

***İN VİTRO* ŞARTLARDA KADMIYUMUN
OLUŞTURDUĞU GENETİK VE OKSİDATİF
HASARA KARŞI *DERMATOCARPON İNTESTİNIFORME*
(LİKEN) EKSTRELERİNİN ETKİSİ**

Adem GÜNER

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ
2011
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***İN VİTRO* ŞARTLARDA KADMIYUMUN OLUŞTURDUĞU
GENETİK VE OKSİDATİF HASARA KARŞI *DERMATOCARPON*
İNTESTİNIFORME (LİKEN) EKSTRELERİNİN ETKİSİ**

Adem GÜNER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU



**İN VİTRO ŞARTLARDA KADMIYUMUN OLUŞTURDUĞU GENETİK VE
OKSİDATİF HASARA KARŞI *DERMATOCARPON İNTESTİNIFORME* (LİKEN)
EKSTRELERİNİN ETKİSİ**

Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Adem GÜNER tarafından hazırlanan bu çalışma 07/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.


Başkan : Doç. Dr. Fatime GEYİKOĞLU

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Ali ASLAN

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza : 

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***İN VİTRO* ŞARTLARDA KADMIYUMUN OLUŞTURDUĞU GENETİK VE OKSİDATİF HASARA KARŞI *DERMATOCARPON İNTESTİNIFORME* (LİKEN) EKSTRELERİNİN ETKİSİ**

Adem GÜNER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Kadmiyum (Cd) birçok organda ciddi hasarlara yol açan ve önemli metabolik süreçleri etkileyen tehlikeli ağır metallerden biridir. Cd'nin DNA hasarlarını ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu (ROS) teşvik ettiği iyi bilinmektedir. Çeşitli antioksidanların (C vitamini, E vitamini ve N-asetil-L-sistein vb) Cd toksisitesine karşı koruyucu olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan, likenlerin başta antimikrobiyal ve antioksidant özellikleri olmak üzere farklı biyolojik aktiviteleri uzun zamandan beri popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır. Mevcut çalışmada, insan tam kan kültürlerinde genotoksik ve oksidatif hasarlara yol açan kadmiyum klorit (CdCl₂)'e (30 ppm) karşı eş zamanlı olarak uygulanan *D.intestiniforme* liken ekstrelerinin (25 ve 50 ppm) koruyucu role sahip olup olmadığı araştırıldı. Oksidatif etkileri belirlemek için biyokimyasal parametreler (Toplam antioksidan kapasite [TAK] ve Toplam oksidatif durum [TOD]) değerlendirildi. Ayrıca, genotoksik etkilerin değerlendirilmesi için Mikroçekirdek (MÇ) testi kullanılmıştır. İlaveten sitotoksite tayini, çekirdek bölünme indeksi (ÇBİ) kullanılarak yapılmıştır. Cd'nin eritrositlerde sebep olduğu oksidatif hasarlar liken ekstrelerinin varlığında azaltılabildi. Benzer şekilde, CdCl₂ ve liken ekstreleri ile eş zamanlı olarak muamele edilen kültürlerde gözlenen MÇ sıklığının, tek başına CdCl₂ eklenen gruplara oranla azaldığı tespit edildi (P<0.05). Bulgularımız, *D. intestiniforme*'nin antioksidan ve/veya detoksifiye özelliğine bağlı olarak Cd tarafından oluşturulan genetik ve oksidatif hasarı azaltabildiğini ilk kez ortaya koydu.

2011, 50 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Dermatocarpon intestiniforme*, oksidatif stres, kadmiyum, periferik insan kan kültürü, genotoksisite

ABSTRACT

MS Thesis

THE *IN VITRO* EFFECTS OF *DERMATOCARPON INTESTINIFORME* (A LICHEN) EXTRACTS AGAINST CADMIUM INDUCED GENETIC AND OXIDATIVE DAMAGE

Adem GÜNER

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Cadmium (Cd) is one of the most harmful heavy metals and influences important metabolic processes causing serious damages in many organs. It is well known that Cd could provoke generation of reactive oxygen species (ROS) and DNA damage. Some antioxidants (such as vitamin C, vitamin E and N-acetyl-L-cysteine) have been used as protectors against cadmium-induced toxicity. On the other hand, lichens have long been investigated for biological activities; mainly antimicrobial and antioxidant activities. In this study, we aimed to determine whether *D. intestiniforme* extracts (25 and 50 ppm) conferred a protection against cadmium chloride (CdCl₂) (30 ppm) induced genetic and oxidative damage in human whole blood cultures. Biochemical parameters (total antioxidant capacity [TAC] and total oxidative status [TOS]) were examined to determine oxidative effects. The micronucleus (MN) test was used for analysing genotoxic influences. In addition nuclear division indeks (NDI) was used to determine cytotoxicity. Oxidative damage by CdCl₂ in erythrocytes decreased with application of lichen extracts. Similarly, the positive effect of lichen extracts in decreasing the incidence of MN in comparison with an unprotected level was attained when cultures were treated simultaneously with CdCl₂ and the extracts (P<0.05). The findings of this study firstly revealed that *D. intestiniforme* modulated Cd-induced genetic and oxidative damage in human blood cultures due to its antioxidant and/or detoxifying nature.

2011, 50 papes

Keywords: *Dermatocarpon intestiniforme*, oxidative stress, cadmium, peripheral human blood culture, genotoxicity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren her yönden sonsuz destek ve yardımlarını aldığım, tez konumun belirlenmesi ve çalışmalarının yapılmasında değerli tecrübe ve bilgileriyle bana yol gösteren değerli hocam ve danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında çalışma materyalimin temin edilmesinde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Ali ASLAN'a ve tez çalışmalarını yürüttüğüm Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım ve tezin yazım sürecinde yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım Elanur AYDIN'a ve Sönmez İNCE'ye teşekkür ederim.

Hayat boyu destek ve teşvikleriyle bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan babam Aziz GÜNER'e, annem Ayşegül GÜNER'e, kardeşlerime ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Ars.Gör. Özlem ÖZÇEREZCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ars.Gör. Adem GÜNER

Haziran 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Metaller.....	1
1.1.1. Ağır metaller	2
1.1.2. Kadmiyum	5
1.1.2.a. Kadmiyumun kullanım alanları.....	5
1.1.2.b. Kadmiyum toksitesi	6
1.2. Oksidatif Stres.....	9
1.3. Genotoksisite	11
1.3.1. Kardeş-kromatid değişimi testi (KKD)	11
1.3.2. Kromozom aberasyonları testi (KA).....	12
1.3.3. Mikroçekirdek testi (MÇ).....	12
1.4. Likenler.....	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kan örneklerinin alınması ve kültürlerin kurulması	25
3.1.2. Liken ekstresinin hazırlanışı	25
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	26
3.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar	26
3.1.5. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	27
3.2. Yöntemler	28
3.2.1. Genotoksisite testleri	28
3.2.2. Sitotoksisite tayini.....	29

3.2.3. Biyokimyasal analizler	29
3. 3. Fotoğrafik İşlemler	31
3.4. İstatiksel İşlemler	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4.1. Genetik Bulgular	32
4.2. Sitotoksisite Bulguları	34
4.3. Biyokimyasal Bulgular	34
5. TARTIŞMA	36
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde konsantrasyon
cm ³	Santimetre küp
g	Gram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
kg	Kilogram
M	Metre
M	Molarite
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Ng	Nanogram
Ppm	Milyonda bir birim

Kısaltmalar

BHA	Bütillenmiş hidroksianizol
CAT	Katalaz
CBMN	Sitokinesis Blok Mikroçekirdek
Cd	Kadmiyum
CdCl ₂	Kadmiyum klorit
Cyt-B	Sitokalsin-B
ÇBİ	Çekirdek bölünme indeksi
DNA	Deoksiribonükleik asit
FISH	Floresans in situ hibridizasyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon

IARC	International Agency for Research on Cancer
KA	Kromozom aberasyonları
KKD	Kardeş-kromatid değişimi
LPO	Lipit peroksidasyonu
MÇ	Mikroçekirdek
MDA	Malondialdehit
MMR	Mismatch tamir sistemi
MNCE	Normo kromatik eritrosit
MPCE	Mikronükleotid polikromatik eritrosi
MT	Metallotionein
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Süperoksit radikalleri
TAK	Toplam antioksidan kapasitesi
TOD	Toplam antioksidan durum
TrxR	Thioredoksin redüktaz
9-AA	9-Aminoakridin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Serbest Radikal Kaynakları	10
Şekil 1.2. MÇ Oluşum Mekanizması ve Farklı Tiplerde Mikroçekirdek Oluşumları.....	14
Şekil 4.1. <i>Dermatocarpon intestiniforme</i> Liken Ekstrelerinin (50 ppm) Uygulanan İnsan Lenfosit Hücrelerinde Örnek Çift Çekirdekli Hücre Fotoğrafı.....	33
Şekil 4.2. CdCl ₂ (30 ppm) Uygulanan İnsan Lenfosit Hücrelerinde Örnek Çift Çekirdekli Hücre Fotoğrafı (1000 x)	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Çeşitli Endüstri Uygulamalarından Kaynaklanan Atık Metal Türleri	3
Çizelge 1.2. Ağır Metallerin Topraktaki Değerleri	4
Çizelge 1.3. Ağır Metal Toksisitesinde Rol Oynayan Faktörler	4
Çizelge 3.1. Araştırmalar Esnasında Kullanılan Aletler ve Cihazlar	27
Çizelge 4.1. <i>In Vitro</i> Koşullarda <i>Dermatocarpon intestiniforme</i> ve Cd Uygulamalarının MÇ Frekansına Etkileri	32
Çizelge 4.2. <i>In Vitro</i> Koşullarda <i>Dermatocarpon intestiniforme</i> ve Cd Uygulamalarının ÇBİ Oranına Etkileri.....	34
Çizelge 4.3. <i>In Vitro</i> Koşullarda <i>Dermatocarpon intestiniforme</i> ve Cd Uygulamalarının TAK ve TOD Düzeylerine Etkileri	35

1.GİRİŞ

1.1. Metaller

Metal kelimesi genel olarak, elektrik ve ısıyı iletme özelliğine sahip maddelere verilen isimdir. Günlük yaşantımızda sürekli etkileşimde olduğumuz yaklaşık 35 metal vardır ve bunların 23 tanesi (mangan, civa, nikel, platin, gümüş, tellür, talyum, kalay, kadmiyum, vanadyum ve çinko) ağır metal veya ağır elementler diye adlandırılır (Sienko 1983; Glanze 1996).

Periyodik tablodaki 105 elementin yaklaşık 80'ini metaller oluşturur ve bunların 30 kadarının insanlarda toksisite oluşturduğu bilinmektedir. Özellikle mesleki ve çevresel maruziyet sebebiyle kadmiyum (Cd), alüminyum (Al), kurşun (Pb), civa (Hg), ve manganez (Mn)'in biyolojik sistemler üzerinde ciddi sağlık sorunlarına yol açtığı gözlenmiştir. Metallerin diğer toksik maddelerden ayrılan en önemli özellikleri, insanlar tarafından hem oluşturulamaması hem de yok edilememesidir (Mason 1991; Dudal 2006).

Paracelsus doğada bulunan tüm maddelerin aynı zamanda toksik özelliği olan bir zehir olduğunu ayrıca, maddelerin toksik özelliği ile tedavi edici özelliği arasındaki farkı insan vücudundaki miktarının belirlediğini ifade etmiştir (Selinus vd 2005). Toksisite oluşumunda; doz, maruziyet yolu, maruziyet süresi ve maruziyet sıklığı önemli olduğu kadar, maruz kalınan maddenin kimyasal şekli, diğer kimyasallarla etkileşimi gibi etkenler ile yaşam biçimi, bağışıklık sistemi ve türe ait özellikler de toksisiteyi değiştirebilir (Goyer and Clarkson 2001). Metaller 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 etkileri görülür (Dudal 2006). Metallerin kimyasal formunun da, hedef organ seçiminde önemli bir rolünün olduğu gözlenmiştir. Kısa ve uzun süreli maruziyette metallerin

doku ve organlar üzerinde farklı etki gösterdikleri rapor edilmektedir. Akut maruziyette merkezi sinir sistemi, akciğer, böbrek ve karaciğerde ciddi hasar oluşumu gözlenmiştir. Kronik maruziyette ise; Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve kas distrofisi gibi ciddi patolojiler gözlenirken, ilerleyen süreçte kanser oluşturma riskinin de arttığı tespit edilmiştir (Birmingham and Key 1963; Lagrega 2004; Lizon *et al.* 2004).

Metallerin toksisite ve karsinojenite mekanizmasının bir parçası olarak; oksijen ve azot radikallerini üreterek ya da tiyol ve azot grubu taşıyan moleküllerle veya iz elementlerle etkileşerek antioksidan sistemlerin etkinliklerini azalttığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak hücre içinde DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve proteinlerde değişiklikler oluşturarak hücrelerin fonksiyonlarını bozdukları tespit edilmiştir (Leonard *et al.* 2004).

1.1.1. Ağır metaller

Ağır metaller, canlı bünyesine girdiği zaman toksik etki oluşturan, periyodik cetvelin, üçüncü ya da daha yüksek periyodunda bulunan (yoğunluğu 5 g/cm³'den büyük olan) hem iz veya eser elementler için hem de metaller için kullanılan terimdir. Fiziksel açıdan sıvı, katı ve gaz halde bulunabilirler (Gündüz vd 1998; Nies 1999).

Ağır metaller; altın işlemede, boya pigmentlerinin yapımında, çömlek sırlamalarında, mürekkep, saç boyası, plastiklerin, pestisitlerin ve ilaçların yapımında, pil, alaşımlar, benzeri ve metal parçalar, tekstil boyları, çelik elektrolizle olarak da endüstriyel uygulamalarda ve parenteral beslenme karışımlarında, krom ile dozaj radyolojik işlemler sırasında galyumun direkt enjeksiyonu ve x-ray cihazı gibi tıbbi uygulamalarda kullanılır. Ağır metaller çevreye; üretildiği, kullanıldığı ve son olarak da atıldığı yerlerden giriş yaparlar. Küçük miktarlarda, bazı ağır metaller (Mn, demir (Fe), bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi) yaşam için gerekli iken, Cd, nikel (Ni), civa (Hg) ve kurşun (Pb) gibi metallerin yaşam için gerekli olmadığı bilinmektedir (Heinmann 1980; Wayne and Ming-Ho 1999). Eser miktarlarda bile toksik olan bu elementler, su ve toprak ortamında düşük derişimlerde bile canlı organizmalara zarar verebildiği ve hatta ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (Sharma and Forster 1994; Aksoy *et al.* 1999).

Ağır metallerin çevreye yayılımları ele alındığında, jeolojik ve biyolojik çevirilerle metallerin emisyonu uğradığı yerlerden daha da uzaklarda biriktiği gözlenmiştir (Karakas 2000). Bu çevirilerden ziyade insan aktivitelerinin, bu zehirlerin çevreye yayılımında özellikle de endüstriyel alanlardaki çimento, demir-çelik, termik santraller, cam, çöp ve atık çamur yakma tesislerin artışına paralel pek çok ağır metalin çevremizde konsantrasyonlarının artışında daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Vahter *et al.* 2002). Ağır metallerin yol açtığı zararlar öncelikle meslek hastalıkları sorunları olarak düşünülmüş daha sonra toprak ve su kaynaklarının kirliliğinin artmasıyla toksik etkileri daha yaygın olarak ele alınmaya başlamıştır (Rether 2002).

Çizelge 1.1. Çeşitli Endüstri Uygulamalarından Kaynaklanan Atık Metal Türleri (Kahvecioğlu vd 2009)

Endüstri Kolu	Ağır Metal Türleri							
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-Alkali Üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	+	-	+
Demir-Çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+
Termik Santraller	+	+	+	+	+	+	+	+

Ağır metal kontaminasyonu çevremizde çok geniş bir alanda etkili olmaktadır (Nriagu 1990). Bunlar sedimentte, temiz su kaynaklarında ve deniz suyunda özellikle de toprakta (katı atıklarla, kirli sularla veya fosfatlı gübrelerle) birikerek ortam şartlarına bağlı olarak fauna ve flora bünyesine geçerek besin zincirini etkilemektedirler (Türkez 2004; Demirezen ve Aksoy 2005).

Doğal çevrimler sonucu yıllık ortalama 7.600 ton kadmiyum, 18.800 ton arsenik, 3.600 ton cıva, 332.000 ton kurşunun atmosfere karıştığı bilinmektedir. Ağır metallerin topraklarda sınır değerlerine ait değerler Çizelge 1.2’de gösterilmiştir (Türkez 2004).

Çizelge 1.2. Ağır Metallerin Topraktaki Değerleri

Ağır Metal	Toprakta Sınır Değeri (Kuru toprakta mg/kg)
Kurşun (Pb)	100
Kadmiyum (Cd)	3
Krom (Cr)	100
Bakır (Cu)	100
Nikel (Ni)	50
Cıva (Hg)	2
Çinko (Zn)	300

Ağır metaller, insanların tarım, ilaç, sanayi, endüstri atıklarıyla teması sırasında yiyecek, su, hava gibi yollarla ağız veya deri yoluyla insan vücuduna girmesi ve vücut tarafından atılamaması durumunda yumuşak dokularda birikerek toksik etkiler oluşturur. Ağır metaller canlı bünyelerde sadece konsantrasyonlarına bağlı olarak etki göstermezler, aynı zamanda etki canlı türüne ve metal iyonunun yapısına bağlıdır (Bigersson *et al.* 1988). Ağır metal toksisitesinde rol oynayan faktörler aşağıdaki tabloda (Çizelge 1.3) gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Ağır Metal Toksisitesinin Ortaya Çıkmasında Rol Oynayan Faktörler (Türkez 2004)

Element	Atom çapı, Değerlilik, Mobilite
Kimyasal form	Organik, İnorganik
Bileşik türü	Oksit, Tuzlar
Fiziksel form	Tanecik büyüklüğü, Çözünürlük
Konsantrasyon	Yüksek, Düşük
Süre	Akut, Kronik, Değişken
İnteraksiyonlar	Diğer metal ve bileşiklerle
Giriş yolu	Ağız, Deri, Solunum
Coğrafik şartlar	Rüzgar, Su, Taşıma, Kaynağa uzaklık
Besin zinciri	Bitkisel kullanım, Tarım, Avcılık

1.1.2. Kadmiyum

Günümüzde endüstride kullanımı gittikçe artan Cd, Stromeyer tarafından 1817 yılında Almanya'da keşfedilmiştir. Aynı zamanda Cd periyodik tabloda 2b grubunda bulunan orta sertlikte, gümüş beyazı renge sahip olan bir geçiş elementidir. Cd doğada genellikle saf halde bulunmaz. Bunun yerine kadmiyum sülfat veya sülfid, kadmiyum oksit, kadmiyum klorit şeklinde ve genelde çinko, bakır ve kurşun elementleriyle birlikte ince partiküller halinde yer alır. Atmosferde kadmiyum tuzları içerisinde en yoğun olarak kadmiyum oksit bulunur (Liu *et al.* 2002; Murugavel *et al.* 2007). Cd'nin neden olduğu çevre kirliliği günümüzde insan sağlığını tehdit eden bir unsur olarak görülmektedir (Méndez-Armenta and Rios 2007).

1.1.2.a. Kadmiyumun kullanım alanları

Cd, sanayi ve endüstrinin gelişmesiyle günümüzde pek çok alanda kullanılmaya başlanmış ve vazgeçilemez bir materyal haline gelmiştir. Cd'nin kullanıldığı başlıca alanlar aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır (Kirkham 2006; Murugavel *et al.* 2007);

- Cd özellikle birçok ortamda (deniz, alkali ortam) korozyonuna karşı dayanıklı olması nedeniyle alüminyum, demir, çelik, pirinç kaplamasında kullanılmaktadır.
- Nükleer reaktör koruyucu sistemlerinde, seramikçilikte, cam, boya maddesi, gübre ve plastik üretimi gibi endüstrinin çeşitli alanlarında da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.
- Sağlamlaştırıcı özelliğinden dolayı pencere profilleri gibi plastiklerin üretiminde Cd kullanılmaktadır. Fakat plastiklerde kadmiyum kullanımı, çevresel nedenlerden dolayı İsveç'te yasaklanmış, İsviçre'de sınırlandırılmıştır.
- Metal alaşımı hazırlanmasında koruyucu olarak kullanılmaktadır. Cam endüstrisi ve seramik yapımlarında, çinko, bakır ve kurşun cevherlerinin arındırılmasında, elektrolizle kaplama ve galvanizleme işlemlerinde paslanmayı önleyici, lastik tamiratında ve fotoğrafçılıkta da kullanılmaktadır.

- Cd bunlardan başka stabilizatör olarak plastik ve sentetik elyaf sanayinde, televizyon tüpleri ve floresan lamba yapımında da kullanılmaktadır.
- En önemli kullanım alanlarından biriside Ni-Cd, Ag-Cd, Hg-Cd pilleridir. Normal Ni-Cd pilleri günlük hayatta kullanılan elektronik cihazlarda, büyük kapasiteli olanları ise uçak ve gemilerde geniş bir tüketim alanı bulmuştur.

1.1.2.b. Kadmiyum toksitesi

Kanser oluşturma etkinliklerine göre kimyasal maddeler, International Agency for Research on Cancer (IARC) tarafından sınıflandırılmış ve Cd akciğer kanseriyle olan ilişkisinden dolayı 1.grup karsinojenler arasında gösterilmiştir. Cd, güçlü toksik etkilerinden dolayı günümüzde “modern toksik metal” olarak da adlandırılmaktadır. Bu toksik etkinin temel nedeni ise, Cd'nin enzim ve diğer proteinlerin tiol (-SH) grupları için aşırı ilgi göstermesi ve aktivitelerini engellemiş olmasıdır (Mengel and Kirkby 1979; Liu *et al.* 2002).

Cd maruziyeti, daha çok oral yolla veya solunum yoluyla gerçekleşmektedir. Deri yoluyla maruziyetin toksisiteye yol açacak düzeyde olmadığı rapor edilmiştir (Lauwerys 1986). Cd solunum yoluyla %15-50 oranında emilirken, bu oran sindirim yoluyla %2-7'e kadar düşmektedir. Hedef organlar ise karaciğer, plasenta, böbrek, beyin ve kemiklerdir. Cd birçok metale kıyasla %20'lik gibi yüksek bir oranla vücutta absorbe edilemiyor olsa bile kısa süreli olarak 0,05 mg/kg Cd alınımı mide rahatsızlıklarına neden olurken, 14 günden daha uzun süreli maruziyette (0,005 mg/kg/gün) böbrek ve kemiklerde önemli problemlere neden olmaktadır (Kahvecioğlu vd 1999).

Karaciğer ve kandan süzülen Cd'nin % 70'i böbreklerin proksimal tübüleri tarafından alınır ve bunların hasar görmesiyle kandan asitleri uzaklaştırma fonksiyonları yok edilmiş olur. Böbrek korteksinde Cd birikimi sonucunda ilk olarak Na^+ glikoz ve Na^+ aminoasit taşıyıcı proteinleri baskılanırken, ikincil olarak bazolateral $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesini azaltarak, glikoz ve aminoasitlerin proksimal tübül hücrelerinin luminal tarafından geri emilimini azaltır. Geri dönüşümsüz olarak fosfat seviyelerinde düşmeye

yol açar (*hypophosphatemia*). Bu fonksiyon bozukluğu, kanda yüksek asit birikimi sonucu eklemlerde ürik asit kristalleri birikir ve eklem iltihaplanmalarının bir şekli olan gut hastalığına sebep olurlar. Bir diğer etki ise kanda klorid seviyeleri düşmesiyle (*hyperchloremia*) böbreklerde %30 oranında bir küçülmenin olmasıdır (Tsuruoka *et al.* 2000; Göktaş 2007).

Cd toksisitesinde karaciğer ve parankiması hedef organdır. Bunun nedeni tiyol gruplarınca zengin ve düşük molekül ağırlıklı metal bağlama özelliğine sahip olan metallothionein (MT) proteinlerinin karaciğerde sentezlenmesidir. Cd maruziyetinde hepatositlerde reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin meydana gelmesi için birçok mekanizma rol oynar. Cd, katalaz (CAT) ile süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini bozarak antioksidan savunma sistemine zarar verir ya da hücresel glutatyon (GSH) düzeyini azaltır. Cd aktif metallerle (Fe ve Cu) yer değiştirerek, reaktif oksijen türlerinin üretimi ile bunların serbest hale gelmesini sağlar veya mangan- SOD ve CAT'ı kodlayan genlerin ekspresyonunu da baskırlar. Ayrıca Cd, ksantinoksidazın (oksijenin redüksiyonu ve süperoksit radikalının oluşumu) aktivasyonundan sorumlu solunum zinciri bileşenlerini ve mitokondri membran içeriğini değiştirerek oksidatif hasara neden olur (Coyle *et al.* 2000; Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2001; Liu *et al.* 2002; Göktaş 2007).

Cd'nin, beyin hücrelerinde de reaktif oksijen türlerine aşırı ilgi gösterdiği rapor edilmiştir. Fakat Cd, kan-beyin bariyerinin koruyucu özelliği nedeniyle beyin parankimasına kolaylıkla geçemez. Serbest reaktif oksijen türlerinin üretimi, Fas reseptörlerinin ekspresyonunu arttırarak membran lipidlerin yıkımına yol açar ve bariyerin geçirgenliğini arttırır. Mitokondri kardiyolipinin hasarı sonucunda sitokrom C hücre içine girer ve hücreyi apoptozise ve nekrozise götüren mekanizmaların aktive edilmesini sağlar. Beyinin parietal korteks, striatum ve serebellum gibi bölgelerinde lipid peroksidasyonuna neden olduğu da gözlenmiştir (Shukla *et al.* 1996).

Kronik Cd zehirlenmeleri genel olarak düşük dozda ve uzun süre Cd toz ya da buharlarının solunması ya da kontamine yiyecek ve içeceklerin alınmasıyla meydana

gelir ve en önemli etkisi özellikle akciğer ve prostat kanseridir (Kahvecioğlu vd 1999). Cd ile kronik zehirlenmelerde böbrek hasarı ortaya çıkar ve idrarda düşük moleküllü protein görülür. Organizmaya aşırı dozda Cd girişı (60-480 mg/g) böbrekler üzerinde tahrip edici etkinin ortaya çıkmasına yol açar ve bu etki kuşlarda dahil olmak üzere tüm canlılarda görülür. 1946 yılında Japonya’da Jintu nehri civarında ve Japonca’da acı anlamına gelen “*İtai İtai*” olarak adlandırılan bir hastalık kronik Cd maruziyeti sonucu osteomalazi ve osteoporozis gibi kemiklerde olağandışı değişiklikler ile renal fonksiyon bozukluklarının birlikte seyrettiği klinik bir vakaya yol açmıştır (Kobayashi *et al.* 2002).

Cd’nin karsinojenik mekanizması tam açıklanamamış olmakla birlikte bu mekanizmanın doğrudan yada dolaylı olarak DNA ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Doğrudan ilişkide Cd DNA ile kovalent bağlanmış iken, dolaylı ilişkide Cd, sülfidril gruplarına ve DNA bazlarına bağlanır. DNA-protein ve DNA-amino asit çapraz bağı deformasyonu ile DNA’da oksidatif hasar, hücrel oksidanlar serbest radikallerde artışlara neden olmaktadır (Rojas *et al.* 1999; Kasprzak 2002).

Cd dolaylı olarak antioksidan düzeyini azaltmakta ve intrasellüler hidrojen peroksit artışına sebep olmaktadır. Hidrojen peroksit artışı Fe ve Cu aracılığıyla redoks reaksiyonlarını kataliz etmekte, oluşan serbest radikaller DNA ile çapraz bağlar yapmakta ve lipid peroksidasyonunu tetiklemektedir. Cd’nin serbest radikal ürettiği gözlenmemiş olup, ancak uygulamadan hemen sonra dokularda lipid peroksidasyonu artışı gözlenmiştir (Aksoy 1999).

Cd, genel olarak proto-onkogenler olarak bilinen AP-1 ailesinden; c-myc, c-fos ve c-jun, çabuk uyarı genleri ile MT’yi uyararak, GSH ve ısı şok proteinlerini kodlayan stres yanıt genlerinin ekspresyonunu artırır. 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 yolları kullanarak apoptozisi indükler ve p53 genini inaktive eder. Sonuçta DNA zincirinde kırılmaya neden olur ve DNA sentezini baskılar. Hücre içinde serbest radikallerin üretimini

artırarak ve hücrel antioksidan sistemleri etkileyerek kansere yol açmaktadır (Waalkes 2000; Waisberg *et al.* 2003; Il'yasova and Schwartz 2005).

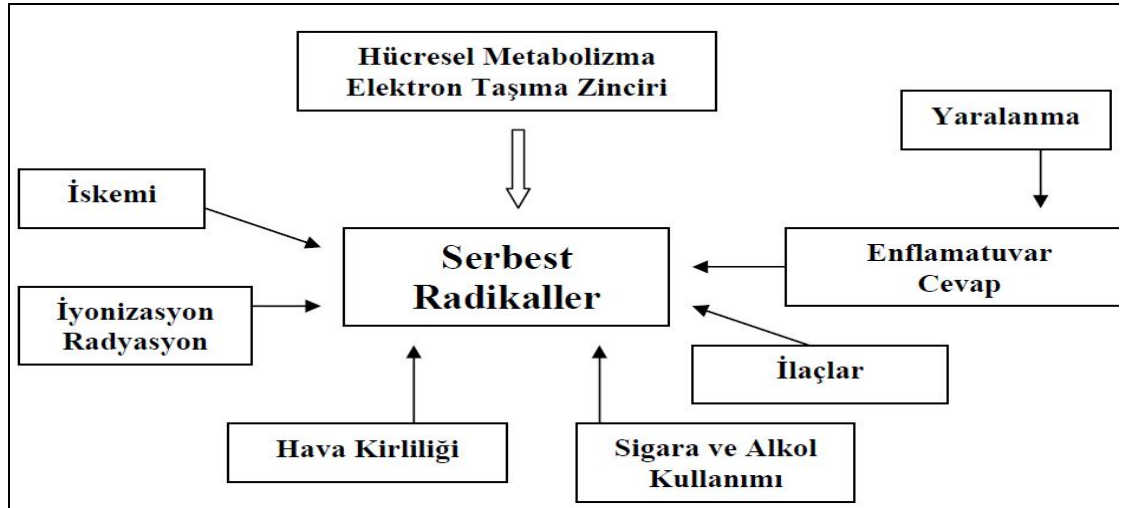
Uzun süreli mesleki maruziyette Cd karsinojenitesi, akciğer ve prostat kanserlerine, testis ile hematopoietik sistem tümörlerine ve leydig hücre adenomlarına neden olurken, memeli hücrelerinde sitotoksositeye, Cd-DNA bağlanma aracılığı ile sülfidril ihtiva eden proteinlerin inhibisyonu ile reaktif oksijen çeşitlerinin indüklenmesine, kromozomal anomaliye ve mutajeniteye yol açtığı gözlenmiştir (Waalkes *et al.* 1988).

Salmonella ve *E. coli*'de yapılan önceki çalışmalarda Cd'nin kanserojenik etkili olmadığı düşünülmesine rağmen, sonraki hücre çalışmaları Cd'nin biyolojik yarıömrü yaklaşık 10-30 yıl arası olduğu için, maruziyet bitse de karsinojenik etki göstererek, mutasyonu tetiklediği, DNA zincirlerini kırdığı ve kromozomal defektlere neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Cd, hasar gören genlerin tamir mekanizmalarını da inhibe ederek genotoksik etkiyi arttırmaktadır (Misra *et al.* 1998; Cooke *et al.* 2006).

1.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller, ilk defa 1900 yılında Gomberg tarafından keşfedilmiş olup, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip, hücre metabolizmasındaki tepkimeler esnasında ortaya çıkan ve diğer biyolojik materyaller ile tepkimeye girme eğilimi olan oldukça etkin atom veya moleküller olarak tanımlanmıştır (Gilbert and Colton 2002; Von Sonntag 2006). Serbest radikal tepkimelerinde, insan vücudundaki tüm hücrelere kolaylıkla girebilen ve radikal yapısıyla en çok kullanılma özelliğine sahip olan O_2 , H_2O_2 , OH ve geçiş metal iyonları ile LPO (lipit peroksit) üzerine etki oluşturup, SOR (serbest oksijen radikalleri) biyokimyasında önemli rol oynarlar (Burdon 1994; Valko *et al.* 2006). Canlılarda H_2O_2 ve O_2 'lerin toksik etki oluşturması, OH iyonu ve katalizör varlığında veya katalizör olmadan reaktif radikal metal komplekslerine dönüşerek toksik etkilere yol açarlar (Valko *et al.* 2006; Karihtala and Soini 2007).

Serbest radikaller fizyolojik şartlarda hücrenin sinyal iletiminde, mitokondrial respirasyonda, bakteri fagositozunda, karaciğerde detoksifikasyonda ve nötrofiller de zararlı patojenleri yok etmede rol oynamaktadırlar. Bunun yanı sıra şeker hastalığı ve kanser gelişimi, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, hipoksi, travma, inflamasyon, iskemi ve intoksikasyon gibi fizyolojik olmayan şartlarda da meydana gelmektedir. Böylece bu radikallerin hem zararlı hemde yararlı özellikleri olduğu düşünülmektedir (Freeman and Crapo 1982; Von Sonntag 2006). Vücut antioksidan savunma sistemi ile SOR arasındaki dengeden dolayı, SOR üretiminin artması veya antioksidan savunmanın azalması durumunda biyomoleküllerin yapısal ve fonksiyonel yapılarında değişikliklere yol açar ve oksidatif stres oluşur. Dokuda oksidatif hasar oluşumu ile radikal metabolitlerinin artması ve bunların oluşturduğu LPO ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu olarak hücre membranında kontrol kaybolur, geçirgenlik artar ve hücre ölüm gelişir (Freeman and Crapo 1982; Halliwell 1989; Thomas 1995). Serbest radikallerin eksojen ve endojen kaynakları Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Serbest Radikal Kaynakları (Lachance *et al.* 2001; Willcox *et al.* 2004)

Serbest radikallerin hücreler üzerindeki hasarları: Lipid molekülünde doymamış çoklu yağ asitlerinin yan zinciri ya da metilen karbonu üzerinden bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks olay lipid peroksidasyonudur. Okside edici radikaller, hücre membranlarının yapısını ve fonksiyonlarını büyük ölçüde bozarak, LPO

oluşumuna yol açtığı bilinir (Karihtala and Soini 2007). LPO bir kez oluştuğundan sonra bir sonraki hücreyi okside eder ve zincirleme tepkimelere yol açarlar (Gilbert and Colton 2002).

Proteinler ve nükleik asitler üzerinde meydana getirdiği değişiklikler: SOR'un başlıca hedefleri; proteinler, DNA polimerazlar ve DNA onarım enzimleri olup bunları kolayca hasara uğratabildikleri bilinir. Protein oksidasyonu, proteinlerin OH⁻ ve diğer radikallerle kovalent yapısında değişikliğe uğramasıyla oluşmaktadır (Cooke *et al.* 2006). Protein oksidasyonuna çok sayıda mekanizmanın yol açtığı gözlenmiştir. SOR protein içi ve proteinler arası çapraz bağlar oluşturarak oksidasyona neden olmaktadır. Proteinler ve DNA oksidasyonu, karsinogenezis, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma, iskemi-reperfüzyon hasarı, Alzheimer hastalığı, Parkinson, ateroskleroz, karaciğer sirozu ve diğer patolojik durumlara yol açtığı bilinmektedir (Kasprzak 2002, Valko *et al.* 2007). Aynı zamanda SOR, proteinlerdeki enzimlerin etkinliklerini değiştirip, hem membran transporter proteinlerini hem de reseptör etkileşimlerini hasara uğrattığı bilinmektedir (Karihtala and Soini 2007).

1.3. Genotoksisite

Mutajen ve kanserojen maddeler çok düşük konsantrasyonlarda etkili olmaktadır. Çoğu zaman mevcut kimyasal yöntemlerle bu tür maddelerin tespiti mümkün olmaz. Bu nedenle mutajen ve kanserojenlerin canlı dokularında varlığı çeşitli biyolojik yöntemlerle tayin edilebilmektedir. DNA'daki hasarlar *in vivo* ve *in vitro* şartlarda farklı yöntemler kullanılarak tespit edilebilmektedir. Bu yöntemlerin başlıcaları KKD (Kardeş Kromatit Değişimi), KA (Kromozom Aberasyonları), MÇ (Mikroçekirdek) ve diğer (AMES, Tek hücre jel elektroforezi, FISH) testlerdir.

1.3.1. Kardeş-kromatid değişimi testi (KKD)

Kardeş kromatid değişimi (KKD), DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin bir kromozomunun iki kromatidi

arasında özdeş segmentlerin simetrik değişimidir. Bu test ilk olarak amfibilerde uygulanmış ve 1992’de Afnor tarafından standart hale getirilmiştir (Rooney and Czepulkowski 1986; Helleday 2003).

DNA hasarı tespitinde, KKD’ler dozun şiddetine göre genotoksik bileşiklere cevap vererek hasarı açıkça belirler. KKD tam DNA çift sarmalının takasını takiben her iki DNA ipliğinin kırılmasını oluşturduğundan dolayı KKD, DNA kırılmasının sitolojik göstergesidir (Perry and Evans 1975). Mutajen ve kanserojen özellikteki kimyasallara maruz kalan canlı hücrelerinde KKD frekansının arttığı ve dolayısıyla tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında doğrudan bir ilişki olduğu bildirilmiştir. KKD’nin artışıyla *in vivo* tümörlerin oluşumu arasında da bir ilişkinin olduğuda bildirilmiştir (Cheng *et al.* 1981).

1.3.2. Kromozom aberasyonları testi (KA)

Bu test genellikle insan periferik lenfositlerinde uygulanmakta olup indüklenmiş kromozomal aberasyonlar bir kromatide veya her iki kromatide görülmesine bağlı olarak kromatid tip aberasyonlar (asimetrik aberasyonlar) ve kromozom tip aberasyonlar (simetrik aberasyonlar) olmak üzere iki ana grupta incelenmiştir.

1.3.3. Mikroçekirdek testi (MÇ)

MÇ, ilk kez Howell tarafından eritrosit stoplazmasında görülmüş olup, telofazda safhasında esas nükleusun dışında, ya birkaç kromozomun ya da kromatidin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) ya asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından oluşmuş olan çekirdeklerdir ve küçük çekirdekler anlamında bu yapılara “nükleer materyal fragmenti” denilmiştir (Surrallés *et al.* 1995). Aynı şekilde 1900’lü yılların başlarında Jolly bunları “intraglobüler korpüsküller” olarak tanımlarken bunlara “Howell-Jolly cisimecikleri” adı verilmiştir. Brenneke 1937’de fare ve sıçan embriyolarında, 1951’de Thoday *Vicia faba*’da MÇ’leri tespit edip bunlara “fragment çekirdekler” veya “mikroçekirdek” adını vermişlerdir (Kirsch-Volders *et al.* 2003).

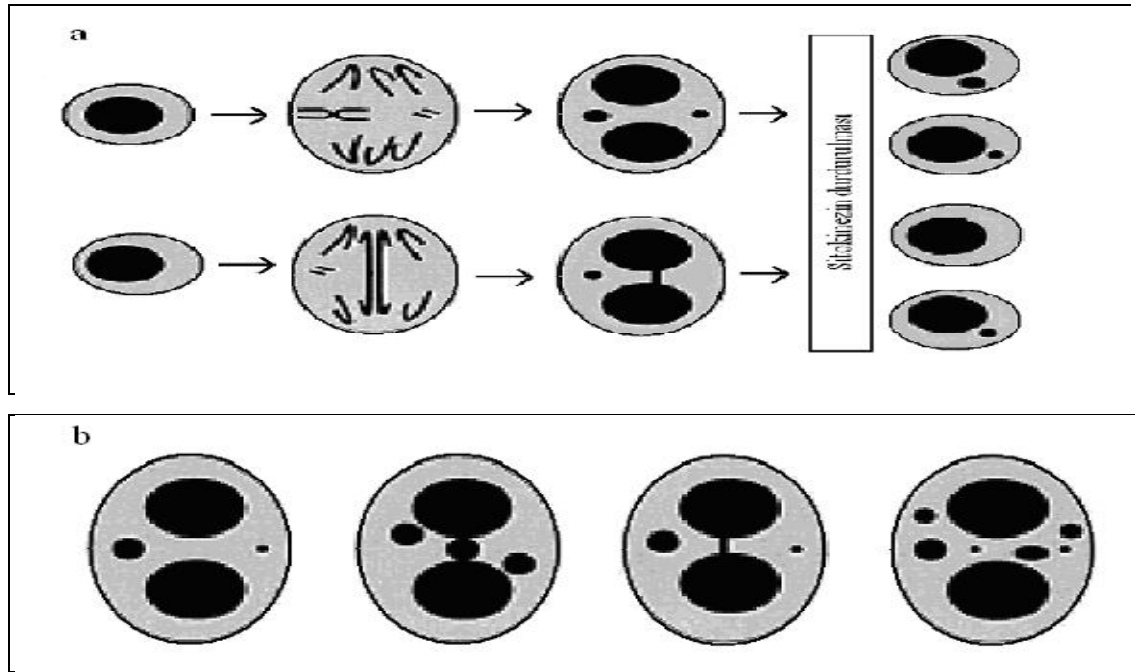
Sitologlar tarafından mikroçekirdeğin yapısı ve orijini yüzyılın başından beri bilinmesine karşın genotoksite potansiyellerinin ölçülmesinde kullanımı çok yenidir (Kirsch-Volders *et al.* 2003). İnsan periferik kan lenfositlerinde kromozom hasarlarının bir göstergesi olarak MÇ sıklığının kullanılması ilk kez 1976 yılında Courtyman ve Heddle tarafından önerilmiştir. Daha sonra bu yöntem 1985'te Fenech ve Morley tarafından geliştirilmiş ve CBMN (Cytokinesis Block Micronucleus) diye adlandırılmıştır (Ilbars 1997). Daha sonra 1980'de MacGregor vd tarafından bu metod periferik kandaki eritrositlerde denenmiş ve metodun oldukça hassas olduğu rapor edilmiştir (Almassy *et al.* 1987).

MÇ'ler hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarının indirekt göstergesi olan oluşumlardır. İnsan hücrelerinde DNA hasarlarının kromozom seviyesinde güvenilir olarak değerlendirilmesi ve hayvanları öldürmeden fazla sayıda örnek alınmasına dayandığı için genetik toksikoloji alanında çok yoğun olarak kullanılmaktadır (Fenech 1993).

MÇ yönteminin geliştirilmesinde en önemli adım; MÇ oluşumuna izin veren, bir çekirdek bölünmesini tamamlamış hücrelerin sayılmasının esas alınmasıdır (Fenech *et al.* 1999). Fenech ve Morley 1986'da sitokinezi-blok mikronukleus metodunu geliştirmiştir. Bu metod, küf mantarlarının bir metaboliti olan aktin inhibitörü Cythochalasin-B ($C_{29}H_{37}NO_5$, Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanır (Fenech *et al.* 1999, Kirsch-Volders vd. 2003) ve standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda (1-6 $\mu\text{g/ml}$) Cyt-B metabolitinin ilavesiyle, karyokinezi tamamlamış, ancak sitokinezi gerçekleştirmemiş çift çekirdekli hücreler oluşturulmakta ve MÇ bulunduran hücrelerin oranı tespit edilebilmektedir. İkinci bölünmesini tamamlamış dört çekirdekli hücrelerde bu safhada görülmüştür (Fenech 2000; Kutbay 2001; Demirel ve Zamani 2002). MÇ tekniğine göre hazırlanan sitogenetik preparatların analizinde Heddle ve Countryman (1976) tarafından rapor edilmiş olan kriterler esas alınmaktadır. Bu kriterler (Fenech 2000; Demirel ve Zamani 2002);

- MÇ esas çekirdek ile aynı yapıda olmalıdır.
- MÇ esas çekirdekten 1/3'ünden küçük olmalıdır.
- MÇ esas çekirdeğe bağlı veya bitişik değil, ayrı, yuvarlak veya yaklaşık yuvarlak şekilli olmalıdır.
- Nükleer olmayan partiküllerden farklı olarak ışığı yansıtılmamalıdır.
- Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması yani MÇ, feulgen pozitif veya diğer DNA'ya özel reaksiyonlarda pozitif reaksiyon göstermelidir.
- MÇ'ler sitoplazması iyi gözlenen hücrelerde sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MÇ'lerin sayılması esaslarını kapsamaktadır.

MÇ oluşum mekanizması ve farklı tiplerde MÇ oluşumları Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. MÇ Oluşum Mekanizması (a) ve Farklı Tiplerde Mikroçekirdek Oluşumları (b) (Fenech 2000; Kutbay 2001; Türkez 2007).

Diğer genotoksisite testleri: 1970'de Bruce Ames ve arkadaşları tarafından ortaya konan Ames testi, kanserojenik maddeleri tespit etme konusundaki hassasiyetinin yüksek olması, ucuz olması ve hızlı uygulanabilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılan

bir testtir. Uygulanma şekli, tespit edilmek istenen kimyasal maddenin varlığında veya yokluğunda, histidine gereksinim duyan mutant bakterili (*Salmonella thphimurium* mutant suşları) ortamda geri mutasyon (revertants) sonucu oluşan histidine bağımsız bakterilerin çoğalmasına dayanır (Eken 2003; Boyacıoğlu 2004; Türkez 2007).

Genetik toksikoloji alanında, DNA hasarını hem mitoz safhasında hemde interfaz safhasında tespitini mümkün kılan Floresans in situ hibridizasyon (FISH) tekniği de yaygın olarak kullanılmaktadır (Maluszynska *et al.* 2003; Türkez 2007).

DNA hasarını ve tamirini değerlendirmede uygulanan SCGE (Tek hücre jel elektroforezi) veya komet testi oldukça hızlı ve hassas bir testtir. Bu testin esası az sayıda hücre (<10.000) kullanılarak çok düşük seviyelerde bile DNA hasarlarının tespiti yapılabilmektedir (Tice *et al.* 2000; Lee and Steinert 2003; Türkez 2007).

1.4. Likenler

Mantarlar ve alglerin bir araya gelerek oluşturdukları simbiyotik bitki grubuna liken denir. 20.000'den fazla türe sahip olan likenlerin ülkemizdeki florası tamamlanmamış olup, şu ana kadar ki tür sayısı 1300 olarak belirlenmiştir (Öztürk ve Aslan 1991; Aslan 2000). Kendine özgü ürettikleri maddeler ile üstün yaşam mukaveti göstermeleri ve bu maddelerin sitotoksik etkilerinin az oluşu nedeniyle likenler günümüzdeki araştırmaların odağı haline gelmiştir (Huneck 1999).

Likenler tek başlarına birer organizma yapısında olmayıp mantarlar ve fotosentetik alglerden meydana gelen simbiyotik birlik olduğundan, şekil ve yaşayış bakımından kendilerini oluşturan alg ve mantarlardan tamamen farklı bir yapı göstermektedirler. Renksiz bir mantar hifinden oluşan tallusun yapısına katılan fotosentetik canlı (fotobiyont), genellikle yeşil alg ya da bir siyanobakteridir; fakat bazı sarı-yeşil alglerden ve kahverengi alglerden oluştukları da bilinmektedir. En çok *Cyanophyta* ve *Chlorophyta*'ya ait cinsler ve *Xanthophyta* ve *Phaeophyta*'dan bazı alg türlerini içermektedir. Mantarlarda ise genellikle *Ascomycetes* ve nadir olarak da

Basidiomycetes'e ait cinsler görülmektedir. Alg bu yapının içinde vejetatif olarak çoğalmaktadır. Mantarların meydana getirdiği frukrifikasyonlar serbest yaşayan mantarlarinkinden farklı olduğu gözlenmiştir. Liken yapısındaki mantarın cinsine göre oluşturulan frukrifikasyonlar farklılık göstermektedir (Tokat 2004).

Yeni farmakolojik aktif moleküllerin keşfi ve geliştirilmesi sonucunda farmasötik endüstrisinde değişimler meydana gelmiştir (Behera *et al.* 2005). Yüksek bitkiler ile likenlerin doğal ilaçlar olarak antik çağdan beri kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle likenlerin sahip olduğu sekonder metabolitler biyolojik ve farmakolojik alanlarda da yoğun şekilde kullanılmaktadır (Barnes 2000). Likenler yavaş büyüyen organizmalardır ve onların sekonder metabolitleri aminoasit türevlerini, şeker alkollerini, mono-siklik aromatik bileşikler, alifatik asitleri, depsit, depsidon, dibenzofurans, ksanton, terpen türevlerini ve dibenzofuran türevlerinden usnik asit (UA) gibi antibiyotik etkileri saptanmış maddeleri içermektedir (Brodo *et al.* 2001). Likenlerin besin, boya maddesi ve iyileştirici özelliğinden dolayı geleneksel tedavilerde ilaç olarak kullanıldıkları kaydedilmiştir (Perry *et al.* 1975).

Yeni analitik metodların geliştirilmesi (kalın tabaka kromatografisi, UV, manyetik rezonans spektrometrisi) likenik maddelerin daha fazla izole edilmesine imkân sağlanmış ve yapıları hakkında ilginç bulguların ortaya çıkarılmasına yol açmıştır. Son zamanlarda liken fungus ve liken doku kültür metodlarının gelişimiyle, hızla büyüyen organizmalar içinde gen transferi ile sekonder metabolitlerin sentezi ümit edilen gelişmelerdir (Huneck 1999).

Likenlerin kullanım alanları: Likenler doğada pek çok küçük hayvandan insanlara kadar çeşitli grupların gidasını oluşturmaktadır. Amerika'da bazı yerliler, taze liken yerine avlanan geyiklerin midesindeki kısmen sindirilmiş likenleri yemeyi tercih etmişlerdir. Bu materyal ile çiğ balık yumurtasının karışımı sevilen bir yemektir ve "mide dondurması" olarak adlandırılmıştır. Ayrıca likenler meşrubat olarak kullanımın yanı sıra, peltesine limon suyu, şeker, çikolata ve badem karıştırılarak bir çeşit şekerleme dahi yapılmıştır. Mısırlılar ekmek yapımında *Evernia prunastri*'yi daha nadir

olarak da *Pseudevernia furfuracea*'yı kullanmaktadırlar. Manna likeni veya kudret helvası olarak bilinen *Lecanora esculenta*'nın besin değeri oldukça yüksektir. Bu likenin Orta Doğu'nun kurak bölgelerinde özellikle step ve çöllerde, Büyük Sahra'da, Arabistan'da, Kırım'dan Türkmenistan'a kadar yayıldığı bilinir (Karamanoğlu 1971; Zeybek 1982; Tutel 1986; Brodo *et al.* 2001).

Likenlerin tıbbi kullanımları çok eski zamanlardan beri bilinmekte olup, likenin morfolojik yapısına uygun tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Örneğin uzun iplikli bir yapıda olan *Usnea barbata* ve diğer *Usnea* türleri saç dökülmesi ve saç çıkmasında, retikulat bir tallusa sahip *Lobaria pulmonaria* akciğer ve verem hastalığı tedavisinde kullanılmıştır. Benzer şekilde sarı-turuncu renkli bir liken olan *Xanthoria parietina* sarılık hastalığının tedavisinde, Kafatası likeni olarak bilinen *Parmelia saxatilis* veya diğer bazı türlerin epilepsi (sara) hastalığının tedavisi, tallusunda küçük sigillere benzeyen tüberküller olan *Peltigera apthosa* pamukçuk hastalığına yakalanmış çocukların tedavisinde kullanılmıştır (Karamanoğlu 1971; Galun 1988; Karakuş vd 2009).

Likenlerin çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğuna dair çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar çoğunlukla likenlerin antitümöral ve antiinflamatuvar, bir bölümü de antiülserojenik etkilere sahip olduklarını göstermiştir. Pek çok kaynakta likenlerin soğuk algınlıkları, kuduz hastalığı, bağırsak kurtlarının düşürülmesi, alerji, ateşli hastalıklar, sarılık, cilt hastalıkları, humma nöbetleri, boğmaca, öksürük ve solunum yolu hastalıkları ve kemik kırıklarının tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, balgam söktürücü ve laksatif amaçlı kullanımlarının yanı sıra damar büzücü olarak kan akışının engellenmesinde, saçların dökülmesinin engellenmesinde ve saçların gürleştirilmesinde de kullanıldıkları kaydedilmiştir (Smith 1975; Galun 1988). Bazı liken türleri (*Cladonia*, *Cetraria* ve *Pertusaria* cinsleri) acı tatlarından dolayı humma nöbetlerinde kullanılmıştır. *Usnea* cinsine ait türler ve *Pseudevernia furfuracea* kanamalarda doku ve damarları büzen ilaç olarak kullanılırken, *Cladonia pyxidata* özellikle boğmaca öksürüğüne karşı kullanılmıştır (Öztürk 1995).

Likenler ilaç olarak, laksatif, ekspektoran veya tonik şeklinde, dahili ve harici macun veya lapa şeklinde, yada dekoksasyon (kaynatma) veya infüzyon (demleme) şeklinde uygulanmaktadır. Bazı likenik bileşiklerin (polisakkaritler, glukanlar ve glikoproteinler) anti-tümör aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Zeybek 1982; Tutel 1986; Tokat 2004). Likenlerin tallus rengi (*Xanthoria*, sarı boya elde edilmesinde) boya üretilmesinde kullanılır. Bu boyaların alındığı likenler antimikrobiyal özelliğe sahip olduğundan özel giysiler ve pek çok tekstil ürünlerinde kullanılır (Karamanoğlu 1971). *Centraria islandica* ve *Lobaria pulmonaria* gibi liken türleri dericilik sanayinde kullanılmaktadır (Tutel 1986; Aslan vd 1998). Aynı zamanda parfümeri ve kozmetik alanında da likenler (*Evernia prunastri*, *Pseudevernia furfuracea*, *Lobaria pulmonaria*) hoş kokulu maddelerin yapımında kullanılmaktadır (Tokat 2004).

Likenler bir bölgedeki kirlilik ve metal miktarının belirlenmesi amacı ile hava kirliliğinin indikatörü olarakta önemli rol oynar. Mezar taşlarının yaşı, anıtların yaşı, en son heyelan ve deprem tarihlerinin belirlenmesinde de likenler kullanılmaktadır (Herzig and Urech 1987; Richardson and David 1988).

Yukarıdaki literatür bilgileri doğrultusunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılabılır;

- Ağır metaller çevrede gittikçe artan konsantrasyonları ile canlılar üzerinde potansiyel tehdit unsurları haline gelmiştir.
- Cd özellikle son yıllarda çok sayıda endüstri alanında kullanılmaktadır. Cd'li atıklar çevre sağlığını ciddi biçimde etkilemektedir.
- Cd güçlü bir prooksidan ve mutajenik etkili ağır bir metaldir.
- Günümüzde doğal veya insan yapımı mutajenlere karşı koruyucuların keşfedilmesi en popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır.
- Analitik tekniklerdeki hızlı ilerleme likenlerin biyolojik aktivitelere sahip ilginç bileşenleri olduğunu ortaya çıkarmıştır.
- Likenler yapısındaki bileşenlerin türü ve miktarına göre antioksidan veya antigenotoksik etki potansiyeline sahiptir.

Bu nedenle mevcut çalışma da bölgemizde geniş yayılış gösteren *Dermatocarpon intestiniforme* likenin *in vitro* Cd toksisitesine karşı potansiyel koruyuculuğu araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Osawa *et al.* 1991, yürüttükleri bu çalışmada *Hypogymnia enteromorpha* (Ach.) Nyl. likeninin ana bileşenlerinden biri olan physodik asitin, *Salmonella typhimurium* TA 98 de bulunan benzo(a) piren ve heterosiklik aminler gibi indirekt mutajenlerin mutajenitesini durdurduğunu fakat bu liken 6-nitropiperonal ve adriamisin gibi direkt mutajenlere karşı etki gösteremediğini bildirmişlerdir. Bu metabolitin antimutajenik etkisinin serbest radikal salınımı ya da antioksidatif aktivitelerle ilişkili olmadığı rapor edilmiştir. Physodik asit'in hepatik mikrozomal oksidasyon sistemleri bloke ederek, N-hydroxy-Trp-P-2 gibi reaktif metabolitlerin oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür. *H. Enteromorpha*'nın diğer bir bileşeni olan physodalik asit *S. typhimurium* TA 100'de mutajenik olduğu rapor edilmesine karşın, *S. typhimurium* TA 98'de bir heterosiklik aminin (Trp-P-2) mutajenitesini engellediğini rapor etmişlerdir.

Jagetia *et al.* 1994, Swiss albino farelerde MPCE (mikronükleuslu polikromatik eritrosit) ve MNCE (normo kromatik eritrosit) hücrelerine 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mg/kg dozlarında uygulanan CdCl₂'nin doza bağlı olarak MÇ frekansı sıklığında artışlara neden olduğunu gözlemişlerdir.

El Azzouzi *et al.* 1994, insan T lenfosit CEM-C12 hücrelerinde Cd'nin doza ve zamana bağlı olarak letal etkili olduğunu ve *in vivo* ortamda lenfositlerde meydana gelen hasarların, Cd'nin apoptotik bir etkisinin sonucu olduğunu rapor etmişlerdir.

Privezentsev *et al.* 1996, *in vitro* şartlarda insan periferel kan lenfositlerine CdCl₂ (2×10^{-5} ile 2×10^{-1} µg/ml)'nin 1 saatlik inkübasyon uygulaması sonrasında nükleotitlerde parçalanmaların meydana geldiğini, ayrıca CdCl₂'nin tek enjeksiyonluk uygulamalarında (1 mg/kg) periferel kan lenfositlerinde ve dalak hücrelerinde DNA hasarlarına neden olduğunu gözlemişlerdir. Cd'nin toksik etkisinin sonucu olarak DNA onarımı sırasındaki görevli enzimlerin (DNA-glikolaz veya nükleaz) yapılarında hasarların oluştuğunu ve inaktif hale geldikleri bildirilmiştir.

Xu *et al.* 1999, *in vivo* ve *in vitro* şartlarda Cd maruziyeti ile ratların farklı organlarında programlı hücre ölümlerinin meydana geldiğini gösteren çalışma yapmışlardır. Bu araştırmada, yetişkin erkek ratlar 48 ve 72 saatlik süre boyunca Cd'ye maruz bırakılmış ve bu süre sonunda Cd maruziyeti ile p53 geni (hücre döngüsünde tümör oluşumunu engelleyen protein) arasında negatif bir ilişkinin olduğu rapor edilmiştir.

Palus *et al.* 2003, bir batarya fabrikasındaki işçiler üzerinde Cd'nin meydana getirdiği genotoksik etkileri belirlemek için yürüttükleri araştırmada, Cd'ye maruz kalan işçilerden alınan kan örnekleri ve somatik hücrelerdeki zararlar MN, SCE, FISH ve Comet Assay yöntemleriyle analiz edilmiştir. Elde edilen verilere göre, Cd'nin periferal lenfositlerde hem anojenik hemde klastojenik etkiler oluşturduğu hatta uzun süreli maruziyette çalışanlar için Cd'nin potansiyel bir tehdit unsuru olarak kabul edilebileceği ortaya konulmuştur.

Toplan vd 2003, 4 hafta boyunca içme sularına Cd (20µg/ml) ilave edilerek Cd'ye maruz bırakılan ratlarda meydana gelen oksidatif stresi ve antioksidan savunma mekanizmasındaki değişimleri belirlemek için çalışma yürütmüşlerdir. Bu süre sonunda ratlardan alınan kan örneklerinden lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA (malondialdehyde), SOD (süper oksit dismutaz) ve GSH (glutatyon) seviyeleri gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre, Cd'nin MDA'yı arttırdığını, SOD ve GSH seviyelerinde ise azalmaya yol açtığını bildirilmiştir.

Katalay vd 2004, 24 gün boyunca Cd'ye maruz bırakılan *G. niger* (kömürcü kaya balıkları) eritrositlerinde meydana gelen değişimleri belirlemek için yaptıkları çalışmada, normal eritrositlerin değişikliğe uğrayarak küresel şekil aldığı ve hücre zarının dikensi yapı kazandığını (spiküllü eritrosit), immature ve dejenere olmuş eritrosit sayısında, parçalı eritrosit ve MÇ frekansı sıklığında artışların olduğunu bildirmişlerdir.

Çelik vd 2005, rat kemik iliğinde CdCl₂'nin yol açtığı genotoksik etkilerinin belirlenmesi ve bu etkiler sonucu meydana gelen KA'ların tayini için yaptıkları

araştırmada, yetişkin ratlar 18 hafta boyunca her 48 saatte bir 0.5 mg/kg dozunda CdCl₂'ye maruz bırakılmıştır. Belirlenen süre sonunda ratlardan alınan kan örneklerinin analizi MN test yöntemiyle yapılmıştır. Elde edilen verilere göre, CdCl₂'nin kemik iliği eritrositlerinde kontrol grubuna kıyasla MN frekansını istatistiksel olarak önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir.

Mutlu 2008, Türkiye'de yayılış gösteren *Evernia divaricata* (L.) Ach., *Flavocetraria cucullata* (Bellardi) Kärnefelt and A. Thell, *Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb.) Fűrnr., *Ramalina polymorpha* (Lilj.) Ach. ve *Usnea filipendula* Stirt. likenlerinin su, etanol ve aseton ekstralarının antioksidan etkilerini araştırdığı çalışmasında ilgili likenlerin tümünün antioksidan etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. *E. Divaricata* ekstraları arasında antioksidan aktivite bakımından; Su<Etanol<Aseton, sıralamasını yapmıştır. Aynı çalışmada, fenolik bileşik miktarı ile antioksidan aktivitesi arasında da ilişki olduğunu gözlemiştir. Nitekim antioksidan aktivitenin yüksek olduğu liken türlerinde fenolik bileşiklerin de yüksek olduğunu rapor etmiştir.

Zeytinoğlu vd 2008, *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. likeninden elde edilen ekstraların genotoksik ve antigenotoksik aktivitelerini araştırdıkları bu çalışmada, *Cetraria aculeata* ekstresinin bakteriyel organizmalar üzerinde önemli bir antigenotoksik aktiviteye sahip olduğunu ancak memeli hücrelerinde böyle bir aktiviteye sahip olmadığını belirtmişlerdir.

Çelik vd 2009, Cd maruziyeti sonucu erkek Wistar ratların kemik dokusu ve periferel kanlarında genotoksistesinin değerlendirilmesi amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla ratlar 24 saatlik akut ve 60 günlük beslenme ile Cd (15 mg/kg)'ye maruz bırakılmıştır. Elde edilen verilere göre CdCl₂'nin hem periferel kanda hemde kemik iliğinde MN frekansında önemli artışlara sebep olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda Cd'nin kemik iliğinde sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiği, periferik kanda ise yalnızca genotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Türkez vd 2010, *in vitro* şartlarda Aflatoxin B₁ (toksik ve karsinojenik madde) ile muamele edilen hücrelerin TAK ve genotoksisitesi üzerine, *Pseudovernia furfuracea* (L.) Zoph. likeninin metanol, aseton, n-hekzan ve eter ekstraktlarının Aflatoxin B₁'in mutajenik etkilerini baskıladığını ve olumsuz etkilerini azalttığını rapor etmişlerdir.

Nemmiche *et al.* 2011, CdCl₂ (kadmiyum klorit)'nin insan T lenfositlerindeki Jurkat T hücreleri üzerinde oksidatif stres oluşturduğunu ve DNA'da hasarlar meydana getirdiğine dair çalışma yürütmüşlerdir. Elde edilen verilere göre, Cd'ye maruz bırakılan Jurkat T hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede DNA'da hasarların meydana geldiğini, SOD ve GSH-Px (glutasyon peroksidaz) seviyelerinde azalmaların olduğunu ayrıca protein karbonil seviyeleri ile lipid peroksidasyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde artışların olduğu rapor edilmiştir.

Tripathi *et al.* 2011, oral olarak CdCl₂'ye maruz bırakılan Wistar ratların böbreklerinde meydana gelen değişimleri gözlemişlerdir. Rastgele A, B ve C gruplarına ayrılan Wistar ratları, sırasıyla günlük olarak 5 ve 10 mg/kg doz CdCl₂'ye maruz bırakılmıştır. 8 hafta boyunca yürütülen çalışma sonucu ratların böbreklerinden alınan örneklerin incelenmesi sonucunda, böbreklerde histopatolojik değişimlerin meydana geldiği bildirilmiştir.

Wu *et al.* 2011, DNA topoizomeraz II (DNA'nın kompakt yapısını koruyan protein) enzimi üzerine Cd'nin inhibe edici bir etkisinin olduğunu gösterdikleri çalışmada, CdCl₂'nin çok düşük konsantrasyonlarda DNA topoizomeraz II enziminin aktivitesini inhibe ettiğini fakat bu inhibisyonun glutasyon tarafından azaldığını bildirmişlerdir.

Güllüce vd 2011, *Cladonia rangiformes* ve *Umbilicaria vellea* liken türlerinin çeşitli biyolojik aktivelere sahip olduğunu gösterdikleri bu çalışmada, bu likenlerin metanol ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik özellikleri Ames testi kullanılarak analiz edilmiştir. Metanol ekstraktlarının antimutajenik özelliklerini belirlemek için iyi birer mutajen olarak bilinen 9-AA (9-Aminoakridin) ve NaN (sodyum azide) kullanılmıştır.

Elde edilen verilere göre, bu liken türlerinin mutajenik etkiye sahip olmadığını ve bu liken türlerinin 9-AA'ya karşı antimutajenik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Kosanić *et al.* 2011, *Cetraria islandica*, *Lecanora atra*, *Parmelia pertusa*, *Pseudoevernia furfuraceae* ve *Umbilicaria cylindrica* gibi liken türü ekstralarının sahip olduğu antioksidan etkilerin daha iyi anlaşılması için alfa-tokoferol, BHA (butylated hydroxyanisole) ve askorbik asit gibi güçlü antioksidanlarla aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, bu liken ekstralarının güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve güçlü bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabilmesi kaydedilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kan örneklerinin alınması ve kültürlerin kurulması

Bu çalışmada, aynı yaş grubunda olan (25-27) sigara ve alkol kullanmayan, belirli bir hastalığı saptanmayan ve mesleği dolayısıyla fiziksel veya kimyasal ajanlara maruz kalmamış gönüllü 5 erkek donör dahil edildi. Heparinize enjektöre alınan periferik kan numuneleri, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Toksikoloji ve Doku Kültürü Laboratuvarlarında yürütülen biyokimyasal ve genetik araştırmalarda kullanıldı.

Yapılan ön denemelerden elde edilen sonuçlar ve mevcut literatür bilgileri doğrultusunda *D. intestiniforme* (25 ve 50 ppm) ve CdCl₂ (30 ppm)'nin kültürlere uygulanacak olan dozları tespit edildi. Biyokimyasal çalışmalar 2 saatlik tam kan kültürleri üzerinde yapıldı. Genotoksisite çalışmaları ise 72 saatlik tam kan kültürleri üzerinde yapıldı. İlgili sürelerin sonunda, kültürler sonlandırılarak uygulanacak olan test tekniklerine uygun prosedürler izlenerek preparatlar elde edildi. Elde edilen preparatlar daha sonra analiz edilmek üzere uygun koşullarda saklandı. Kontrol grubu kültürlere herhangi bir ekstre veya metal eklenmedi.

3.1.2. Liken ekstresinin hazırlanışı

20 gr'lık liken örneği 400 ml distile su içeren bir cam kap içerisine alındı. Manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak 15 dk kaynatıldı. Daha sonra ekstreler Whatmann No.1 filtre kağıdı ile süzüldü.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kromozom medium B Biochrom® firmasından, cytochalasin-B, L-glutamine, CdCl₂ (CAS No.7790-78-5), giemsa Sigma® firmasından, potasyum klorür (KCl), glasiyal asetik asit ve sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) Riedel-de Haent® firmasından, metanol ve potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) Fluka® firmasından, sodyum heparin Roche firmasından, TAS ve TOS kitleri Rel Assay Diagnostics® firmasından temin edilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan *D. intestiniforme* liken türü Erzurum ve Artvin illerinden 2010 yaz döneminde toplanmıştır.

Dermatocarpon intestiniforme (Körber) Hasse.

Tallusu çok loblu olup, lop kalınlığı 0,15-0,3 mm, lop genişliği ise 3-10 mm olan liken türü olup üst yüzeyinin rengi gri-kahverengiden koyu kahverengiye kadar değişkenlik gösterir. Lopların kenarları genç iken kalkık, daha sonra içe doğru kıvrılır. Alt yüzeyinin rengi ise genellikle koyu kahverengi ya da daha açık renkte olup düzdür. Dik yamaçlardaki kayalar üzerinde geliştiği rapor edilmiştir (Purvis *et al.* 1992; Wirth 1995; Aslan 2000).

Toplama İstasyonu: Erzurum-Oltu Yolu Köşk Köyü yol ayrımı, yükseklik: 1860 m, Toplama koordinatları: Enlem: 40° 6' N, Boylam: 41° 23' E.. Kalkerli kaya üzerinden toplanmıştır.

3.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar

Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlarla ilgili bilgiler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmalar Esnasında Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Aletler ve Cihazlar	Temin Edildikleri Firmalar
Distile su cihazı	Easypure RF compact ultarpure ws, USA
Etüv	Heraeus FB 420, Germany
Hassas terazi	Sartorius AG, Germany
Mikroskop	Prior T-100 mA, England
Otomotik pipet	Finpipette Labsystems, Finland
pH metre	Handylab - 2BNC
Santrifüj	Heraeus 4600, Germany
Spektrofotometre	Beckman DU 500, USA
Su banyosu	Nüve BM 101, Nüve M.S.L.T.A, Ankara

3.1.5. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Hipotonik çözeltinin hazırlanışı: 0,5592 gr KCl tartılarak 100 ml distile suda çözüldü. Konsantrasyonu 0,075 M olan KCl çözeltisi kullanılmadan önce etüvde 37°C'ye kadar ısıtıldı.

Tespit (fiksatif) çözeltisinin hazırlanışı: 1 kısım Glasiyel asetik asit'in üzerine 3 kısım metanol ilave edilerek iyice karıştırıldı. Solüsyon her kullanım için taze olarak hazırlandı. Kullanmadan önce buzdolabında (+4°C'de) soğutuldu.

Giemsa boya çözeltisinin hazırlanışı

A Çözeltisi: Na₂HPO₄'ten 11,88gr tartılarak 1litre distile suda çözüldü.

B Çözeltisi: KH₂PO₄'ten 9,08gr tartılarak 1 litre distile suda çözüldü.

A çözeltisinden 30 ml şaleye konuldu. Üzerine; pH metre 6,8'i gösterinceye kadar B çözeltisinden ilave edildi. Sonra üzerine 5 ml Giemsa boyası eklendi. Pipetajla

karıştırıldı. Üzerinin yağı kurutma kâğıdı ile alındı. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Genotoksisite testleri

Genotoksisite araştırmaları, güvenilir ve oldukça yaygın olarak kullanılan Mikroçekirdek (MÇ) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

Tüm kromozom çalışmalarında olduğu gibi bu araştırmada da özellikle hücre kültürlerindeki kontaminasyon ihtimalini azaltmak ve çalışma sırasında optimum miktarda hücre elde edebilmek için sterilite, pH ve sıcaklık koşullarına dikkat edildi.

Mikroçekirdek (MÇ) yöntemi: Protokol numarası verilmiş steril hücre kültür tüplerine (cellstar) önceden hazırlanmış ve 37°C'ye getirilmiş besiyerinden (Chromosome Medium B) 6 ml konuldu. Besiyerinin üzerine 0,5 ml tam kan eklendi. *D. intestiniforme* (25 ve 50 ppm) ve CdCl₂ (30 ppm) ayrı ayrı ve birlikte tüplerdeki kültürlerle eklendi. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldı ve kapakları kapatılarak 37°C'lik etüve bırakıldı. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra, sitokalazin-B'den son konsantrasyonu 3 µg/ml olacak şekilde tüm kültürlerle ilave edildi. 72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler santrifüj işlemine alındı. Kùltürler 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj süresinin sonunda süpernatant pastör pipeti ile atıldı. Tüpte kalan çökeltinin (pellet) üzerine 8 ml hipotonik çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi. Hipotonik özelti eklenen tüpler 37°C'lik etüvde 15-20 dk bekletildi. Bekleme süresi sonunda etüvden çıkarılan tüpler 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpte kalan pellet üzerine taze hazırlanmış soğuk tespit çözeltisinden yavaş yavaş 7 ml eklenerek 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Bir önceki basamak iki kez daha tekrar edildi. Son süpernatant da atıldı ve pellet pastör pipeti ile yavaş yavaş karıştırıldı. Pipetle çekilen pellet önceden üzerine protokol numarası yazılmış, temizlenmiş ve soğutulmuş (+4°C) lamlara 45°'lik açılı ile yayılarak lamlar oda ısısında karanlık bir ortamda 3 gün

kurumaya bırakıldı. Yayma işlemini takip eden 3. günün sonunda preparatlar 15 dk. Giemsa boyasında bekletildi. Boyama işleminin sonunda preparatlar tekrar distile sudan geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamalar entellan kullanılarak kapatıldı ve incelemeye hazır hale getirildi. Preparatlar ışık mikroskopunda immersiyon ($\times 100$) objektifi ile incelendi. MÇ oluşumunu değerlendirmek için hazırladığımız sitokalazin-B'li kültürlerde elde edilen binükleuslu hücrelerde MÇ değerlendirme kriterleri dikkate alındı. Mononükleuslu, trinükleuslu veya daha fazla çekirdekli hücreler değerlendirme dışı bırakıldı. Her bir kültürde en az 1000 binükleuslu hücre incelendi ve MÇ frekansına bakıldı.

3.2.2. Sitotoksosite tayini

Çekirdek bölünme indeksi (ÇBİ): MÇ test yönteminde bir, iki, üç ve dört nükleuslu hücre oranını tespit etmek amacı ile her bireyden 400 hücre sayılmıştır. Bu orandan yola çıkarak Çekirdek Bölünme İndeksi (ÇBİ) hesaplanmıştır (Fenech 2000).

Hesaplama şu formüle göre yapılmıştır:

$$\text{ÇBİ} = (1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4) / N$$

(N1: 1 nükleuslu hücre sayısı, N2: 2 nükleuslu hücre sayısı, N3: 3 nükleuslu hücre sayısı, N4: 4 nükleuslu hücre sayısı, N: Toplam hücre sayısı) formülüne göre hesaplanmıştır.

3.2.2. Biyokimyasal analizler

2 saatlik periferik kan kültürleri üzerine *D. intestiniforme* ve Cd muamelelerinin biyokimyasal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) ölçüldü.

Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK): TAK düzeylerinin tespiti işleminde Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TAS (total antioxidant status) ticari kitleri kullanıldı (Erel 2004).

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10 ml

30 µl plazma örneğinin bulunduğu kuvartz küvete 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 660 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 75 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm’de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak TAK düzeyleri mmol Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

$$\text{TAK (mmol Trolox Equiv./L)} = [(\Delta\text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta\text{Örneğin değeri})] / [(\Delta\text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta\text{Standart 2'nin absorbansı})] \times 20$$

Toplam Oksidan Durum (TOD): TOD (total oksidan durum), tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. İncelenen numunede bulunan oksidanlar ferroz iyon-*o*-dianisidin yapısını ferik iyona oksitlerler. Bu reaksiyonu ortamda bulunan gliserol yaklaşık üç kat hızlandırmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar “xylenol orange” ile renkli bir kompleks meydana getirirler. Numunede bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılır. Araştırmamızda Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOS (total oxidant status) ticari kitleri kullanıldı.

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10 ml

75 µl plazma örneğinin bulunduğu kuvartz küvete 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 530 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Bekleme sonunda 530 nm’de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

$TOD (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) = (\Delta\text{Örneğin değeri}/\Delta\text{Standart 2'nin değeri}) \times (\text{Standart 2 değeri})$

3. 3. Fotoğrafik İşlemler

MÇ preparatlarından Olympus marka fotoğraf makinesi ile (100x) fotoğraflar çekildi.

3.4. İstatiksel İşlemler

Çalışmadan elde edilen bulguların istatiksel yönden değerlendirilmesinde S.P.S.S 18 programı kullanıldı. Tespit edilen MÇ analizlerinde belirlenen ortalamalar ile TAK ve TOD düzeylerinin kontrol ve deney grupları arasında değişiklik gösterip göstermediği varyans analizi kullanılarak belirlendi (Seymen vd 2000; Bukowska and Kowalska 2004). Varyans analizi için one way Anova testlerinden Duncan testi kullanıldı. Elde edilen veriler 0,05 anlam seviyesi göz önünde bulundurularak yorumlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

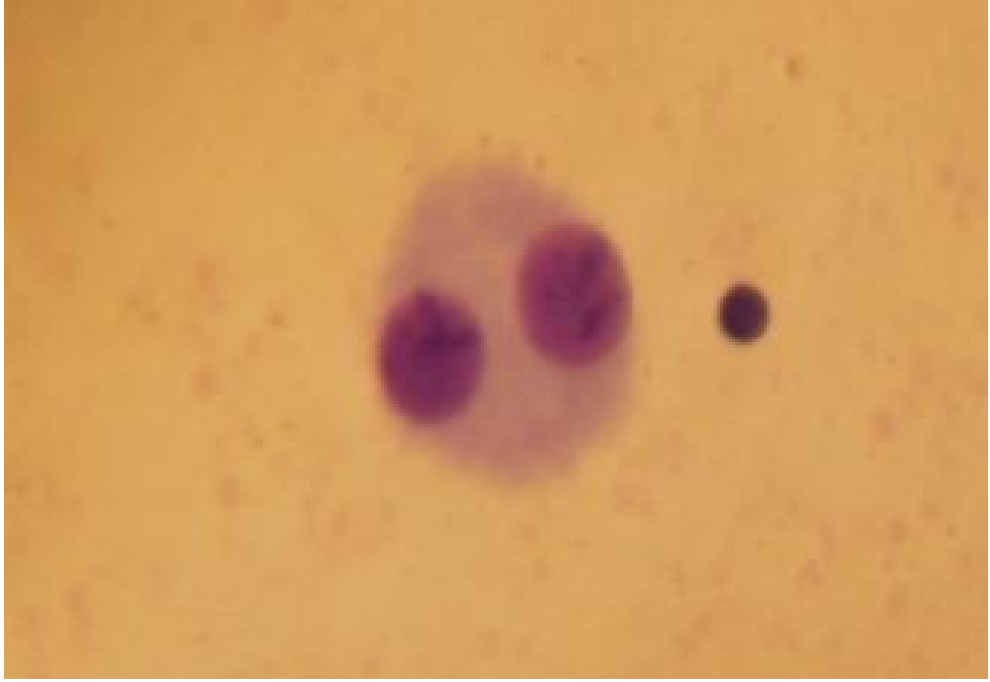
4.1. Genetik Bulgular

Çalışmada *in vitro* koşullarda insan tam kan kültürleri liken ekstreleri (25 ve 50 ppm) ve CdCl₂ (30 ppm) ile muamele edilmiştir. Sitogenetik araştırmalar MÇ testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *In vitro* koşullarda MÇ/1000 hücre değeri bütün konsantrasyonlar için 4.07 ve 15.86 değerleri arasında bulunmuştur. Kontrol grubu için tespit edilen MÇ/1000 hücre değeri (4.12) ile liken uygulanan deney gruplarından elde edilen MÇ/1000 değerleri arasında istatistiki açıdan herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Farklı konsantrasyonlarda kültürlerle uygulanan *D. intestiniforme* sulu ekstreleri kontrol grubuna kıyasla MÇ sıklığında belirgin bir değişikliğe yol açmamıştır. Aksine CdCl₂ muamelesi kültürlerde gözlenen MÇ sıklığında belirgin (P<0,05) bir artışa neden olmuştur. Bununla birlikte *D. intestiniforme* ekstreleri ve CdCl₂ eş zamanlı ve birlikte uygulandığı kültürlerde gözlenen MÇ oranlarında sadece Cd uygulanan gruba kıyasla belirgin azalmalar gözlenmiştir. Ancak birlikte uygulamalar sonrası gözlenen MÇ/1000 hücre oranları hala kontrollerden farklı bulunmuştur. Liken ekstreleri ve Cd uygulamalarını tam kan kültürlerinde ortaya koyduğu MÇ/1000 hücre değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. MÇ testi tekniğine uygun olarak hazırlanmış preparatlarda elde edilen örnek fotoğraflar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

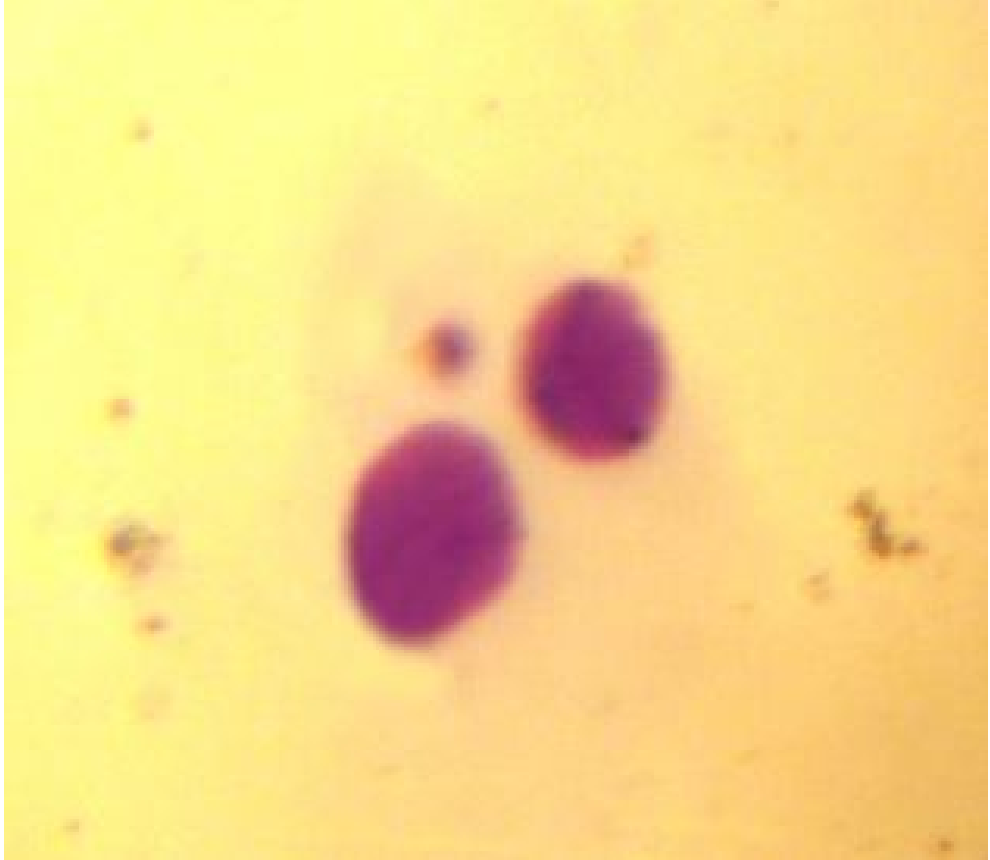
Çizelge 4.1. *In Vitro* Koşullarda *Dermatocarpon intestiniforme* ve Cd Uygulamalarının MÇ Frekansına Etkileri

Gruplar	MÇ
Kontrol	4,12 ± 1.07 ^a
Liken (25 ppm)	4,16 ± 1.12 ^a
Liken (50 ppm)	4,07 ± 0.96 ^a
CdCl ₂ (30 ppm)	15,86 ± 2.03 ^d
Liken (25 ppm) + CdCl ₂	13,08 ± 1.89 ^c
Liken (50 ppm) + CdCl ₂	11,05 ± 1.92 ^b

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=5). Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.



Şekil 4.1. *Dermatocarpon intestiniforme* Liken Ekstresi (50 ppm) Uygulanan İnsan Lenfosit Hücrelerinde Örnek Çift Çekirdekli Hücre Fotoğrafi



Şekil 4.2. CdCl_2 (30 ppm) Uygulanan İnsan Lenfosit Hücrelerinde Örnek Mikronükleus Oluşumu (1000 x)

4.2. Sitotoksisite Bulguları

In vitro koşullarda Cd sitotoksisitesine karşı *D. intestiniforme* sulu ekstralarının potansiyel koruyuculuğu ÇBİ ile araştırıldı. Liken ekstralarının ÇBİ'yi arttırdığı ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Tek başına Cd muamelesi ÇBİ'de kontrollere oranla belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Kültürlere eş zamanlı olarak Cd ve ekstre ilavelerinin Cd'nin oluşturduğu sitotoksisiteyi azaltabildiği gözlemlendi. Kontrol ve deney gruplarında gözlenen ÇBİ oranları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. *In Vitro* Koşullarda *Dermatocarpon intestiniforme* ve Cd Uygulamalarının ÇBİ Oranına Etkileri

Gruplar	ÇBİ
Kontrol	1.23 ± 0.04 ^c
Liken (25 ppm)	1,32 ± 0.02 ^c
Liken (50 ppm)	1,27 ± 0.07 ^c
CdCl ₂ (30 ppm)	0,81 ± 0.06 ^a
Liken (25 ppm) + CdCl ₂	1,08 ± 0.02 ^b
Liken (50 ppm) + CdCl ₂	1,13 ± 0.03 ^b

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=5). Aynı sütündeki farklı harfler P<0,05 düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Tam kan kültürlerinden elde edilen plazma örneklerinde yapılan TAK ve TOD ölçümlerine ait sonuçlar sırasıyla Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Kültürlere ilave edilen liken ekstraları TOD düzeyini değiştirmeksizin TAK düzeyinde artışlara neden olmuştur. Aksine tek başına Cd ilavesi plazma örneklerinde TOD düzeyini yükseltmiş, TAK düzeyini ise düşürmüştür. Bununla birlikte Cd ve liken ekstralarının eş zamanlı uygulamaları tek başına Cd'ye oranla çalışılan bu iki biyokimyasal parametrede olumlu değişikliklere neden olmuştur. Nitekim 25 ve 50 ppm liken ekstresi ilaveleri, tek başına Cd ilave edilen kültürlerde gözlenen TOD düzeylerine oranla sırasıyla %15.7 ve %14.5

oranlarında bir iyileştirme sağlamıştır. Benzer şekilde 25 ve 50 ppm liken muameleri TAK düzeylerinde %35.5 ile %43.4 arasında bir iyileştirme sağlamıştır.

Çizelge 4.3. *In Vitro* Koşullarda *Dermatocarpon Intestiniforme* ve Cd Uygulamalarının TAK Ve TOD Düzeylerine Etkileri

Gruplar	TAK (mmol Trolox Equiv./L)	TOD ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)
Kontrol	$6,32 \pm 1.23^c$	$11,14 \pm 2.45^a$
Liken (25 ppm)	$6,88 \pm 1.33^d$	$10,96 \pm 2.35^a$
Liken (50 ppm)	$6,62 \pm 1.27^d$	$11,21 \pm 2.43^a$
CdCl ₂	$3,56 \pm 1.46^a$	$16,45 \pm 2.93^c$
Liken (25 ppm) + CdCl ₂	$5,12 \pm 1.52^b$	$13,86 \pm 2.58^b$
Liken (50 ppm) + CdCl ₂	$5,34 \pm 1.43^b$	$14,06 \pm 3.02^b$

*Değerler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=5). Aynı sütundaki farklı harfler $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA

Cd'nin giderek birçok sanayi dalında kullanımının yaygınlaşması, havaya, toprağa, suya kolaylıkla kontamine olması ve insanların sıklıkla solunum ya da besin yoluyla maruz kalması sebebiyle Cd toksisitesi yoğun olarak çalışılan bir konu haline gelmiştir. Cd'nin neden olduğu toksik etkiler, özellikle sanayi bölgelerinde yaşayan insanlar üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile büyük ölçüde ortaya konmuş fakat toksik etkilerinin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Mevcut çalışmamızda, CdCl₂'nin DNA hasarlarını ve SOR'larının oluşumunu teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Çalışmalar, SOR'ların uzaklaştırılmasında görev alan antioksidan enzimlerin memeli hücre savunmasında önemli bir role sahip olduğunu ve farklı toksik ajanlara maruz kalmış kan hücrelerinde bu enzimlerin indüklendiğini veya inhibe olduğunu göstermiştir (Afaq *et al.* 1998; Prasad *et al.* 2006).

Mevcut bulgular Cd'nin *in vitro* tam kan kültürlerinde oksidatif parametreleri etkilediği ve genetik hasara yol açtığını ortaya koydu. Cd genetik hasarı ile oksidatif parametreler arasında doğrudan bir ilişkinin gözlenmesi Cd genotoksitesinin oksidatif stresle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim, SOR, çeşitli çevresel toksikanlara maruz kalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu oluşuma neden olan en önemli elementlerden biride Cd'dir. CdCl₂ bir fenton metali olmamasına rağmen, proteinlerdeki fenton metallerinin (Cu, Fe) yerini alarak bu metallere bağlı olmayan formlarının miktarını artırır ve kalmodulindeki Ca⁺²'la yer değiştirir, kalmoduline bağlı fonksiyonları değiştirir. Proteinler, enzimler gibi tiyol (-SH) grubu içeren biyolojik yapılara olan güçlü ilgisinden dolayı, bu yapılara bağlanır ve aktivitelerini baskılar; CAT, SOD ve GSH-Px 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 sebep olur (Lermioğlu and Bernard 1998; Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2001).

Cd insan sağlığını tehdit etmesi açısından önemli bir ağır metal olup, canlı dokularda meydana getirdiği genotoksik ve mutajenik etkileri günümüze kadar yoğun olarak ele alınmıştır. Cd'nin oksidatif strese yol aması ve diğer metallerle etkileşime girebilme yeteneğiyle hücrelerde hasarlar oluşturduğu ve hücrelerin homeostatisini etkilediği bilinmektedir. Cd maruziyeti sonucu insan keratinosit hücrelerinde (HaCaT) SOR oluşumunun ve makromoleküler düzeyde DNA'da oksidatif hasarların oluştuğu gözlenmiştir. Aynı zamanda Cd uygulamalarında GSH-Px ve CAT aktivlerinde azalma, glutatyon redüktaz (GR) aktiviteleri ve GSH konsantrasyonlarında artışların görüldüğu bildirilmiştir (Nzengue *et al.* 2008). 12 hafta boyunca ratların içme sularına Cd (50 mg/l) ilave edilerek yürütölen bir çalışmada, Cd'nin lipit peroksidasyonunu uyardığı ve DNA ve proteinlerde oksidatif hasarlara neden olduğu rapor edilmiştir (Gałazyn-Sidorczuk *et al.* 2009). Cd'nin DNA onarım mekanizması olan MMR (mismatch repair) sistemini %20-50 oranlarında inhibe ettiği ve Cd'nin artan dozlarında, hücrelerde yeterince onarım yapılamadığından genlerde mutasyona neden olduğu gözlenmiştir (Jin *et al.* 2003). Cd dokuların çoğunda kanser oluşturma, DNA onarım mekanizmasını baskılama, apoptosisi engelleme, aşırı hücre çoğalmalarına neden olmasında dolayı mitojen bir madde olarak kabul edilmiştir. Hücre kóltür sistemlerinde Cd'nin düşük doz uygulamalarında (0.1-10 µM) apoptosise yol açtığı, yüksek doz uygulamalarında (>50 µM) ise hücrelerde nekroza neden olduğu gözlenmiştir (Templeton and Liu 2010). Cd'le yapılan epidemiyolojik alışmalar, Cd'nin hücrelerde KA ve/veya KKD oluşumlarını teşvik etmesi nedeniyle kanser oluşumunda önemli bir rolünün olduğu ortaya konmuştur. Cd' nin sitogenetik etkilerini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada, 40 sağlıklı birey ve 40'da Cd toz ve dumanına maruz kalmış birey deneye dahil edilmiştir. Bireylerden alınan kan ve idrar örnekleri üzerinde gerçekleştirilen analizlerde Cd'ye maruz kalmış bireylerde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde KA ve KKD oluşumu gözlendiği bildirilmiştir (Abraham *et al.* 2011). Cd hücrede mitokondriye bağlanarak, hücresel solunumu ve oksidatif fosforilasyonu inhibe ederken diğer yandan sülfidril gruplarına bağlanarak, glutatyonu baskılar ve lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumuna yol açmıştır. Aynı zamanda Cd'nin CAT, mangan-SOD ve Cu/Zn-SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini de inhibe ettiği gözlenmiştir (Ercal vd 2001). *Salmonella* ve *E. coli*'de yapılan önceki çalışmalarda CdCl₂'nin mutajenik etkisi olmadığının düşünölmesine rağmen, hücre kóltürleriyle yapılan son alışmalar Cd'nin

mutasyonu tetiklediği (Meplan *et al.* 1999), DNA zincirlerini kırdığı ve kromozomal defektlere neden olduğunu ortaya koymuştur (Misra *et al.* 1972). Ayrıca Cd, hasarlanan genlerin tamir mekanizmalarını da inhibe ederek genotoksik etkiyi arttırdığı rapor edilmiştir (Hartwig 1994).

Son zamanlarda Cd toksisitesini azaltmaya veya engellemeye yönelik çok sayıda araştırma yürütülmüştür. Bu araştırmaların büyük bölümü Cd mutajenitesi veya karsinojenitesinin oksidatif stres ile yakından ilişkili olması nedeniyle koruyucu olarak önerilen doğal ya da sentetik bileşiklerin antioksidan etkinliğinin keşfedilmesine yoğunlaşmıştır. 8 hafta boyunca içme sularına CdCl₂ (100mg/l) eklenerek Cd'ye maruz bırakılan ratların vasküler dokularında meydana gelen oksidatif hasarlara karşı askorbik asitin, Cd'ye karşı koruyucu bir rolünün olduğu ve oksidatif stresi azaltıcı yönde etki gösterdiği belirtilmiştir (Donpunha *et al.* 2011). CdCl₂'nin fare karaciğer hücrelerinde neden olduğu hasarlara karşı karnosininin glutayon seviyesini, CAT ve SOR aktivitelerini azaltarak koruyucu yönde bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Fouad *et al.* 2009). Dişi ratlar üzerinde CdCl₂ toksik etkisine karşı selenyum (Se)'un koruyucu etkisinin olduğunu ve Se'nin GPx ve TrxR (thioredoksin redüktaz) aktivilerini ve glutayon seviyelerini arttırdığını ve lipid peroksidasyon seviyelerinde azalmalara yol açtığı rapor edilmiştir (El-Sharaky *et al.* 2007). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda sarımsaktan elde edilen DTS (diallyl tetrasulfide) ekstrelerinin Cd'nin yol açtığı peroksidatif zararlara karşı etkili bir antioksidan ve koruyucu olarak kullanılabileceği kaydedilmiştir (Ponnusamy and Pari 2011). MT, memelilerin çekirdek, mitokondri, lizozom ve özellikle hücre stoplazmalarında yoğun olarak bulunan proteinlerdir. Cd'nin neden olduğu sitotoksik zararlara karşı MT'nin etkili bir koruyucu olduğu gösterilmiştir (Sabolić *et al.* 2010). Rat testislerinde Cd'nin yol açtığı antioksidan savunma sistemi değişiklikleri ve lipid peroksidasyon seviyelerindeki artışa karşı, koenzim Q(10) ve E vitaminin koruyucu bir rolünün olduğu ve iyi birer antioksidan olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Ognjanović *et al.* 2003). Aynı zamanda ratlarda Cd'nin oluşturduğu gonadotoksik ve spermiotoksik zararlara karşı soğan (*Allium cepa*) ve sarımsak (*Allium sativum*) ekstrelerinin antioksidan savunma sistemini kuvvetlendirdiği, lipid

peroksidasyon seviyelerini azalttığını ve oksidatif hasarlara karşı iyi birer koruyucu oldukları tespit edilmiştir (Ola-Mudathir 2008).

Nitekim MT, askorbik asit, soğan ve sarımsak ekstraları, termisatran, E vitamini, Se ve Zn(çinko) iyonları, sodyum selenat, kateşin (siyah çay), beta karoten (havuç, kavun), resveratrol (üzüm, kızılçık), polifenol (yeşil çay), lutein (ıspanak, kara lahana) gibi antioksidan özellikteki pek çok doğal yada sentetik molekülün Cd toksisitesine karşı etkili bulunmuştur (Becker *et al.* 1991; Akgül ve Ayar 1993; Toyokuni *et al.* 1995).

Diğer taraftan likenler fungus ve alg kombinasyonundan oluşmuş canlılardır. Likenlerin sahip olduğu sekonder bileşikler sayesinde antioksidan, antimutajenik, analjesik ve antiproliferatif olarak birçok alanda yaygın şekilde kullanıldığı bilinmektedir (Boustie and Grube 2005). Mevcut çalışma sonuçları farklı konsantrasyonlardaki *D. intestiniforme* ekstralarının CdCl₂'ye karşı antigenotoksik etkili olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular ışığında, *D. intestiniforme*'nin insan kan hücrelerinde herhangi bir genetik zarara yol açmaksızın farklı konsantrasyonlarda pozitif etkileri olduğu belirlenmiştir. Nitekim, ekstralar ve Cd metalinin birlikte muamelesi, tek başına Cd muamelesine oranla genetik (MÇ), sitotoksik (ÇBİ), biyokimyasal (TAK ve TOD) parametrelerde belirgin iyileştirmeler sağlamıştır. Önceki araştırmalar, bizmutun muhtemel genotoksik etkilerine karşı *D. intestiniforme*'nin anti-mutajenik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Geyikoğlu vd 2007). *D. intestiniforme*'nin sekonder metabolitlerini saptamak amacıyla henüz araştırmalara rastlanmamıştır. Önceki çalışmalarda *Dermatocarpon fluviatile*, *Dermatocarpon hepaticum* ve *Dermatocarpon miniatum* gibi *Dermatocarpon* cinsine ait birçok likenin sekonder metabolit içermediği kaydedilmiştir (Richardson and David 1988; Aydın 2011). Ancak bütün bu türlerin mannitol, sorbitol, volemitol ve arabitol gibi birçok şeker alkolü içerdiği tespit edilmiştir (Taylor 1967; Smith 1969). Oksidatif stresse karşı eritrol, sorbitol veya mannitol gibi şeker alkollerinin hücreleri koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu araştırmada *D. intestiniforme*'nin antioksidan etkisinin içerdiği şeker alkollerinden dolayı olabileceği düşünülmektedir. Civa klorit (HgCl₂)'in insan kan kültürlerinde oluşturduğu sitotoksik etkilere karşı *D. intestiniforme* liken ekstralarının

koruyuculuğu üzerine yapılan çalışmada, lenfositlerdeki DNA hasarları KKD ve MÇ testleriyle ortaya konmuştur. Elde edilen bulgulara göre, insan lenfositlerinde HgCl₂'nin meydana getirdiği genetik hasarlara karşı *D. intestiniforme*'nin DNA'nın direncini arttırdığı gözlenmiştir (Türkez ve Dirican 2011). *D. miniatum* polisakkaritlerinin Cd'nin neden olduğu lipid peroksidaz seviyelerini düşürdüğü ve oksidatif stressi baskıladığı bildirilmiştir (Jin *et al.* 2001).

Pseudevernia furfuracea (L.) Zopf likeninin antimutajenik aktivitesini belirlemek için yürütülen çalışmada, bu liken türünün gram pozitif bakteriler karşı etki gösterdiği fakat gram negatif bakteriler üzerinde etkili olmadığı bulunmuştur (Gücin vd 1997; Aydın 2011). İnsan lenfosit kültürlerinde tarım ve ormancılık faaliyetlerinde zararlıların kontrol edilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan piretroid pestisidlerden biri olan permetrin (PM)'in neden olduğu genetik hasara karşı *Rhizoplaca chrysoleuca* (Sm.) Zopf. liken türünün koruyucu etkisi araştırılmıştır. *R. chrysoleuca*'nın ekstre tipine ve doza bağlı olarak PM tarafından oluşturulan genotoksik etkileri azaltabildiği bildirilmiştir. Ayrıca bu ekstralar anti-genotoksisite aktivitelerine göre metanol > aseton > hekzan şeklinde sıralanmıştır (Aydın vd 2010).

Gliotoxin (GTX; *Gliocladium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen toksik, karsinojenik ve mutajenik sekonder metabolitlerden biri) ile muamele edilmiş lenfosit kültürlerinde *Pseudovernia furfuracea* (L.) Zoph. likeninin rolünü ve farklı konsantrasyonlarda (50, 75 ve 100 ng/mL) GTX'in genotoksik etkileri *in vitro* şartlarda araştırmıştır. Araştırma sonucunda *P. furfuracea* liken ekstralarının GTX tarafından teşvik edilen genetik hasarları azaltabildiği gözlenmiştir (Türkez vd 2010). *Bryoria fuscescens* (Gyeln.) Brodo and Hawksw, *Dermatocarpon intestiniformis* (Körb.) Hasse - Kudratov and Mayrhofer, *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb. ve *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf, liken türlerinin methanol ve sulu ekstralarının toplam antioksidan aktivitesi, toplam fenolik madde içeriği ve indirgeme gücü değerlendirilmiştir. Deneyle sonucunda *P. rufescens*'in su ve metanol ekstralarının en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Odabaşoğlu vd 2005; Aydın 2011). Yapılan diğer bir çalışmada *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale (Parmeliaceae) likeninden elde edilen metil

orsenillat, orsenillik asit, atranorin ve lekanorik asiti içeren fenolik maddelerin orta dereceli antioksidan etki gösterdiği rapor edilmiştir (Jayapraksha and Rao 2000). Ayrıca *Usnea articulata* (Ach.) Motyka likeninden izole edilen stiktik asit türevlerinin önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Lohézic-Le Dèvéhat 2007).

Sonuç olarak, mevcut bulgularımız *D. intestiniforme* likenine ait sulu ekstrelerin mutajenik etkilere sahip olmadıklarını gösterirken, insan lenfositlerinde genotoksik etki oluşturan CdCl₂'ye karşı doza bağlı olarak antioksidan özellik gösterdiği açıkça ortaya konmuştur. Böylece *D. intestiniforme* likeninin genetik ve oksidatif hasarlara karşı yeni bir terapötik kaynak olarak kullanılabilmesi teklif edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abraham, K.S., Abdel-Gawad, N.B., Mahmoud, A.M., El-Gowaily, M.M., Emara, A.M. and Hwaihy, M.M., 2011. Genotoxic effect of occupational exposure to cadmium. *Toxicol Ind Health*, 27 (2), 173-9.
- Afaq, F., Abidi, P., Matin, R. and Rahman, Q., 1998. Activation of alveolar macrophages and peripheral red blood cells in rats exposed to fibers/particles. *Toxicol Lett.*, 99 (3), 175-182.
- Akgül, A., Ayar, A., 1993. Yerli baharatların antioksidan etkileri. *Doğa- TR. J. of Agriculture and Forestry.*, 17, 1061-1068.
- Aksoy, A., Hale, W.H. and Dixon. M., 1999. *Capsella Bursa-Pastoris* (L.) Medic. As A biomonitor of heavy metals, *Sci.Total Environ.*, 226, 177-186.
- Almassy, Z., Krepinski, A.B., Bianco, A. and Köteles, G.J., 1987, The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl. Radiat. Isot.*, 38, 241-249.
- Aslan, A., Öztürk A. ve Kaya E., 1998. Likenlerin ekonomik önemi ve Oltu bölgesinden tespit edilen önemli liken türleri. Geçmişten geleceğe Oltu ve Çevresi Sempozyumu, Erzurum.
- Aslan, A., 2000. Lichens from the Regions of Artvin, Erzurum, and Kars (Turkey). *Israel Journal of Plant Sciences*, 48, 143-155.
- Aydın, E., Türkez H., Anar A. ve Aslan A., 2010. Permetrin ile oluşturulan deneysel DNA hasarında *Rhizoplaca chrysoleuca* (Sm.) Zopf. liken türünün koruyucu etkinliği. 1. Ulusal Palandöken Toksikoloji Sempozyumu, Erzurum.
- Aydın, E., 2011. Erzurum ve Artvin illerinde tespit edilen bazı liken türlerinin sitogenetik ve oksidatif etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Barnes, J., 2000. Pharmacognosy in the 21 St Century. *Pharm J.*, 264, 701-703.
- Becker, BF., Reinholz, N., Leipert, B., Raschke, P., Permanetter, B. and Gerlach, E., 1991. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest.*, 100, 176-181.
- Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A. and Makhija, U., 2005. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis in vitro*. *Biotechnollett.* 27, 991-995.
- Bigersson, B., Sterner, O. and Zimerson, E., 1988. *Chemie und Gesundheit*. VCH Verlagsgesellschaft, 3 (527), 26455-26458.
- Birmingham, D.J. and Key, M.M., 1963. Preliminary survey: U.S. Borax plant, California. Cincinnati, Ohio, Occupational Health Research and Training Facility, Division of Occupational Health.
- Boustie, J. and Grube, M., 2005. Lichens as a promising source of bioactive secondary metabolites, *Plant Genetic Resources*, 3, 273-287.
- Boyacıoğlu, M., 2004. İzmir körfezi sedimentlerinde direkt mutajenlerin belirlenmesi. *E.Ü. Su Ürünleri Derg.*, 21 (1-2), 23-27.
- Brodo, I.M., Sharnoff, S.D. and Sharnoff, S., 2001. *Lichens of North America*. Ch. 10 Lichens and People. Yale University Press, New Haven.

- Brzóska, M.M. and Moniuszko-Jakoniuk, J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem Toxicology*, 39 (10), 967-980.
- Burdon, R.H., 1994. Free radicals and cell proliferation. Free radical damage and its control 28 Nd Ed. In: Rice-Evans Ca, Burdon Rh (Eds), 155–185.
- Çelik, A., Çömelekoğlu, U. ve Yalin, S., 2005. A study on the investigation of cadmium chloride genotoxicity in rat bone marrow using micronucleus test and chromosome aberration analysis. *Toxicol Ind Health*, 21 (10), 243-248.
- Çelik, A., Büyükakilli, B., Çimen, B., Taşdelen, B., Öztürk, M.I. ve Eke, D., 2009. Assessment of cadmium genotoxicity in peripheral blood and bone marrow tissues of male Wistar rats. *Toxicol Mech Methods*, 19 (2), 135-140.
- Cheng, M., Conner, M. K. and Alaria, Y., 1981. Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchanges in bloom's syndrome lymphocytes. *Cancer Res*, 71, 4508-4512.
- Cooke, M.S., Olinski, R. and Evans, M.D., 2006. Does measurement of oxidative damage to dna have clinical significance?. *Clin Chim Acta*, 365, 30-49.
- Coyle, P., Niezing, G., Shelton, T.L., Philcox, J.C. and Rofe, A. M., 2000. Tolerance to cadmium hepatotoxicity by metallothionein and zinc: *In vivo* and *in vitro* studies with mt-null mice. *Toxicology*, 150 (1-3), 53-67.
- Demirel, S. ve Zamani, A.G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg.*, 12 (3), 123-127.
- Demirezen D. ve Aksoy A., 2005. Plazma Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES) kullanılarak bal örneklerinde ağır metal tayini, *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 18, 569-575.
- Donpunha, W., Kukongviriyapan, U., Sompamit, K., Pakdeechote, P., Kukongviriyapan, V. and Pannangpetch, P., 2011. Protective effect of ascorbic acid on cadmium-induced hypertension and vascular dysfunction in mice. *Biometals*, 24 (1), 105-15.
- Dudal, D.R., 2006. Inventory of major soils of the world with special referance to mineral stress. *Plant adaptasion to mineral stres in problem soils*, Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Ithaca, N. Y.
- Eken, A., 2003. Hiberbarik oksijen tedavisi, oksidatif stres ve genetik toksisite arasındaki ilişkinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- El-Azzouzi, B., Tsangaris, G.T., Pellegrini, O., Manuel, Y., Benveniste, J. and Thomas, Y., 1994. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. *Toxicology*, 88 (1-3), 127-39.
- El-Sharaky, A.S., Newairy, A.A., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M. and Sheweita, S.A., 2007. Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats. *Toxicology*, 235 (3), 185-93.
- Ercal, N., Gürer-Orhan, H. ve Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*, 1 (6), 529-39.
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry (Toronto)*, 37 (2), 112-119.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis blocks micronucleus technique. A detailed Fenech, M. and Morley A.A., 1985. Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research*, 148, 29-36.

- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E. and Bonassi, S., 1999. The human micronucleus project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.*, 428, 271-283.
- Fenech, M., 2000. A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis*, 15 (4), 329-336.
- Fouad, A.A., Qureshi, H. A., Yacoubi, M.T. and Al-Melhim, W.N., 2009. Protective role of carnosine in mice with cadmium-induced acute hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*, 47 (11), 2863-70.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D., 1982. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.*, 47, 412-426.
- Galazyn-Sidorczuk, M., Brzóska, M.M., Jurczuk, M. and Moniuszko-Jakoniuk, J., 2009. Oxidative damage to proteins and DNA in rats exposed to cadmium and/or ethanol. *Chem Biol Interact.*, 180 (1), 31-8.
- Galun, M., 1988. *Handbook of Lichenology*, CRC Pres Inc., Florida.
- Geyikoğlu, F., Türkez, H. ve Aslan, A., 2007. The protective roles of some lichen species on colloidal bismuth subcitrate genotoxicity. *Toxicol Ind Health.*, 23 (8), 487-492.
- Gilbert, D.L. and Colton, C.A., 2002. *Reactive oxygen species in biological systems: An inter disciplinary approach*. Kluwer Academic Publishers.
- Glanze, W.D., 1996. *Mosby medical encyclopedia*, Revised Edition, St. Louis, MO, C.V. Mosby.
- Goyer, R.A. and Clarkson, W.T., 2001. *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.
- Göktaş, Ö., 2007. Kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres üzerine resveratrolün koruyucu etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Gücin, F., Dülger, B. ve Aslan, A., 1997. *Pseudovernia furfuraceae* (L.) Zopf likeninin antimikrobiyal aktivitesi. *Çevre Dergisi*, 7, 22-24.
- Güllüce, M., Ağar, G., Aslan, A., Karadayı, M., Bozari, S. ve Orhan, F., 2011. Protective effects of methanol extracts from *Cladonia rangiformis* and *Umbilicaria vellea* against known mutagens sodium azide and 9-aminoacridine. *Toxicol Ind Health*.
- Gündüz, L., Saruşık, A., Tozaçan, B., Davraz, M. ve Çankıran, O., 1998. Pomza Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Cilt1, 285.
- Halliwell, B., 1989. Tell me about free radicals, Doctor: A Review. *J R Soc Med*, 82, 747-752.
- Hartwig, A., 1994. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect.*, 3, 45-50.
- Heinmann, W., 1980. *Fundamentals of food chemistry*. Avı Publishing Comp., 344.
- Helleday, T., 2003. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat. Res.*, 532, 103-115.

- Herzig, R. and Urech, M., 1987. Flechten als bioindikatoren der luftverschmutzung in der schweiz: methoden-evaluation und eichung mit wichtigen luftschadstoffen. VDI Ber., 609, 619-625.
- Huneck, S., 1999. The significance of lichens and their metabolites. Naturwissenschaften, 86, 559-576.
- Ilbars, H., 1997. Kuaförlerde ve kozmetik üretim yerinde çalışan bireylerde olası genotoksik etkilerin mikroçekirdek testi ile araştırılması. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Il'yasova, D. and Schwartz, G.G. 2005. Cadmiucm and renal cancer. Tox App Phar, 207 (2), 179-186.
- Jagetia, G.C. and Adiga, S.K., 1994. Cadmium chloride induces dose-dependent increases in the frequency of micronuclei in mouse bone marrow Mutat Res., 306 (1),85-90.
- Jayaprakasha, G.K. and Rao, L.J., 2000. Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. Z Naturforsch C., 55 (11-12), 1018-1022.
- Jin, J., Bian, X., Ge, P., Jing, H., Ding, L. and Ding, D., 2001. The effects of the polysaccharides from *Dermatocarpon miniatum* on oxygen radicals and lipid peroxidation, Zhong Yao Cai., 24 (9), 660-661.
- Jin, Y.H., Clark, A.B., Slebos, R.J., Al-Refai, H., Taylor, J.A., Kunkel, T.A., Resnick, M.A. and Gordenin, D.A., 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. Nat Genet., 34 (3), 326-9.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A.ve Timur, S., 2009. Metallerin Çevresel Etkileri-I. Metalurji, 136.Sayı Information Occupational Safety and Health Information Centre 1999
- Karakaş, D., 2000. Ağır metallerin toksik etkileri. Tübitak Marmara Araştırma Merkezi Eğitim Notları.
- Karakuş, B., Odabaşoğlu, F., Cakir, A., Halici, Z., Bayir, Y., Halici, M., Aslan, A. ve Süleyman, H., 2009. The effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria*, a lichen species, on indometacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration. Phytotherapy Research, 23 (5), 635-639.
- Karamanoğlu, K., 1971. Türkiye'nin önmeli liken türleri. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 1 (10), 1-50.
- Karihtala, P. and Soini, Y., 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. Apmis, 115, 81-103.
- Kasprzak, K.S., 2002. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. Free Rad. Biol. Med., 32, 958-967.
- Katalay, S. ve Parlak. H., 2004. The effects of cadmium on erythrocyte structure of Black goby (*Gobus niger* L.1758). Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi, 21, 99-102.
- Kirkham, M.B.. 2006. Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendmets. Geoderma, 137, (1-2), 19-32.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardemac, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, J.R.M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrales, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. Mutat. Res., 540, 153-163.

- Kobayashi, E., Okubo, Y., Suwazono, Y., Kide, T., Nishijo, M., Nakagawa, H. and Nogawa, K., 2002. Influence of years engaged in agriculture and number of pregnancies and deliveries on mortality of inhabitants of the Jinzu River Basin Area. *Japan. Occup. Environ. Med.*, 59, 897-850.
- Kosanić, M. and Ranković, B., 2011. Lichens as possible sources of antioxidants. *Pak J Pharm Sci.*, 24 (2), 165-70.
- Kutbay, Y.B., 2001. Sitokalazin-B ile bloklanan hücrelerde yaşa bağlı mikronükleus oranları. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Samsun.
- Lachance, P.A., Nakat, Z. and Jeong, W.S., 2001. Antioxidants: an integrative approach. *Nutr.*, 17, 835-838.
- Lagrega, D., 2004. Hazardous waste management. International Edition, Singapore, 1146.
- Lauwerys, R.R., 1986. Health maintenance of workers exposed to cadmium. The Cadmium Council, Inc., New York.
- Lee, R.F. and Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res.*, 544 (1), 43-64.
- Leonard, S.S., Haris, G.K. and Shi, X., 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Bio Med.*, 37 (12), 1921-1942.
- Lermioğlu, F. and Bernard, A., 1998. Effect of calmodulin-inhibitors and verapamil on the nephrotoxicity of cadmium in rat. *Toxicol Lett.*, 95 (1), 9-13.
- Liu, J., Kadiiska, M.B., Corton, J.C., Qu, W., Waalkes, M., Mason, R.P., Liu, Y. and Klaassen, C.D., 2002. Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice. *Free Radical Bio Med.*, 32, 525-535.
- Lizon, T.G. and Ortiz, E.P., 2004. Drop size liquid membrane dispersions. *Industrial And Engineering Chemistry*, 39, 5020-5028.
- Lohèzic-Le Dèvehat, F., Tomasi, S., Elix, J.A., Bernard, A., Rouaud, I., Uriac P. and Boustie, J., 2007. Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. *Journal of Natural Product*, 70 (7), 1218-1220.
- Maluszynska, J., Juchimiuk, J. and Wolny, E., 2003. Chromosomal aberrations in *Crepis capillaris* cells detected by FISH. *Folia Histochem Cytobiol.*, 41 (2), 101-104.
- Mason, C.F., 1991. Biology of freshwater pollution, Singapore, Essex University, 351.
- Méndez-Armenta and Ríos, M., 2007. Cadmium neurotoxicity. *Environ. Toxicol Phar.*, 23 (3), 350-358.
- Mengel, K. and Kirkby, A., 1979. Principles of plant nutrition. International Potash Institute Worblaufen-Bern, Switzerland, 124-130.
- Misra, H.P. and Fridovich, K., 1972. The generation of superoxide radical during the autooxidation of hemoglobin. *J Biol Chem.*, 247, 6960-62.
- Misra, R.R., Smith, G.T., Waalkes, M.P., 1998. Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines, *Toxicology*, 126 (2), 103-114.

- Murugavel, P., Pari, L., Sitasawad, S.L., Kumar, S. and Kumar, S., 2007. 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.
- Mutlu, S., 2008. Bazı liken türlerinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nemmiche, S., Chabane-Sari, D., Kadri, M. ve Guiraud, P., 2011. Cadmium chloride-induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion. *Toxicol In Vitro.*, 25 (1), 191-8.
- Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 51, 730- 50.
- Nzengue, Y., Steiman, R. and Guiraud, P., 2008. Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines, *Free Radic Res.*, 42 (2), 142-53.
- Nriagu, J.O., 1990. Global metal pollution-poisoning. *The Biosphere Environment*, 32, 7-32.
- Odabaşoğlu, F., Cakir, A., Süleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M. ve Kazaz, C., 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103 (1), 59-65.
- Ognjanovic, B.J., Pavlovic, S.Z., Maletic, S.D., Zikic, R.V., Radojčić, A.S. and Stajin R.M., 2003. Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiol. Res.*, 52, 563–570.
- Ola-Mudathir, K.F., Suru, S.M., Fafunso, M.A., Obioha, U.E. and Faremi, T.Y., 2008. Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm character and testicular oxidative damage in rats. *Food Chem. Toxicol*, 46, 3604–3611.
- Osawa, T., Kumon H., Reece C.A. and Shibamoto T., 1991. Inhibitory effect of lichen constituents on mutagenicity induced by heterocyclic amines. *Environmental and Molecular Mutagenesis (New York, N.Y.)*, 18 (1), 35-40.
- Öztürk, A. ve Aslan, A., 1991. Likenlerin ekonomik özellikleri ve kuzeydoğu anadolu'dan bazı liken türleri. *Yüzüncü Yıl Üni., Fen-Edeb. Fak., Fen Bilimleri Dergisi*, 2/2, 27-42.
- Öztürk, A., 1995. Meme kanserli olguların lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi sıklığı. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A.T. and Nilsson, R., 2003. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res.*, 9, 540 (1), 19-28.
- Perry, P. and Evans, H.J., 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258, 121-125.
- Prasad, N.R., Srinivasan, M., Pugalendi, K.V. and Menon, V.P., 2006. Protective effect of ferulic acid on gamma-radiation-induced micronuclei, dicentric aberration and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat Res.*, 603 (2), 129-134.
- Privezentsev, K.V, Sirota, N.P. and Gaznev, A.I., 1996. Effects of combined action of Cd and gamma radiation on DNA damage and repair in lymphoid tissues of mice *Radiats Biol Radioecol.*, 36 (2), 234-40.

- Ponnusamy, M. and Pari, L., 2011. Protective role of diallyl tetrasulfide on cadmium-induced testicular damage in adult rats: A biochemical and histological study. *Toxicol Ind Health.*, 27 (5), 407-16.
- Purvis, O.W., Coppins, B.J., Hawksworth, D.L., James, P.W. and Moore, D.M., 1992. The Lichen Flora of Great Britain and Ireland. Natural History Museum publications in association with the British Lichen Society, 710.
- Rether, A., 2002, Doktora Tezi, Münih Teknik Üniveristesi, Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen.
- Richardson, S. and David, L., 1988. Medicinal and other economic aspects of lichens In: M. Galun (ED) *LS. Handbook of lichenology*, 3, 93-95.
- Rojas, E., Herrera, L.A., Poirier, L. A. and Ostrosky-Wegman, P., 1999. Are metals dietary carcinogens?. *Mutation Research*, 443, 157-181.
- Rooney, D.E. and Czepulkowski B.H., 1986. *Human cytogenetics: a practical approach.* Oxford-IRL Press-W, 1-224.
- Sabolić. I., Breljak, D., Skarica. M. and Herak-Kramberger, C.M., 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 23 (5), 897-926.
- Selinus, O., Alloway, B., Centeno, J.A., Finkelman, R.B., Fuge, R., Lindh, U. and Smedley, P., 2005. *Essentials of medical geology. Impacts of natural environment on public health*, Elsevier Academic Pres.
- Sharma, D.C. and Forster, C.F., 1994. The treatment of chromium wastewaters using the sorptive potential of lead mould. *Bioresource Technology*, 49, 31-40.
- Shukla, A., Shukla, G.S. and Srimal, R.C., 1996. Cadmium-induced alterations in blood brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Hum. Exp. Toxicol.*, 15, 400-405.
- Smith, D., Muscatine L. and Lewis D., 1969. Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis. *Biol. Rev.*, 44, 17-90.
- Smith, A. L., 1975. *Lichens. Surrey, England, The richmond publishing Co. Ltd.*
- Surrales, J., Xamena, N., Creus, A. and Marcos, R., 1995. The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat. Res.*, 342, 43-59.
- Sienko, R.A., 1983. *Temel Kimya (Chemistry:Principles And Properties)*, (Çevirenler: Gündüz, N., Gündüz, T., Tüzün, C., Pulat, E., Üneri, S., Zeren, A., Özgüner, S.), Savaş Yayınları, Fen Bilimleri Dizisi.
- Taylor, C.J., 1967. The lichens of ohio, Part I. Foliose Lichens. *Biological Notes No. 3*, The Ohio Biological Survey, The Ohio State University, 147.
- Templeton, D.M. and Liu, Y., 2010. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chem Biol Interact.*, 188 (2), 267-75.
- Thomas, M.J., 1995. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working?. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 5, 21-29.

- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: gui Fines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.*, 35 (3), 206-221.
- Tokat, Z.G., 2004. Ankara bölgesi likenlerinin antimikrobaiyal aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Toplan, S.D., Özçelik, N., Dariyerli ve Akyolcu, M.C., 2003. Oxidant and antioxidant status of cadmium administered rats. *J. Phys. IV France*, 107, 1309-1312.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. and Hiai, H., 1995. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett*, 358, 1-3.
- Tripathi, S. and Srivastav, A.K., 2011. Cytoarchitectural alterations in kidney of Wistar rat after oral exposure to cadmium chloride. *Tissue Cell.*, 43 (2), 131-6.
- Tsuruoka, S., Sugimoto, K.I., Muto, S., Nomiyama, K., Fujimura, A. and Imai, M., 2000. Acut 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.
- Türkez, H., 2004. Bizmutun (Bi) *in vitro* şartlarda insan periferel lenfositleri üzerine sitotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Türkez, H., 2007. Bazı bor bileşiklerinin *in vitro* şartlarda periferel insan kanı üzerine genetik ve biyokimyasal. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- Türkez, H., Geyikoglu F., Aslan A., Karagöz Y., Türkez, O. ve Anar, M., 2010. Antimutagenic effects of lichen *Pseudovernia furfuracea* (L.) Zoph. extracts against the mutagenicity of aflatoxin B1 *in vitro*. *Toxicology and Industrial Health*, 26 (9), 625-631.
- Türkez, H. and Dirican, E., 2011. A modulator against mercury chloride-induced genotoxic damage: *Dermatocarpon intestiniforme* (L.). *Toxicol Ind Health*.
- Tutel, B., 1986. Liken biyolojisi ve faydaları, Marmara Üniversitesi-Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2 (2), 185-194.
- Vahter, M., Berglund, M., Akesson, A. and Lidén, C., 2002. Metals and women's health.. *Environ. Res.*, 88 (3), 145-155.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact*, 160 (1), 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, Mt., Mazur, M. and Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int Biochem Cell Biol.*, 39, 44-84.
- Von Sonntag, C., 2006. Free-radical-induced DNA damage and its repair. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Waalkes, M.P., Rehm, S., Riggs, C.W., Bare, R.M., Devor, D.E., Poirier, L.A., Wenk, M.L., Henneman, J.R. and Balaschak, M.S., 1988. Cadmium carcinogenesis in the male Wistar rats: dose-response analysis of tumor induction in the prostate and testes and at the injection site. *Cancer. Res.*, 48, 4656-4663.
- Waalkes, M.P., 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem.*, 79, 241–244.

- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. and Beyersmann, D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192 (2-3), 95-117.
- Wayne, G. and Ming-Ho, Y., 1999. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems. Scrc. Press Llc, 2 Edition.
- Willcox, J.K., Sarah, L.A. and George, L.C., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev In Food Sci Nutr.*, 44 (4), 275-295.
- Wu, X., Yalowich, J.C. and Hasinoff, B.B., 2011. Cadmium is a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II. *J Inorg Biochem.*, 105 (6), 833-838.
- Wirth, V., 1995. Die Flechten Baden Württembergs. Teil 1-2, Ulmer, Stuttgart.
- Xu, G., Zhou, G., Jin, T. and Zhou, T., 1999. Hammarström S, Bergh A, Nordberg G. Apoptosis and p53 gene expression in male reproductive tissues of cadmium exposed rats. *Biometals.*, 12 (2), 131-139.
- Zeybek, N., 1982. Likenler ve sanayide önemi. 4. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitapçığı, 91-95.
- Zeytinoğlu, H., Incesu, Z., Tuylu, BA., Turk, A.O. ve Barutca, B., 2008. Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. *in vitro*. *Phytother Research*, 22 (1), 118-123.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Ağrı'nın Doğubayazıt ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Doğubayazıt'ta tamamladı. 2005 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden 2009 yılında mezun oldu. 2009-2011 Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen aynı enstitüde yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.