ortalama \pm SD				
	ERİTROSİT ($\times 10^6 / \text{mm}^3$)	HEMOGLOBİN (g/dl)	HEMATOKRİT (%)	ORTALAMA ERİTROSİT HACMI (fl)	ORTALAMA ERİTROSİT HEMOGLOBİNİ(Pg)
K (n=7)	7,99 \pm 0,33	16,97 \pm 1,43	54,14 \pm 2,37	68,77 \pm 3,46	21,26 \pm 1,04
İK (n=7)	7,89 \pm 0,40	16,88 \pm 0,25	53,14 \pm 2,74	67,39 \pm 2,94	21,41 \pm 0,71
ÇE (n=7)	7,29 \pm 0,34 ^{**}	14,77 \pm 0,38 ^{**}	58,14 \pm 4,67 ^{***}	79,25 \pm 8,00 ^{**}	20,29 \pm 1,36 ^{**}
T (n=7)	7,87 \pm 0,32	16,18 \pm 0,61 ^{**}	54,43 \pm 2,51	69,18 \pm 3,50	20,86 \pm 1,15

** Kontrol Grublarına göre önem kontrolü (P < 0,01)

*** Kontrol Grublarına göre önem kontrolü (P < 0,001)

+ + Kontrol Grubuna göre önem kontrolü (P < 0,01)

SD Standart Deviation (Sapma)

Tablo 2 : Çinkonun Eritrosit Membranındaki Protein, Lipid Komponentlerine ve Bu Komponentlerin Oransal Değerlerine Etkisi.
Ortalama ± SD

GRUPLAR	PROTEİN (mg/ml)	KOLESTEROL (mg/ml)	FOSFOLİPID (mg/ml)	KOLESTEROL FOSFOLİPID (Molar)	PROTEİN LİPID (Kütlesel)
K (n=7)	5,71 ± 0,53	1,303 ± 0,081	3,47 ± 0,23	0,78 ± 0,07	1,19 ± 0,16
İK (n=7)	4,91 ± 0,60	1,303 ± 0,10	3,52 ± 0,27	0,77 ± 0,06	1,02 ± 0,13
CE (n=7)	4,10 ± 0,38 ^{**}	1,44 ± 0,08 ^{**}	3,39 ± 0,24	0,88 ± 0,04 ^{***}	0,85 ± 0,07 ^{**}
T (n=7)	4,96 ± 0,51	1,29 ± 0,09	3,42 ± 0,14	0,78 ± 0,03	1,05 ± 0,09

^{**} Kontrol grublarına göre önem kontrolü (P < 0,01)

^{***} Kontrol grublarına göre önem kontrolü (P < 0,001)

SD Standart Deviation (Sapma)

Tablo 3 Çinkonun Ağirlik Artisi, Serum Lipid ve Protein Düzeyleri Ile Iliskisi

GRUPLAR	AĞIRLIK ARTIŞI (Başlangıç değerinin %si)	FEMUR ÇINKOSU µg/g.kuru.ağırl.	TOTAL KOLESTEROL (mg/dL)	HDL- KOLESTEROL (mg/dL)	FOSFOLIPID (mg/dL)	Ortalama ± SD
						PROTEİN (g/dL)
K (n=7)	144 ± 51	263,01 ± 54,80	71,00 ± 10,64	44,44 ± 6,28	163,57 ± 27,91	7,14 ± 0,54
İK (n=7)	79 ± 18 ^{**}	304,95 ± 61,11	59,55 ± 17,44 ^{**}	41,90 ± 10,53	156,77 ± 27,70	7,11 ± 0,45
ÇE (n=7)	38 ± 13 ^{***}	192,98 ± 19,98 ^{***}	63,17 ± 9,03	32,37 ± 4,95 [*]	169,61 ± 31,93	6,36 ± 0,77 ^{**}
T (n=7)	104 ± 26	253,8 ± 18,1	61,98 ± 10,83	40,63 ± 6,51	154,94 ± 40,46	6,92 ± 0,32

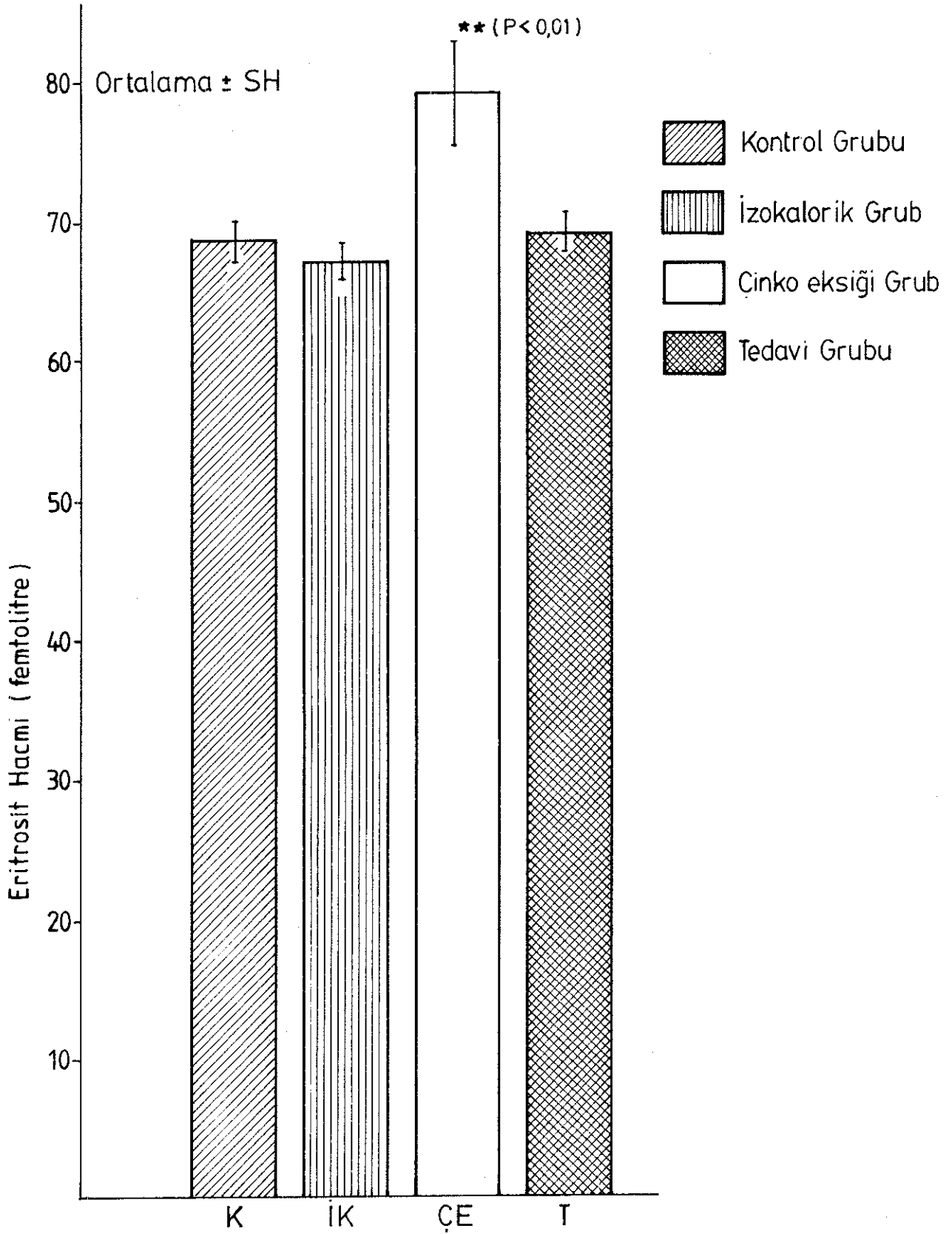
* Kontrol Grublarına göre önem kontrolü (P<0,05)

** Kontrol Grublarına göre önem kontrolü (P<0,01)

*** Kontrol Grublarına göre önem kontrolü (P<0,001)

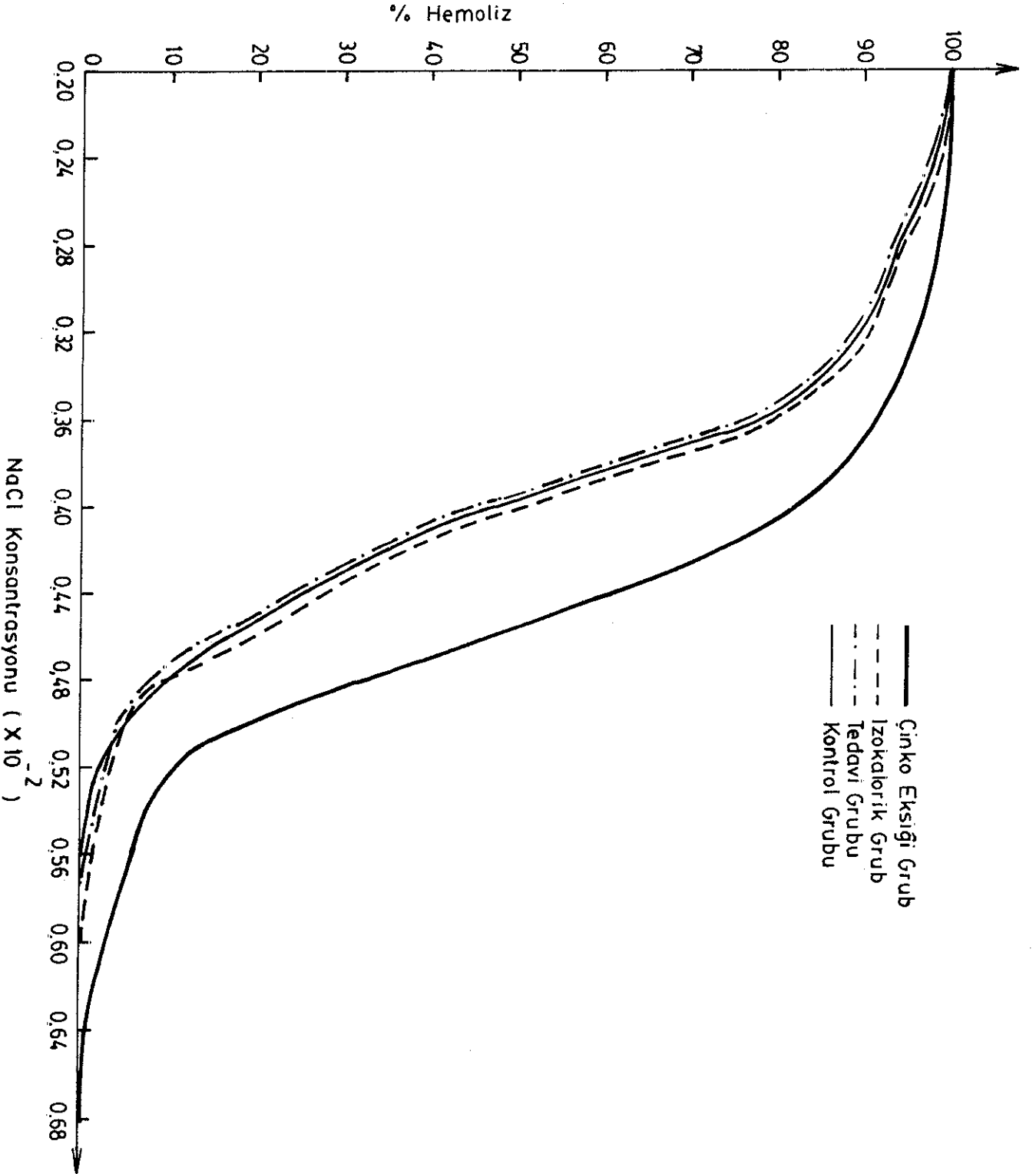
** Kontrol Grubuna göre önem kontrolü (P<0,01)

SD: Standart Deviation (Sapma)

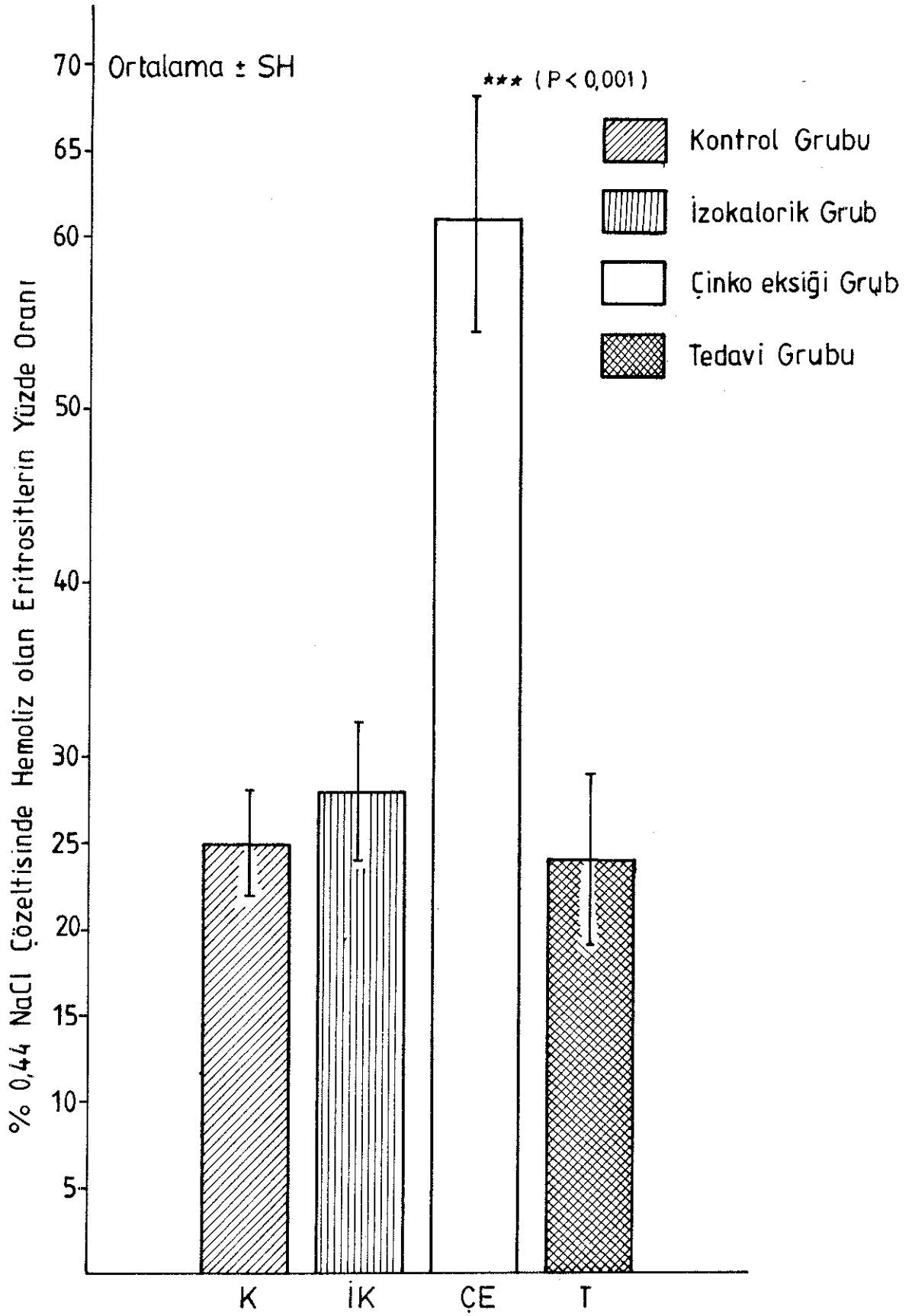


Sekil 2 : Çinkonun Eritrosit Hacmine Etkisi

** Kontrol ve İzokalorik gruplara göre önem kontrolü
SH: Standart hata



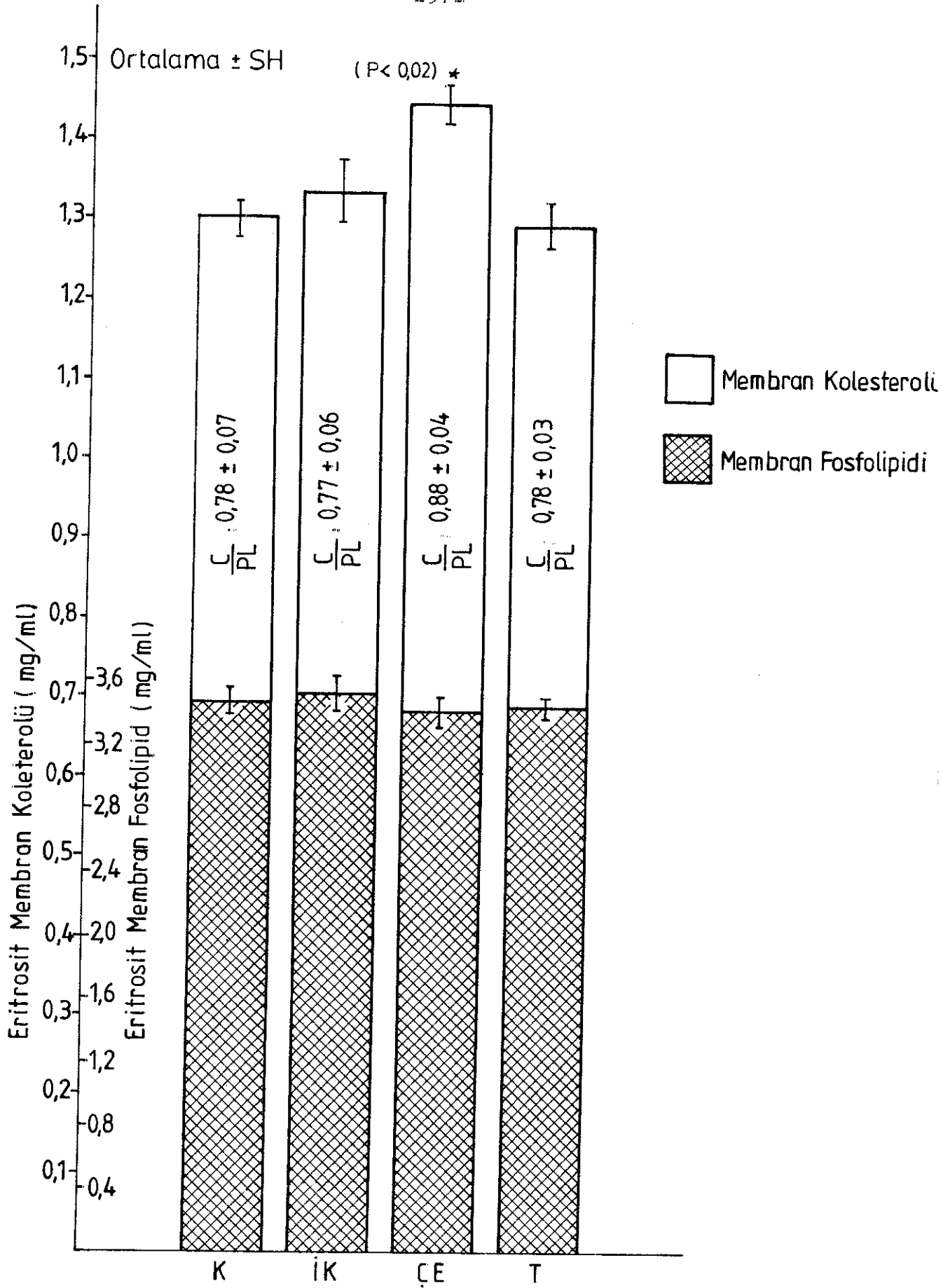
Sekil 3 Çinkonun Eritrosit Ozmotik Direnci ile İlişkisi (Hemoliz Eğrisi)



Şekil 4 : Çinkonun Eritrosit Frajlitesine Etkisi

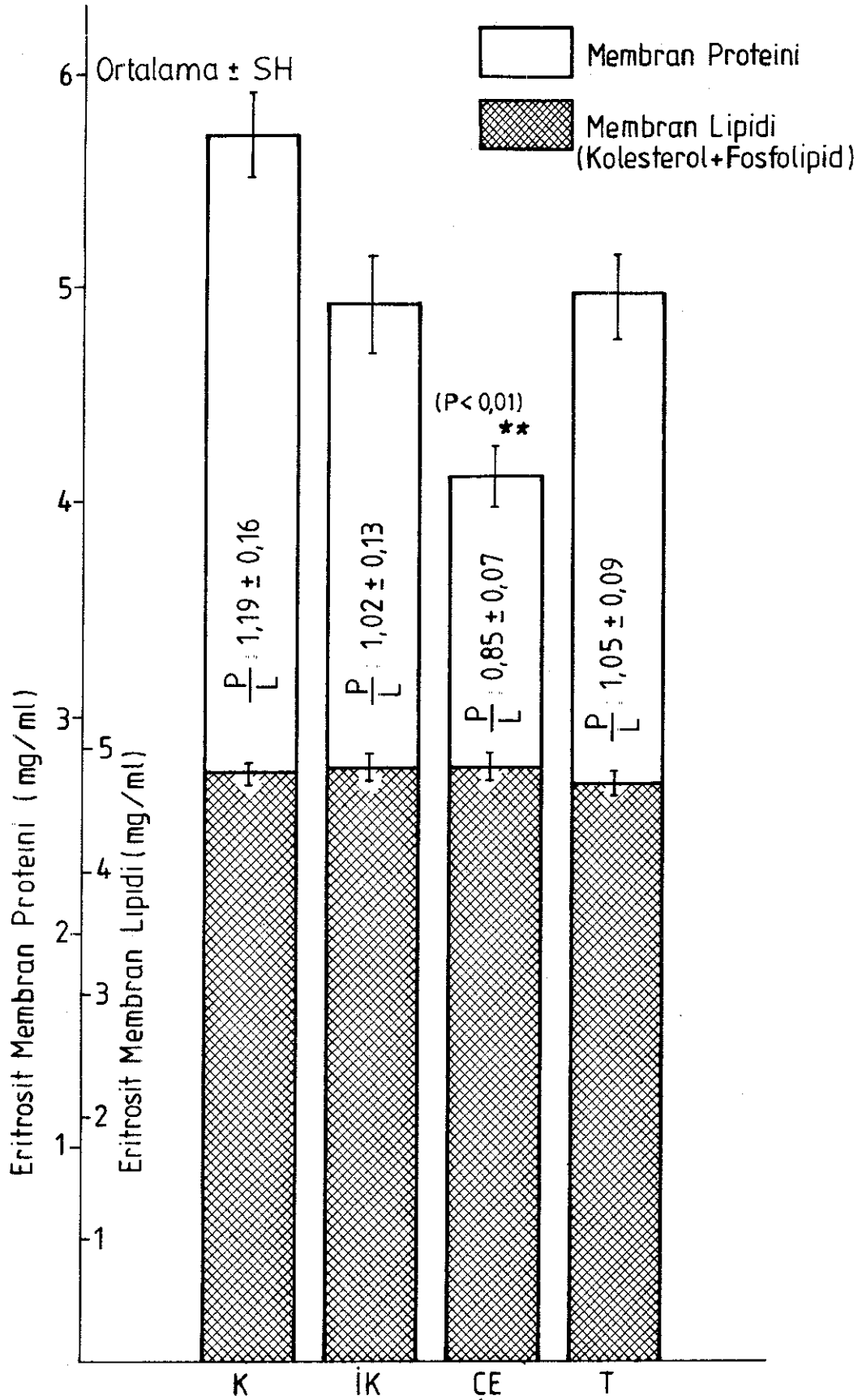
*** Kontrol ve İzokalorik grublara göre önem kontrolü

SH: Standart hata



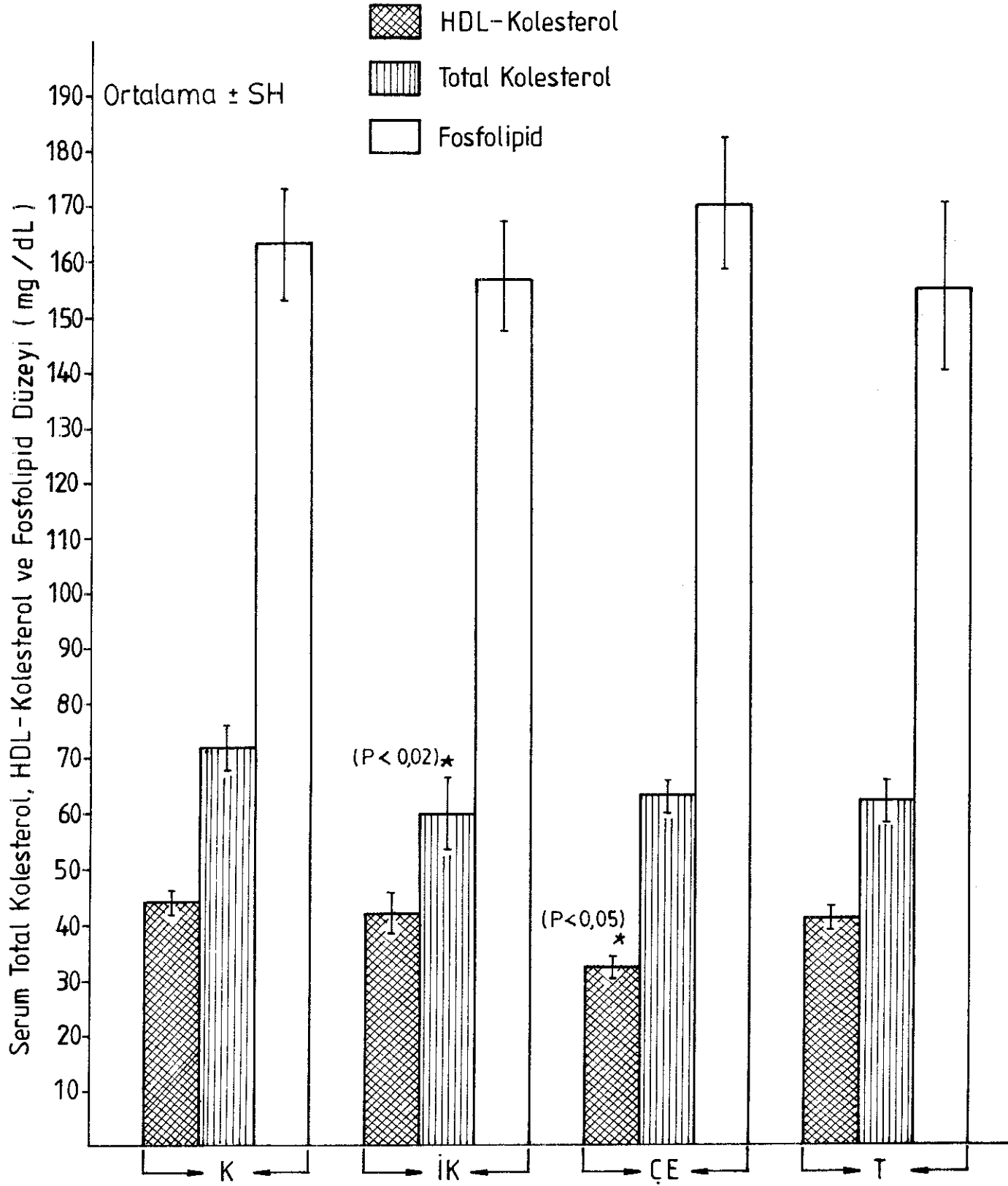
Şekil 5 : Çinkonun Eritrosit Membran Lipidleri İle İlişkisi.

* Kontrol ve İzokalorik grublara göre önem kontrolü
SH:Standart hata



Şekil 6 : Çinkonun Eritrosit Membran Proteini ve Protein/ Lipid Oranı (P/L) ile ilişkisi.

** Kontrol ve İzokalorik grublara göre önem kontrolü
SH: Standart hata



Şekil 7 : Çinkonun Serum Lipidlerine Etkisi.

* Kontrol ve İzokalorik grublara göre önem kontrolü
SH: Standart hata

Tablo 4 Cinkonun Kan Parametrelerine Etkisi

Kat. No:	HEMATOKRIT (%)			HEMOGLOBIN (g/dL)			ERITROSIT ($\times 10^6/\text{mm}^3$)			ORTALAMA ERITROSIT HACMI MCV : ($\text{fl} = 10^{-15}$ Litre)			ORTALAMA ERITROSIT HEMOGLOBİNİ MCH : ($\text{Pg} = 10^{-12}$ gram)							
	K	İK	CE	T	K	İK	CE	T	K	İK	CE	T	K	İK	CE	T				
1	54	52	54	53	15,28	16,88	15,45	15,94	7,45	7,65	7,20	7,72	72,48	67,97	75,00	68,65	20,51	22,07	21,46	20,65
2	57	54	58	52	16,59	17,34	14,06	16,41	8,25	8,10	7,40	8,10	69,09	66,67	78,38	64,20	20,11	21,41	19,00	20,26
3	56	50	65	57	16,94	15,94	14,81	16,41	7,95	7,10	6,85	8,50	70,44	70,42	94,89	67,06	21,30	22,45	21,62	19,31
4	58	52	61	56	18,75	17,81	14,53	15,47	8,10	8,20	6,90	7,60	71,60	63,41	88,41	73,68	23,15	21,72	21,06	20,36
5	53	58	62	53	17,81	16,88	15,45	16,53	8,35	8,10	7,50	7,70	63,47	71,60	82,67	68,83	21,33	20,84	20,60	21,48
6	52	55	53	58	16,47	16,88	15,00	17,34	7,85	8,20	7,80	7,85	66,24	67,07	67,95	73,89	20,98	20,59	19,23	22,09
7	49	51	54	52	17,00	16,41	14,10	16,69	7,20	7,90	7,40	7,65	68,05	64,56	72,97	67,97	21,47	20,77	19,05	21,82
Ort.	54,14	53,14	58,14	54,43	16,97	16,88	14,77	16,18	7,99	7,89	7,29	7,87	68,77	67,39	79,25	69,18	21,26	21,41	20,29	20,86
S.D	2,37	2,74	4,67	2,51	1,42	0,25	0,38	0,61	0,33	0,40	0,34	0,32	3,46	2,94	9,99	3,50	1,04	0,71	1,36	1,15
S.H	0,97	1,04	1,76	0,95	0,58	0,09	0,14	0,23	0,13	0,15	0,13	0,12	1,41	1,11	3,78	1,32	0,43	0,27	0,51	0,43

Tablo 5 : Çinkonun Ağırlık Artışı ile ilişkisi.

Rat. No:	BAŞLANGIÇ AĞIRLIKLARI (g)					SON AĞIRLIKLARI (g)					AĞIRLIK ARTIŞI (Başlangıçtaki değerinin yüzdesi olarak)				
	K	PF	ZD	T		K	PF	ZD	T		K	PF	ZD	T	
1	78	96	100	92		190	158	136	148		143	64	36	61	
2	52	108	76	78		186	174	90	170		257	61	18	117	
3	80	84	96	68		184	178	130	150		130	111	35	121	
4	76	86	96	76		170	162	154	152		123	88	60	100	
5	72	90	88	92		150	170	128	164		108	88	45	78	
6	70	90	90	64		152	156	128	150		117	73	42	134	
7.	75	108	104	74		175	182	136	160		133	69	31	116	
Ort.	72	95	93	78		172	169	129	156		144	79	38	104	
S.D	9,38	9,90	9,23	10,86		16,12	10,11	19,35	8,44		50,91	17,65	12,97	25,95	
S.H	3,55	3,74	3,49	4,11		6,09	3,82	7,32	3,19		19,24	6,67	4,90	9,81	

Tablo 6 : Eritrosit Membran direncine Cinkonun etkisi.

Gruplar	NaCl Konsantrasyonu ($\times 10^{-2}$)												
	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	0,44	0,48	0,52	0,56	0,60	0,64	
K (n=7)	100 (1,95)	98 ± 0,8 (2,39)	94 ± 1 (2,39)	90 ± 1 (2,40)	79 ± 3 (7,38)	47 ± 2 (5,30)	25 ± 3 (7,35)	10 ± 1 (2,42)	2 ± 1 (2,40)	0	0	0	
İK (n=7)	100 (0,80)	99 ± 0,3 (0,80)	94 ± 0,6 (1,58)	91 ± 1 (2,48)	79 ± 2 (5,24)	50 ± 3 (7,92)	28 ± 4 (10,58)	9 ± 1 (2,47)	3 ± 1 (2,43)	1 ± 0,6 (1,57)	0	0	
CE (n=7)	100 (1,32)	99 ± 0,5 (1,32)	98 ± 0,8 (2,11)	96 ± 1,45 (3,83)	93 ± 2 (5,29)	82 ± 4 (10,68)	61 ± 7 (18,52)	32 ± 6 (15,87)	10 ± 1 (2,45)	6 ± 0,9 (2,38)	3 ± 1 (2,646)	0,29 ±	
T (n=7)	100 (1,85)	98 ± 0,7 (1,85)	93 ± 0,9 (2,37)	89 ± 2 (5,29)	78 ± 4 (10,45)	46 ± 5 (13,23)	24 ± 5 (13,3)	7 ± 2 (5,27)	2 ± 1 (2,48)	0	0	0	

% Hemoliz değeri

Tablo 7 Cinkonun Eritrosit Membran Bilesimine Etkisi:

Grup	MEMBRAN KOLESTEROLÜ (mg/m/Eritrosit)				MEMBRAN FOSFOLİPİD (mg/m/Eritrosit)				MEMBRAN PROTEİNİ (mg/m/Eritrosit)				MEMBRAN KOLESTEROL / FOSFOLİPİD ORANI (Molar)				MEMBRAN PROTEİN / LİPİD ORANI (Kütlesel)			
	K	İK	CE	T	K	İK	CE	T	K	İK	CE	T	K	İK	CE	T	K	İK	CE	T
1	1,26	1,19	1,49	1,33	3,53	3,18	3,62	3,46	5,86	4,92	4,50	5,28	0,74	0,77	0,85	0,79	1,23	1,13	0,88	1,10
2	1,37	1,37	1,33	1,26	3,38	3,27	3,12	3,52	4,98	4,45	4,20	5,71	0,84	0,86	0,88	0,74	1,05	0,96	0,94	1,19
3	1,42	1,49	1,46	1,30	3,40	3,39	3,58	3,27	4,71	5,95	3,72	4,86	0,86	0,83	0,84	0,82	0,98	1,22	0,74	1,07
4	1,33	1,26	1,49	1,42	3,66	3,63	3,16	3,66	5,57	4,05	3,93	5,00	0,75	0,72	0,97	0,77	1,12	0,83	0,85	0,99
5	1,26	1,33	1,42	1,12	3,78	3,82	3,23	3,25	4,43	4,90	3,62	4,14	0,69	0,72	0,90	0,76	0,88	0,96	0,78	0,95
6	1,19	1,42	1,37	1,28	3,12	3,90	3,27	3,37	5,71	5,28	4,10	4,57	0,79	0,75	0,86	0,78	1,33	0,99	0,88	0,98
7	1,31	1,26	1,55	1,33	3,45	3,42	3,71	3,44	5,18	4,85	4,65	5,14	0,77	0,76	0,86	0,80	1,09	1,04	0,88	1,08
Ort.	1,30	1,33	1,44	1,29	3,47	3,52	3,39	3,42	5,21	4,91	4,10	4,96	0,78	0,77	0,88	0,78	1,10	1,02	0,85	1,05
S.D	0,07	0,10	0,08	0,09	0,21	0,27	0,24	0,14	0,53	0,60	0,38	0,51	0,07	0,06	0,04	0,03	0,16	0,13	0,02	0,09
S.H	0,02	0,04	0,03	0,03	0,08	0,10	0,09	0,05	0,20	0,23	0,14	0,19	0,03	0,02	0,02	0,01	0,06	0,05	0,01	0,03

Tablo 8 : Cinkonun Serum Lipid ve Protein Düzeylerine Etkisi.

Rat No:	TOTAL KOLESTEROL (mg/dL)				HDL-KOLESTEROL (mg/dL)				FOSFOLIPID (mg/dL)				PROTEİN (g/dL)			
	K	İK	ÇE	T	K	İK	CE	T	K	İK	CE	T	K	İK	CE	T
1	77,70	54,05	75,67	52,97	48,88	35,55	35,55	35,55	202	162	187	112	6,71	6,79	5,64	6,93
2	70,30	67,03	73,51	77,84	44,44	48,88	31,11	53,33	169	203	192	208	6,50	6,50	6,64	7,21
3	84,30	95,14	62,70	59,46	53,33	62,22	40,00	40,00	182	128	144	179	7,21	7,79	5,43	6,64
4	73,50	49,30	64,86	48,65	40,00	40,00	31,11	35,55	165	168	203	97	8,07	6,93	4,93	7,36
5	62,70	51,90	54,10	70,27	40,00	35,55	35,55	44,44	139	130	117	170	7,57	7,57	5,21	7,07
6	81,10	42,16	59,46	62,70	48,88	31,11	26,66	40,00	171	150	192	139	6,79	7,21	6,93	6,71
7	54,10	57,30	51,89	63,84	35,55	40,00	26,66	35,55	117	157	152	179	7,14	7,00	6,36	6,50
Ort.	71,96	59,55	63,17	62,24	44,44	41,90	32,37	40,63	163,57	156,85	170	155	7,14	7,11	5,88	6,92
S.D	10,64	17,43	9,03	9,91	6,28	10,53	4,95	6,51	27,91	25,43	31,93	40,46	0,54	0,45	0,77	0,32
S.H	4,02	6,58	3,41	3,75	2,37	3,98	1,87	2,46	10,55	9,62	12,09	15,30	0,20	0,17	0,29	0,12

TARTIŞMA

Çinkonun bitki ve hayvanların büyüme ve gelişmelerinde gerekli bir iz element olduğu pekçok yayında gösterilmiştir (84). Çinko eksikliğinde birçok dokuda protein sentezinin azaldığı (48,63 , 49), büyüme ve gelişme geriliğinin ortaya çıktığı rapor edilmiştir (46,84). Daha sonra yapılan çalışmalarda büyüme geriliğinin çinko eksikliğine bağlı büyüme faktör azalışı ile açıklandığı (30 ,77 ,80) ve büyüme hormonuna dirençli tipte gerilik olduğu bildirilmiştir (78). Bizim çalışmamızda da hayvanların gözlem periyodu esnasında büyüme hızlarındaki gerilik literatür bulgularını destekler nitelikte idi. Marginal çinko eksikliği oluşturduğumuz III. grup sığırlarda iştah ve aktivite kaybı ile birlikte ağırlık artışıdaki azalma oldukça belirgin bulundu. 15 günlük oral çinko tedavisi ile iştah ve ağırlık artışının kontrol değerlere çok yakın olduğu bulgulardan anlaşılmaktadır. İnsanlarda diyete bağlı çinko eksikliğinin genellikle marginal olması nedeniyle bu çalışmada ileri derecede çinko eksikliği oluşturma yöntemi kullanılmıyarak, klinikte gözlenen şartlar taklit edilmeye çalışıldı.

Çinko eksikliğinin göstergesi olarak genellikle saç, kan, serum ve doku çinko düzeyleri kullanılmaktadır. Çinko eksikliğinde saç çinkosunun güvenilir bir indeks olamayacağı (2) ve yumuşak dokularda çinko düzeyinin genellikle değişmediğini (54) bildiren ya-

yınlar dikkate alınarak çalışmamızda femur çinkosu esas parametre olarak seçildi ve bulgularımız bu konuda yapılan benzer çalışmaların sonuçları ile uyum gösterdi (30 , 62 , 80).

Çinko eksikliğinin en iyi tanımlanmış belirtilerinden birisi anemidir. Eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı ve ortalama eritrosit hemoglobin düzeyi çinko eksikliğinde azalır. Heme ve globin sentezinde çinkoya gereksinim olduğu için çinko eksikliğinde anemi görülmesi doğaldır (1 , 36 , 83). Bu nedenle bizim çinko eksikliği oluşturduğumuz sıçanlarda da eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı ve ortalama eritrosit hemoglobin düzeyi azalmış bulundu ve oral çinko tedavisi ile bu değerlerden ikisi kontrol değerlerine yaklaştı. Bulgularımız literatür değerleri ile uyum gösterdi (89 , 102). Ancak ortalama eritrosit hemoglobin miktarının kontrol değerinin altında kalması dolaşımda genç eritrositlerin artmış olabileceğini düşündürdü. Çinko eksikliğinde makrositer hipokromik anemi gözlenmesine karşın 4 haftalık kısıtlı beslenme, kan parametrelerinde önemli bir değişikliğe sebep olmadı.

Hematokrit değeri ve ortalama eritrosit hacminin III.grupta artmış olması, çinko eksikliğinde iyon ve su dengesinin bozulduğunu gösteren çalışmaları (8 , 11) destekler mahiyettedir. Membran kolesterol artışının membranda $Na^+ - K^+$ ATPase aktivitesini azaltması da hücre içi Na^+ ve su birikimi sonucu volüm artışını açıklar (53 , 59 , 104).

Çalışmamızda çinko eksikliği oluşturulan sıçanlarda eritrosit ozmotik frajilitesinin artmış olduğu hemoliz eğrisinde çok belirgin şekilde görülmektedir. Çinko eksikliğinde ozmotik frajilitenin arttığını gösteren pekçok yayın vardır (6 , 11 , 13) ancak mekanizması yeterince açıklanmamıştır. Bazı yazarlar eritrosit ozmotik direnç

azalışını, çinko eksikliğine bağlı lipid peroksidasyon artışı ile açıklarlar (11,64). Ancak çinko eksikliğinde eritrosit membranında lipid peroksidasyonunun değişmediğini bildiren yayınlar bu açıklamaya ters düşmektedir (12).

Çinko eksikliğinde gözlediğimiz membran akışkanlık azalışı, ozmotik frajilite artışının nedenlerinden birisi olabilir. Bilinenler dikkate alındığında membran akışkanlığındaki azalmanın eritrosit deformabilitesinde bozulma ve frajilite artışına yol açacağı ortaya çıkar (94, 99). Şu halde çalışmamızda gözlenen frajilite artışını akışkanlık azalışı ile açıklamak mümkündür.

Kolesterol metabolizmasına çinkonun etkisini inceleyen pekçok yayın varsada bunların sonuçları arasında var olan çelişki bu konuda kesin yargıya ulaşmayı imkansızlaştırıyor.

Biz çalışmamızda kontrol değerlerine göre kısıtlı kalori alan sıçanlarda serum total kolesterolünde anlamlı azalış saptadık. Bu sonuç klinikte, serum kolesterolünü diyet kısıtlaması ile ayarlayan tedavi prensibinin esasını oluşturur ve çok iyi bilinmektedir (15,65). Çinkodan yetersiz diyetle beslenen III. grupta ise serum total kolesterolünün izokalorik diyet alan II.ci gruba göre anlamlı yükseldiğini gözledik. Bu esnada serum HDL-K miktarı da azalmıştı. Bu bulgular çinko eksikliğinin kolesterol metabolizmasına olumsuz etkisini açıkça göstermiştir ve bizim daha önceki sonuçlarımızla uyum içindedir (20, 79). Çinko ile tedavi kolesterol düzeylerini kontrol değerlere yaklaştırmıştır. Bu esnada antiaterojenik olarak nitelenen kolesterol fraksiyonunda da anlamlı artış olmuştur.

Çinkonun HDL-K fraksiyonunda artış yaparak lipid metabolizmasına olumlu yönde etki ettiğini bildiren Koo ve Williams'ın (57) ve diğerlerinin (55, 79) sonuçları ile uyum içinde olan bu bulgu-

muz lipid metabolizmasının çinko eksikliğinden olumsuz yonde etkileneceğini göstermektedir.

Çinkonun protein sentezin de gerekli enzimlerin aktivitesindeki rolü göz önüne alındığında çinko eksikliğine bağlı serum protein düzeylerinde ve eritrosit membran protein miktarındaki azalış normal bir beklentidir (49 , 63, 83 , 84). Ancak marginal çinko eksikliğinde eritrosit membran proteinleri ile ilgili yayına rastlanamadığından bu bulgumuzu teyid etme şansına sahip değiliz fakat beklenmesi gereken bir bulgu gibi görünüyor ve yadırganmıyor.

Çalışmamızda çinko eksikliğinden eritrosit membran lipid bileşiminin anlamlı şekilde etkilendiği ortaya çıktı. Değişiklik membranın kolesterol fraksiyonunda çok belirgin idi. Membranın total fosfolipidlerinde ise değişiklik saptanamadı.

Çinko eksikliği yapılan sıçanlarda membran kolesterolü artmış, fosfolipid düzeyi değişmemiş ve dolayısıyla membran kolesterol/fosfolipid oranı artmış bulundu. Çinko tedavisi kolesteroldeki artışı normale çevirerek orandaki artışıda düzeltti.

Kontrol gruplarının membran lipid ölçümleri literatürdeki bulguları ile oldukça benzerdir. Ancak çinko eksikliğinde membran lipid değişiklikleri bilinmemektedir. Bu nedenle çinko eksikliğinde gözlediğimiz eritrosit membranındaki kolesterol fosfolipid değişikliğinin nedenlerini de açıklayacak literatür bilgisinden yoksunuz. Mütemmel nedenler bilinenlerin sentezi ile elde edilebilir.

Eritrosit membranının lipid kompozisyonu plazma lipidlerindeki değişiklikten etkilenir (47 , 50, 69). Çinkonun plazma lipoprotein düzeylerini ve lipid bileşimini değiştirerek eritrosit membranının lipid komponentlerini dolaylı olarak etkilemesi mümkündür. Ancak çinkonun lipid metabolizmasına özellikle plazma kolesterol

düzeylerine etkisini bildiren raporların sonuçları arasında çelişki vardır (38 , 45 , 55 , 56 , 57 , 62) .

Çinko eksikliği oluşturduğumuz sıçanlarda serum HDL-K düzeyi azaldı. HDL plazmada bulunan LCAT enzimi aracılığı ile eritrosit membranından kolesterolü uzaklaştırdığı gibi, plazmada serbest kolesterolü esterleştirerek kolesterolün eritrositlerde birikmesini onler (65 , 69 , 72) . Nitekim kalıtsal LCAT eksikliğinde ve parankimal karaciğer hastalığında serum HDL-K düzeyinin azaldığı, eritrosit membranında kolesterol biriktiği gösterilmiştir (71 , 72 , 74 , 75 , 76) . Çinko eksikliğinde plazma LCAT aktivitesinin azaldığı da ayrıca rapor edilmiştir (62) . Hernekadar çalışmamızda serum LCAT düzeyleri ölçülmemişse de literatür bilgisi dikkate alınarak çinko eksikliğinde eritrosit membranında gözlenen kolesterol birikimi, enzim aktivitesindeki azalışa bağlanabilir kanısındayız .

Bu kanıyı destekliyen bir başka bulgu da marginal çinko eksikliği oluşan III. grupta azalan serum total kolesterol düzeyinin daha çok HDL- fraksiyonuna ait olmasıdır .

Membran akışkanlığına etkili faktörlerden en önemlisinin kolesterol/fosfolipid oranının büyümesi olduğu bilinir (28) . Bizim çalışmamızda serum fosfolipid düzeyleri çinko eksikliğinden etkilenmiş ve benzer şekilde membran fosfolipidleri de değişmemiştir . Böylece membran kolesterolünün artmış, fosfolipidinin değişmemiş olması kolesterol fosfolipid oranının büyümesine ve akışkanlığın azalmasına neden olarak gösterilmek istenmiştir . Membran kolesterol/fosfolipid oranı ile akışkanlık arasında ters ilişki olduğunu bildiren raporlarda bizi desteklemektedir . (19 , 27 , 33 , 74) .

Eritrosit membranında kolesterol artışının ozmotik frajiliteyi azalttığını (25) rapor eden in vitro bulgular dikkate alındı-

ğında, çinko eksikliğinde eritrosit membranında kolesterol artışı ile ozmotik direncin azaldığını gösteren bulgularımızın çelişkili olabileceği akla gelebilir. Ancak in vivo işaretli eritrositlerle yapılan çalışmalarla (92 ,93) kolesterol ile yüklü eritrositlerde ilk 24 saatte ozmotik direncin arttığını ve daha sonra azalarak hemoliz görüldüğü kanıtlanmıştır. Bununla birlikte bizim bulgularımızda eritrosit hacminin de artmış olması hemolizi kolaylaştıran bir diğer faktördür. Esasen çinko tedavisi ile frajilitenin düzelmesi de bu değişikliklerden çinkonun sorumlu olduğunu gösteriyor.

Sonuç olarak denebilir ki çinko eksikliğinde eritrosit membran frajilitésinin artması, membran lipid komponentlerinin değişmesine dolayısıyla membran bütünlüğünün bozulmasına ve akışkanlığının azalmasına bağlıdır. Selektif çinko eksikliği ile oluşturulan bu bozukluğun çinko tedavisi ile düzeltilebilmesi çinkonun doğrudan sorumlu olduğunun kanıtıdır.

Marginal çinko eksikliği ensidensinin yüksek olduğu az gelişmiş veya gelişmekte olan toplumlarda eritrosit akışkanlık azalmasının klinik sonuçlarına sıklıkla rastlanabileceğine dikkati çekmesi bakımından bulgularımızın önemli olduğu kanısındayız. Daha ileri çalışmalarla konunun derinliğine incelenmesi ve mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir.

Akdeniz Üniversitesi
Rektörlük Kütüphanesi
Demirbaş No. 4387

ÖZET

28 Swiss Albino sıçanda çinkonun eritrosit membran akışkanlığına etkisi ve bunun anemi ile ilişkisi incelendi.

Sıçanlar eşit sayıda 4 gruba ayrıldı. I. grup normal diyetle beslendi. Çinko eksikliğinde iştah kaybı dikkate alınarak çalışmaya II. kontrol grubu ilave edildi. II. grup sıçanlara, III. gruptakiler ile izokalorik olacak şekilde yeterli çinko içeren su ve yem verilerek kısıtlı diyet uygulandı. III. gruptaki hayvanlar ise deionize su ve çinkosu yetersiz diyetle beslendi. IV. grup iki hafta çinkosu eksik diyetle beslendikten sonra 15 gün süreyle intragastrik çinko tedavisine alındı.

Çinko eksikliği bulunan sıçanlarda iştah ve aktivite kaybı, tüy dökülmesi ve ağırlık artışında azalma görüldü. Kontrol grubu ağırlık artışı % 144 \pm 51, II. grupta % 79 \pm 18, III. grupta % 38 \pm 13 IV. grupta % 104 \pm 26 olarak belirlendi. II. ve III. grupların ağırlık artışındaki azalma anlamlı bulundu ($p < 0,01$, $p < 0,001$)

Çinko eksikliğinin göstergesi olarak seçilen femur çinko düzeyleri I. grupta 263.01 - 54.80 ug/g, II. grupta 304.95 \pm 61.11 ug/g, III. grupta 192.98 \pm 19.98 ug/g olarak belirlendi. III. grubun femur çinkosundaki azalma anlamlı bulundu ($p < 0,001$)

Çinko eksikliği bulunan sıçanlarda eritrosit sayısı ve hemoglobinin düzeyi her iki kontrol grubuna göre azaldı. ($p < 0,01$, $p < 0,01$)

Eritrosit hacmi ve hematokrit değeri ise çinko eksikliğinde artmış bulundu ($P < 0,01$, $P < 0,001$).

Bütün grupların serum total fosfolipid düzeyleri değişmedi. Serum total kolesterol miktarında sadece II. gruptaki azalma anlamlı bulundu ($P < 0,01$). Diğer grupların kontrol grubuna göre değişikliği istatistiksel önem göstermedi. Buna karşın yüksek dansiteli lipoproteinin içerdiği kolesterol düzeyinin (HDL-K) çinko eksikliği bulunan sıçanlarda anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($P < 0,05$)

Eritrosit membranının total fosfolipid miktarı bütün gruplarda birbirine yakın olarak belirlendiği halde kolesterol düzeyi çinko eksikliğinde artmış bulundu ($P < 0,02$)

Sonuç olarak çinko eksikliğinde eritrositlerde ozmotik direncin azaldığı, makrositer hipokrom bir anemi geliştiği, eritrosit membranında C/P oranının artmış olduğu, C/P oranındaki artışın plazma HDL-K düzeyindeki azalmaya bağlı olduğu sonucuna ulaşıldı.

KAYNAKLAR

- 1- Abdulla M, and Swensson E.: Effect of oral zinc intake on aminolaevulinic acid dehydratase in red blood cells. Scand. J.Clin. Lab. Invest. 39: 31-36, 1979.
- 2- Aggett PJ.: Zinc Nutrition in medicine. Med Digest. 10(6): 11-19, 1984.
- 3- Ann M, Markwell K, Haas SM.: Protein determination by modified lowry method. Methods in enzymology 72: 296-303, 1981.
- 4- Ashraf MH, Fosmire GS.: Effects of marginal zinc deficiency on subclinical lead toxicity in the rat neonate. J.Nutr. 115: 334-346,
- 5- Axelrod D.: Lateral motion of membrane proteins and biological function. J.Membr. Biol. 75: 1-10, 1983.
- 6- Avigad LS, Bernheimer AW.: Inhibition of hemolysis by zinc and its reversal by L-Histidine. Infect. Immun. 19(3): 1101-1103, 1978.
- 7- Baur JD, Ackerman PG, Toro G.: Phosphalipidis in clinical laboratory methods. C.V. Mosby Comp., St.Louis pp. 450-451, 1974.
- 8- Betger WS, Savage JE, O'Dell BL.: Effect of extracellular zinc concentration on water metabolism in the chick. Fed.Proc. 38 : 282, 1979.

- 9- Bettger WJ, Reeves PG, Savage JE.: Interaction of zinc and vitamin E in the chick. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 163: 432-436, 1980.
- 10- Bettger JW, Reeves PG, Moscatelli EA, Savage JE.: Interaction of zinc and polyunsaturated fatty acids in the chick. J. Nutr. 110: 50-58, 1980.
- 11- Bettger WJ, and O'Dell BL.: A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. Life. Science 28(13): 1438-1452, 1981.
- 12- Bettger WJ, Fish TJ, and O'Dell BL.: Effects of copper and zinc status of rats on eritrosit stability and superoxide dismutase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 279-282, 1978.
- 13- Bettger WJ, Fernandez MS, and O'Dell BL.: Effect of zinc deficiency on the zinc content of rat red cell membranes. Fed. Proc. 39: 3307, 1980.
- 14- Bessis M, and Mohandas N.: Diffractometric metod for the measurment of cellular deformability. Blood Cells. 1: 307-313, 1975.
- 15- Blackburn H.: Plasma lipids: Optimal levels for health, edited by American Health Foundation. Akademik Press, pp: 1-79, 1980.
- 16- Bretscher MS, and Raff MC.: Mammalian Plasma membranes Nature 258: 43-49, 1975.
- 17- Brock J.J, Tanner M.J.A, and Kempf C.: The human erythrocyte anion-transport protein. Biochem. J. 213: 577-586, 1983.
- 18- Bryazewska M, Leyko W.: Effect of insulin on human erythrocyte membrane fluidity in diabetes mellitus. Diabetologia 24(5): 311-313.

- 19- Borochoy H, Abott RE, Schachter D: Modulation of erythrocyte membrane proteins by membrane cholesterol and lipid fluidity. *Biochemistry* 18: 251-255, 1979.
- 20- Bulut O, Öner G.: Cerrahi travmanın aterojenik risk üzerine etkisi. *Türkiye Klinikleri Bilimsel Araştırma Dergisi* 2(3): 264-267, 1984.
- 21- Chvapil M.: Effect of zinc on cells and biomembranes. *Med.Clin. North.Ame.* 60(4): 799,1976.
- 22- Chvapil M, Montgomeri D, Ludwig JC, and Zukoski CF.: Zinc in erythrocyte ghosts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 162: 480-484, 1979.
- 23- Chvapil, M.: New aspects in the biological role of zinc. A stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life. Science* 19(8): 1041-1043, 1973.
- 24- Chvapil M, Ryan JN, Zukoski CF.: The effect of zinc and other metals on the stability of lysosomes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140.
- 25- Cooper RA, Arner EC, Wiley JS, and Shattil SJ.: Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. *The Journal of Clinical investigation.* 55: 115-126, 1975.
- 26- Cooper RA, Jandl JH.: The role of membrane lipids in the survival of red cells in hereditary spherocytosis. *J.Clin. Invest* 48: 736-744, 1969.
- 27- Cooper RA, Durocher JR.: Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. *J.Clin. Invest* 60: 115-121, 1977.

- 28- Cooper RA.: Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N.Engl. J.Med.* 297(7): 371-378, 1977.
- 29- Cooper RA.: Lipids of human red cell membrane. *Semin. Hematol* 7: 296, 1970.
- 30- Cossack ZT.: Somatomedin - C in zinc deficiency. *Experientia* 40: 498-499, 1984.
- 31- Das UN.: Cell membrane fluidity and prostaglandins. *Medical Hypothesis* 7: 549-553, 1981.
- 32- Dash S, Brewer GJ, and Jun FS.: Effect of zinc on hemoglobin binding by red blood cell membranes.
- 33- Demel, RA, De Kruyff B.: The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 457: 109-132, 1976.
- 34- Dodge JT, Mitchell C, and Hanahan DJ.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100: 119-130, 1963.
- 35- Drabkin DL, and Austin JH.: Spectrophotometric studies II. preparations from washed blood cells sulfhemoglobin and nitric oxide hemoglobine *J.Biol. Chem.* 112: 51, 1935.
- 36- Eisa EA, Gauharı AE, Magdy SA.: Blood zinc and copper in normal and in diseased egyptions. *J.Tropical Medicine and Hygiene.* 75: 246-249, 1972.
- 37- Farquhar JW, Ahrens JR.: Effects of dietary fats on human erythrocytes fatty acids patterns. *J.Clin. Invest* 42: 675, 1963.
- 38- Fisher RW, Girouz A, Belonje B, Shah BG.: The effect of distary copper and zinc on cholesterol metabolism. *Am. J.Clin. Nutr.* 33: 1019, 1980.

- 39- Ganong WF.: Review of medical physiology. 11 th edition
california 1983. pp:
- 40- Goldstein DB: The effects of drugs on membrane fluidity.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 43-64, 1984.
- 41- Guest GM.: Osmometric behavior of normal and abnormal human
erythrocytes. Blood 3: 541, 1948.
- 42- Harry DS, Day RC, Owen JS, Agorastos J, and Foo AY.: Plasma
lecithin cholesterol acyltransferase activity and the lipoprotein
abnormalities of liver disease. Scand. J.Clin Lab. Invest
38 suppl 150: 223-227, 1978.
- 43- Heider GJ, Boyett RL.: The picomole determination of free and
total cholesterol in cells in culture. J.Lip. Res. 19: 514-518,
1978.
- 44- Hexum TD.: Studies on the reaction catalyzed by transport (Na-K)
adenosine triphosphatase. I.Effects of divalent metals. Biochem.
Pharmacology 23: 3441-3447, 1974.
- 45- Hooper PL, Visconti L, Garry PJ, Johnson GE.: Zinc lowers
High-density lipoprotein-cholesterol levels. JAMA 244(17):
1960-1961, 1980.
- 46- Hurley LS.: Studies on nutritional factors in mammalian
development. J.Nutr. 91: 27-38, 1967.
- 47- Hui DY, and Harmony JK.: Interaction of plasma lipoproteins with
erythrocytes I. Alteration of erythrocyte morphology. Biochim.
Biophys. Acta 550: 407-424, 1979.
- 48- Hsu JM, and Antony WL.: Zinc deficiency and oxidation of
L-Methionine Methyl - C¹⁴ in rats. J.Nutr. 97: 279-285, 1968.

- 49- Hsu JM, and Antony WL.: Impairment of Cystine - S³⁵ incorporation into skin protein by zinc deficient rats. J.Nutr.101: 452-455, 1971.
- 50- Hui DY, Neol GJ, and Harmony JK.: Binding of plasma low density lipoproteins to erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 664: 513-526, 1981.
- 51- Jacob HS.: Abnormal membran protein of red blood cells in hereditary spherocytosis. J.Clin. Invest. 50: 1800,1971.
- 52- Jackson P, and Morgan DB.: The relation between the membrane cholesterol content and anion exchange in the erythrocytes of patients with cholestasis. Biochim. Biophys. Acta 693: 99-104, 1982.
- 53- Jackson PA, and Morgan DB.: The relation between membrane cholesterol and phospholipid and sodium efflux in erythrocytes from healthy subjects and patients with chronic cholestasis. Clinical Science 62: 101-107, 1982.
- 54- Kahn AM and Özeran RS.: Liver and zinc serum abnormalities in rats with cirrhosis. Gastroenterology 53(2): 193-197, 1967.
- 55- Koo LS, and Ramlet JS.: Dietary cholesterol decreases the serum level of zinc further evidence for the positive relationship between serum zinc and high density lipoproteins. Amer.J.Clin. Nutr. 37: 918-923, 1983.
- 56- Klevay LM.: Hypercholesterolemia in rats produced by an increase in the ratio of zinc to copper ingested. Am. J.Clin. Nutr. 26: 1060-1068, 1973.

- 57- Koo SI, and Williams DA.: Relationship between the nutritional status of zinc and cholesterol concentration of serum lipoproteins in adult male rats. *Am. J. Clin Nutr* 34: 2376-2381, 1981.
- 58- Korenbrot JJ.: Ion transport in membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 39: 19-48, 1977.
- 59- Kroes J, and Ostwald R.: Erythrocyte membrane--effect of increased cholesterol content on permeability. *Biochem. Biophys. Acta* 249: 647-650, 1971.
- 60- Kruckeberg WC, and Bewer GJ.: Zinc inhibition of human erythrocyte membrane ATPase. *Clin. Res* 25: 578 A, 1977.
- 61- Koo SI, and Tur DE.: Effect of zinc deficiency on intestinal transport of triglyceride in the rat. *J.Nutr.* 107: 909-919, 1977.
- 62- Lefevre M, Keen CL, Lönnerdal B.: Different effects of zinc and copper deficiency on composition of plasma high density lipoproteins in rats. *J.Nutr.* 115: 359-368, 1985.
- 63- Macapinlac MP, Pearson WN, Barney GH, and Darby WS.: Protein and Nucleic Acid Metabolism in the testes of zinc deficient rats. *J.Nutr.* 95: 569-577, 1968.
- 64- Machlin LJ, Gabriel E, and MacDonald A.: Influence of zinc on peroxidative hemolysis and filtration rate of red blood cells from vitamin E deficient rats. *Fed. Proc.* 39: 1047, 1980.
- 65- Masoro EJ.: Lipids and lipid metabolism. *Ann. Rev. Physiol* 39: 301-321, 1977.

- 66- Malmquist J, Israelsson B, and Ljungquist.: Inhibition of human liver membrane adenylate cyclase by zinc ions. *Horm. Metab. Res* 11(9): 530-531, 1979.
- 67- Marchesi VT.: The red cell membrane skeleton. Recent progress. *J. American society of hematology* 61(1): 1-11, 1983.
- 68- Marchesi VT.: Functional proteins of human red blood cell membrane. *Semin. Hematok* 16: 3, 1979.
- 69- Myant NB.: Cholesterol transport through the plasma. *Clinical science* 62: 261-271, 1982.
- 70- Michael J, Hilton PJ, Jones NF.: Zinc and the sodium pump in uremia. *Am. J.Clin. Nutr.* 31: 1945-1947, 1978.
- 71- Neerhout RC.: Abnormalities of erythrocyte stromal lipids in hepatic disease *J.Lab. Clin.Med.* 71(3): 438-447, 1968.
- 72- Norum KR.: Familial lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invenst* 20: 231, 1967.
- 73- Owen JS, Hutton RA, Day RC, Bruckdorfer KR.: Platelet lipid composition and platelet aggregation in human liver disease. *J. Lipid. Res* 22: 423-430, 1981.
- 74- Owen JS, Bruckdorfer KR, Day RC, and McIntyre N.: Decreased erythrocytes membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J.Lipid Res.* 23: 124-132, 1982.
- 75- Owen JS, Hutton RA, Hope MJ, Harry DS.: Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and cell membrane lipids and function in human liver disease. *Scand. J.Clin. Lab. Invest* 38 Suppl. 150: 228-232, 1978.

- 76- Owen JS, and Mc. Intyre N.: Erythrocyte lipid composition and sodium transport in human liver disease. *Biochim. Biophys. Acta* 510: 168-176, 1978.
- 77- Öner G, Bor NM.: Serum somatomedin-A activity and insulin levels in zinc deficiency, *Nutr. Rep. Int.* 18(6): 749-754, 1978.
- 78- Öner G, Bala MR.: Büyüme hormonu tedavisine direnç oluşumunda çinkonun rolü. *Türkiye Klinikleri Bilimsel Araştırma Dergisi* 1: 15-18, 1983.
- 79- Öner G, Bor NM, Şermet A, Ağar A, Tanalp R.: Çinkonun Aterojenezise etkisi. *Türkiye Klinikleri Bilimsel Araştırma Dergisi* 3(1): 25-28, 1985.
- 80- Öner G, Bhaumick B, Bala MR.: Effect of zinc deficiency on serum somatomedin levels and skeletal growth in young rats. *Endocrinology* 114(5): 1860-1863, 1984.
- 81- Patrick J, Michael J, Golden MN.: Effect of zinc on leucocyte sodium transport in vitro. *Clin. Sci. Mol. Med.* 54: 585-587, 1978.
- 82- Philips GB, Dodge JT.: Phospholipid and phospholipid fatty acid and aldehyde composition of red cells of patients with abetalipoproteinemia. *J. Lab. Clin. Med.* 71(4): 629, 1968.
- 83- Prasad AS.: A century of research on the metabolic role of zinc *Am. J. Clin. Nutr.* 22: 1215-1221, 1969.
- 84- Prasad AS: Trace elements. Biochemical and clinical effects of zinc and copper. *Am. J. Hematology* 6: 77-87, 1979.
- 85- Rose HG, Oklander M.: Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J. Lipid Res.* 6: 428-431, 1965.

- 98- Thorp JM, Barret AM.: Studies on the mode of action of clofibrate effects on hormone induced changes in plasma free fatty acids, cholesterol, phospholipids and total esterified fatty acids in rats and dogs. Br. J. Pharmac. Chemother 32: 381-391, 1968.
- 99- Vanderkooi J, and Fischkoff S.: Erythrocyte membranes compression of lipid phases by increased cholesterol content. Biochim. Biophys. Acta 274: 71-74, 1972.
- 100- Walker BL, Yurkowski M.: Effect of cell age on erythrocyte fatty acid composition in rats on different dietary regimes. Biochem. J. 103: 218-224, 1967.
- 101- Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, Bithell CT, Foerster J.: Clinical Hematology Eighth Edition 99: 74-104, 1981.
- 102- Wintrobe MM, Shumacker HB, and Schmidt WS.: Values for number size and hemoglobin content of erythrocytes in normal dogs, rabbits and rats. Am.J. Physiol 114,502, 1936.
- 103- Woo W, Gibbs DL.: Zinc and lipid metabolism. Am.J. Clin Nutr 34(1): 120-121, 1981.
- 104- Yeagle PL.: Cholesterol modulation of (Na-K)-ATPase ATP hydrolyzing activity in the human erythrocyte. Biochem. Biophys. Acta 727: 30-44, 1983.