

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KADMİYUMUN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Özgür GÖKTAŞ
FARMAKOLOJİ ANABİLİMDALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gökür AKTAY**

MALATYA-2007

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KADMIYUMUN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Özgür GÖKTAŞ
FARMAKOLOJİ ANABİLİMDALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Göknur AKTAY**

MALATYA – 2007

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince bana her tűrlű olanađı sađlayan ve tűm birikimlerini bana yansıtan danıőman hocam Sayın Prof. Dr. Gűknur AKTAY'a, çalıőmamın bir kısmını tamamlamak űzere İnonű Ŭniversitesi Tıp Fakűltesi Fizyoloji ABD laboratuvarlarının olanaklarından yararlanmamı sađlayan Sayın Prof. Dr. M. Hanifi EMRE'ye ve bana her zaman destek olan sevgili aileme sonsuz teőekkűrlerimi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	III
TABLolar DİZİNİ	IV
SİMGELEr VE KISALTMALAR DİZİNİ	V
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. METALLERİN TOKSİK ETKİLERİ	3
2.2. KADMİYUM	4
2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
2.2.2. Çevrede Kadmiyum ve Maruziyet Kaynakları	5
2.2.3. Kadmiyumun Farmakokinetiği	7
2.2.4. Kadmiyumun Toksikokinetiği	11
2.3. OKSİDATİF STRES	18
2.3.1. Serbest radikaller	18
2.3.2. Serbest Radikal Kaynakları	19
2.3.3. Serbest Radikallerin Biyokimyası	20
2.3.4. Serbest Radikallerin Hücresel Hasarı	22
2.3.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	24
2.4. RESVERATROL	26
2.4.1. Resveratrolün Farmakolojisi	27
2.4.2. Resveratrolün Biyolojik Aktiviteleri	30
3. MATERYAL-YÖNTEM	36
3.1. GEREÇLER	36
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	37
3.2. DENEY GRUPLARI	37
3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER	38
3.3.1. Tiyoarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini	38
3.3.2. Doku Glutasyon (GSH) Tayini	39
3.3.3. Dokularda Total Sülfidril Gruplarının (T-SH) Tayini	40
3.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi	41
3.3.5. Protein Tayini	42
3.3.6. AST ve ALT enzim aktivitelerinin tayini	44
3.3.7. İstatistiksel analiz	44
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
7. ÖZET	56
8. SUMMARY	57
9. KAYNAKÇA	58
10. ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kadmiyum	5
Şekil 2. Kadmiyumun vücuttaki dağılımı	8
Şekil 3. Kadmiyumun beyin hücrelerindeki toksisitesi	13
Şekil 4. Kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres tablosu	18
Şekil 5. Serbest radikallerin hücresel kaynakları ve şematik olarak hasarı	19
Şekil 6. Resveratrol	27
Şekil 7. Resveratrolün biyosentezi	28
Şekil 8. Resveratrolün kanda taşınması ve hücre içine geçiş hipotezi	29
Şekil 9. Resveratrolün hücre döngüsü üzerine etkisi	32
Şekil 10. TBARS kalibrasyon grafiği	39
Şekil 11. GSH kalibrasyon grafiği	40
Şekil 12. TSH kalibrasyon grafiği	41
Şekil 13. Protein kalibrasyon grafiği	43
Şekil 14. Serum AST, ALT aktiviteleri	45
Şekil 15. Doku TBARS düzeyleri	46
Şekil 16. Doku GSH düzeyleri	46
Şekil 17. Doku TSH düzeyleri	47
Şekil 18. Doku SOD aktiviteleri	47

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarının serum AST, ALT aktiviteleri, doku TBARS, GSH, T-SH düzeyleri, doku SOD aktiviteleri.....	48
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
BSA	: Bovine serum albumin
Cd	: Kadmiyum
CAT	: Katalaz
DTNB	: 5,5'-ditiyobis-(2-nitro-benzoik asit)
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
OH[·]	: Hidroksil radikali
IARC	: International Agency for Research on Cancer
MT	: Metallotionein
NO[·]	: Nitrik oksit radikali
ROO[·]	: Peroksil radikali
O₂^{·-}	: Süperoksit radikali
RES	: Resveratrol
SOD	: Süperoksit dismutaz
T-SH	: Total Sülfidril Gruplarının
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri
<i>i.p.</i>	: İntra peritoneal
<i>i.v.</i>	: İntra venöz

1. GİRİŞ

Endüstriyel ve çevresel kirlenici olarak kadmiyumun (Cd) önemi son yıllarda daha da belirginleşmiştir. Birleşik Devletler Çevresel Koruma Komisyonunun öncelikli zararlı maddeler listesinde yer alan Cd'a, çoğu kez doğrudan solunum yolu veya besin zinciri aracılığıyla maruz kalınır. Maruziyet yolu, dozu ve süresine bağlı olarak akciğer, karaciğer, böbrek, kemik, testis ve plasentada hasara neden olabilir (1).

Modern toksik metal olarak tanımlanan Cd'un, genel maruziyet kaynakları besinler ve içme suyu olmasına karşın, toksisiteye neden olabilecek bir diğer önemli kaynak ise, ticari atıklar ile kontamine gübrelerin tarım alanlarında kullanılmasıdır. Cd toz ya da gazlarına iş yeri maruziyetleri de meslek hastalıkları açısından özellikle tehlike arz eder. Solunum ve ağız yoluyla alınabilen Cd'un büyük bir kısmı karaciğer ve böbrekte depolanır ve başlıca idrarla atılır. Diyetle alınan Cd'un mide-bağırsak kanalından emilimi düşüktür. Dolayısıyla, ağız yoluyla akut zehirlenme nadir görülür. Ancak, kontamine yiyecek ve içeceklerle yüksek düzeylerde alınması toksik etkilere neden olabilir (2).

Kadmiyumla ilgili yapılan çalışmalarda, Cd'un karsinojenik etkisinin yanısıra, hem akut ve hem de kronik maruziyetiyle birçok organda hasara neden olduğu gösterilmiştir. Akut Cd zehirlenmesi, başta karaciğer ve testislerde hasara neden olurken, kronik maruziyet renal hasar, anemi, immünotoksisite ve osteotoksisiteyle sonuçlanır. Akut Cd zehirlenmesinde, Cd'un dolaylı olarak reaktif oksijen türleri ve radikallerin üretimine neden olduğu düşünülmektedir (3, 4).

Serbest radikaller, bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren molekül veya molekül parçaları olarak tanımlanmaktadır. Birçok patolojik olaydan, organizmadaki prooksidan/antioksidan dengenin bozulması sonucu hücre içi serbest oksijen radikal düzeyinin artması sorumludur. Reaktif oksijen radikalleri DNA, proteinler ve lipitler gibi makromoleküllerle etkileşerek DNA hasarı, lipit peroksidasyon ve protein oksidasyonuna neden olarak hücrenin bütünlüğünü bozarlar (5).

Prooksidan düzeyini artıran etmenlere karşı hücrenin yaşamını sürdürebilmesi, organizmanın serbest radikallerden koruyucu biyokimyasal savunma mekanizmalarına

sahip olmasına bağlıdır. Tüm memeli hücreleri zararlı radikallere karşı savunma sistemleriyle donatılmıştır. Serbest radikallerin hücrelerdeki denge düzeyi normalde sitozol ve membranlarda lokalize olmuş ya da hücre dışı sıvılarda bulunan bu savunma sistemleriyle ayarlanırken , antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı veya aşırı miktarda serbest radikal üretildiği durumlarda dışardan alınan destek antioksidan maddelerin yararlarıyla ilgili araştırmalar sürmektedir (5,6).

Doğal ürünlerin büyük bir bölümü, hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki olası klinik özellikleri açısından araştırılmaktadır. Fitoaleksinin olarak bilinen bitki antibiyotiklerini içeren ve güçlü antifungal özellikli olan polimerler (viniferinler) familyası bu doğal ürünler arasındadır. Bu grubun en etkili üyesi olan resveratrol (RES; 3,5,4'-trihidroksistilben), asma bitkisi de dahil birçok bitki tarafından travmatik zedelenme, UV ışığına maruziyet ya da fungal enfeksiyona (*Botrytis cinerea*) karşı yanıt olarak sentezlenen bir fitoaleksindir (7).

RES'ün; antioksidan (8), antikanser (9), östrojenik (10), antiplatelet (11), vazorelaksan (12), iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu (13), antiinflamatuvar (14), hepatoprotektif (15), antimikrobiyal (16) aktiviteleri olduğu ve *Helicobacter pylori* (17), *Herpes Simpleks Virus* (18) üzerine etkili olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmada; sıçanlarda Cd uygulamasının, karaciğer, böbrek, beyin ve kalp dokularındaki olası toksisitesini, oksidatif hasar mekanizmaları açısından araştırarak akut Cd toksisitesi mekanizmalarını irdelemeyi ve RES ön tedavisinin, Cd toksisitesi üzerindeki etkisini araştırarak, doğal antioksidanların ağır metal toksisitesi üzerindeki olası koruyucu etkilerini aydınlatmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. METALLERİN TOKSİK ETKİLERİ

Metaller, insanlar için bilinen en eski toksinlerdir. Metalleri diğer toksik maddelerden ayıran en önemli özellikleri, insanlar tarafından ne oluşturulabilir ne de yok edilebilir olmalarıdır. Metaller, çevresel taşınım sonucu besinler ve içme suları ile; insanlar tarafından veya antropojenik olarak hava, su, toprak ve besinlerle organizmaya girebilirler. Periyodik tablodaki 105 elementin yaklaşık 80'ini metaller oluşturur ve bunların 30 kadarının insanlarda toksisite oluşturduğu bilinmektedir. Özellikle mesleki ve çevresel maruziyet sonucu kadmiyum (Cd), alüminyum, kurşun, civa, ve manganez biyolojik sistemlerle etkileşerek ciddi sağlık sorunlarına yol açar (2,19).

Metallerin toksik etkileri her metalin özelliğine göre değişmektedir. Ama genel olarak metallerin hepsi doza bağlı olarak çeşitli organ sistemlerini etkilemektedir. Bu nedenle metal zehirlenmelerinde “hedef veya kritik organ”, o metale en duyarlı olan etki yeri için kullanılmaktadır. Örneğin Cd'a en duyarlı organ, böbrekler olmakla beraber karaciğer, akciğer ve diğer organlarda da toksik etkisi görülür (2).

Metallerin neden olduğu toksisite ve karsinojenitenin mekanizmasının bir parçası olarak reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretimi olduğu bilinmektedir. Birçoğu tiyol ve azot grubu taşıyan moleküllerle veya iz elementlerle etkileşerek antioksidan sistemlerin etkinliğinin azalmasına neden olur. Sonuç olarak, hücre içinde DNA hasarı, lipid peroksidasyon ve proteinlerde değişiklikler oluşturarak hücrelerin fonksiyonlarını bozarlar (20).

Toksisite oluşumunda; doz, maruziyet yolu, maruziyet süresi ve maruziyet sıklığı önemlidir. Diğer taraftan, maruz kalınan maddenin kimyasal şekli, diğer kimyasallarla etkileşimi gibi etmenlerle yaşam biçimi, bağışıklık sistemi ve türe ait özellikler de toksisiteyi değiştirebilir (2).

Metal endüstrisinin gelişmesi ve teknolojiadaki kullanım alanlarının genişlemesi, metallerin çevresel düzeylerinin artmasına neden olmuştur. Epidemiyolojik çalışmalara göre, Cd en toksik metallerden biridir. Birçok metalden farklı olarak 1940'lı yıllardan gelen büyük ölçekli kullanımının son dönemlerde oldukça artması, Cd'un canlılar üzerindeki etkileriyle ilgili araştırmaları artırmaktadır.

2.2. KADMIYUM

Yirminci yüzyılın metali olarak tanımlanan Cd, 1817 yılında Almanya'da Stromeyer tarafından keşfedilmiştir. Doğada çinko ve kurşun filizlerinde bulunan Cd'un günümüzdeki endüstriyel kullanımı elli yıl öncesine oranla oldukça fazladır. International Agency for Research on Cancer (IARC), kimyasal maddeleri insandaki karsinojenik etki risklerine göre beş gruba ayırmıştır. IARC'nin sınıflandırmasında, Cd akciğer kanseriyle olan ilişkisinden dolayı Grup 1: İnsanda Karsinojenik Etkili Maddeler arasında yer almaktadır (3, 4, 21).

2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kadmiyum, periyodik tabloda II-b grubunda bulunan bir geçiş elementidir. Orta sertlikte bir metal olan Cd, gümüş beyazı rengindedir ve doğada genellikle saf halde bulunmaz. Ancak; Cd-oksit, Cd-klorit, Cd-sülfat veya Cd/sülfid şeklinde mineral bileşiği olarak bulunur.

Kadmiyumun kimyasal özellikleri:

Atom numarası : 48

Atom ağırlığı : 112.41 g/mol

Kaynama noktası : 767 °C

Erime noktası : 321 °C

Özgül ağırlığı : (20 °C): 8.65 g/cm³

Kadmiyumun kaynama noktası çinkodan (907 °C) farklıdır, ancak koordinasyon geometrileri eşit derecede uyumlu olduğu için kimyasal davranış olarak birbirine çok

benzemektedirler. Cd'un kükürt ve karbonat tuzları suda çözünmez, sülfat, asetat, nitrat ve halojenli bileşikleri suda çözünür. Cd'un çevre ve ekosistem üzerindeki etkileri bu tuzların doğadaki dağılımına bağlıdır. Cd'un neden olduğu çevre kirliliği günümüzde insan sağlığını tehdit eden bir unsur olarak görülmektedir (21).



Şekil 1. Kadmiyum (<http://www.kimyaevi.org/elementler/kadmiyum>.Erişim tarihi:30.04.2007)

2.2.2. Çevrede Kadmiyum ve Maruziyet Kaynakları

Endüstriyel ve çevresel bir kirletici olan Cd'un başlıca kontaminasyon kaynakları; Cd'la kontamine besinler ve içme suyudur. Bunların dışında antropojenik olarak, endüstride kullanımından kaynaklanan atıklar çevreyi kirletmektedir.

Kadmiyumun başlıca kullanım alanları:

- 1-) Elektrolizle kaplama ve galvanizleme işlemlerinde paslanmayı önleyici
- 2-) Plastiklerin üretiminde sağlamlaştırıcı
- 3-) Boya maddesi
- 4-) Metal alaşımı hazırlanmasında koruyucu
- 5-) Cam endüstrisi ve seramik yapımı
- 6-) Çinko, bakır ve kurşun cevherlerinin arındırılması ve
- 7-) Nikel-Cd pillerinin yapımı (4, 22)

Ayrıca, ev eşyaları, otomobiller ve kamyonlar, zirai aletler, uçak parçaları, endüstriyel aletler, el aletleri, tutturucu özelliği olan; vida somunu, civata, vida, çivi gibi

malzemeler de genel olarak Cd'la kaplıdır. Cd, lastik tamiratında ve fotoğrafçılıkta da kullanılmaktadır.

Gübreler, çürümüş organik maddeler içeren gübreler ve atık maddelerin doğrudan toprağa eklenmesiyle ağır metaller toprağa geçerler. Hatta, iç lağım suyu çamuru da, kanallar veya tuvaletlerden yıkanan maddeleri içerdiklerinden ağır metallerle bulaşık halde bulunur, Ör. tuvaletlere atılan sigara izmaritleri Cd içerir. Otomobil tekerleklerinin caddeleri hızla geçtiği veya ezdiği zamanlarda lastikten yayılabilir veya yağmurdan sonra çamurda topladığı yerden lağım suyu sistemlerine geçer (22).

Kadmiyum maruziyetine neden olan bir diğer potansiyel kaynak, ticari atıklarla kontamine gübrelerin tarımsal alanlarda kullanılmasıdır. Ticari atıkların, kuru materyali 1500 mg/kg'dan daha fazla Cd içerebilir. Diğer taraftan, pestisitler ve fosfatlı gübreler de Cd içermektedir. Toprağa geçen Cd, bitkiler tarafından kolaylıkla alınarak besin zinciri içinde insan ve hayvan organizmasına taşınır. Cd'un et, balık ve meyvelerde 1-50 µg/kg, tahıllarda ise yaklaşık 150 µg/kg kadar bulunduğu tespit edilmiştir. Midye, istiridye gibi kabuklu deniz hayvanlarında Cd düzeyi 100-1000 µg/kg'a kadar çıkabilmektedir. Hayvan karaciğer, böbrek ve üreme organlarında yüksek miktarlarda bulunabileceğinden sakatat tüketiminde temkinli olmakta fayda vardır (2, 22).

Kadmiyuma maruziyet, daha çok oral yolla veya solunum yoluyla olur. Deri yoluyla maruziyet toksisiteye yol açacak düzeyde değildir. Cd toz ya da buharına maruziyet gözlerde tahriş edici hasara neden olmaktadır. Solunum yolu ile maruziyet endüstriyel bölgelerde ve madencilik bulunduğu bölgelerde daha çok görülür. Ör. Portekiz'in altın madeni çıkarılan kuzeydoğu bölgesinde yaşayan insanların kanında yüksek miktarda Cd ve kurşun tespit edilmiştir (23). Ayrıca, Kuzey Amerika ve Avrupa'da hava, su ya da besinlerle Cd'un günlük alımının yaklaşık 10-40 µg/gün olduğu bildirilmiştir (2).

Kontamine besinlerin yanısıra sigara içimi de Cd maruziyetinin potansiyel kaynağıdır. Sigara içimiyle bu karsinojen metale hem oral hem de solunum yoluyla maruziyet söz konusudur. Bir adet sigara 1-2 µg kadar düşük bir düzeyde Cd içerse de, bu miktarın tekrarlayan dozlarında, maruz kalınan Cd'un birikimi toksik etkilere neden

olabilecek düzeye ulaşabilmektedir. Cd tütünden başka, tahıllar, lifli sebzeler ve patatesten de bulunur (24).

2.2.3 . Kadmiyumun Farmakokinetiği

Solunum veya ağız yoluyla alınabilen Cd, kan aracılığı ile organlara taşınır. En çok karaciğer ve böbrekte depolanır. Biyolojik yarı ömrü yaklaşık 20 yıl olan Cd, esas olarak feçes ve idrarla atılır.

1. Emilim

Endüstriyel bölgelerde veya kontamine bölgelerde Cd'un solunum yolu ile alınan miktarının, oral yolla alınan miktarından fazla olabileceği ve Cd'un solunum yolu ile emiliminin, mide-bağırsak kanalındaki emiliminden daha fazla olduğu bildirilmektedir. Solunum yoluyla emilim ve akciğerdeki birikimi; Cd'a maruziyet dozu, süresi ve maruziyet yolu ile Cd bileşiğinin partikül büyüklüğüne ve kimyasal özelliğine bağlı olarak değişir, ancak yinede emilim oranı %15-30 arasındadır. Çapları 2-3 µm'den daha az olanlar alveollere geçer, daha büyük olanlar ise nazofarengeal bölgede birikir. Cd-oksit ile Cd-sülfid'in her ikisinde suda çözünmez, ancak Cd-sülfid'in emilimi daha azdır. Solunumla alınan Cd, alveollerden kan dolaşımına geçerek dokulara dağılır. Kısmen akciğerlerde de birikir, bronşit, kronik ödem ve kansere neden olabilecek akciğer toksisitesine yol açar (25, 26).

Sigara içimiyle, sigarada bulunan Cd'un yaklaşık % 30-40'ı sistemik kan dolaşımına geçerken % 10'u akciğerlerde depolanır. Yapılan araştırmalara göre, sigara içenlerdeki kan Cd düzeyi ve renal Cd birikimi içmeyenlere göre daha yüksektir (24).

Diyetle alınan Cd'un mide-bağırsak kanalından emilimi düşüktür. % 5-8 oranında emilir. Cd, esas olarak ince bağırsakların villus hücrelerinden ve onikiparmak bağırsağından emilir. Bağırsak hücreleri Cd toksisitesinde koruyucu rol oynar, ancak bu metalin birikiminde de ilk hedef organ durumundadır (25).

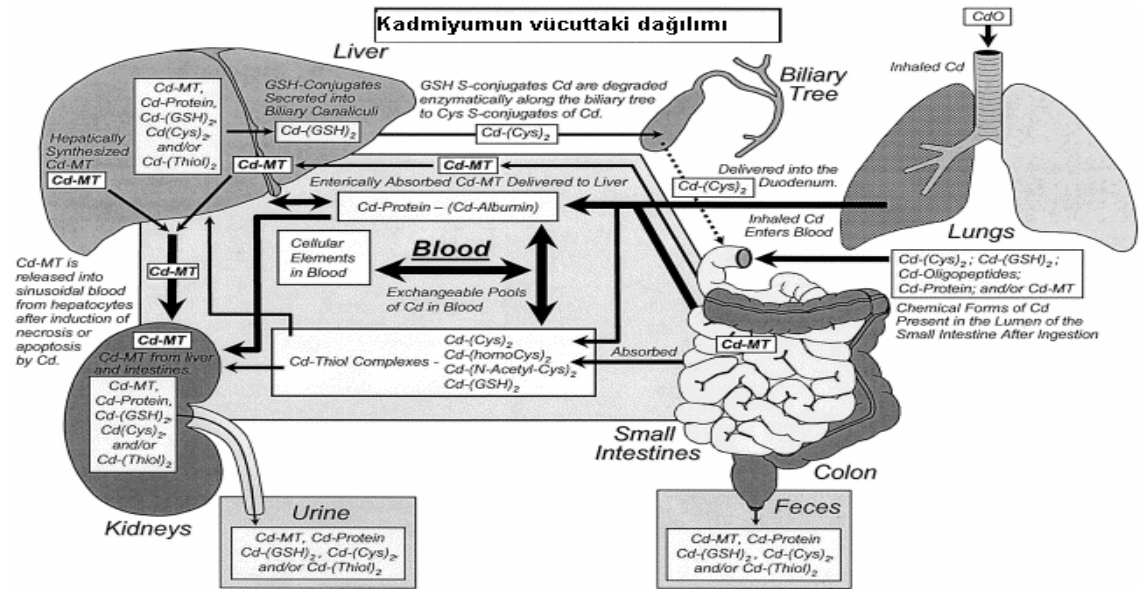
Kadmiyum, hücre içine membranda bulunan taşıyıcı proteinlerle alınır. Taşıyıcı proteinlere bağlanırken, kalsiyum ve çinko ile yarışır. Cd hücre içine, kalsiyum, çinko, demir ve bakır gibi esansiyel elementlerle aynı mekanizmayla alındığından, bu

elementlerden yoksun ve düşük miktarda protein içeren diyetle beslenmeyle emilimi artar. Ayrıca demir eksikliği olan kadınlarda da Cd'un emilimi daha fazladır (27, 28).

Kadmiyumun hücre içine alınmasıyla ilgili bir diğer mekanizma da, Cd'un glutatyon ve sistein gibi tiyol konjüгатlarının; amino asit, oligopeptit, organik anyon/kasyon ve homeostatik diğer molekülleri hücre içine alan taşıyıcı proteinlerin moleküler olarak benzeri olması şeklinde açıklanmaktadır. Son yıllarda, Cd iyonunu bağlayan metallothionein (MT), albumin ya da diğer proteinlerin, Cd'la konjüгат oluşturdukları zaman emici veya reseptör aracılı endositoz taşıyıcısının substratı gibi davrandığı da düşünülmektedir (29).

2. Dağılım

Kadmiyum kanda MT, albumin ile aminoasit ve tiyol grupları olan proteinlerle taşınır. Sistemik kan dolaşımından, MT üretiminin indüklendiği karaciğer ve böbreğe büyük oranda dağılır. Ayrıca kalp, safra kesesi, prostat, pankreas, plasenta, beyin ve birçok organa dağılır. Sonunda da böbrekte depolanır. Alttaki şekilde de görüldüğü gibi dokularda esas olarak MT'ne ve diğer proteinler ile tiyol gruplarına bağlı olarak bulunur. Cd'a akut maruziyette büyük bir çoğunluğu karaciğere dağılır, ancak hepatik MT üretimini takiben redistribüsyonu böbrekte olur (29, 30).



Şekil 2. Kadmiyumun vücuttaki dağılımı. (MT, metallothionein; Cys, sistein; GSH, glutatyon; N-Acetyl-Cys, N-asetilsistein; homoCys, homosistein) (29).

3. Plasentaya Geçiş

Plasenta, toksik metale maruziyette hem annenin hem de ceninin sağlığının değerlendirilmesinden dolayı ikili gösterge olarak kabul edilmektedir. MT'ler zenobiyotiklerin plasentaya geşişinde koruyucu rol oynar, ancak zenobiyotiklere bağlanması stabil olmadığı için geçişi tamamen engelleyememektedir. Cd'un plasentadaki ortalama miktarının 4 ng/g, plasentanın yaş ağırlığına bağlı olarak 1-6 ng/gr'a kadar yayılabileceği ve kontamine bölgelerde yaşayanlar ile sigara içen kadınlarda bu oranın daha fazla olduğu bildirilmiştir (31).

Hamile kadınlardan ağır metallere maruziyeti, plasentada hasara ve ceninde esansiyel iz elementlerin taşınmasında değişikliğe neden olmaktadır. Toksikite mekanizmasının, Cd'un; çinko, demir, kalsiyum ve bakır'ın taşıyıcı proteinlerini inhibe ettiği; plasentanın anne tarafındaki membranlarında kalsiyum kanallarını inhibe ettiği ve cenindeki Na/K ATP-az'ı baskılayarak sodyum ile potasyum arasındaki dengeyi değiştirdiği şeklinde geliştiği düşünülmektedir. Ceninde inko, bakır, demir gibi esansiyel elementlerin eksikliği, nükleik asitlerin ve proteinlerin metabolizmalarını değiştirerek organlarda gelişim bozukluğu ile ceninin büyümesinin zayıflamasına neden olduğu bildirilmiştir (32).

Sigara içen ve içmeyen hamile kadınlarda yapılan bir çalışmada, sigara içen kadınlardan plasentalarında Cd miktarı ve çinko düzeyinin içmeyenlere oranla daha fazla olduğu bulunmuştur. Cd ve inkonun MT sentezini indklemelerinden dolayı MT dzeyininde içmeyenlere oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Plasentada MT'lerin esas olarak iki izoformu vardır. Bunlar MT-1 ve MT-2'dir. Sigara içenlerin plasentalarındaki Cd ve çinko düzeylerindeki artışın özellikle MT-2 sentezini indüklediği bildirilmektedir (33).

4. Kan-Beyin Bariyeri ve Beyin-Omirilik Sıvısından Geçiş

Beyin ve omirilik dokusundaki kapilerler, vücudun diğer yerlerindekiinden daha farklı bir yapıya sahiptirler. Bunların yapısal özellikleri nedeniyle kan-beyin engeli oluşturdukları kabul edilir. Beyin-omirilik sıvısı beyin içindeki ventrikülleri, omirilikteki bazı yapıları ve beyin ile omiriliğin çevresindeki subaraknoid aralığı doldurur. Beyin kapilerleri gibi koroid pleksuslarda ilerinden geçen kandaki

maddelerden sadece lipofilik olanların geçişine izin verdiği için beyin-omirilik sıvısı engelinden söz edilmektedir (35).

Kadmiyum, kan-beyin engeline olan seçici geçirgenliğinden dolayı bariyeri geçer. Çinko ve manganez gibi esansiyel iz elementlerinin beyin-omirilik sıvısı ve kan-beyin bariyeri aracılığı ile beyine geçtikleri bilinmektedir. Bu tip elementler, beyin büyüme gibi fonksiyonları için gereklidir. Deneysel çalışmalarda Cd maruziyetinin beyin ve beyincikte histopatolojik hasara neden olduğu tespit edilmiştir. Cd'un beyindeki ters etkilerinin Cd'un beyine taşınması ve metabolizmasıyla ilgili olduğu bildirilmiştir. Cd'un geometrik şeklinin çinkoya benzemesi, çinko yerine beyine taşınmış olabileceğini düşündürmektedir. Sıçanlara *i.v.* yolla değişik dozlarda $^{109}\text{CdCl}_2$ ve ^{109}Cd verildikten bir saat sonra $^{109}\text{CdCl}_2$ 'ün koroid pleksusta, ^{109}Cd 'un beyin epifizinde ve beyin diğer bölgelerinde biriktiği tespit edilmiştir (36). Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmaya göre; Cd'un demir eksikliğine neden olduğu ve gelişme döneminde olan sıçanlarda beyine yüksek miktarda geçtiği bildirilmiştir (37).

5. Atılım

Oral yolla emilen Cd'un atılımı oldukça yavaştır. Cd başlıca idrarla ve feçesle atılmaktadır. Diyetle alınan Cd'un mide-bağırsak kanalından emilimi %5-8 oranındadır. Cd'un emilmeyen kısmı yani % 90'dan fazla olan miktarı ince ve kalın bağırsak içinden ilerler ve feçesle atılır. Bu nedenle, Cd'a oral yolla maruziyette feçes belirteç olarak kullanılabilir. Birçok araştırmacıya göre, karaciğer hücreleri tarafından tiyol konjüгатları halinde safra kanalikülleri içine salınan ve safra sisteminden sonra ince ve kalın bağırsak içine ilerleyen Cd, feçesle atılan Cd'un asıl kaynağıdır. (29).

Kadmiyumun idrarla atılımı, maruziyet tipine bağlıdır. Ör. inorganik formda akut parenteral maruziyette idrarla atılım dikkate alınmayacak kadar azdır. Böbreklerde dağılan Cd-MT kompleksleri kolayca tübüler lümene süzülür ve buradan geri emilimi güç olduğu için büyük bir kısmı idrarla atılır. Cd-MT'ine akut ya da kronik maruziyet sonucu idrarla atılım, CdCl_2 'e akut maruziyetle atılıma oranla daha fazladır. Cd'un idrarla atılımı proksimal tübüler epitelinin yapısına ve fizyolojik bütünlüğüne bağlıdır. Nefrotoksik bir madde ya da Cd tarafından tübülerde oluşturulan hasar, süzülen Cd türlerinin emiliminin azalmasına ve hasarlı bölgelerden salıverilen Cd'larla birlikte atılımın artmasına neden olur (29).

2.2.4. Kadmiyumun Toksikokinetiği

Önemli bir çevresel ve mesleki kirlenici olan Cd, en toksik metallere biridir ve canlıların sağlığı için potansiyel tehlike arz eder. Birçok araştırmacıya göre böbrekler Cd toksisitesine en duyarlı organlardır.

Kadmiyum toksisitesinin temeli;

1. Metalloenzimlerdeki Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Ca^{+2} gibi metal iyonlarıyla yer değiştirme
2. Proteinler, enzimler gibi tiyol (-SH) grubu içeren biyolojik yapılara olan güçlü afinitesinden dolayı, bu yapılara bağlanma
3. Kalmodulindeki Ca^{+2} 'la yer değiştirip, kalmoduline bağlı fonksiyonları aktive etme ya da düzenleme (27, 34).

1. Akut Toksikite

Akut toksisite çok yüksek miktarda Cd solunması ya da oral yolla alınması ile ortaya çıkar. Ölümle sonuçlanan akut maruziyet nadiren gerçekleşir. İnsanlar için ölümle sonuçlanan maruziyet dozu 20-30 mg/kg'dır. Maruziyetin şiddetine bağlı olarak Cd'un klinik semptomları; mide bulantısı, kusma, karın ağrısı ve krampları, baş ağrısı, kas krampları, yorgunluk, şok ve ölümdür. Cd-oksit buharlarına 8 saat 5 mg/m³ dozda maruziyetin, insanlar için öldürücü olduğu bildirilmiştir (40, 41).

Kadmiyumun orta düzeyde ya da yüksek düzeyde maruziyeti karaciğer, akciğer, plasenta, uterus ve testis gibi organlarda hemorajik hasara neden olur. Toksikite, Cd'un hücredeki mikrovasküler permeabiliteyi artırmasıyla başlar. Bunun altında yatan mekanizmanında Cd'un adezyon moleküllerinin fonksiyonlarını değiştirmesi olduğu düşünülmektedir.

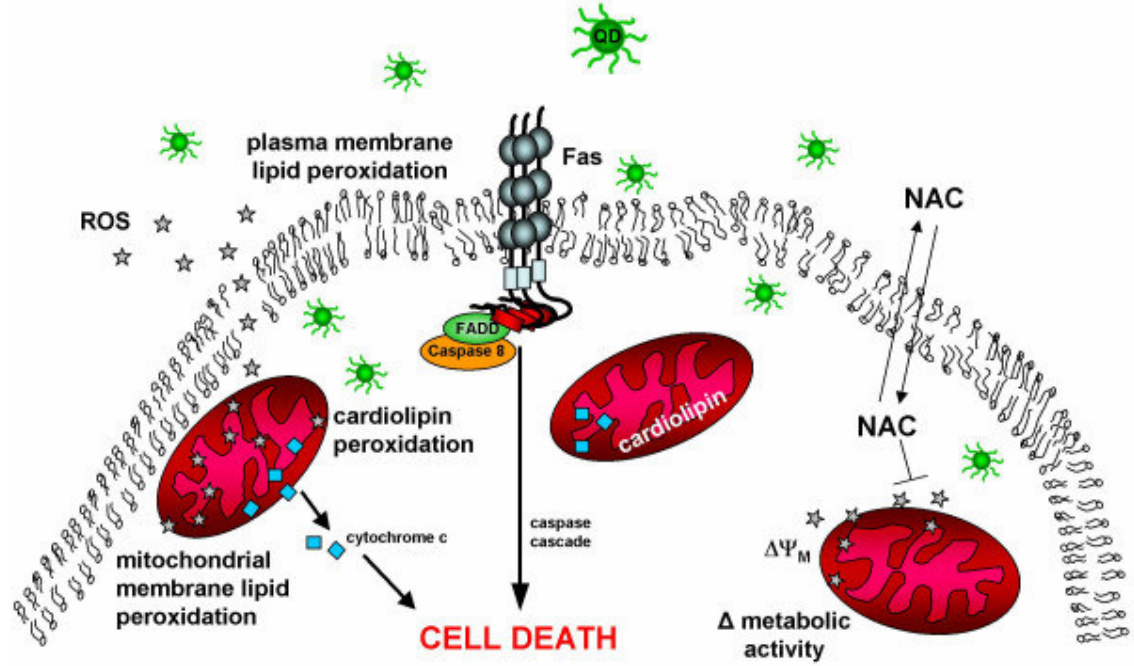
Solunma yoluyla akut Cd maruziyeti akciğer ödeme ve solunum yolu irritasyonuna neden olur. Akciğerler üzerindeki bu toksik etkisinin özellikle Ca^{+2} 'a bağımlı hücre adezyon molekülleri olan E-cadherin and VE-cadherin'lerin fonksiyonlarını bozarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Cd'un bu etkisinin mekanizması; sitotoksik diğer etkileriyle beraber Cd'un E-cadherin'lerin Ca^{+2} bağlayan bölgesinde Ca^{+2} 'la yer değiştirmiş olabileceği şeklinde açıklanmaktadır (38).

Metallotioneinlerin sentezi esas olarak karaciğerde yapıldığı için akut Cd toksisitesinde karaciğer hedef organdır. MT'ler tiyol gruplarınca zengin, düşük molekül ağırlıklı metal bağlayan sitozolik proteinlerdir. Karaciğerde MT'lerin sentezi; hormonlar, sitokinler, çinko ve Cd gibi metaller ile çeşitli zenobiyotikler tarafından indüklenir. MT'lerin β ve α olmak üzere iki bağlanma bölgesi vardır. β bölgesi 3 atom bağlayabilirken, α bölgesi 4 atom bağlar. Çinko MT'in α bölgesine bağlanır, ancak Cd'un MT'e olan afinitesi çinkodan sekiz kat daha fazla olduğundan, bir MT yedi gram Cd'u bağlayabilir. MT'ler MT-metal kompleksi oluşturarak, Cd ve civa gibi ağır metallerin toksisitesinin önlenmesinde koruyucu rol oynarlar. Özellikle de karaciğer parenkima hücrelerindeki Cd'un detoksifiye edilmesinde temel mekanizmadır (27, 42).

Akut Cd maruziyetinde hepatositlerde reaktif oksijen türlerinin ve radikallerin oluşumundan birçok mekanizma sorumludur. Cd, hücrel glutatyon düzeyini ya da katalaz ile süperoksit dismutaz aktivitesini azaltarak antioksidan savunma sistemine zarar verir. Mangan süperoksit dismutaz ve katalazı kodlayan genlerin ekspresyonunu baskılar. Demir, bakır gibi redoks aktif metallerle yer değiştirip, onların serbest hale gelmesini sağlayarak dolaylı yoldan reaktif oksijen türlerinin üretimini sağlar. Polimorfonükleer lökositleri ya da makrofajları aktive ederek reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle enflamasyon yanıtını başlatır. Ayrıca, moleküler oksijenin redüksiyonundan sorumlu ya da süperoksit radikalinin oluşumunu sağlayan ksantin oksidazın aktivasyonundan sorumlu solunum zinciri bileşenlerini ve mitokondri membran içeriğini değiştirerek oksidatif hasara neden olur (43).

Akut Cd maruziyeti de kronik Cd maruziyeti gibi böbreklerde proksimal tübül hasarına neden olur. Karaciğer ve kandan süzülen Cd'un % 70'i böbreklerin proksimal tübülleri tarafından alınır ve böbrek korteksinde birikir. Cd-MT kompleksi hepatosit hücreleri için koruyucudur, ancak böbrekte ilk olarak Na^+ -glikoz ve Na^+ -amino asit taşıyıcı proteinleri baskılar ve ikincil olarak bazolateral Na^+ - K^+ -ATPaz aktivitesini azaltarak, glikoz ve aminoasitlerin proksimal tübül hücrelerinin luminal tarafından geri emilimini azaltır. Mikroperfüzyon yoluyla izole edilen tavşan böbreklerinin tübüllerine uygulanan Cd-MT'in, glikoz ve aminoasitlerin geri emilimini kadmiyum klorürden daha fazla azalttığı ve daha toksik olduğu bildirilmiştir (44).

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, akut Cd uygulamasından sonra böbrek dokusunda, membran lipitlerinin peroksidasyonu ve antioksidan enzimlerin düzeylerindeki değişikliklerle karakterize oksidatif stres oluşumu belirlenmiştir. Sıçan renal proksimal tübül hücre kültürlerine ve fare hepatoma hücre kültürlerine tek doz olarak 25–75 μM kadmiyum klorür uygulaması yapılan başka bir çalışmada, Cd'un karaciğer ve böbrek hücrelerinde ağır metal toksisitesinin endojen ve ekzojen belirteci olarak kabul edilen “endoplazmik retikulum stres-responsive alkalın fosfataz”ın düzeylerinde azalmayla endoplazmik strese neden olduğu belirtilmiştir (39, 45).



Şekil 3. Kadmiyumun beyin hücrelerindeki toksisitesi (46).

Kadmiyum beyin hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin üretimini indükler. Reaktif oksijen türlerinin üretimi, Fas reseptörlerinin ekspresyonunu artırır ve membran lipitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Mitokondri membran lipitlerinin peroksidasyonu ve kardiyolipinin hasarı sonucunda sitokrom C hücre içine salınır ve apoptotik kaskadı başlatır. Bu hasar hücreyi apoptozise ve nekrozise götüren mekanizmaların aktive edilmesini sağlar. Cd nanopartiküllerinin insan nöroblastoma kültür hücrelerine uygulanması, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve apoptozise götüren yolların aktive edilmesini sağlarken; N-asetil sistein uygulamasının antioksidan

enzimleri indükleyerek ve mitokondri hasarını hafifleterek oksidatif hasarı azalttığı bildirilmiştir (46).

Akut Cd toksisitesine en duyarlı organlardan biri de testislerdir. Cd, testislerde reaktif oksijen türlerinin üretimini artırıp, antioksidan enzim seviyelerini azaltarak oksidatif strese neden olmaktadır. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada C vitamini ve E vitamini kombinasyonlarının antioksidan savunma sistemlerini destekleyerek Cd'un neden olduğu testis hasarını azalttıkları belirtilmiştir (47).

Deneysel çalışmalara göre Cd'un 5 µmol/kg ve daha az dozları sıçan testislerinde spermatojenik hücrelerin apoptozisine neden olacak hasarı başlatmamakta, ancak 10 µmol/kg ve daha fazla düzeydeki dozlarının sıçan ve farelerin testis interstisyel hücrelerinde hemorajik nekroza yol açtığı bildirilmiştir (48).

Akut Cd maruziyeti reaktif oksijen türlerinin üretimine bağlı olarak kalpte kardiyomiyopatiye neden olmaktadır (49). Bir durum raporunda, Cd buharlarına bir gün boyunca maruziyetten sonra miyokarda enflamasyonla ilgili bir hasar tespit edildiği bildirilmiştir (50).

2. Kronik Toksikite

Kronik Cd toksisitesi, genel olarak düşük dozda ve uzun süre Cd toz ya da buharlarının solunması ya da kontamine yiyecek ve içeceklerin alınmasıyla oluşur. Oral yolla maruziyetin en şiddetli kronik etkisi, renal tübüler disfonksiyonla sonuçlanan renal toksisitedir. Cd'un renal korteksteki miktarının 200 µg/g'ı aşması durumunda kritik etkilerinin başlayabileceği bildirilmiştir. Diyetle alınan Cd ayrıca anemi, osteoporoz, osteomalazi, hipertansiyon ve Japonya'da Cd'la kontamine postmenapozal dönemdeki kadınlarda görülen "itai-itai" (ouch-ouch) olarak adlandırılan kemiklerde kendiliğinden kırılmalara neden olur. Solunum yoluyla Cd bileşiklerinin toz ve buharlarına kronik maruziyet renal ve pulmoner toksisiteyle sonuçlanmaktadır. Cd'a 20 yıl maruziyetteki eşik limit değerinin 0.02 mg/m³ olduğu bildirilmiştir (40).

Kronik Cd maruziyeti akciğerde zamanla lökositlerin aktivasyonu, enflamatuvar mediyatörlerin salınımı ve makrofajların baskılanmasıyla ödem ve anfizeme neden olur. Deneysel olarak Cd'un neden olduğu anfizemin oluşturulduğu bir çalışmada, makrofajik ve nötrofilik aktiviteyle uyumlu olan jelatinolitik aktiviteyle ilişkili MMP-9 ve MMP-

2’de artış olduğu ile düşük dozdaki uygulamada fibrozise neden olduğu bildirilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar, Cd toz ve buharlarına maruz kalan işçilerde ve kontamine bölgelerde yaşayanlarda, solunum yolu kanserlerinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Belçika’nın kuzey doğusundaki üç adet kurşun saflaştırma fabrikasına yakın bölgelerde yaşayanlar ve fabrika işçileri üzerinde yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, Cd maruziyetinin artışıyla akciğer kanseri artışının birbiriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu toplumda renal disfonksiyon, kalsiüri, osteoporoz ve toplumun % 35’inde kemik kırılmaları riski belirlenmiştir (51, 52).

Kronik Cd maruziyeti hepatotoksisiteye ve nefrotoksisiteye neden olur. Bu toksisitenin mekanizması oksidatif stres oluşumuyla açıklanmaktadır. Cd, oksijen radikalleri ve nitrik oksit radikallerinin oluşumunu artırıp ve glutasyon düzeyini azaltarak karaciğer ve böbrek korteksinde lipit peroksidasyona neden olur. N-asetilsistein gibi antioksidanların Cd’la birlikte uygulandığı deneysel çalışmalarda karaciğer ve böbrek hasarının azaltıldığı bildirilmiştir (53).

Kadmiyumun neden olduğu oksidatif hasar bazolateral Na^+K^+ -ATPaz aktivitesini azaltır. Bunun sonucunda proksimal tübüllerde D vitamini, D vitamininin aktif formu olan 1-25 (OH) D_3 ’e dönüştürülemez ya da çok az seviyede dönüştürülür. Düşük D vitamini hidrosilasyonu osteoporoz ve osteomalaziye neden olur. Bu olaya Cd’un neden olduğu Fankoni sendromu denilmektedir. Kuzeykutbu deniz ürünlerinin Cd ve selenyumla kontamine olduğu bilinmektedir. On yıldan daha uzun süreli Cd’a maruz kalan Kuzeydoğu Greenland’daki fok balıklarında yapılan epidemiyolojik bir çalışmaya göre; fok balıklarında, insan için kritik doz olarak kabul edilen 50 $\mu\text{g}/\text{gr}$ yaş doku’dan daha fazla Cd düzeyi tespit edilmiş, ancak yapılan histopatolojik analizler sonucunda nefropati ve osteodistrofi belirtilerinin olmamasının, bu balıkların yaşadığı doğal ortamda D vitamini, kalsiyum, fosfor, çinko, selenyum ve proteince zengin beslenmelerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (54).

Kontamine pirinç (Cd maruziyetinin % 50-70’inden sorumlu) ve suların tüketilmesi 1946 yılında Japonya’da “itai-itai” hastalığı adı verilen bir epidemik olaya neden olmuştur. Halkın ekonomik durumunun kötü olmasından dolayı kalsiyumca eksik ve kötü beslenme Cd’un kronik etkilerinin daha şiddetli gelişmesine yol açmış. Cd’un kemikler üzerindeki toksik etkisi, kalsiyum ve D vitamininin metabolizmasını bozması

ile renal tübüler fonksiyon bozukluğuna yol açmasıyla açıklanmaktadır. Japonya'daki bu olay postmenopozal dönemdeki kadınları erkeklerden daha fazla etkilemiş ve kendiliğinden gelişen kemik kırılmalarına neden olmuştur. Yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalara göre; Cd'un kadınlarda serum kalsiotropik hormon düzeyleri üzerindeki ters etkisi ile kalsiyum ve fosfat metabolizmasında neden olduğu hasarın erkeklerden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kadınlardaki kan Cd düzeyinin erkeklerden daha fazla olması kadınlardaki demir eksikliğinin Cd'un emilimini artırmasıyla açıklanmaktadır. Ayrıca yumurtalığı çıkarılan sıçanlarda yapılan bir çalışmaya göre Cd'un östrojen reseptörlerine bağlanıp uterus hiperplazisine neden olduğu ve androjen gibi hareket edip androjenle ilgili genlerin ekspresyonuna neden olduğu bildirilmiştir (55, 56).

Kadmiyumun beyinde oluşturduğu oksidatif hasar, ubiquitin- proteozom yolağını bozup siklooksijenaz-2'nin ve prostaglandin E2'nin nöronal düzeyini artırmasıyla enflamasyona neden olmaktadır. Bu nedenle Alzheimer, Parkinson ve Amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olabileceği düşünülmektedir (57).

Tedavisi:

Kadmiyum intoksikasyonunda klinik kullanım için onaylanmış etkin bir şelasyon tedavisi yoktur. Deneysel çalışmalarda dimerkaprolün suda çözünebilen türevleri olan mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit ve 2,3-dimerkaptopropan-1-sulfonik asidin etkili olduğu bildirilmektedir. MT-Cd kompleksini ayırmak oldukça güç olduğundan, bu konudaki araştırmalar devam etmektedir (58, 59).

Kadmiyum Karsinogenezi:

Kadmiyum insanlar için en etkin karsinogen metallerden biridir. Kronik maruziyeti akciğer, prostat, pankreas ve böbrek kanserine neden olur. Karakteristik akciğer kanserinden dolayı IARC'nin Grup 1 sınıflandırmasında yer almaktadır. IARC'nin 1993 yılındaki raporuna göre Cd, genotoksik olmayan bir karsinojendir. Bakterilerde yapılan testlerde mutajenik etkisi görülmemiş, ancak hayvanlarda in vitro yapılan testlerde çok zayıf bir mutajenite tespit edilmiştir. Cd'un insandaki biyolojik yarıömürü yaklaşık 10-30 yıl arası olduğu için, maruziyet bitse de karsinogenik etkisini gösterebilmektedir.

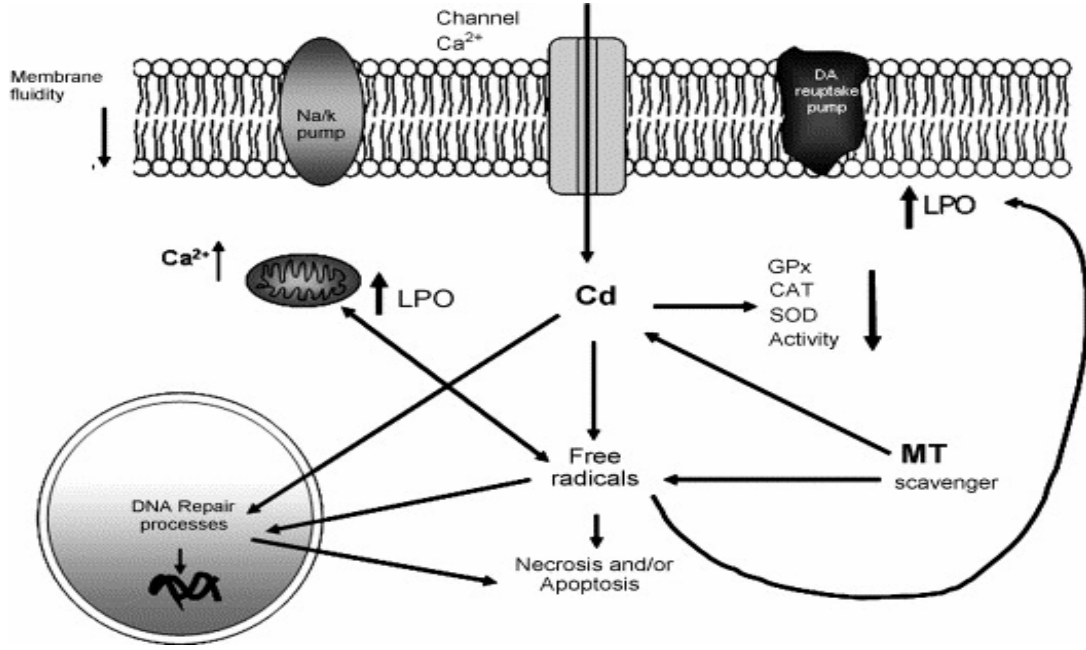
Cd'un karsinojenik etkisinin hücresel ve moleküler mekanizması;

- 1) Proto-onkogenlerin aktivasyonu
- 2) Tümör baskılayan genlerin inaktivasyonu
- 3) Hücre adezyon mekanizmasının bozulması
- 4) Apoptozisin indüksiyonu
- 5) DNA onarımının inhibisyonu
- 6) Serbest radikal üretimi ve antioksidan sistemi etkileme (60, 61)

Kadmiyum, genel olarak proto-onkogenler olarak tanımlanan AP-1 ailesinden olan c-myc ,c-fos ve c-jun; immediate early response genleri ile MT, glutatyon ve ısı-şok proteinlerini kodlayan stres yanıt genlerinin ekspresyonunu artırır; süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan genlerin ekspresyonunu baskılar. E-cadherin ve VE-cadherin'ler gibi tümör baskılayan proteinlerin hücre-hücre adezyonundaki fonksiyonlarını bozar. Kaspazları aktive ederek ya da başka bir mekanizmayla mitokondriye bağlı yolağı kullanarak apoptozisi indükler. P53 genini inaktive eder. DNA zincirinde kırılmaya neden olur ve DNA sentezini baskılar. Hücre içinde serbest radikallerin üretimini artırarak ve hücresel antioksidan sistemleri etkileyerek karsinojeneze neden olur (60, 61, 62).

Kadmiyum ve oksidatif stres:

Kadmiyumun neden olduğu serbest radikal üretimi için dolaylı bir mekanizma öne sürülmektedir. Cd, metalloenzimlerdeki çinko, kalsiyum, bakır ve demirin yerini alarak bu metallerin bağlı olmayan formlarının miktarını artırır; glutatyon gibi serbest radikal süpürücülerin tiyol gruplarına bağlanır, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimleri inhibe eder. Fenton metali olmamasına rağmen, süperoksit ve nitrik oksidinde içinde olduğu birçok serbest radikalın üretimine neden olduğu ve böylece hücre membranındaki yapıların peroksidasyonuna, DNA hasarına ve protein oksidasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Membran lipitlerinin oksidasyonu, membran yapısının polimerizasyonuna ve çapraz bağlarla bozulmasına neden olur. Mitokondri membranındaki hasar, kalsiyumun mitokondriden hücre içine salıverilmesini sağlar. Bu da DNA hasarına, apoptoza ve nekroza yol açan kaspaz-3 aktivasyonuna neden olur (27, 61, 63).



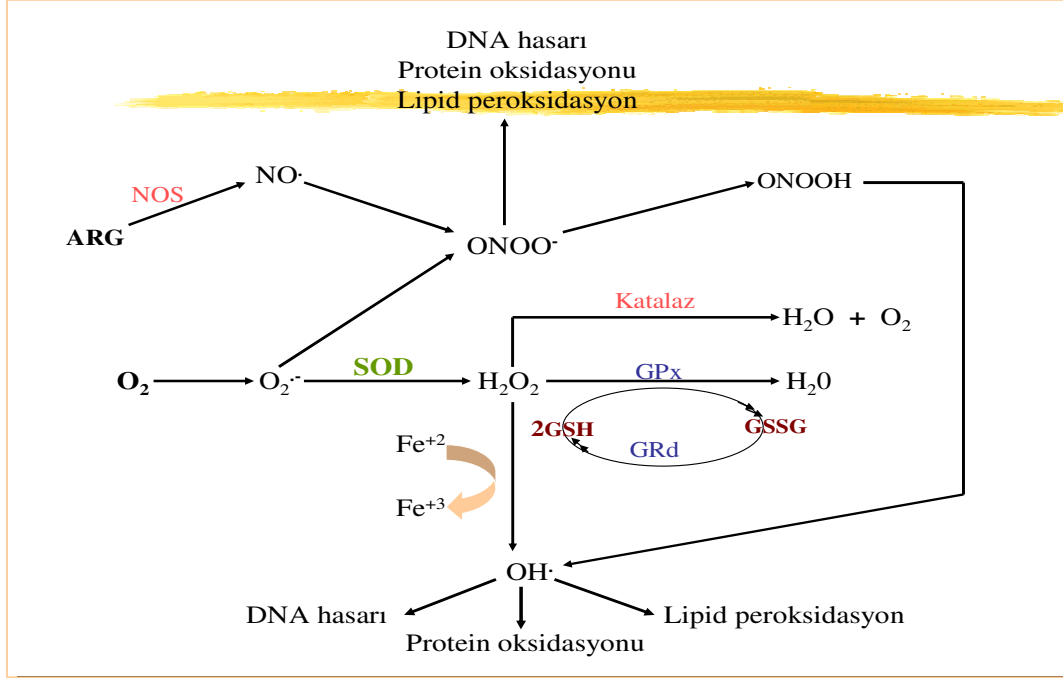
Şekil 4. Kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres tablosu (21).

2.3. OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller, bir ya da daha fazla sayıda eşleşmemiş elektrona sahip, stabil olmayan, oldukça etkin atom ya da moleküllerdir. İlk defa 1900 yılında Gomberg tarafından keşfedilmiştir. Serbest radikal üretimi, patofizyolojinin bir parçasıdır ve pek çok zenobiyotığın toksisitesi, serbest radikallerin fazla miktarda üretimi ile ilgilidir. Vücutta oksidan madde düzeylerinin artmış ve enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidan kapasitenin azalmış olması olarak tanımlanan oksidatif stres, son yirmi yıldır toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir (64).

2.3.1. Serbest Radikaller

Reaktif oksijen radikalleri ve reaktif nitrojen radikalleri normal hücrel metabolizmanın ürünleridir. Hem zararlı hem de yararlı oldukları için, biyolojik sistemde ikili rol oynadıkları düşünülmektedir. Hücrenin normal fonksiyonları için gerekli en önemli moleküller olan oksijen ve nitrojenler, endojen veya ekzojen etmenlere bağlı olarak hücreye zarar veren serbest radikallere dönüşebilirler. Bu zararlı etkilerine oksidatif stres ve nitrozatif stres denilmektedir (65).



Şekil 5. Serbest radikallerin hücresel kaynakları ve şematik olarak hasarı.

2.3.2. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller endojen ya da ekzojen etmenlere bağlı olarak üretilirler.

Reaktif oksijen radikallerinin potansiyel endojen kaynakları;

- Mitokondri, endoplazmik retikulum, sitokrom P-450, peroksisomlar, mikrozomlar ve enflamatuvar hücre aktivasyonu potansiyel kaynaklardır. Mitokondri vücuttaki süperoksit'in ($O_2^{\cdot-}$) başlıca kaynağıdır. Her bir mg protein için dakikada 2–3 nmol $O_2^{\cdot-}$ üretir, ayrıca hidrojen peroksitte (H_2O_2) üretir. Sitokrom P-450 indüklenince, özellikle $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 üretir.

- Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz ve diğer oksidan enzimler, önemli reaktif oksijen radikalleri kaynaklarıdır. Ksantin oksidaz molybdo-flavoenzyme'ler grubundan bir enzim ailesidir. Hipoksantini ksantine ve ksantini de ürik aside katalizler. Reaksiyonun ilk adımında $O_2^{\cdot-}$ ve ikinci adımında H_2O_2 oluşur.

- Makrofajlar, nötrofil ve eozinofillerde serbest radikal üretirler. Makrofajların aktivasyonu ile nitrik oksit (NO^{\cdot}), $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'inde içinde olduğu çeşitli radikaller oluşur. H_2O_2 'in % 80'inden mikrozomlar sorumludur.

- Araşidonik asit metabolizması sırasında $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşur.

- Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile salıverilen sitokinler gibi moleküllerin başlattıkları hepatotoksik olaylar sırasında da radikaller oluşur (66).

Reaktif oksijen radikallerinin potansiyel ekzojen kaynakları;

- İlaçlar: Aminotriazol, asetaminofen, bleomisin, doksorubisin, hiperbarik oksijen, klonazin, klosapin, 3,4-metilendioksümetamfetamin, nitrofurantoin, siprofloksasin, siklosporin, trisiklik antidepresanlar, troglitazon ve barbitüratlar.

- Metal iyonları: Demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa.

- Kirleticiler: Asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, nitrik oksit, nitrojen dioksit, silika, bazı solventler, toksinler, hipoklorit, kükürt dioksit, yangın, parakuat, dikuat, plumbagin, juglon.

- Radyasyon: Ultraviyole ışık, x-ray, gamma radyasyon ve ayrıca beslenme şeklinde ekzojen kaynak olarak düşünülmektedir (67).

2.3.3. Serbest Radikallerin Biyokimyası

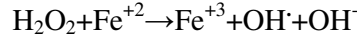
- Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) :

Hücrenin normal metabolik fonksiyonları sırasında veya patolojik bir durumda, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşur. ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$) Moleküler oksijenin metabolizmasının ilk ara ürünüdür. Vücuda alınan oksijenin % 2'si hücrelerde $O_2^{\cdot-}$ 'e dönüşür. Bütün oksidasyon reaksiyonları sırasında ve fagositik etkinlik sırasında oluşur, ancak asıl olarak mitokondrideki enerji metabolizması sırasında NADH-dehidrojenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıyla oluşur. Hidroksil radikali'ne (OH^{\cdot}) oranla daha az reaktif olmasına rağmen DNA'ya zarar verebilmektedir. NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit radikallerinin oluşmasını ve Haber-Weiss reaksiyonu aracılığı ile OH^{\cdot} 'nin oluşmasını sağlar. $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^-$ (Haber-Weiss reaksiyonu) $O_2^{\cdot-}$, Süperoksit dismutaz enzimi (SOD) tarafından H_2O_2 'e dönüştürülerek ya da hafif asidik ortamda kendiliğinden dismutasyonla da detoksifiye edilir (66, 68, 69).

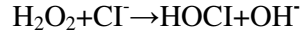
- Hidrojen peroksit (H_2O_2) :

Hidrojen peroksit, hücre içindeki birçok reaksiyon tarafından oksijen molekülünün iki elektron alarak indirgenmesiyle ya da $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu sırasında oluşur. Makrofajların aktiviteleri ve tiroit hormonunun biyosentezi gibi birçok hücre metabolik fonksiyonda rol oynayan H_2O_2 , özellikle mitokondride oksidatif elektron taşınması sırasında üretilir, ayrıca hücrelerde çok düşük miktarlarda da bulunur. H_2O_2 , radikal olmamasına rağmen okside edicidir. NO ile reaksiyona girerek OH^{\cdot} ve

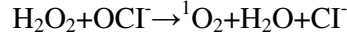
peroksinitritlerin oluşmasını sağlar. Demir, bakır gibi geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu aracılığıyla OH[•] radikalinin oluşmasını sağlar;



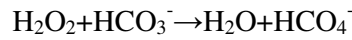
Klorit iyonlarının enzimatik (miyeloperoksidaz) oksidasyonu ile hipokloröz asit gibi radikallerin oluşmasını sağlar;



Hipokloröz asit, singlet oksijenin (¹O₂) oluşmasına neden olabilir;



Hidrojen peroksit, ayrıca hidrojen karbonat iyonunu, hidrojen peroksi karbonata da dönüştürebilir;

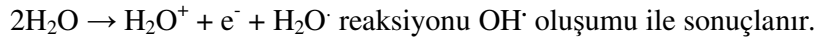


Hidrojen peroksit, Katalaz ve Peroksidazlar tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir (68, 70).

- Hidroksil radikali (OH[•]) :

Oksijen radikalleri içinde en reaktif olanıdır. Yüzden fazla şekilde DNA modifikasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. OH[•], temel olarak üç mekanizmayla üretilir:

1) Suyun dekompozisyonuna neden olan iyonlaştırıcı radyasyon



2) Alkilhidroperoksitlerin fotolitik dekompozisyonu ve

3) Fenton reaksiyonuna göre, metallerin katalizliğinde H₂O₂'in yıkımı ile oluşur (66, 68).

- Peroksil radikali (ROO[•]) :

Kısaca tanımlamak gerekirse, peroksil radikali, hidroperoksil radikalinin konjuge asidi yani dioksil radikali'dir. Lipit peroksidasyonunu başlatır, proteinlerde modifikasyonlara neden olur. O₂⁻ ile birlikte sinerjistik etki oluşturarak DNA'da hasara neden olur (64, 66, 77).

- Nitrik oksit (NO) :

Nitrik oksit, organizmada yaygın olarak bulunan ve birçok hücre ile dokuda doğal olarak sentezlenen, ömrü saniyelerle ifade edilen, eşleşmemiş bir elektronu

bulunan serbest radikal gazdır. Özellikle vasküler endotelial hücrelerde Nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla üretilir. Nitrik oksit sentaz enziminin nöronal, endotelial ve indüklenbilir olmak üzere bilinen üç tane izoformu vardır. NO, oksidatif stres altında apoptozisi, sitotoksiteyi, mutajenezisi ve DNA hasarını artırır, ayrıca lipit oksidasyonuna neden olur. NO, O_2^- ile reaksiyona girerek peroksinitriti ($NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$) ve peroksinitrit üzerinden OH^\cdot ve nitrojendioksit radikallerini oluşturur. $ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH$ ve $ONOOH \rightarrow NO_2 + OH^\cdot$ Oluşan peroksinitrit hücrede nükleer bir enzim olan poli(ADP-riboz) sentazı (PARS) aktive ederek ATP tüketimine ve hücrenin ölümüne neden olabilir. NO'nin fizyolojik etkilerinin çoğu, bazı geçiş metal iyonlarına kolaylıkla bağlanmasından dolayıdır. Eğer hücrelerin nitrozatif strese verdiği yanıtlar, oksidatif strese verdiği yanıtlara benzerse NO proteinlerle reaksiyona girerek protein-S-nitrozotiyolleri oluşturur (70, 71).

2.3.4. Serbest Radikallerin Hücresel Hasarı

1. Nükleik asitler üzerine etkileri :

Reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimi DNA molekülünün tüm bileşenleri üzerinde modifikasyonlara neden olur. OH^\cdot , hem purin hem de pirimidin bazlarında hasar oluşturur ve deoksiriboz halkasında yarımla ve zincir kırılmalarına neden olur. Genetik materyallerin sürekli modifiye edilmesi karsinogenezis, yaşlanma ve mutajenezisin ilk adımını oluşturur (65, 72).

2. Proteinler üzerine etkileri :

Protein oksidasyonu, proteinlerin OH^\cdot ve diğer radikallerle kovalent değişikliklere uğraması sonucunda meydana gelir. Pek çok sayıda mekanizmanın protein oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen radikalleri protein içi ve proteinler arası çapraz bağlar oluşturarak oksidasyona neden olurlar. Bunlar kısaca; ditirozin oluşumu, sülfidril gruplarının oksidasyonu ile disistein çapraz bağının oluşumu, radikal aracılığıyla proteinden hidrojenin çıkarılması sonucu oluşan karbon merkezli protein radikallerinin etkileşimi ve okside proteinin karbonil grubuna lizinin amino grubunun eklenmesi şeklinde düşünülmektedir. Geçiş metalleri, hem serbest aminoasitlerin hem de proteindeki aminoasit dizilerinin oksidatif modifikasyonlarını artırarak protein oksidasyonuna neden olur. Peroksinitrit radikali de proteinlerin oksidasyonuna neden olur. Proteinlerin ve enzimlerin oksidasyonunun, yaşlanma,

iskemi-reperfüzyon hasarı, Alzheimer hastalığı, Parkinson, ateroskleroz, karaciğer sirozu, kanser ve diğer patolojik durumlarla yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir (66, 72).

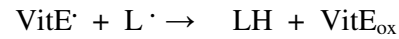
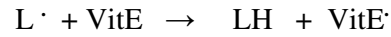
3. Lipitler üzerine etkileri :

Doymamış çoklu yağ asitlerinin yan zinciri ya da metilen karbonu üzerinden radikal aracılığıyla bir hidrojen atomunun çıkarılması lipit peroksidasyonu, olarak tanımlanmaktadır. Lipit peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonu üç aşamada gerçekleşir (66).

a- Başlangıç aşamasında, hidroksil radikali, doymamış yağ asidinden bir hidrojen çıkararak lipit peroksidasyonu başlatır. $\text{OH}^\cdot + \text{LH (lipit)} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{L}^\cdot$ (lipit radikali)

b- İlerleme aşamasında, lipit radikali oksijen molekülüyle hızlıca reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini oluşturur. $\text{L}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LO}_2^\cdot$ Oluşan peroksil radikali diğer lipit moleküllerine saldırır ve onların hidrojen atomunu çıkartarak, lipit hidroperoksitleri oluştururken aynı zamanda birbiri ardına ikincil oksidasyonları oksijenle birleşerek devam ettirecek lipit radikali de oluşur. $\text{LO}_2^\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}^\cdot$

c- Reaksiyon, lipit peroksil radikalinin antioksidanlar tarafından temizlenmesiyle ya da iki lipit peroksil radikalinin kombinasyonu ile keton ve alkol gibi radikal olmayan ürünlere dönüşmesiyle sonlanır. $2 \text{LO}_2^\cdot \rightarrow \text{keton} + \text{alkol} + \text{O}_2$ veya;



Lipitler siklooksijenazlar ve lipoksijenazlar tarafından da okside edilir. Son zamanlardaki çalışmalar, lipoksijenazın lipoproteinleri, biyomembranlardaki fosfolipit ve kolesterol esterlerini spesifik olarak okside edebildiğini göstermiştir. 15-lipoksijenazların, ateroskleroze ilk safhasındaki lipit peroksidasyona katkıda bulunduğu da düşünülmektedir. Lipit peroksidasyonu, membran yapısının bozulması ve iyon geçirgenliğinin artmasıyla birlikte membran akışkanlığının kaybında artışa neden olur. Bu olaylar hücrenin ölümüyle sonuçlanır.

Hücrede oluşan oksidatif ve nitrozatif hasar, daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olarak çeşitli patolojik durumlara yol açar. Bunlar; kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörolojik hastalıklar,

diyabet, iskemi-reperfüzyon, yaşlanma, otoimmün hastalıklar, enfeksiyonlar, allerji, oftalmik patolojiler ve solunum yolu hastalıklarıdır (65).

2.3.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücrelerdeki okside olabilecek maddelerin oksidasyonlarını çok düşük miktarda buldukları durumda dahi geciktiren ya da önleyen maddeler, antioksidanlar olarak tanımlanır. Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak iki gruba ayrılır (73).

1- Enzimatik Savunma Sistemleri

- Süperoksit dismutaz (SOD) :

SOD, O_2^- radikaline karşı koruyucu olan enzimlerin en önemlisidir. SOD enzim ailesi, O_2^- 'in fazlasını detoksifiye etmek için kullandığı kofaktörlerine göre adlandırılır. Ör. Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, Ni-SOD ve Mn-SOD gibi. O_2^- 'i hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu: $2 O_2^- + 2H^+ \rightarrow (SOD) \rightarrow H_2O_2 + O_2$ Metal içerdiği için metalloenzim olarak tanımlanır. Cu/Zn-SOD dimerik yapıdadır ve sitozolde bulunur, iki alt ünitesine Cu ve Zn bağlanır. Mn-SOD, ilk defa Fridovich tarafından bulunmuştur. Daha çok mitokondride bulunur ve tetramerik yapıdadır. Hücre dışı SOD , damar düz kas hücrelerinde üretilir ve hücre dışına salınır (64, 74).

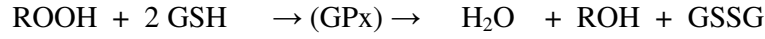
- Katalaz (CAT) :

Katalaz; bitkilerde, hayvanlarda ve aerobik bakterilerde bulunan bir enzimdir. Hücrede daha çok peroksizomlarda bulunur. H_2O_2 'in su ve moleküler oksijene yıkılmasını katalizler ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). CAT tüm enzimler içinde, en büyük reaksiyon hızına sahip olanıdır. Bir molekül CAT bir dakikada 6 milyon hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürebilir. Karaciğer ve eritrositlerde yüksek aktiviteye sahiptir (65, 75).

- Glutasyon peroksidaz (GPx) :

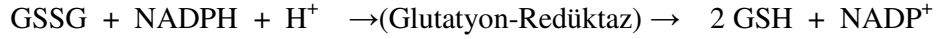
Glutasyon peroksidaz, selenyum bağımlı bir metalloenzimdir veya seleno-proteindir. Ekstrasellüler formu bir glikoprotein olan GPx'in intrasellüler ve mitokondriyel formlarının da farklı antijenik yapıda olduğu düşünülmektedir. Enzimin substratı indirgenmiş glutatyonudur ve bu yüzden enzim dolaylı olarak bir flavoprotein olan glutasyon redüktaza ve hücresele NADPH konsantrasyonlarına bağlıdır. GPx, spesifik olmayan substratları olan H_2O_2 , lipit ve lipit bulundurmeyen hidroperoksitleri indirgemek için spesifik bir hidrojen donörü olan glutatyonu kullanır. GPx, translasyonu

sırasında polipeptid zinciriyle birleşen aktif merkezinde selenosistein bulundurulur. Selenyum eksikliği enzim yetersizliğine neden olur. Hidrojen peroksidin yüksek konsantrasyonlarının ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinde etkilidir. Karaciğerde yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kasta düşük aktivitededir (75).



-Glutasyon redüktaz :

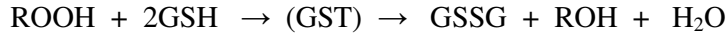
Glutasyon redüktaz, GPx tarafından yükseltgenen okside glutasyonu (GSSG) NADPH koenziminin katalizörlüğünde redükte form olan GSH'a dönüştürür. GPx ile beraber glutasyon redoks döngüsünde hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasını sağlar (77).



NADPH'1, eritrosit içindeki heksoz monofosfat yolu ve bu yolun anahtarı olan Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi sağlar.

-Glutasyon-S-transferaz :

Glutasyon-S-transferaz, organizmaya giren zenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynayan dimerik bir proteindir. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı selenyumdan bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterir (76,77).



2. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemleri

-Glutasyon :

Hücre içi tiyol antioksidanların en önemlisi olan glutasyon; glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden sentezlenen bir tripeptittir. Hücre içinde yoğunluklu olarak sitozolde, mitokondride ve çekirdekte bulunur. Glutasyonun indirgenmiş formu redükte glutatyondur ve GSH şeklinde ifade edilir. Yükseltgenmiş yani oksitlenmiş formu da glutasyon disülfittir ve GSSG şeklinde ifade edilir. Glutasyon, oksidatif hasar durumunda DNA onarımı ve ekspresyonu için gerekli protein sülfidrilleri ile diğer proteinlerin sülfidrillerini redükte formda tutarak redoks dengesini sağlar. OH[•] radikalini ve singlet oksijeni doğrudan süpürür. GPx'ın katalitik etkisiyle lipid peroksitleri ve hidrojen peroksitleri detoksifiye eder. Diazottrioksit ve peroksinitriti detoksifiye eder.

Antioksidan etkili vitaminlerin yenilenmesini sağlar. Glutatyonun radikalleri detoksifiye etmesi reaksiyonu: $GSH + R \rightarrow GS^{\cdot} + RH$ Reaksiyonu ile oluşan til radikali okside glutatyonu oluşturmak için dimerize olabilir. $GS^{\cdot} + GS^{\cdot} \rightarrow GSSG$ Oluşan okside glutatyon hücre içinde birikir. GSH/GSSG oranı denge durumunu kaybedecek kadar değişirse protein-glutatyon karma disülfidlerini oluşturur. $GSSG + \text{protein-SH} \rightarrow \text{protein-SSG} + GSH$ Oluşan bu karma disülfidler, protein katmanları daha fazla olduğu için okside glutatyondan daha uzun ömürlüdür (66).

Glutatyon dışında farklı mekanizmalarla oksidatif hasarı engelleyen veya azaltan diğer maddeler; MT'ler, C vitamini, E vitamini, A vitamini, melatonin, ürik asit, selenyum, albümin, sistein, bilirubin, seruloplazmin, ferritin, transferrin, laktoferrin, haptoglobülin, hemopeksin, mannitol, oksipurinol, probukol, deferoksamin, lipoik asit, flavonoidler, fitoaleksinler ve araştırma aşamasında olan birçok madde vardır (77).

“IN VINO VERITAS”

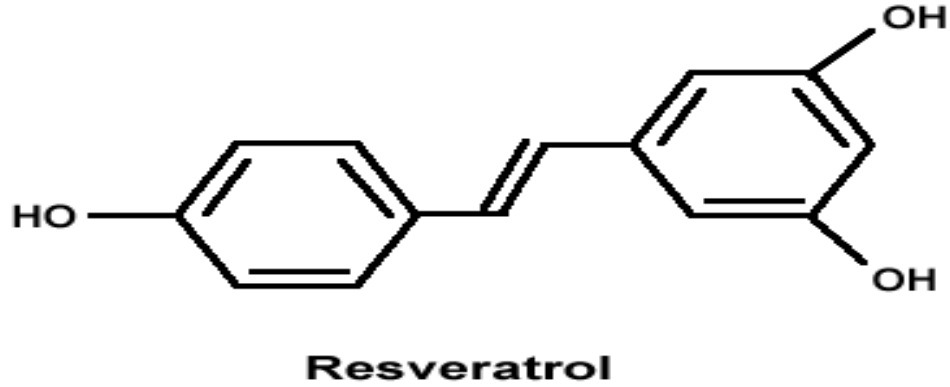
Hem şarap hem gerçeğin özü...

Kehribar taneli asma güzeli...

Yani, ÜZÜM...

2.4. RESVERATROL

Resveratrol (RES), travmatik zedelenme, *uv* ışığına maruziyet ya da fungal enfeksiyona (*Botrytis cinerea*) karşı cevap olarak bazı bitkiler tarafından sentezlenen non-flavonoid yapıda polifenolik bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler patojenik mikroorganizmalara karşı bitkiler tarafından korunma amaçlı sentezlenen kimyasal maddelerdir, bitkisel antibiyotikler de denilebilir. RES, stilben fitoaleksinlerin en aktif bileşiğidir. Cis ve trans stereoisomerleri şeklinde bulunur. Bitkilerde daha çok trans izomerinin bulunması nedeniyle bütün araştırmalar genel olarak trans izomeri üzerinden yapılmıştır (15, 78).



Şekil 6. Resveratrol (82).

3,5,4¹ trihidroksistilben olarak adlandırılan RES'ün; molekül formülü: C₁₄H₁₂O₃ ve molekül ağırlığı: 228,25 daltondur. Bitkilerde polifenoller, RES de dahil genelde glikozit yapısındadır. Bu nedenle RES, 3-O-β-D-glikozit "piceid" olarak bilinir ve cis, trans izomerlerin adları sırasıyla cis-piceid ve trans-piceid'dir. Bunun yanında doğal analogları ve konjüгатları da vardır (79).

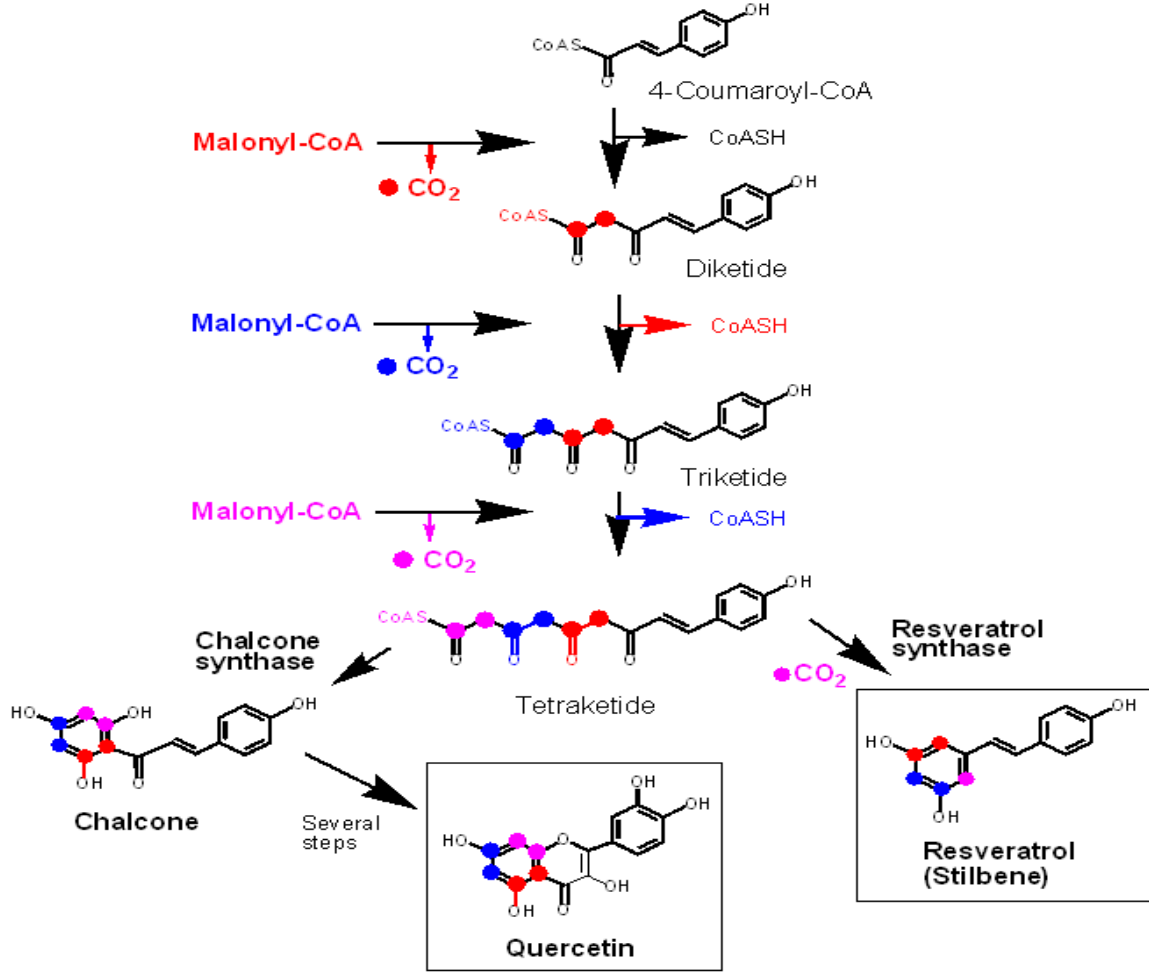
Resveratrol, kırmızı duttan sarıçama kadar birçok bitkide bulunur. Bunlar; *Vitis vinifera* (asma), *Polygonum cuspidatum* (sivri uçlu çoban değneyi), *Bauhinea* türleri, *Ladin* türleri, *Pinus sylvestris* (sarıçam), *Veratrum grandiflorum* (çöpleme), Ökalyptus, *Pistacia vera* (Antep fıstığı), *Arachis hypogea* (yer fıstığı), *Morus rubra* (kırmızı dut), *Artocarpus* (ekmek ağacı) türleri, *Vaccinum* türleri, *Rheum rhaponticum* (Işgın), *Veratrum* türleri, *Cassia* türleri, *Gnetum montanum*'dur. Ancak en çok üzüm kabuğunda (50-100 µg/g) ve yer fıstığında (0.02-1.79 µg/g) bulunur. Kırmızı şaraptaki RES miktarı yaklaşık 1-10 mg/l'tir. Beyaz şarap genel olarak kırmızı şarapta bulunan RES'ün % 1-5'i kadar RES içerir (78, 80, 81).

2.4.1. Resveratrolün Farmakolojisi

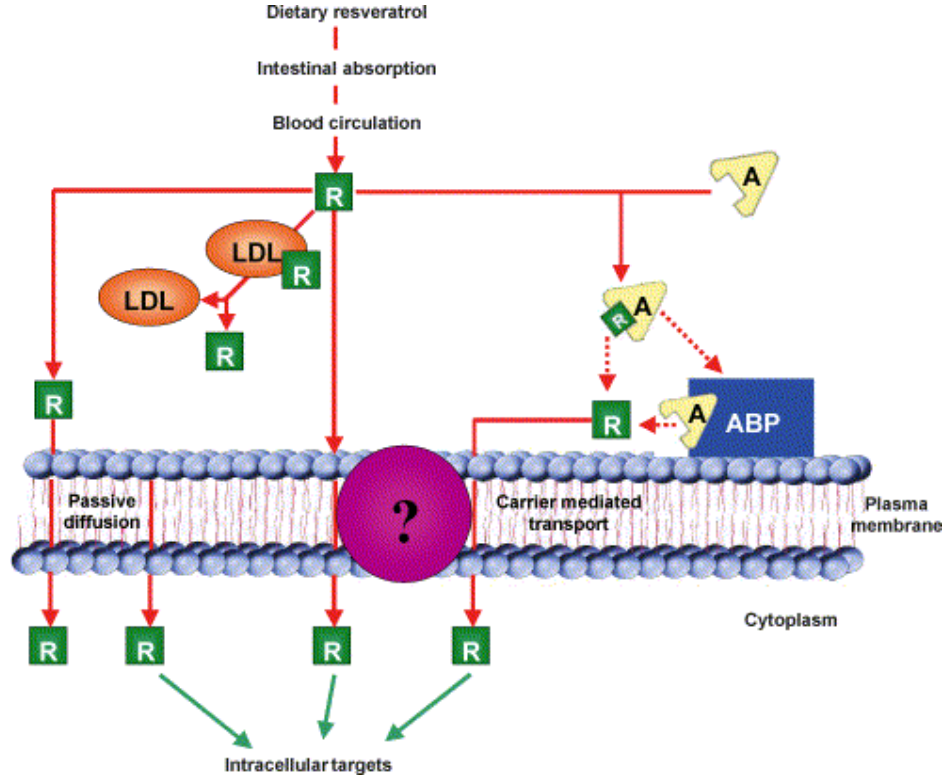
- Biyosentezi :

Resveratrol kısaca; stres, travma, enfeksiyon ya da *uv* ışığı maruziyetinde 4-kumarol koenzim A (4-kumarol-CoA) ve malonil koenzim A (malonil-CoA)'dan sentezlenir, yani sentezi yapısal değil indüklenbilirdir. 4-kumarol-CoA ve malonil-CoA bütün bitkilerde bulunan enzimlerdir. 3 molekül malonil-CoA ve 1 molekül 4-kumarol-

CoA tetraketid yapısını oluşturur. Bu aşamaya kadar sentez basamakları aynı iken bundan sonra ki basamakta oluşan ürünün RES mi yoksa flavonoit mi olduğu uzun yıllar sır olarak kalmış. Daha sonra ise ortamda Resveratrol sentaz varsa ürünün RES ve kalkon sentaz varsa ürünün flavonoit olduğu anlaşılmıştır. Şekil 7'deki renklendirme final üründeki karbonların nerden geldiğini göstermektedir (80, 83).



Resveratrol esas olarak albumine bağlanarak kanda taşınır. Lipoproteinlere de bağlandığı bildirilmiştir. Hepatoblastoma hücreleri üzerinde resveratrolün kinetik karakteriyle ilgili yapılan çalışmaya göre; RES hücre içine asıl olarak taşıyıcı aracılı geçiş ve pasif difüzyonla alınmaktadır. RES albumine bağlanıp kompleks oluşturduktan sonra, albumin membran reseptörlerince bu kompleksin tutulduğu ve daha sonra da bu reseptörler tarafından serbest RES'ün hücre membranına doğru salıverildiği düşünülmektedir. Ancak bu aşamadan sonra geçişle ilgili bir bilgi bulunmamaktadır (84).



Şekil 8. Resveratrolün kanda taşınması ve hücre içine geçiş hipotezi (84).

- Resveratrolün biyotransformasyonu :

Resveratrolün değişik doz ve uygulama süreleriyle yapılan biyoyararlanım çalışmalarına göre; RES oral yolla alındıktan sonra hızla bağırsaklardan emilir ve bir saat gibi kısa sürede kana geçer ve karaciğer, böbrek, kalp ve beyin başta olmak üzere çeşitli organlara dağılır. Oral yolla 25 mg verildiğinde en az % 70'inin emildiği bildirilmiştir. Saf RES ile doğal kırmızı şarap içimiyle alınan RES emiliminin karşılaştırıldığı çalışmalarda RES'in alkoldeki formunun daha fazla emildiği bildirilmiştir. Üzüm suyunun içilmesiyle emilen RES miktarı, saf RES emiliminden daha düşüktür. RES üzüm suyu içinde glikozit formundadır ve bu formunun RES emilimini güçleştirdiği düşünülmektedir. Biyotransformasyonu asıl olarak karaciğer mikrozomlarında ve az miktarda da bağırsaklarda olur. RES, Faz-I reaksiyonları; aril hidroksilazlarla ve sitokrom P-450 enzim sisteminde kapsayan enzimlerle oksidoreduksiyon reaksiyonlarına uğrar. Oluşan reaktif gruplar Faz-II reaksiyonları ile glukuronit ve sülfat konjugatları şeklinde idrarla atılır. Sıçanlara 20 mg/kg dozda RES verildikten 12-24 saat sonra, toplanan idrar örneğinde HPLC ve LC-MS-MS analizleri ile resveratrol metabolitlerine bakılmış ve elde edilen bulgulara göre resveratrolün ana

metabolitlerinin: RES-monoglükuronit, RES-monosülfat, dihidro-RES ve dihidro-RES monosülfat olduğu tespit edilmiştir (85, 86, 87).

2.4.2. Resveratrolün Biyolojik Aktiviteleri

Bilimde keşifler bazen beklenmedik raslantılarla ortaya çıkar. İlk olarak 1976 yılında, Langcake ve Pryce trans-RES'ün (*Vitis vinifera*) asma bitkisinde bulunduğunu tespit etmişler. Ancak RES, “**Fransız Paradoksu**”nun fark edilmesi ve 1992’de Siemann ve Creasy tarafından şarabın içindeki etkin madde olarak trans-RES'ün belirlenmesiyle bilim dünyasına girmiştir (78, 80, 88).

Fransız paradoksu:

Doymuş yağ oranı yüksek besinlerin alınması ile yüksek miktarda alkol ve şarap kültürüne karşı kardiyovasküler sistemle ilgili hastalıkların ve mortalitenin düşük seviyede olmasıyla tanımlanan fransız paradoksu, 40 yıldan daha fazla zaman öncesinde İngiliz bilim adamlarının, milli istatistiklerin kabaca karşılaştırılmasıyla Fransız toplumunun kardiyovasküler hastalıklara karşı korunuyor olabileceğini iddia etmeleriyle ortaya çıkmıştır. Son dönemlerde kronik kalp hastalıkları insidansının araştırıldığı diğer çalışmalarda Fransız toplumunda, diğer ülkelere (Amerika ve Avrupa) göre kronik kalp hastalıklarının daha az olduğu ve daha uzun yaşam süresine sahip olmaları kültürel kaynaklı farklılıklara ve özellikle şarap tüketiminin Fransa’da daha fazla olmasına bağlanmıştır. Etanolün serbest oksijen radikallerin üretimini (özellikle hidroksil radikali) ve lipid peroksidasyonu artırarak, beyinde dahil olmak üzere birçok organda oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar şarap içindeki polifenollerin, kronik etanol tüketiminden kaynaklanan nöronal hasarı düzelttiğini göstermiştir. Erkek sıçanlara % 5’lik etanol ve üzümde elde edilen polifenol ekstresinin verilmesi sonucunda , polifenol karışımının etanolün neden olduğu oksidatif hasarı ve daha da önemlisi reaktif oksijen üretimiyle ilişkili merkezi sinir sistemindeki oksidatif hasarı ve yaşa bağlı nöronal hasarı düzelttiği bildirilmiştir (89, 90).

1. Antioksidan aktivite :

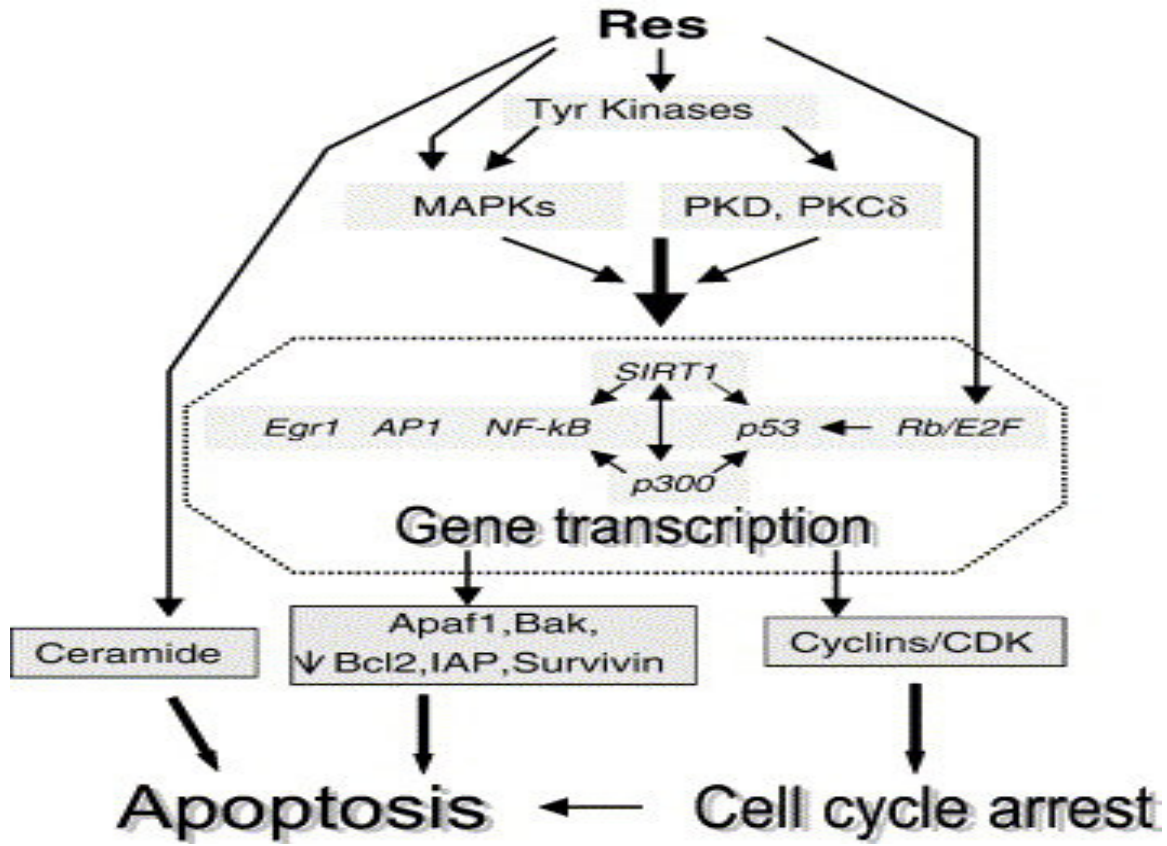
Resveratrol, güçlü bir antioksidandır. En çok bilinen antioksidanlar olan E vitamini ve C vitamininden daha etkilidir. RES; OH[•] ve O₂⁻ radikallerini süpürür, OH[•] radikalının neden olduğu lipid peroksidasyonu inhibe eder, OH[•] ile H₂O₂'in neden olduğu DNA hasarını önler. Protein oksidasyonunu engeller. Serum antioksidan kapasitesini

artırır. Krom maruziyetiyle oluşan NF-κB aktivasyonunu engellediği bildirilmiştir (8, 91). RES, düşük dansiteli lipoproteinlere bağlanarak lipoprotein peroksidasyonunu inhibe eder ve bakır kataliz oksidasyonu sırasında gecikme zamanını uzatır. Lipoprotein sınıflarına ayrılmış plazmaya eklendikten sonra lipit oranı fazla olan (HDL < LDL < VLDL) VLDL'ye daha çok bağlandığı tespit edilmiştir (95). Bu nedenle RES'in lipofilik karakterde olduğu düşünülmektedir. RES'ün serbest radikal süpürücüsü ve enzim düzenleyici özelliklerinden dolayı oksidatif stresin neden olduğu çeşitli böbrek hasarlarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (96). Ayrıca etanolün beyin, karaciğer, kalp ve testisler gibi çeşitli organlarda neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu tespit edilmiştir (97) Nöronal oksidatif stres ve nitrozatif stres ile nöroblastoma hücrelerindeki mitokondriyel hasara karşı koruyucudur (92). Hücrenin yaşam süresi ve canlılığını artıran Sirtuin 1 adlı geni aktive ettiği için yaşam süresini artırdığı (bira mayasında %70) ve nörolojik hastalıklar olan Alzheimer ve Parkinson'da koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir (93). RES'ün Sirtuinleri taklit ederek hücrelerin canlılık süresini uzattığı son dönemlerde birçok araştırmacı tarafından incelenmektedir. Dr. Sinclair ve arkadaşları tarafından farelerle yapılan bir çalışmada (94) RES'ün insan ömrünü 10 yıl kadar uzatabileceği tespit edilmiş ve bu bilgiler Nature Dergisinde dönüm noktası olarak ifade edilmiştir.

2. Antikanser aktivite :

Hücre döngüsü, siklin bağımlı kinazların (hücre döngüsü içindeki fazları düzenleyen enzimler, Cdks) ve siklin (hücre bölünmesini düzenleyen proteinlerin hepsine verilen ad)'lerin aktivasyonu ve sonrada inaktivasyonunu içeren ard arda gelen olaylarla düzenlenir. Hücrede herhangi bir hasar meydana geldiğinde eğer hücre apoptozise giremiyorsa mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler yani kanser oluşumu başlar.

Resveratrol; hücreyi apoptozise götüren p53, p21 ve hücre döngüsünü durduran retinoblastoma gen ürününü (pRb) aktive eder. Siklin bağımlı kinazların inhibisyonuna neden olur. Antitümör etkili olan p300'ü modüle eder. Proliferasyonda ve tümör büyümesinde etkin bir transkripsiyon faktörü olan AP1, tümör oluşumuna neden olan NF-κB ve Egr1 aktivasyonunu inhibe eder. Apoptozisi engelleyen Bcl2 ve inhibitör apoptozis ailesinin düzeyini azaltırken; Apaf1 ve Bak gibi apoptozise götüren yolları ve seramidi aktive eder.



Şekil 9. Resveratrolün hücre döngüsü üzerine etkisi (98).

Resveratrolün antikanser ve kemoprotektif etkisiyle ilgili çok sayıda mekanizma bildirilmiştir. Literatürlere göre bunlar :

- ✚ Agonist ve antagonist aktiviteli bir fitoöstrojen
- ✚ Faz I ve Faz II enzimlerinin modülasyonu
- ✚ Nitrik oksit sentazın modülasyonu
- ✚ Kanser hücrelerinde büyümeyi durdurma ve apoptozisi indükleme
- ✚ Siklooksijenazın modülasyonu (9, 79, 98, 99).

Resveratrolle yapılan hayvan deneylerine göre; RES, melanom olmayan deri kanseri, melanom, göğüs kanseri, gastrik ve kolorektal kanser, akciğer kanseri, özefagus tümörleri, prostat kanseri, hepatoma, nöroblastoma, fibröz karsinom, pankreas kanseri ve lösemiye karşı koruyucudur (100).

3. Östrojenik aktivite :

Resveratrol; östrojenin neden olduğu hücre proliferasyonu, tümör oluşumu ve gelişmesini engelleyerek antiöstrojenik etki ile sentetik bir östrojen olan

dietilstilbestrol'e (4,4'-dihydroxy-*trans*-diethylstilbene) kimyasal yapısının benzerliğiyle östrojen reseptörlerine kolay bağlanmasından dolayı östrojenik etkiye sahiptir. RES'ün östrojen reseptörleri olan ER-alfa ve ER-beta ile farklı bir şekilde etkileştiği ve ER-alfa ile olası bir antagonizma durumu olduğu düşünülmektedir. Moleküler düzeyde dinamik çalışmalara göre ER-alfa'ya steroseçici bir biçimde bağlanmaktadır. Cis izomeri trans izomerine göre reseptörlere daha zayıf bağlanmaktadır (10, 101).

Kanser hücrelerinin invazyonu hücre göçüne bağlıdır. ER-alfa(-) ve ER-beta(+) MDA-MB-231 (insan metastatik meme kanseri hücreleri) hücrelerinin göçü üzerine 50µM resveratrolün etkisi 0.1µM östradiol (E2) ve 50 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF) ile karşılaştırıldığında; östradiol ve epidermal büyüme faktörünün hücre göçünü artırdığı ancak resveratrolün hücre göçünü anlamlı oranda inhibe ettiği ve hatta E2 ve EGF varlığında da etkili olduğu bildirilmiştir (102).

4. Antiplatelet aktivite :

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalara göre; RES, Siklooksijenaz (COX) yolağını güçlü bir şekilde inhibe ederek, tromboksanA₂'nin sentezini engeller. Trombosit aracılı ve adozin difosfat (ADP) aracılı platelet agregasyonunu inhibe eder. Trombosit agregasyonunda rolü olduğu düşünülen lipooksijenaz ürünlerini inhibe ederek ve platelet agregasyonunu inhibe etme fonksiyonu olan NO salınımını artırarak antiplatelet aktiviteye neden olduğu düşünülmektedir (11, 103, 104).

5. İskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu etki :

İskemi - reperfüzyon sırasında aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri oluşarak, oksidatif strese neden olmaktadır. RES'ün, oksidatif stresi önleyerek iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu etki yaratabileceği ve hatta iskemiden önce resveratrol uygulanması ile bu etkinin daha da belirginleşeceği düşünülerek yapılan bir çalışmada; 30 dakikalık spinal kort iskemisine maruziyetten 50 dakika önce 100 µg/kg dozda *i.v.* olarak uygulanan RES'den sonra tavşanlardan elde edilen biyokimyasal parametrelere göre; RES ön tedavisinin, reperfüzyondan 24 saat sonra lumbar spinal korttaki malondialdehit seviyesini kontrole göre anlamlı seviyede azalttığı ve cerrahi işleminden 24 saat sonra spinal kort nötrofil akümülyasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (13, 105).

6. Vazorelaksan aktivite :

Nitrik oksit, çeşitli uyaranlarla damarda veya nitrejik nöronlarda Nitrik oksit sentaz aracılığıyla L-argininden sentezlendiğinde hedef hücrelerde çözünür ve siklik GMP'yi aktive ederek düz kas gevşemesine neden olur. Noradrenalinle kastırılan izole sıçan aortası endotelinde, RES'ün doza bağımlı bir şekilde gevşemeye neden olduğu ve ayrıca $> 6 \times 10^{-5}$ M gibi yüksek konsantrasyonlarda, endotel tabakası soyulmuş aorta halkasında da gevşemeye neden olduğu ile bu etkinin NO inhibitörleriyle dahi engellenemediği bildirilmiştir. Kısaca RES, NO aracılı olan ve olmayan mekanizmayla kasılmayı engellemektedir (12, 106).

7. Antienflamatuvar aktivite :

Resveratrol, siklooksijenazları seçici olmayan bir biçimde inhibe edebilmektedir. Yapılan bir çalışmada; *in vitro* ortamda RES analogları sentezlenmiş ve bunların Siklooksijenaz-2 üzerine olan etkileri, seçici bir Siklooksijenaz-2 inhibitörü olan "selekoksib"le karşılaştırıldığında; RES'ün hidroksil analoglarının selekoksibden daha etkili olduğu ve IC₅₀ değerininse selekoksibden daha düşük olduğu gösterilmiştir (14, 107).

8. Hepatoprotektif aktivite :

Karaciğer stellat hücrelerinin aktivasyonunu engelleyen bir bileşiğin fibrojenezide engelleyebileceği düşüncesiyle; RES'ün stellat hücre proliferasyonu üzerine olan etkisi araştırılmış. Sonuç olarak RES'ün, sinyal ileti yolağını ve hücre protein döngüsü ekspresyonunu inhibe ederek, stellat hücrelerinin aktivasyonunu engellediği bildirilmiştir (15).

9. Antimikrobiyal aktivite :

Resveratrolün; *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dermatofitler, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis*'e karşı antimikrobiyal etkili olduğu bildirilmiştir (16, 108-110).

10. *Helicobacter pylori* üzerine etki :

Helicobacter pylori, midede kronik enflamasyona ve onunda sonucu olan artan oksijen radikalleriyle DNA hasarına neden olur. Oksidatif hasarla, gastrik epitelyal hücre döğüsünün değışmesine ve hücre ölümüne neden olur. RES, *Helicobacter pylori* bakterilerini seçici biçimde inhibe eder. Midede ülser, gastrit ve kanser gelişimine, sitotoksin ilişkili gen A (CagA+) suşunun neden olduğı düşünölmektedir. RES'le yapılan bir çalışmaya göre; RES'ün *in vitro* ortamda *Helicobacter pylori*'nin CagA+ toksininin gelişimi ve büyümesini inhibe ettiğı tespit edilmiştir (17, 111).

11. *Herpes Simpleks Virus* üzerine etki :

Herpes Sympleks Hominis tip1 ve tip2 olmak üzere iki tip olan *Herpes Simpleks Virus* (HSV), mukozal, epidermal ve dermal temas yoluyla bulaşır. Primer genital herpes enfeksiyonlarının % 70-75'inden tip2 ve % 25-30'undan tip1 sorumludur. Nükslerin % 60-88'inden tip2 sorumlu iken, % 14-25'inden tip1 sorumludur.

HSV-2 ile enfekte edilmiş fare vajinasına, enfeksiyondan bir saat sonra RES'ün polietilenglikolde hazırlanmış %19'luk topikal preparatı günde beş kez süröldüğünde HSV-2 replikasyonunu on günde inhibe ettiğı ve 7. günde asiklovirle hemen hemen aynı etkinliğe ulaştığı tespit edilmiştir. Aynı uygulama şekliyle, HSV-1 ile enfekte edilmiş fare vajinasındaki enfeksiyonda inhibe edebildiğı ve ekstrasvajinal lezyonları da azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca asiklovir grubunda ve plasebo grubunda ölümler gerçekleşirken, RES grubundaki farelerde ölümlerin gerçekleşmediğı bildirilmiştir (18, 112).

Toksosite :

Şu ana kadar insanlarda, RES alımıyla ilgili ve RES- ilaç etkileşmeleri ile ilgili herhangi bir ters etki bildirilmemiştir. Günlük 5-10 mg dozunun tamamen güvenli olduğı bildirilmektedir. Sıçanlara günlük 300, 1000 ve 3000 mg/kg dozda 28 gün oral yolla verildiğinde; nefrotoksosite, dehidrasyon, solunum güçlüğü, duruş bozukluğu (kamburlaşma), aktivite kaybı, diyare, burunda kırmızı renkte lezyonlar; erkek sıçanlarda lökositöz ve her iki cinste anemi oluştuğı tespit edilmiştir. 300 mg/kg dozda, herhangi bir ters etki görülmemiştir (113). Kronik maruziyetle ilgili herhangi bir literatür veya vaka bildirilmemiştir.

3. MATERYAL – YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Kadmiyum klorür (%98) MERCK
- Resveratrol M.P. Biomedicals
- % 9'lük İzotonik sodyum klorür solüsyonu İ.E. ULAGAY
- Tiyobarbitürik asit (%99) MERCK
- Sakaroz RİEDEL-DE HAEN
- Sodyum dodesil sülfat (%90) MERCK
- Asetik asit MERCK
- Sodyum hidroksit J.T. BAKER
- Trikloro asetik asit RİEDEL-DE HAEN
- 1,1,3,3-tetra etoksi propan (%97) DROGSAN
- Na₂EDTA SIGMA
- Tris SIGMA
- Hidroklorik asit MERCK
- 5,5'-ditiyobis-2-nitro-benzoik asit (DTNB)..... SIGMA
- İndirgenmiş glutatyon (%99) SIGMA-ALDRICH
- Absolü metanol MERCK-BAKER
- CuCl₂.2H₂O MERCK
- Nitroblue tetrazolium (%98) SIGMA
- Bovine serum albumin ACROS
- Sodyum karbonat CARLO ERBA
- Kloroform CARLO ERBA
- Etanol (%96'lık) CARLO ERBA
- Dietileter RİEDEL-DE HAEN
- Na₂HPO₄ (%99) CARLO ERBA
- KH₂PO₄ MERCK
- CuSO₄.5H₂O RİEDEL-DE HAEN
- Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi SIGMA
- Trisodyumsitrat RİEDEL-DE HAEN

- Ksantin CARLO ERBA
- Ksantin oksidaz M.P. Biomedicals

3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

- Spektrofotometre SHIMADZU UW 1240
- Manyetik karıştırıcı ART SH-3
- Vorteks NÜVE NM-110
- Mikrosantrifüj SIGMA 1-14
- Soğutmalı santrifüj ROTİNA 48 RC
- Sonifikatör Bandelin electronic UW 70
- Hassas terazi OHAUS NV-210
- Su banyosu NÜVE BM-402
- Homojenizatör HEİDOLPH-2021
- pH metre HANNA-211
- Propilen tüpler SIGMA
- Balonjojeler PAYREX
- Otomatik pipet ve uçları ACCUMAX
- Enjektörler SET INJECT
- Cam tüpler KIMAX

3.2. DENEY GRUPLARI

Deneyde Wistar Albino (200 ± 10 g) 20 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneye başlanmadan önce İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2005/72 protokol numarasıyla izin alındı. Elazığ Veteriner Kontrol Merkezi Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen sıçanlar, İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'na getirildi ve standart 12 saat karanlık 12 saat aydınlık, havalandırılmalı, sabit ısıda ve dört kafese beşerli gruplar halinde yerleştirildi. Deney uygulamalarına kadar bir hafta boyunca sıçanlar, standart pellet yemi ve musluk suyu kullanılarak beslendi. Çalışma protokolü uygulanmadan 12-16 saat önce yemleri çekildi ve sadece su verildi.

Grup I: Kontrol (% 0.9 SF, i.p.)

Grup II: Kadmiyum (0.025 mmol/kg, i.p.)

Grup III: Kadmiyum + Resveratrol (0.025 mmol/kg, i.p. + 10 mg/kg, i.p.)

Grup IV: Resveratrol (10 mg/kg, i.p.)

Tüm maddeler % 0.9 Serum fizyolojik (SF), içinde çözülerek hazırlandı. Grup II'ye 5 gün süre ile i.p. SF uygulandı, 5. gün, SF enjeksiyonundan 1 saat sonra Cd i.p olarak enjekte edildi. Grup III'e 5 gün süre ile RES i.p. uygulandı, 5. gün, RES enjeksiyonundan 1 saat sonra Cd i.p. uygulandı. Grup IV'e, 5 gün süre ile RES uygulandı ve 5. gün RES enjeksiyonundan 1 saat sonra RES i.p. uygulandı. Son enjeksiyonlardan 24 saat sonra deney, dokular ve kan örnekleri alınmak üzere eter anestezisi ile sonlandırıldı.

3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Son enjeksiyonlardan 24 saat sonra eter anestezisi altında sakrifiye edilen deney hayvanlarının intrakardiyak kanları alınarak serumları AST ve ALT ölçümü için ayrıldı. Kalp, böbrek ve beyin dokuları ile vena porta'dan, soğuk SF'le perfüze edilerek çıkarılan karaciğer dokuları soğuk SF içinde yıkandı, kurutma kağıdı ile kurutularak deneysel çalışmanın yapılacağı güne kadar -80 °C'de saklandı. Toplanan serum ve hazırlanan dokularda aşağıdaki yöntemler çalışıldı:

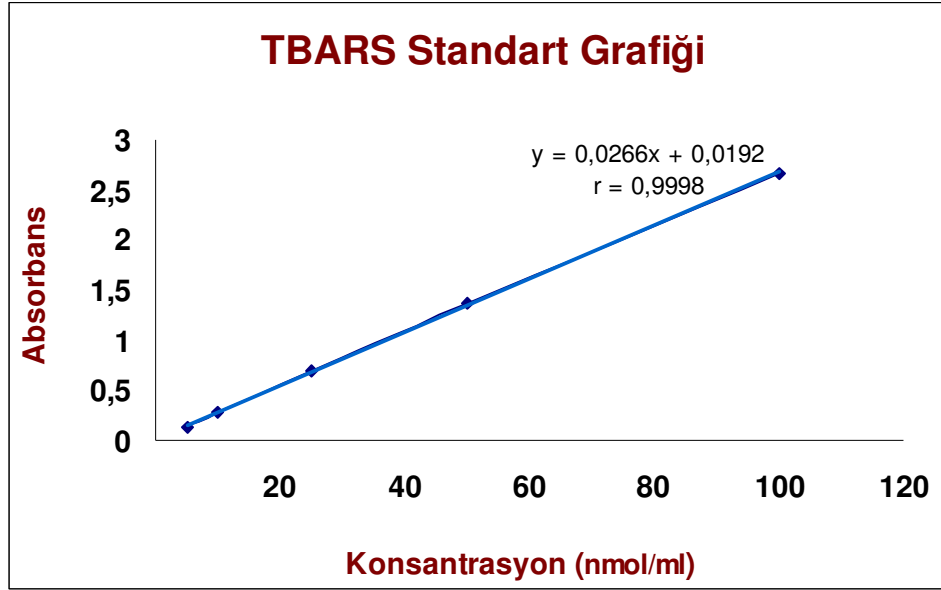
3.3.1. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini

Dokularda TBARS miktarı, Jamall ve Smith'in yöntemine (114) göre çalışıldı. Yöntem, doku homojenatında peroksidize lipidlerin yıkım ürünü olan ve tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren maddelerin, TBA ile verdiği renkli ürünün 532 nm'de miktar tayini prensibine dayanmaktadır.

Bu amaçla:

- 0.25 M sakaroz çözeltisiyle %10'luk doku homojenatları hazırlandı.
- Deney tüplerine alınan 0,2 ml homojenat üzerine; 0,2 ml %8,1'lik sodyum dodesil sülfat, 1,5 ml %20'lik asetik asit (pH'sı NaOH ile 3,5'e ayarlı) ve 1,5 ml %0,8'lik TBA çözeltisi eklendi.
- Son hacim distile su ile 4 ml'ye tamamlandı.
- Tüplerin ağzı kapatılarak 95 °C'ye ayarlı su banyosunda 60 dakika bekletildi.
- Süre sonunda musluk suyu altında soğutulan tüplere eşit hacimde %10'luk TCA eklenip 1000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Doku körü, aynı işlemler sırasında örnek üzerine 1,5 ml TBA çözeltisi yerine distile su eklenerek hazırlandı.
- Santrifüj sonunda üstteki renkli ürün ayrıldı ve 532 nm'de köre karşı okundu.

- Standart çalışma için 1,1,3,3-tetraetoksipropanın stok çözeltisi (200 nmol/ml) hazırlandı. Stok çözeltiden 5, 10, 25, 50, 100 nmol/ml konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı.
- Aynı deney prosedürü uygulandıktan sonra bulunan absorbans değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi.
- Numunelerin konsantrasyonları, bu eğriden elde edilen $y = 0,0266x + 0,0192$ ($r = 0,9998$) denklemine göre hesaplanarak, sonuçlar nmol TBARS/g yaş doku olarak ifade edildi.



Şekil 10. TBARS kalibrasyon grafiği.

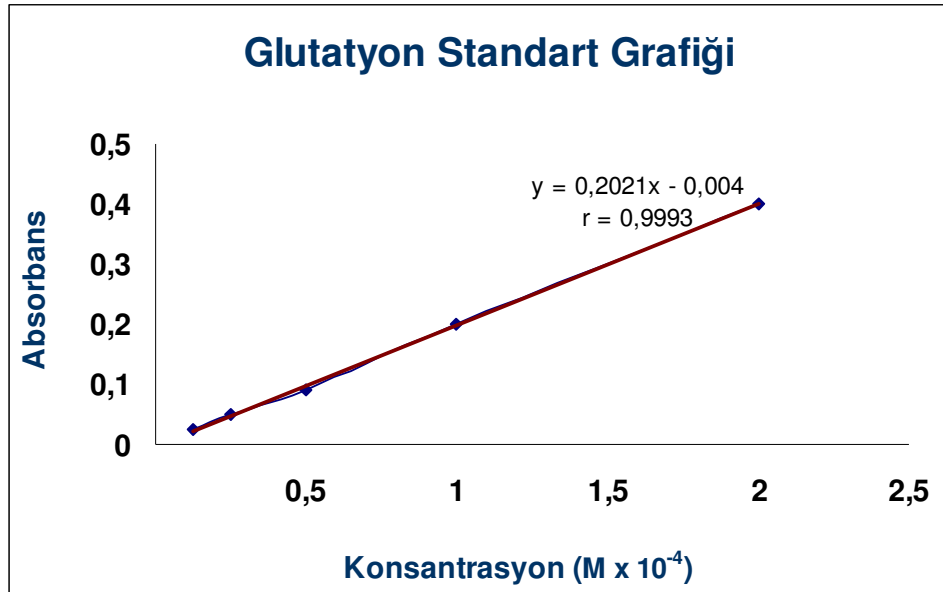
3.3.2. Doku Glutasyon (GSH) Tayini

Dokularda GSH tayini, Sedlak ve Linsay'ın yöntemine (115) göre çalışıldı. Yöntem, 5,5'-ditiyobis-(2-nitro-benzoik asit) (DTNB; Ellman reaktifi) ile tiyol gruplarının reaksiyona girmesi sonucu oluşan 2-nitro-5-merkaptobenzoik asidin 412 nm'de miktar tayini prensibine dayanmaktadır.

Bu amaçla:

- 0.2 gr doku 8,0 ml 0.02 M Na₂ EDTA ile homojenize edildi.
- 15 ml'lik deney tüplerine alınan 5 ml homojenat üzerine; 4 ml distile su ve 1 ml %50'lik TCA eklendi.
- 3000 g'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Doku körü, aynı işlemler sırasında doku homojenatı yerine distile su kullanılarak hazırlandı.

- Santrifüj sonunda elde edilen süpernatandan 0,2 ml alınıp üzerine 4 ml 0.4 M Tris tamponu (pH= 8,9) ve 0,1 ml DTNB eklendi ve vortekslendi.
- 5 dakika içinde 412 nm’de homojenatsız köre karşı okundu.
- Standart çalışması için indirgenmiş glutatyon’un 2.10^{-4} M’lık stok çözeltisinden 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 $\times 10^{-4}$ M konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı.
- Aynı deney prosedürü uygulandıktan sonra bulunan absorbans değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi.
- Numunelerin konsantrasyonları, bu eğriden elde edilen $y = 0,2021x - 0,004$ ($r = 0,9993$) denklemine göre hesaplanarak, sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ yaş doku olarak ifade edildi.



Şekil 11. GSH kalibrasyon grafiği.

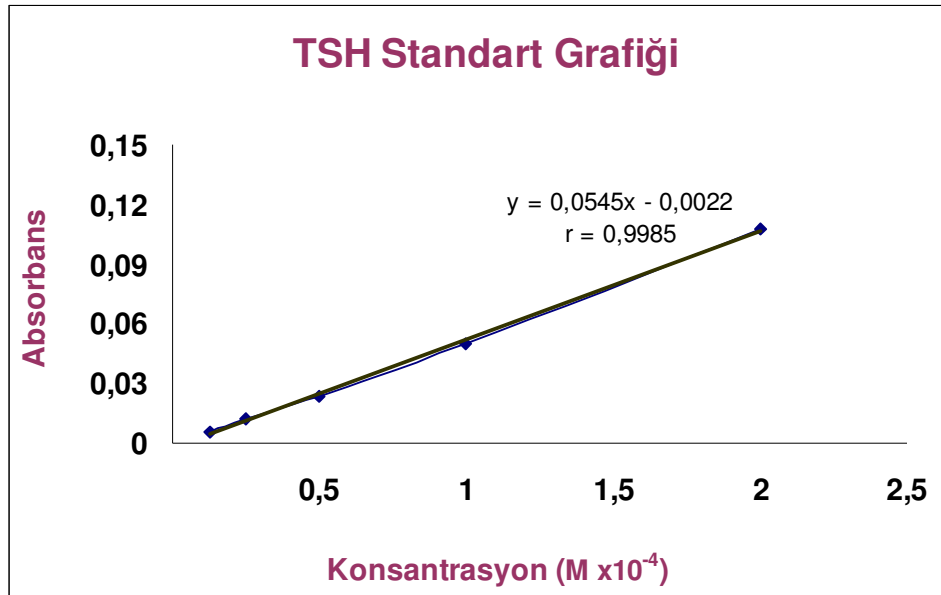
3.3.3. Dokularda Total Sülfidril Gruplarının (TSH) Tayini

Dokularda TSH tayini, Sedlak ve Linsay’ın yöntemine (115) göre çalışıldı. Yöntem, DTNB ile tiyol gruplarının reaksiyona girmesi sonucu oluşan 2-nitro-5-merkaptobenzoik asidin 412 nm’de miktar tayini prensibine dayanmaktadır.

Bu amaçla:

- Dokularda GSH tayini için hazırlanan doku homojenatlarından 0,5 ml deney tüplerine alındı ve üzerine; 1,5 ml 0.2 M Tris tamponu (pH= 8,2) ve 0.1 ml DTNB eklendi.
- Karışımın hacmi 7,9 ml absölu metanolla 10,0 ml’ye tamamlandı.

- Tüplerin ağzı kapatılıp 30 dakika çalkalandı.
- 3000 g'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Doku körü, aynı işlemler sırasında doku homojenatı yerine distile su kullanılarak hazırlandı.
- Süpernatantlar 412 nm'de homojenatsız köre karşı okundu.
- Standart çalışması için indirgenmiş glutatyon'un $2 \cdot 10^{-4}$ M'lık stok çözeltisinden 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 x 10^{-4} M konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı.
- Aynı deney prosedürü uygulandıktan sonra bulunan absorbans değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi.
- Numunelerin konsantrasyonları, bu eğriden elde edilen $y = 0,0545x - 0,0022$ ($r = 0,9985$) denklemine göre hesaplanarak, sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ yaş doku olarak ifade edildi.



Şekil 12. TSH kalibrasyon grafiği.

3.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi tayini, Sun ve Oberley'in yöntemine (116) göre çalışıldı. Yöntem, Ksantin-Ksantin oksidaz sistemi ile oluşturulan süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazolium'u (NBT) indirgemesi sonucu açığa çıkan pembe-mor renkli formazonun 560 nm'de miktar tayini prensibine dayanmaktadır. Bu indirgenme enzimin olmadığı ortamda meydana gelir ve pembe-mor renk oluşur. Ortamda SOD olduğunda ise indirgenme olmaz, enzimin miktar ve aktivitesine bağlı

olarak daha açık bir renk oluşur. 1 Ünite SOD, NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden protein miktarı olarak alındı ve sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Bu amaçla:

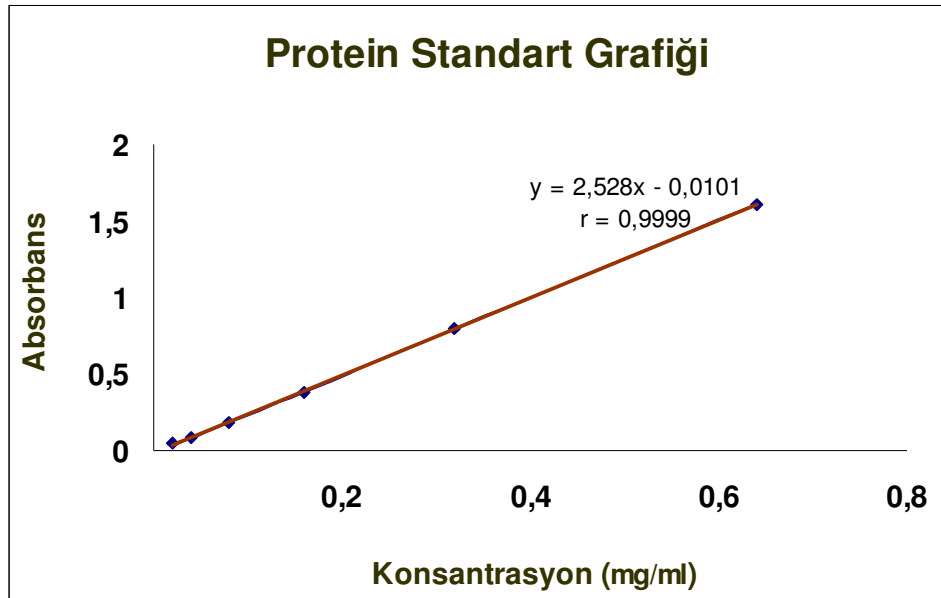
- Dokular tartılıp 19 katı 50 mM pH: 7.8 olan fosfat tamponu eklenerek homojenize edildi ve homojenatlara sonifikasyon uygulandı.
- 4000 rpm'de 4⁰C'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda süpernatanlara 1:1 oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı eklendi ve karıştırıldı.
- Karışımlar 4000 rpm'de 4⁰C'de 50 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda süpernatanlardan 0,100 ml tüplere alınarak üzerine; 2,850 ml Assay reaktifi ve 0,050 ml 167 U/L Ksantin oksidaz çözeltisi eklendi.
- Assay reaktifi: 40 ml 0.3 mmol/L Ksantin çözeltisi, 20 ml 0.6 mmol/L EDTA çözeltisi, 20 ml 150 µmol/L nitro blue tetrazolium çözeltisi, 12 ml 400mmol/L Na₂CO₃ çözeltisi, 6 ml 1 gr/L bovine serum albumin (BSA) çözeltisinin karıştırılmasıyla elde edildi.
- Tüpler 25⁰C'de 20 dakika bekletildi.
- Süre sonunda tüplere 1,0 ml 0.8 mmol/L CuCl₂ çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu.
- Kör, aynı işlemler sırasında numune yerine 0,100 ml distile su kullanılarak hazırlandı.
- Renkli ürün 560 nm'de köre karşı okundu.
- Enzimin inhibisyonu, % **inhibisyon** = $(Abs_{k\ddot{o}r} - Abs_{num}) / Abs_{k\ddot{o}r} \times 100$ denklemi kullanılarak hesaplandı.
- 1 Ünite SOD, NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden protein miktarı olarak değerlendirildi ve U/ml olarak hesaplandı.
- Numunelerdeki SOD Aktivitesi= SOD/Lowry protein denklemi kullanılarak U/mg protein olarak ifade edildi.

3.3.5. Protein Tayini

Dokularda protein tayini, Lowry yöntemine (117) göre çalışıldı. Yöntem, alkali ortamda oluşan bakır-protein kompleksinin, fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini redüklemesi sonucu oluşan koyu mavi renkli ürünün 700 nm'de miktar tayini prensibine dayanmaktadır.

Protein tayini işlemi aşağıdaki gibi yapıldı:

- Dokularda SOD tayini için hazırlanan doku süpernatantlarından 0,010 ml deney tüplerine alındı ve üzerine 2,5 ml C reaktifi ile 0,490 ml distile su eklendi.
- C reaktifi; 50 ml B reaktifine (20,0 gr Na_2CO_3 ve 4 gr NaOH tartılıp, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.) 1,0 ml A reaktifi (0,5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1,0 gr trisodyumsitrat tartıldı, 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.) eklenmesiyle elde edildi.
- Kör tüpü için numune yerine 0,010 ml distile su eklendi.
- Tüplerin ağzı kapatılıp iki defa vortekslenildikten sonra 10 dakika bekletildi.
- 1:1 oranında hazırlanan Folin-fenol belirtecinden 0,250 ml eklendi.
- Tüplerin ağzı kapatılıp iki defa vortekslenildikten sonra karanlıkta 30 dakika bekletildi. Süre sonunda absorbanslar 700 nm'de köre karşı okundu.
- Standart çalışması için BSA'nın 1 mg/ml konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64mg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı.
- Aynı deney prosedürü uygulandıktan sonra bulunan absorbans değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi.
- Numunelerin konsantrasyonları bu eğriden elde edilen $y = 2,528x - 0,0101$ ($r = 0,9999$) denkleminde hesaplanarak, sonuçlar mg protein/ml olarak ifade edildi.



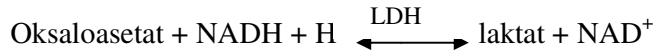
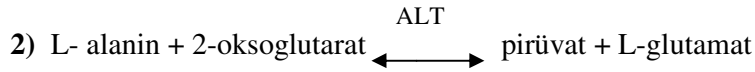
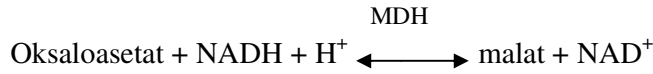
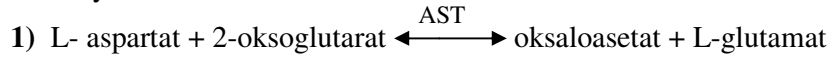
Şekil 13. Protein kalibrasyon grafiği.

3.3.6. AST ve ALT enzim aktivitelerinin tayini

Serum AST, ALT aktiviteleri; Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu (IFCC; International Federation of Clinical Chemistry)'na göre düzenlenmiş ve optimize edilmiş yöntemle göre çalışıldı. ALT aktivitesi için Cormey'in Liquick Cor-ALAT kiti ve AST aktivitesi için Cormey'in Liquick Cor-ASAT kiti kullanılarak *sample start method*'a göre ölçümleri yapıldı.

Yöntemin prensibi: Serumdaki transaminazlar amino asitten amino grubunu α -ketoaside transfer ederler. Reaksiyondaki substratlar AST için α -ketoglutarik asit ve L-aspartat; ALT için ise α -ketoglutarik asit ve L-alanindir. Ürünler ise AST için L-glutamat ve oksaloasetat; ALT için L-glutamat ve pirüvattır.

Reaksiyonlar:



Bu reaksiyonların 340 nm'deki absorbans değişiminin oranı doğrudan enzimlerin aktivitesini vermektedir.

3.3.7. İstatistiksel analiz

Elde edilen sonuçlar bilgisayarda INSTAT programı yardımıyla istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçların aritmetik ortalamaları ve standart hataları bulundu. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi yapıldı. İkili grupların kendi aralarında karşılaştırılması için de POST HOC testlerden *Student-Newman-Keuls* kullanıldı.

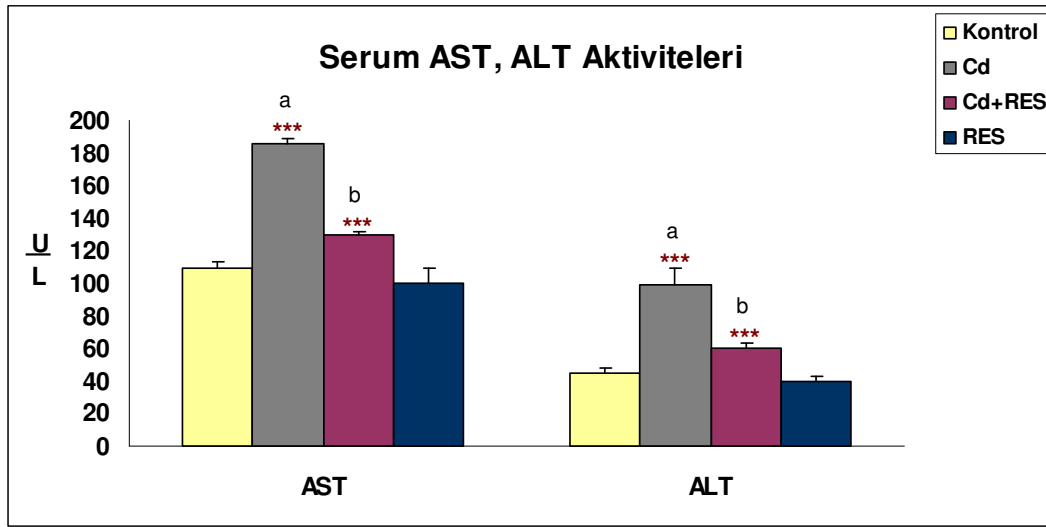
Anlamlılık dereceleri: *** : $p < 0.001$ (ileri derecede anlamlı)

** : $p < 0.01$ (çok anlamlı)

* : $p < 0.05$ (anlamlı) şeklinde ifade edildi.

4. BULGULAR

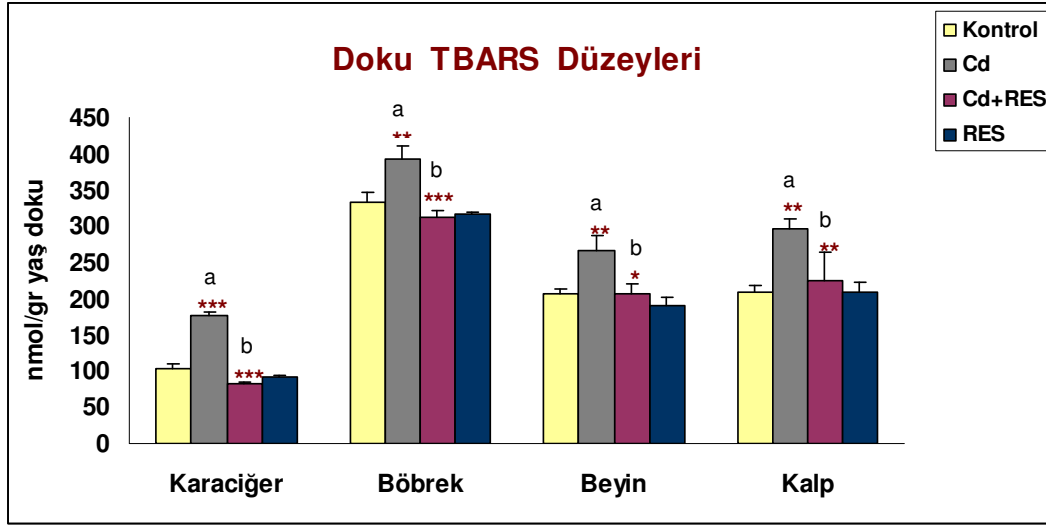
Deney sonunda elde ettiğimiz sonuçlar tablolar ve grafikler halinde aşağıda verilmiştir. Tüm gruplara ait serum AST, ALT aktiviteleri aynı grafikte gösterilmiştir. Her doku için (karaciğer, böbrek, kalp, beyin) antioksidan enzim aktiviteleri ve TBARS düzeyleri ayrı ayrı grafikte gösterilmiştir. Tüm gruplara ait doku antioksidan enzim aktiviteleri ve TBARS düzeyleri ile serum AST, ALT aktiviteleri aynı tabloda gösterilmiştir.



Şekil 14: Serum AST, ALT aktiviteleri.

(a : Kontrole göre, b : Kadmiyuma göre, n:5, *** : $p<0.001$)

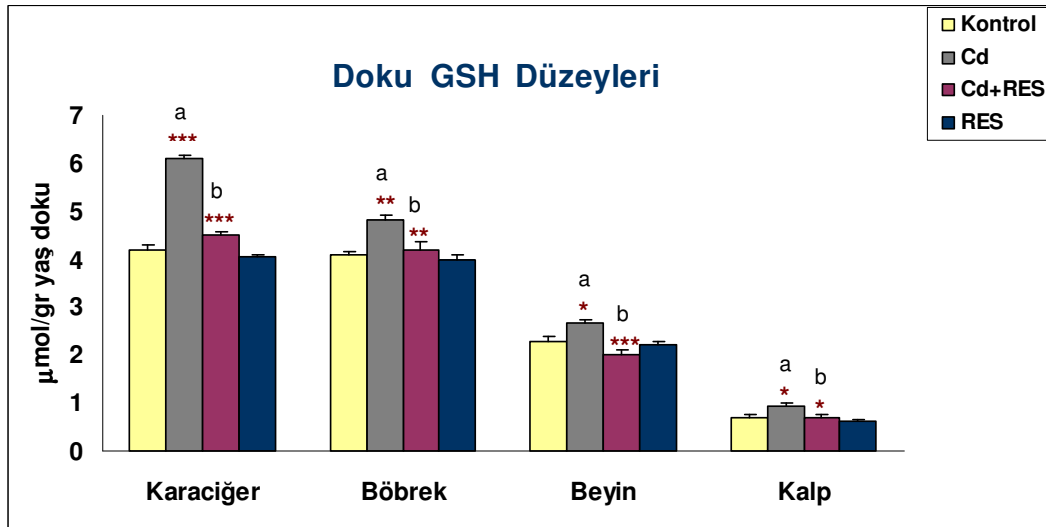
Kadmiyum grubunda serum AST ve ALT enzim aktivitelerinin kontrol ve deney gruplarından çok daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Cd'la birlikte RES uygulanan grupta serum AST, ALT aktiviteleri ise, Cd grubuna göre anlamlı oranda düşüktü ($p<0.001$).



Şekil 15: Doku TBARS düzeyleri. (a : Kontrole göre, b : Kadmiyuma göre, n:5)

*** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$

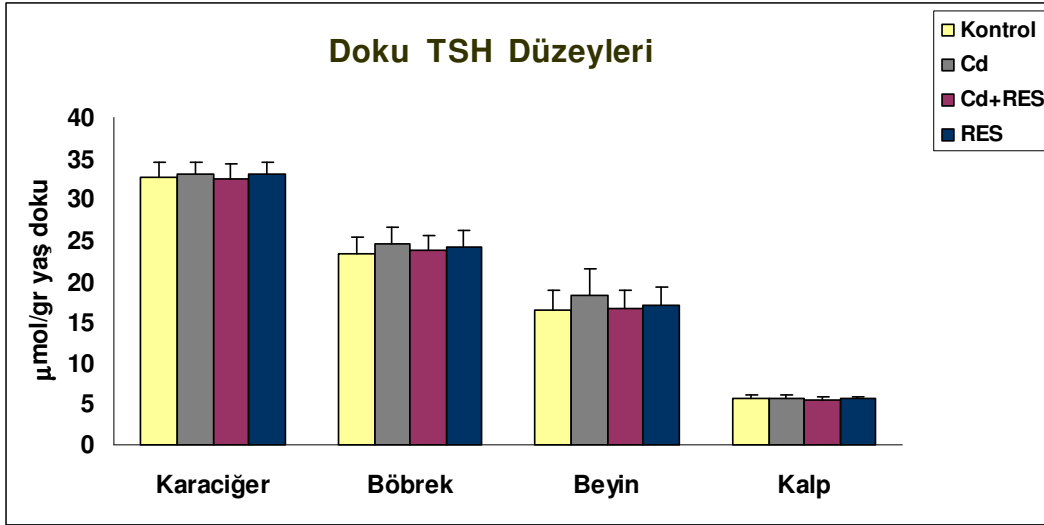
Kadmiyum, tüm dokularda (karaciğer $p < 0.001$, böbrek $p < 0.01$, beyin $p < 0.01$, kalp $p < 0.01$) TBARS'ı anlamlı bir şekilde artırdı. Cd'la birlikte RES uygulanan gruptaki dokularda (karaciğer $p < 0.001$, böbrek $p < 0.001$, beyin $p < 0.05$, kalp $p < 0.01$) TBARS değerlerinde anlamlı bir şekilde düşüş görüldü.



Şekil 16: Doku GSH düzeyleri. (a : Kontrole göre, b : Kadmiyuma göre, n:5)

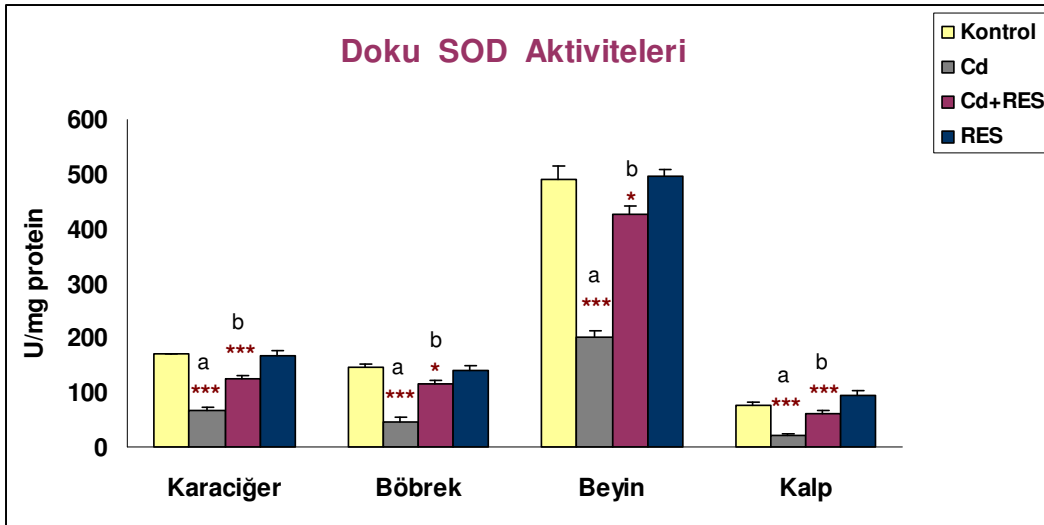
*** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$

Kadmiyum, tüm dokularda (karaciğer $p < 0.001$, böbrek $p < 0.01$, beyin $p < 0.05$, kalp $p < 0.05$) GSH'ü anlamlı bir şekilde artırdı. Cd'la birlikte RES uygulanan gruptaki dokularda (karaciğer $p < 0.001$, böbrek $p < 0.01$, beyin $p < 0.001$, kalp $p < 0.05$) GSH değerlerinde anlamlı bir şekilde düşüş görüldü.



Şekil 17: Doku TSH düzeyleri.
(n:5)

Deney gruplarındaki tüm dokuların TSH düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 18: Doku SOD aktiviteleri. (a : Kontrole göre, b : Kadmiyuma göre, n:5)
*** : p<0.001, **: p<0.01, * : p<0.05

Kadmiyum, tüm dokularda (karaciğer p<0.001, böbrek p<0.001, beyin p<0.001, kalp p<0.001) SOD aktivitesini anlamlı bir şekilde azalttı. Cd'la birlikte RES uygulanan gruptaki dokularda ise (karaciğer p<0.001, böbrek p<0.05, beyin p<0.05, kalp p<0.001) kontrol grubuna yakın seviyede aktivite saptandı.

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarının serum AST, ALT aktiviteleri, doku TBARS, GSH, TSH düzeyleri, doku SOD aktiviteleri.

Parametreler	GRUPLAR (n:5)			
	Kontrol (Ort ± SH)	Cd ^a (Ort ± SH)	RES + Cd ^b (Ort ± SH)	RES (Ort ± SH)
AST (U/L)	109.0 ± 4.7	185.5 ± 3.2***	129.8 ± 2.3***	100.5 ± 8.5
ALT (U/L)	44.5 ± 3.8	98.8 ± 10.6***	60.6 ± 3.0***	40.1 ± 2.6
Karaciğer TBARS nmol/g yaş doku	103.8 ± 6.8	177.0 ± 4.8***	82.9 ± 2.5***	92.8 ± 2.3
Böbrek TBARS nmol/g yaş doku	333.5 ± 12.9	393.6 ± 17.7**	312.4 ± 8.7***	315.8 ± 3.7
Beyin TBARS nmol/g yaş doku	217.7 ± 8.3	267.3 ± 19.2**	205.6 ± 14.7*	191.4 ± 9.9
Kalp TBARS nmol/g yaş doku	208.3 ± 10.5	295.5 ± 13.9**	224.1 ± 39.5**	209.8 ± 11.9
Karaciğer GSH µmol/g yaş doku	4.2 ± 0.09	6.1 ± 0.08***	4.5 ± 0.07***	4.04 ± 0.06
Böbrek GSH µmol/g yaş doku	4.1 ± 0.06	4.8 ± 0.13**	4.2 ± 0.17**	4.0 ± 0.09
Beyin GSH µmol/g yaş doku	2.29 ± 0.11	2.68 ± 0.07*	2.01 ± 0.12***	2.23 ± 0.07
Kalp GSH µmol/g yaş doku	0.68 ± 0.07	0.93 ± 0.08*	0.71 ± 0.05*	0.64 ± 0.03
Karaciğer TSH µmol/g yaş doku	32.7 ± 1.8	33.1 ± 1.5	32.5 ± 1.9	33.0 ± 1.5
Böbrek TSH µmol/g yaş doku	23.4 ± 1.9	24.5 ± 2.0	23.8 ± 1.8	24.2 ± 2.0
Beyin TSH µmol/g yaş doku	16.5 ± 2.4	18.2 ± 3.4	16.7 ± 2.2	17.0 ± 2.2
Kalp TSH µmol/g yaş doku	5.6 ± 0.4	5.7 ± 0.3	5.5 ± 0.3	5.6 ± 0.2
Karaciğer SOD U/mg protein	170.0 ± 2.0	65.9 ± 6.3***	125.3 ± 5.1***	167.7 ± 7.6
Böbrek SOD U/mg protein	146.8 ± 6.7	46.9 ± 6.5***	116.7 ± 5.6*	139.7 ± 8.1
Beyin SOD U/mg protein	488.9 ± 24.3	199.5±12.9***	425.6 ± 16.3*	497.7 ± 12.3
Kalp SOD U/mg protein	74.9 ± 6.8	22.3 ± 3.1***	60.9 ± 4.9***	95.1 ± 8.0

(a: Kontrole göre, b: Kadmiyuma göre,*** : p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.05)

5. TARTIŞMA

Endüstriyel ve çevresel kirlenici olan Cd, en toksik ağır metallere biridir. Pili, metal kaplama, alaşım, plastik, cam, seramik gibi farklı sanayi alanlarında geniş bir kullanıma sahiptir. Başlıca kontaminasyon kaynakları Cd'la kontamine besinler, içme suyu ve sigaradır. Solunum ve ağız yoluyla alınabilen Cd, ince bağırsaklardan emilir, kanda MT, albumin ile aminoasit ve tiyol grupları olan proteinler ile organlara taşınır. Biyolojik yarı ömrü yaklaşık 20 yıl olan Cd, insanlarda en çok karaciğer ve böbrekte MT'ne ve diğer protein ile tiyol gruplarına bağlı olarak depolanır. Akut maruziyette Cd'un büyük bir çoğunluğu karaciğere dağılır, ancak hepatik MT üretimini takiben redistribüsyonu böbrekte olur. Esas olarak feçes ve idrarla atılır (21, 22, 26, 29).

Serbest radikal üretimi, patofizyolojinin bir parçasıdır ve pek çok zenobiyotiğin toksisitesi, serbest radikal üretimi ile ilgilidir. Cd bir Fenton metali olmamasına rağmen, proteinlerdeki fenton metallerinin (bakır, demir) yerini alarak bu metallerin bağlı olmayan formlarının miktarını artırır; kalmodulindeki Ca^{+2} 'la yer değiştirir, kalmoduline bağlı fonksiyonları değiştirir; proteinler, enzimler gibi tiyol (-SH) grubu içeren biyolojik yapılara olan güçlü afinitesinden dolayı, bu yapılara bağlanır ve aktivitelerini baskılar; katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimleri inhibe eder. Bu nedenle süperoksit ve nitrik oksidinde içinde olduğu birçok serbest radikalın üretimine dolaylı yoldan neden olduğu ve böylece hücre membranındaki yapıların peroksidasyonuna, DNA hasarına ve protein oksidasyonuna yol açtığı düşünülmektedir (27, 34).

Akut maruziyetle Cd'un böbrek, karaciğer, beyin, kalp, akciğer, plasenta, uterus ve testiste serbest radikallerin üretimini artırarak, lipit peroksidasyona neden olduğu, nekrozu indüklediği ve hücre hasar oluşturduğu; kronik olarak maruz kalınması ile ise özellikle akciğer, böbrek, karaciğer ve kemikte ciddi hasarlara yol açtığı bilinmektedir (40-43, 46-50).

Son dönemlerde, antioksidan özelliğe sahip doğal maddelerin ve besinlerin serbest radikallerin neden olduğu hücre hasar üzerine olan olası faydaları birçok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır. Bu doğal bileşiklerden biri de viniferinler ailesinden olan RES'dür (73). RES, travmatik zedelenme, *uv* ışığına maruziyet ya da fungal

enfeksiyona (*Botrytis cinerea*) karşı cevap olarak bazı bitkiler tarafından sentezlenen non-flavonoid yapıda polifenolik bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler patojenik mikroorganizmalara karşı bitkiler tarafından korunma amaçlı sentezlenen kimyasal maddelerdir, bitkisel antibiyotikler de denilebilir. Kırmızı duttan yaban mersinine kadar birçok bitkide bulunan RES, en çok üzüm kabuğunda (50-100 µg/g) ve yer fıstığında (0.02-1.79 µg/g) bulunur (78, 80-83).

Resveratrolün değişik doz ve uygulama süreleriyle yapılan biyoyararlanım çalışmalarına göre; RES oral yolla alındıktan sonra hızla bağırsaklardan emilir ve bir saat gibi kısa sürede kana geçer, kanda albumine ve lipoproteinlere bağlı olarak taşınır ve karaciğer, böbrek, kalp ve beyin başta olmak üzere çeşitli organlara dağılır ve asıl olarak idrarla atılır (84-87).

Her ne kadar trans-RES ilk olarak 1976 yılında, Langcake ve Pryce tarafından (*Vitis vinifera*) asma bitkisinde bildirilmişse de “Fransız Paradoksu” adı verilen çelişkinin fark edilmesi RES’ün bilim dünyasına girmesinin başlangıcı olmuştur ve 1992’de Siemann ve Creasy tarafından şarabın içindeki etkin madde olarak trans-RES’ün belirlenmesi, RES’le ilgili çalışmaları artırmıştır. Dr. Sinclair ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (94) RES’ün insan ömrünü 10 yıl kadar uzatabileceği tespit edilmiş ve bu bilgilerin Nature Dergisinde dönüm noktası olarak ifade edilmesi bütün araştırmacıların ilgisini RES’e çekmiştir (78, 80, 88).

En çok bilinen antioksidanlar olan E vitamini ve C vitamininden daha güçlü olan RES; OH[•] ve O₂^{•-} radikallerini süpürür, OH[•] radikalinin neden olduğu lipid peroksidasyonu inhibe eder, demir ve bakırla şelasyon yapar, OH[•] ile H₂O₂’in neden olduğu DNA hasarını önler. Protein oksidasyonunu engeller. Serum antioksidan kapasitesini artırır. Düşük dansiteli lipoproteinlere bağlanarak lipoprotein peroksidasyonunu inhibe eder ve bakır kataliz oksidasyonu sırasında gecikme zamanını uzatır. RES’ün ayrıca, antikanser, östrojenik, antiplatelet, vazorelaksan, iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu, antiinflamatuvar, hepatoprotektif , antimikrobiyal aktiviteli olduğu ve *Helicobacter pylori* ile *Herpes Simpleks Virus* üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir (91-112).

Daha önce sıçanlarda denenmemiş olan bu çalışmada, karaciğer, böbrek, beyin ve kalp dokularındaki oksidan/antioksidan parametrelerle serum AST, ALT düzeylerini

değerlendirerek, RES ön tedavisinin akut Cd toksisitesini önleyip önleyemediğini araştırmayı ve Cd'un toksik etki mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunmayı amaçladık.

Transaminazlar hepatositlerde bulunan hücre içi enzimlerdir. Karaciğer hasarında hücre dışına sızmalarıyla kan seviyelerinin yükselmesi, hepatotoksitenin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Aspartat aminotransferaz (AST) ve Alanin aminotransferazın (ALT) kandaki aktivitesi, karaciğer hasarının şiddetini gösterir. AST hepatositlerin sitozolünde ve mitokondrilerinde bulunur, ayrıca iskelet kası, kalp, böbrek, beyin ve pankreasta da bulunur. ALT ise diğer organlara göre daha çok karaciğerde, hepatosit hücrelerinin sitozolünde bulunur. Bu nedenle ALT karaciğere daha özgül iken, AST kalp ve iskelet kası harabiyetinde de yükselmektedir. Akut ve kronik maruziyette Cd'un serum AST, ALT aktivitelerini yükselttiği bildirilmektedir. Sıçanlarda tek doz 2.5 mg/kg ve 3.9 mg/kg Cd enjeksiyonundan sonra serum AST, ALT aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir (118, 119, 120). Çalışmamızın sonuçlarına göre Cd grubundaki serum AST, ALT aktivitelerinin kontrol grubuna oranla yüksek olması literatürler ile uygunluk göstermektedir. Serum AST, ALT aktivitelerinin yükselmesi, Cd'un hepatotoksositeye neden olarak bu enzimlerin hepatositlerin sitozolünden kana sızdığını göstermektedir. Farelerde tek doz 900 mg/kg Asetaminofen'le oluşturulan toksisitede, kan AST, ALT aktivitesindeki yükselmeyi 30 mg/kg i.p. olarak verilen RES'ün düşürdüğü bildirilmiştir (121). Çalışmamızda, akut Cd uygulamasında sıçan serumlarındaki transaminazların yükselişini, RES ön uygulaması kontrole yakın bir seviyeye düşürmüştür. Bulgularımıza göre RES ön tedavisi Cd'un neden olduğu karaciğer TBARS ve GSH'daki yükselmeyi kontrol gruba yakın bir seviyeye düşürürken, Cd'un baskıladığı karaciğer SOD aktivitesini yükselterek karaciğer dokusundaki oksidatif hasarı tedavi etmiştir. Bu nedenle oksidatif hasarla yükselen serum AST, ALT aktivitelerini düşürmüştür.

Lipit peroksidasyonunun temel göstergesi, hücre membran lipitlerinin son yıkım ürünleri olan aldehit ve ketonların düzeyindeki değişiktir ve TBARS şeklinde ifade edilir. Akut Cd maruziyetinden sonra sıçan karaciğer, böbrek , beyin, ve plazmasında TBARS düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (120, 122, 123). Bulgularımız, uyguladığımız doz ve sürede Cd'un sıçan karaciğer, böbrek, beyin ve kalp dokusunda TBARS düzeylerini anlamlı düzeyde arttırdığını göstermektedir. Tek doz maruziyet sonrasında

bile Cd'un hücresel hasarı başlatan mekanizmaları harekete geçirebildiği ve oksidatif stresin bu mekanizmalara dolaylı olarak katkıda bulunduğu görüşü ağır basmaktadır. Casalino ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre tek doz 2.5 mg/kg kadmiyum klorür uygulaması yapıldıktan 6, 24 ve 48 saat sonra sakrifiye edilen sıçanlardaki karaciğer ve böbrek TBARS düzeylerinin karşılaştırılmasıyla, uygulamadan 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların böbrek TBARS düzeylerinin karaciğer TBARS düzeylerinin iki katından daha fazla olduğu tespit edilmiştir (124). Bizim çalışmamızda da böbrek TBARS düzeyleri karaciğer TBARS düzeylerinden daha yüksek çıkmıştır. Bu sonuç; karaciğerde antioksidan enzim kapasitesinin böbrekten çok daha fazla olmasından dolayı Cd uygulamasından 24 saat sonra dokulardaki antioksidan kapasitenin azalmasının böbreği daha fazla etkilediğini ve ayrıca, akut Cd maruziyetinde hepatik MT sentezini takiben redistribüsyonun böbrekte olmasının böbrekteki toksisiteyi artırmış olabileceğini düşündürmektedir. RES'ün membran lipitlerinin oksidasyonunu önleyerek ve antioksidan kapasiteyi güçlendirerek oksidatif stres kaynaklı doku harabiyetini önlediği bildirilmiştir (78-80). Hücre kültürü ortamında RES'ün serbest radikalleri (O_2^- , OH^{\cdot}) süpürdüğü ve krom maruziyetiyle artan radikal üretimine bağlı olarak gelişen membran lipitlerinin peroksidasyonunu engellediği bildirilmiştir (91). Çalışmamızda, RES ön tedavisi tüm dokulardaki lipit peroksidasyon düzeylerini önemli ölçüde düşürmüştür. RES, sahip olduğu hidroksil grupları nedeniyle hidrojen elektronu verip OH^{\cdot} ve O_2^- radikallerini süpürerek hücre membranlarının peroksidasyonunu engellemektedir (97).

Akut Cd maruziyetinin hücreler üzerindeki ilk toksisitesinin ROS üretimini artırarak DNA hasarı, protein oksidasyonu ve lipit peroksidasyonu şeklinde geliştiği bilinmektedir, ancak antioksidan enzimler üzerindeki etkisi yeterince aydınlatılamamıştır. Tek doz 0.025 mmol/kg, 0.4 mg/kg ve 2.5 mg/kg Cd uygulamasından 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların karaciğer ve kalp dokularında GSH düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (122, 125, 126). Çalışmamızın sonuçlarına göre, Cd bütün dokularda GSH düzeylerini anlamlı oranda artırmıştır. Değişik doz ve sürelerde uygulanan Cd'la GSH düzeylerinde azalma olduğunu gösteren çalışmalar (127, 128) ile bulgularımız karşılaştırıldığında, Cd'un GSH üzerindeki farklı etkilerinin, maruz kalınan doz ve süreyle yakından ilgili olduğunu göstermektedir. Uzun süreli ve yüksek dozlarda maruziyetlerde organizmanın GSH deposu tükenmekte ve düzeyide azalmaktadır. Akut Cd toksisitesini takiben gelişen GSH düzeylerindeki değişiklik

henüz yeterince aydınlatılamamışsa da, bulgularımızda görülen GSH düzeylerindeki artışın, Cd'un neden olduğu oksidatif hasara karşı, organizmanın akut bir yanıtı olabileceğini düşünüyoruz. RES'ün SOD, CAT gibi antioksidan enzimleri ve GSH'u düzenleyen genlerin ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir. Sıçan aorta düz kas hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada, RES uygulamasının hücresel GSH düzeyini kontrol gruba göre anlamlı derecede yükselttiği bildirilmiştir (129). Çalışmamızda, RES ön tedavisi tüm dokulardaki GSH düzeylerinin kontrole yakın bir seviyeye gelmesini sağlamıştır. Sonuçlarımıza göre RES, hem Cd'un neden olduğu artan radikal üretimini azaltarak hem de antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırarak, hücrenin savunma sistemine katkıda bulunuyor ve hücresel GSH düzeylerinin kontrol grubuna yakın bir düzeye gelmesini sağlıyor olabilir. Bulgularımıza göre tüm dokuların total sülfidril gruplarında (TSH), kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Dokularda GSH düzeylerinde farklılık varken TSH düzeylerinde farklılık olmaması, sülfidril grubu taşıyan diğer moleküllerdeki olası azalma ya da artışla organizmanın antioksidan kapasiteyi dengelemeye çalıştığını gösterdiği gibi, akut Cd toksisitesindeki antioksidan durumu yansıtmada TSH'ın ölçümünün sorgulanması gerektiğini de düşündürmektedir.

Bir metalloenzim olan SOD, $O_2^{\cdot\cdot}$ 'i detoksifiye ederek, hücreleri serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasara karşı korur. Cd'un SOD'da bulunan metaller olan bakır, çinko veya manganla yer değiştirerek enzimi inhibe ettiği ya da doğrudan enzimle etkileşip proteinin yapısını bozduğu düşünülmekte ise de SOD üzerine olan etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bazı çalışmalara göre; akut Cd maruziyeti sıçanlarda doku SOD aktivitesini azaltmaktadır. Tek doz 2.5 mg/kg ve 5 mg/kg Cd uygulamasından 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçan karaciğer ve böbreklerinde SOD aktivitelerinin azaldığı bildirilmiştir (123, 125). Başka bir çalışmada ise 0.4 mg/kg Cd uygulamasından 24 saat sonra, Cd uygulanan gruptaki sıçan kanında kontrol gruba göre SOD aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir (130). Çalışmamızda, tüm dokularda Cd uygulaması yapılan gruplardaki SOD aktivitelerinin kontrol gruba göre daha düşük olduğunu tespit ettik. SOD aktivitelerinde gözlemlenen bu değişikliklerin Cd'un maruziyet dozu, süresi ve uygulama şekli ile uygulanan hayvanların durumuna bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Sıçanlarda oluşturulan kronik alkol tüketiminin karaciğer dokusunda neden olduğu oksidatif hasara bağlı olarak azalan SOD aktivitesinin RES uygulamasıyla kontrole yakın bir düzeye yükseldiği bildirilmiştir (97). Çalışmamızda,

RES ön tedavisi tüm dokulardaki SOD aktivitelerini kontrole yakın bir düzeye yükseltmiştir. Sonuçlarımız RES'ün, hem Cd'un neden olduğu artan radikalleri süpürerek hem de SOD'un ekspresyonunu artırarak, hücrelerin savunma sistemini desteklediğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akut Cd zehirlenmesinin moleküler tanısında doku TBARS, GSH, TSH düzeyleri, SOD aktivitesi ve serum AST, ALT aktiviteleri önemli parametrelerdir. Uyguladığımız doz ve sürede Cd, tüm dokularda TBARS, GSH düzeylerinde artış, SOD düzeylerinde düşme, serum AST, ALT aktivitelerinde yükselme sağlamış ve TSH düzeylerinde anlamlı fark oluşturmamıştır. Çalışmamızın bulguları, oksidatif stresin, Cd toksisitesinin temel mekanizması olmamakla birlikte, hücrel hasarın erken göstergesi olduğu görüşünü desteklemektedir. Çalışmamızda, doğal bir antioksidan olan RES ön uygulaması, hücrelerde serbest radikal süpürücü özelliği ve antioksidan kapasiteyi güçlendirici özelliği sayesinde lipit peroksidasyonu düşürmüş ve enzim düzeylerini dengelemiştir.

Buna göre;

1. Resveratrol gibi doğal antioksidanların, ağır metal toksisitesi sonucunda gelişen hücre ve doku hasarına karşı koruyucu olabileceği kanaatindeyiz. Bu, daha ileri hayvan deneyleri ve ayrıntılı çalışmalarla da doğrulanabilir.

2. Yaptığımız çalışmanın, ağır metallerin zararlı etkilerini önlemeye yönelik ileri hayvan deneylerine ışık tutması ve aydınlatılan etki mekanizmaları üzerinden hareketle yeni ilaç geliştirme çalışmalarına katkıda bulunması bakımından yararlı olacağı kanaatindeyiz. Ayrıca bu çalışmanın, oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavisinde de yeni bir açılım sağlayabileceği de değerlendirilmelidir.

7. ÖZET

Kadmiyum (Cd), endüstride geniş bir alanda kullanılan, mesleki ve çevresel maruziyetle insan sağlığını tehdit eden ağır metaldir. Kadmiyum toksisitesinin erken göstergesinin oksidatif hasar olduğu kabul edilmektedir. Çevresel etmenlere karşı yanıt olarak asma bitkisi de dahil birçok bitki türü tarafından sentezlenen resveratrol (RES; 3,5,4'-trihydroxystilbene) bir fitoaleksindir. RES'in, serbest radikalleri süpürme; OH[•] radikaline maruziyetle oluşan hücre membranındaki lipit peroksidasyonu önleme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, deneysel sıçan modelinde akut Cd maruziyetinin neden olduğu dokulardaki oksidatif hasar üzerine RES ön tedavisinin etkisini irdelemektir. Wistar albino erkek sıçanlar, her grupta 5 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup I: Kontrol (SF, *i.p.*), Grup II Cd (0.025 mmol/kg, *i.p.*), Grup III RES + Cd, Grup IV RES (10 mg/kg/gün, *i.p.*). Cd uygulamasından 24 saat sonra karaciğer, böbrek, beyin ve kalp dokularında tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), redükte glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve total sülfidril grupları (T-SH) çalışıldı ve serumda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri ölçüldü.

Kadmiyum, sıçanların tüm dokularında lipit peroksidasyonu uyararak TBARS ve GSH düzeylerini artırdı, SOD aktivitesini baskıladı, serum AST, ALT aktivitelerini ise yükseltti. RES ön tedavisi ile dokulardaki TBARS ve GSH düzeylerini azalırken SOD aktivitesi arttı. Diğer taraftan, RES, serum AST, ALT aktivitelerinin artmasını önledi.

Bulgularımız, tek doz Cd uygulamasının hücrelerde anlamlı bir oksidatif strese yol açabildiğini ve doğal bir antioksidan olan RES'in akut Cd toksisitesi üzerinde koruyucu etkisinin olduğunu ve Cd'un neden olduğu oksidatif stresle ortaya çıkan olumsuz etkileri düzelttiğini göstermektedir .

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Kadmiyum, Karaciğer enzimleri, Oksidatif stres, Resveratrol, Lipit peroksidasyon.

8. SUMMARY

Cadmium (Cd) is a heavy metal, which is widely used in industry, affecting human health through occupational and environmental exposure. Oxidative damage has been demonstrated as an early sign of Cd toxicity. Resveratrol (RES; 3,5,4'-trihydroxystilbene) is a phytoalexin produced by a variety of plant species, such as grapevines, in response to injury. It has been reported that RES scavenger the free radicals and inhibit lipid peroxidation in cell membranes caused by exposure to HO[•] radicals.

The aim of this study is to evaluate the effects of RES pre-treatment on tissues oxidative damage caused by acute Cd exposure in an experimental model in rats. Adult male Wistar rats were divided into 4 groups of 5 animals each. Group I: Control (SF, i.p.), Group II: Cd (0.025 mmol/kg, i.p.), Group III: RES + Cd, Group IV: RES (10 mg/kg/day, i.p.). After 24 h the Cd administration, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and total sulfhydryl groups (T-SH) were investigated in liver, kidney, brain, heart tissues and aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in serum were tested.

TBARS levels and GSH content were increased and SOD activity was inhibited by Cd-induced lipid peroxidation in all tissues of rats. In addition, Cd increased the serum AST, ALT activities. The pre-treatment with RES lowered the levels of TBARS, GSH and elevated SOD activity in the all tissue. Moreover, increase of AST, ALT activities in serum was prevented by RES.

Our results demonstrate that, administration of single dose Cd may cause a significant oxidative stress in the cells and RES, the natural antioxidant, has protective effect on Cd toxicity and ameliorate the adverse effects of Cd-induced oxidative stress.

Keywords: Antioxidant, Cadmium, Hepatic enzymes, Oxidative stress, Resveratrol, Lipid peroxidation,

9. KAYNAKÇA

1. Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., Woods, J.M.: The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci* 79, (16), 1493-1506, 2006
2. Goyer, R.A., Clarkson, W.T.: Toxic effects of metals. Edited by: Klaassen, C.D.: *Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, 6th ed*, McGraw-Hill, USA, 811-827, 2001
3. Liu, J., Kadiiska, M.B., Corton, J.C., Qu, W., Waalkes, M., Mason, R.P., Liu, Y., Klaassen, C.D.: Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/III-null mice. *Free Radical Bio Med* 32, 525-535, 2002
4. Murugavel, P., Pari, L., Sitasawad, S.L., Kumar, S., Kumar, S.: Cadmium induced mitochondrial injury and apoptosis in vero cells: Protective effect of diallyl tetrasulfide from garlic. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, (1), 161-170, 2007
5. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, (1), 44-84, 2007
6. Liu, Y., Zhang, S.P., Cai, Y.Q.: Cytoprotective effects of selenium on cadmium-induced LLC-PK₁ cells apoptosis by activating JNK pathway. *Toxicology in Vitro* 21, (4), 677-684, 2007
7. Pervaiz, S.: Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist Update* 7, (6), 333-344, 2004
8. Olas, B., Nowak, P., Kolodziejczyk, J., Ponczek, M., Wachowicz, B.: Protective effects of resveratrol against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and lipids exposed to peroxynitrite. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7, (2), 96-102, 2006
9. Soleas, G.J., Grass, L., Josephy, P.D., Goldberg, D.M., Diamandis, E.P.: A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin Biochem* 35, (2), 119-124, 2002
10. Matsumura, A., Ghosh, A., Pope, G. S., Darbre, P. D.: Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 94, (5), 431-443, 2005
11. Olas, B., Wachowicz, B.: Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. *Thrombosis Research* 106, (2), 143-148, 2002
12. Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J.M., Gomez, E., Fernandez, P.: The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* 61, (2), 294-302, 2002
13. Kaplan, S., Bisleri, G., Morgan, J.A., Cheema, F.H., Oz, M.C.: Resveratrol, a Natural Red Wine Polyphenol, Reduces Ischemia-Reperfusion-Induced Spinal Cord Injury. *The Annals of Thoracic Surgery* 80, (6), 2242-2249, 2005
14. Tsai, W.J., Shiao, Y.J., Lin, S.J., Chiou, W.F., Lin, L.C., Yang, T.H., Teng, C.M., Wu, T.S., Yang, L.M.: Selective COX-2 inhibitors. Part 1: Synthesis and biological evaluation of phenylazobenzenesulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett* 16, (17), 4440-4443, 2006
15. Fremont, L.: Minireview - Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66, (8), 663-673, 2000
16. Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O., Lewis, K.: Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. *Antimicrob Agents Ch* 46, (10), 3133-3141, 2002
17. Mahady, G.B., Pendland, S.L.: Resveratrol inhibits the growth of helicobacter pylori in vitro. *The American Journal of Gastroenterology* 95, (7), 1849, 2000
18. Docherty, J.J., Fu, M.M.H., Stiffler, B.S., Limperos, R.J., Pokabla, C.M., DeLucia, A. L.: Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antivir Res* 43, (3), 135-145, 1999

19. Altindag, Z.Z., Baydar, T., Engin, A.B., Sahin, G.: Effects of the metals on dihydropteridine reductase activity. *Toxicol in Vitro* 17, (5-6), 533-537, 2003
20. Leonard, S.S., Haris, G.K., Shi, X.: Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Bio Med* 37, (12), 1921-1942, 2004
21. Méndez-Armenta, M., Ríos, C.: Cadmium neurotoxicity. *Environ Toxicol Phar* 23, (3), 350-358, 2007
22. Kirkham, M.B.: Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137, (1-2), 19-32, 2006
23. Coelho, P., Silva, S., Roma-Torres, J., Costa, C., Henriques, A., Teixeira, J., Gomes, M., Mayan, O.: Health impact of living near an abandoned mine – Case study: Jales mines. *Int J Hyg Environ Heal*, In Press, Corrected Proof, Available online 23 February 2007
24. Baker, J.R., Edwards, R.J., Lasker, J.M., Moore, M.R., Satarug, S.: Renal and hepatic accumulation of cadmium and lead in the expression of CYP4F2 and CYP2E1. *Toxicol Lett* 159, (2), 182-191, 2005
25. Bergeron, P-M., Jumarie, C.: Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation. *Toxicology* 219, (1-3), 156-166, 2006
26. Jumarie, C.: Cadmium transport through type II alveolar cell monolayers: contribution of transcellular and paracellular pathways in the rat ATII and the human A549 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1564, (2), 487-499, 2002
27. Brzóška, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J.: Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem Toxicology* 39, (10), 967-980, 2001
28. Vahter, M., Berglund, M., Akesson, A., Lidén, C.: Metals and Women's Health. *Environ Res* 88, (3), 145-155, 2002
29. Zalups, R.K., Ahmad, S.: Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharm* 186, (3), 163-188, 2003
30. Bridges, C.C., Zalups, R.K.: Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharm* 204, (3), 274-308, 2005
31. Iyengar, G.V., Rapp, A.: Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 3: Toxic trace elements in placenta and placenta as a biomarker for these elements. *Sci Total Environ* 280, (1-3), 221-238, 2001
32. Kuriwaki, J., Nishijo, M., Honda, R., Tawara, K., Nakagawa, H., Hori, E., Nishijo, H.: Effects of cadmium exposure during pregnancy on trace elements in fetal rat liver and kidney. *Toxicol Lett* 156, (3), 369-376, 2005
33. Ronco, A.M., Garrido, F., Llanos, M.N.: Smoking specifically induces metallothionein-2 isoform in human placenta at term. *Toxicology* 223, (1-2), 46-53, 2006
34. Lermioglu, F., Bernard, A.: Effect of calmodulin-inhibitors and verapamil on the nephrotoxicity of cadmium in rat. *Toxicol Lett* 95, (1), 9-13, 1998
35. Kayaalp, S.O.: İlaçların dağılımı. Tıbbi Farmakoloji, 10. baskı, ISBN:975-8506-27-7, Feryal Matbaacılık, pp:34-35, Ankara 2002
36. Takeda, A., Takefuta, S., Ijio, H., Okada, S., Oku, N.: ¹⁰⁹Cd transport in rat brain. *Brain Res Bull* 49, (6), 453-457, 1999
37. Crowe, A., Morgan, E.H.: Effect of Dietary Cadmium on Iron Metabolism in Growing Rats. *Toxicol Appl Pharm* 145, (1), 136-146, 1997
38. Pearson, C.A., Lamar, P.C., Prozialeck, W.C.: Effects of cadmium on E-cadherin and VE-cadherin in mouse lung. *Life Sci* 72, (11), 1303-1320, 2003
39. Hiramatsu, N., Kasai, A., Du, S., Takeda, M., Hayakawa, K., Okamura, M., Yao, J., Kitamura, M.: Rapid, transient induction of ER stress in the liver and kidney after acute

exposure to heavy metal: Evidence from transgenic sensor mice. *FEBS Letters* 581, (10), 2055-2059, 2007

40. <http://rais.ornl.gov/tox/profiles/cadmium.shtml#t21>/The Risk Assessment Information System, Erişim tarihi: 04.05.2007
41. Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G.F., Kjellström, T.: "Cadmium in the environment. 2nd Ed." CRC Pres, Cleveland, Ohio, 1976
42. Coyle, P., Niezing, G., Shelton, T.L., Philcox, J.C., Rofe, A.M.: Tolerance to cadmium hepatotoxicity by metallothionein and zinc: in vivo and in vitro studies with MT-null mice. *Toxicology* 150, (1-3), 53-67, 2000
43. Liu, J., Kadiiska, M.B., Corton, J.C., Qu, W., Waalkes, M.P., Mason, R.P., Liu, Y., Klaassen, C.D.: Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice. *Free Radical Bio Med* 32, (6), 525-535, 2002
44. Tsuruoka, S., Sugimoto, K.I., Muto, S., Nomiyama, K., Fujimura, A., Imai, M.: Acute Effect of Cadmium-Metallothionein on Glucose and Amino Acid Transport across the Apical Membrane of the Rabbit Proximal Tubule Perfused In Vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 292, (2), 769-777, 2000
45. Sarkar, S., Yadav, P., Trivedi, R., Bansal, A.K., Bhatnagar, D.: Cadmium induced lipid peroxidation and the status of antioxidant system in rat tissues, *J. Trace Elem. Med. Biol* 9, 144-149, 1995
46. Choi, A.O., Cho, S.J., Desbarats, J., Lovrić, J., Maysinger, D.: Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. *J Nanobiotechnology* 5, (1), 2007
47. Koyuturk, M., Yanardag, R., Bolkent, S., Tunali, S.: Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage. *Environ Tox Pharm* 21, (3), 235-240, 2006
48. Zhou, T., Jia, X., Chapin, R.E., Maronpot, R.R., Haris, M.W., Liu, J., Waalkes, M.P., Eddy, E.M.: Cadmium at a non-toxic dose alters gene expression in mouse testes. *Toxicol Lett* 154, (3), 191-200, 2004
49. Mikhleva, L.M.: Cadmium-related pathology in man. *Arkh Patol. Review* 50, (9), 81-5, 1988 (Abstract)
50. Taylor, A., Jackson, M.A., Patil, D., Burston, J. & Lee, H.A.: Poisoning with cadmium fumes after smelting lead. *Br. Med. J* 288, 1270-1271, 1984
51. Kirschvink, N., Vincke, G., Fiévez, L., Onclin, C., Wirth, D., Belleflamme, M., Louis, R., Cataldo, D., Peck, M.J., Gustin, Pascal.: Repeated cadmium nebulizations induce pulmonary MMP-2 and MMP-9 production and emphysema in rats. *Toxicology* 211, (1-2), 36-48, 2005
52. Nordberg, G.F.: Lung cancer and exposure to environmental cadmium. *The Lancet Oncology* 7, (2), 99-101, 2006
53. Shaikh, Z.A., Vu, T.T., Zaman, K.: Oxidative Stress as a Mechanism of Chronic Cadmium-Induced Hepatotoxicity and Renal Toxicity and Protection by Antioxidants. *Toxicol Appl Pharm* 154, (3), 256-263, 1999
54. Sonne-Hansen, C., Dietz, R., Leifsson, P.S., Hyldstrup, L., Riget, F.F.: Cadmium toxicity to ringed seals (*Phoca hispida*): an epidemiological study of possible cadmium-induced nephropathy and osteodystrophy in ringed seals (*Phoca hispida*) from Qaanaaq in Northwest Greenland. *Sci Total Environ* 295, (1-3), 167-181, 2002
55. Inaba, T., Kobayashi, E., Suwazono, Yasushi., Uetani, M., Oishi, Mitsuhiro., Nakagawa, H., Nogawa, K.: Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicol Lett* 159, (2), 192-201, 2005
56. Vahter, Marie., Åkesson, A., Lidén, C., Ceccatelli, S., Berglund, M.: Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ Res* 104, (1), 85-95, 2007

57. Li, Z., Jansen, M., Pierre, S-R., Figueiredo-Pereira, M.E.: Neurodegeneration: linking ubiquitin/proteasome pathway impairment with inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, (5), 547-552, 2003
58. Baldwin, D.R., Marshall, W.J.: Heavy metal poisoning and its laboratory investigation. *Ann Clin Biochem* 36, 267-300, 1999
59. Nogueira, C.W., Soares, F.A., Nascimento, P.C., Muller, D., Rocha, J.B.T.: 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinatase. *Toxicology* 184, (2-3), 85-95, 2003
60. Il'yasova, D., Schwartz, G.G.: Cadmium and renal cancer. *Tox App Phar* 207, (2), 179-186, 2005
61. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D.: Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, (2-3), 95-117, 2003
62. Waalkes, M.P.: Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem* 79, 241-244, 2000
63. Bertin, G., Averbek, D.: Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (review). *Biochimie* 88, (11), 1549-1559, 2006
64. Bergendi, L., Beneš, L., Ďuračková, Z., Ferenčík, M.: Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65, (18-19), 1865-1874, 1999
65. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, Jan., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, (1), 44-84, 2007
66. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact* 160, (1), 1-40, 2006
67. Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A.: Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 10, (6), 141-7, 2004
68. Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., Paules, R.S.: Oxidative Stress And Cell Cycle Checkpoint Function. *Free Radical Biology & Medicine* 28, (9), 1387-1404, 2000
69. Hamilton, R.J., Kalu, C., Prisk, E., Padleyb, F.B. & Pierceb, H.: Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chem* 60, (2), 193-199, 1997
70. Jensen, S.J.K.: Oxidative stress and free radicals. *J Mol Struc-Theochem* 666-667, 387-392, 2003
71. Szabo, C.: Role of poly(ADP-ribose) synthase in inflammation. *Eur. J. Pharmacol* 350, 1-19, 1998 (Abstract)
72. Kasprzak, K.S.: Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radical Bio Med* 32, (10), 958-967, 2002
73. Berger, M.M.: Can oxidative damage be treated nutritionally?. *Clin Nutr* 24, 172-183, 2005
74. Culotta, V.C., Yang, M., O'Halloran, T.V.: Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763, (7), 747-758, 2006
75. Szaleczky, E., Prechl, J., Fehér, J., Somogyi, A.: Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus - a rational approach. *Postgrad Med J* 75, 13-17, 1999
76. Bajpai, P., Anil Tripathi, K., Agrawal, D.: Increased frequencies of glutathione-S-transferase (GSTM1 and GSTT1) null genotypes in Indian patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia Res*, In Press, Corrected Proof, 2007
77. Sorg, O.: Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies* 327, (7), 649-662, 2004

78. Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, A.I., Spanos, M.: trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties *Food Control* 17, (9), 700-706, 2006
79. Signorelli, P., Ghidoni, R.: Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16, (8), 449-466, 2005
80. Soleas, G.J., Diamandis, E.P. and Goldberg, D.M.: Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone?. *Clin Biochem* 30, (2), 91-113
81. Tokuşoğlu, Ö., Unal, M.K., Yemiş, F.: Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem* 53, (12), 5003-9, 2005
82. <http://www.resveratrol.org.uk/resveratrol.gif>. Erişim tarihi: 11.05.2007
83. <http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schroeder/Resveratrol.html>. Erişim tarihi: 11.05.2007
84. Jannin, B., Menzel, M., Berlot, J-P., Delmas, D., Lançon, A., Latruffe, N.: Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol* 68, (6), 1113-1118, 2004
85. Piver, B., Fer, M., Vitrac, X., Merillon, J-M., Dreano, Y., Berthou, F., Lucas, D.: Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 68, (4), 773-782, 2004
86. Vitaglione, P., Sforza, S., Galaverna, G., Ghidini, C., Vescovi, N.C.P.P., Fogliano, V., Marchelli, R.: Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res* 49, 495-504, 2005
87. Wang, D., Hang, T., Wu, C., Liu, W.: Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B* 829, (1-2), 97-106, 2005
88. Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M.: Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agr Food Chem* 50, 2731-2741, 2002
89. De Lorgeril, M., Salen, P., Paillard, F., Laporte, F., Boucher, F., De Leiris, J.: Mediterranean diet and the French paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 54, (3), 503-515, 2002
90. Sun, A.Y., Simonyi, A., Sun, G.Y.: The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Bio Med* 32, 4, 314-318, 2002
91. Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.-H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Haris, G.K., Shi, X.: Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Bioph Res Co* 309, (4), 1017-102, 2003
92. Lee, S.R., Kwak, J.H., Kim, H.J., Pyo, S.: Neuroprotective effects of kobophenol A against the withdrawal of tropic support, nitrosative stress, and mitochondrial damage in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett* 17, (7), 1879-1882, 2007
93. Anekonda, T.S.: Resveratrol—A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 52, (2), 316-326, 2006
94. Sinclair D.A., Baur1, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, A.H., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, J.P., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Couteur, D.L., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., Cabo, R.D.: Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, (16), 337-342, 2006
95. Belguendouz, L., Frémont, L., Gozzelino, M.T.: Interaction of Transresveratrol with Plasma Lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 55, (6), 811-816, 1998

96. Rodrigo, R., Bosco, C.: Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney- A review. *Com Biochem Phys A* 142, 317-327, 2006
97. Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., May, M.E., Gharbi, N., Kamoun, A., El-Fazaâ, S.: Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 80, (11), 1033-1039, 2007
98. Günther, S., Ruhe, C., Derikito, M.G., Böse, G., Sauer, H., Wartenberg, M.: Polyphenols prevent cell shedding from mouse mammary cancer spheroids and inhibit cancer cell invasion in confrontation cultures derived from embryonic stem cells. *Cancer Lett* 250, (1), 25-35, 2007
99. Kuo, P.-L., Chiang, L.-C., Lin, C.-C.: Resveratrol- induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci* 72, (1), 23-34, 2002
100. Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., Kim, A.L.: Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharm*, In Press, Corrected Proof, Available online 3 January 2007
101. Henry, L.A., Diane M.W.: Resveratrol: Phytoestrogen Effects on Reproductive Physiology and Behavior in Female Rats. *Horm Behav* 41, (2), 220-228, 2002
102. Nicolas, A., Suranganie, D.: Resveratrol and Estradiol Exert Disparate Effects on Cell Migration, Cell Surface Actin Structures, and Focal Adhesion Assembly in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *Neoplasia* 7, (2), 128-140, 2005
103. Pace-Asciak, C.R., Hahn, S., Diamandis, E.P., Soleas, G., Goldberg, D.M.: The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta* 235 (2), 207-219, 1995. (Abstract)
104. Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A., Oleszek, W.: Inhibition of blood platelet adhesion and secretion by different phenolics from *Yucca schidigera* Roezl. Bark. *Nutrition* 21, (2), 199-206, 2005
105. Kiziltepe, U., Nilufer, N., Turan, D., Han, U., Ulus, A.T., Akar, F.: Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg* 40, (1), 138-145, 2004
106. Chen, C.K., Pace-Asciak, C.R.: Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *General Pharmacology: The Vascular System* 27, (2), 363-366, 1999, (Abstract)
107. Murias, M., Handler, N., Erker, T., Pleban, K., Ecker, G., Saiko, P., Szekeres, T., Jäger, W.: Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship. *Bioorgan Med Chem* 12, (21), 5571-5578, 2004
108. Filip, V., Plocková, M., Midrkal, J., Píková, Z., Melzoch, K., Schmidt, K.: Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chem* 83, (4), 585-593, 2003
109. Man, M., Chan, Y.: Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol* 63, (2), 99-104, 2002
110. Docherty, J., Fu, M.M., Tsai, M.: Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 243-244, 2001
111. Mahady, G.B., Pendland, S.L., Chadwick, L.R.: Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of *CagA+* strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *The American Journal of Gastroenterology* 98, (6), 1440-1441, 2003
112. Docherty, J.J., Fu, M.M., Hah, J.M., Sweet, T.J., Faith, S.A., Booth, T.: Effect of resveratrol on herpes simplex virus vaginal infection in the Mouse. *Antivir Res* 67, (3), 155-162, 2005
113. Crowell J.A., Korytko, P.J., Morrissey, R.L.: Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 82, (2), 614-619, 2004

- 114.** Jamall, I.S., Smith, J.C.: Effects of cadmium on glutathione peroxidase, süperoxide dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: A possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharm* 80,33-42, 1985
- 115.** Sedlak, J., Lindsay, R.H.: Estimation of total protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem* 25, 192-205, 1968
- 116.** Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y.: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34, (3), 497-500, 1988
- 117.** Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Rondall, J.R.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275, 1951
- 118.** Dudley, R.E., Svoboda, D.J., Klaassen, C.D.: Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol Appl Pharm* 65, (2), 302-313, 1982 (Abstract)
- 119.** Margeli, A.P., Theocharis, S.E., Spiliopoulou, C., Horti, M., Koutselinis, An.: Hepatic stimulator substance administration affects cadmium-induced hepatotoxicity in the rat. *International Hepatology Communications* 5, (2), 128-134, 1996 (Abstract)
- 120.** El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S., Baghdadi, H.H.: Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene. *Food Chem Toxicol* 42, (10), 1563-1571, 2004
- 121.** Şener, G., Toklu, H.Z., Şehirli, A.Ö., Velioglu-Ögünç, A., Çetinel, S., Gedik, N.: Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol Res* 35, (1), 62-68, 2006 (Abstract)
- 122.** Eybl, V., Kotyzová, D., Bludovská, M.: The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. *Toxicol Lett* 151, (1), 79-85, 2004
- 123.** Yalin, S., Comelekoglu, Ulku., Bagis, S., Sahin, N.O., Ogenler, O., Hatungil, R.: Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *Ecotox Environ Safe* 65, (1), 140-144, 2006
- 124.** Casalino, E., Calzaretto, G., Sblano, C., Landriscina, C.: Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179, 37-50, 2002
- 125.** Casalino, E., Valzaretto, G., Sblano, C., Landriscina, V., Felice Tecce, M., Landriscina, C.: Antioxidant effect of hydroxytyrosol (DPE) and Mn^{2+} in liver of cadmium-intoxicated rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 625-632, 2002
- 126.** Ognjanović, B.I., Marković, S.D., Pavlović, S.Z., Zikić, R.V., Stajin, A.S., Saičić, Z.S.: Combined effects of coenzyme Q10 and Vitamin E in cadmium induced alterations of antioxidant defense system in the rat heart. *Environ Toxicol Phar* 22, 219-224, 2006
- 127.** El-Sharakly, A.S., Newairy, A.A., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M., Sheweita, S.A.: Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats *Toxicology* 235, (3), 185-193, 2007
- 128.** Pari, L., Murugavel, P.: Role of diallyl tetrasulfide in ameliorating the cadmium induced biochemical changes in rats. *Environ Toxicol Phar* 20, (3), 493-500, 2005
- 129.** Li, Y., Cao, Z., Zhu, H.: Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res* 53, (1), 6-15, 2006
- 130.** Ogjanovic, B.I., Pavlovic, S.Z., Maletic, S.D., Zikic, R.V., Stajin, A.S., Radojicic, R.M., Saicic, Z.S., Petrovic, V.M.: Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium, *Physiol. Rev.* 52, 563-570, 2003

10. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Malatya'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya'da tamamladım. 2000 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden mezun oldum. 2005 yılı bahar döneminde İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilimdalında yüksek lisans öğrenimine başladım. Halen aynı enstitüde yüksek lisans öğrenimime devam etmekteyim.