

T. C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

KADMIYUM'UN İNSAN ERİTROSİTLERİ ÜZERİNE *IN*
***VITRO* TOKSİK ETKİSİ VE**
VİTAMİN C VE E'NİN KORUYUCU ROLÜ

Özlem TEZCAN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Dilek PANDIR

YOZGAT 2011

T. C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KADMİYUM'UN İNSAN ERİTROSİTLERİ ÜZERİNE *IN VITRO*
TOKSİK ETKİSİ VE
VİTAMİN C VE E'NİN KORUYUCU ROLÜ

Özlem TEZCAN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Dilek PANDIR

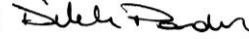
**Bu çalışma, Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri I.F.E-2011/47 No'lu
projesiyle desteklenmiştir.**


YOZGAT 2011


T.C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAYI

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı 7011030005 numaralı öğrencisi Özlem TEZCAN'ın hazırladığı “Kadmiyumun İnsan Eritrositleri Üzerine Toksik Etkisi Ve Vitamin C Ve E'nin Koruyucu Rolü” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezi ile ilgili TEZ SAVUNMA SINAVI, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca 20/12/2011 Salı günü saat 10:00'da yapılmış, tezin onayına OY BİRLİĞİYLE karar verilmiştir.

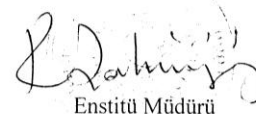
Başkan : Doç. Dr. Dilek PANDIR (Danışman) 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halil Erhan EROĞLU 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fahriye ERCAN 

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26/12/2011 tarih ve 14 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

26/12/2011

Enstitü Müdürü
(Ünvanı, Adı Soyadı)
Prof. Dr. Recep ŞAHİNGÖZ
Bozok Üniversitesi
Fen Bil. Enst. Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	VI
ABSTRACT	VIII
TEŞEKKÜR	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
KISALTMALAR LİSTESİ	XII
1.GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı.....	1
1.2. Tezin Konusu ve Önemi.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kadmiyum.....	3
2.1.1. Toksik Etkileri.....	4
2.1.2. Kronik Pulmoner Bozukluklar	4
2.1.3. Renal Bozukluklar.....	4
2.1.4. İskelet Sistemi	4
2.1.5. Karsinojenite	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Kimyasallar	11
3.2. İnsan Eritrositlerinin Hazırlanması	11
3.3. Eritrositlere Uygulama Planı.....	11
3.4. Malondialdehid Miktarının Belirlenmesi, Antioksidan Enzimlerin Tayini	12
3.4.1. Malondialdehid Miktarının Tayini.....	12
3.4.2. Süperoksit Dismutaz Enzimi.....	12
3.4.3. Katalaz Enzimi	13

3.4.4. Glutasyon Peroksidaz Enzimi.....	13
3.5. Ferrosiyanomethemoglobin Metodu ile Hemoglobin Tayini.....	14
3.6. İstatistiki Analizler	14
4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR.....	15
4.1. Kadmiyum 'un Malondialdehit Miktarına ve Enzim Aktivitelerine Etkisi	15
4.1.1. Kadmiyum'un Malondialdehit Miktarına Etkisi.....	15
4.1.2. Kadmiyum'un Süperoksid Dismutaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	16
4.1.3. Kadmiyum'un Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	16
4.1.4. Kadmiyum'un Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	17
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	19
6. KAYNAKLAR	24
7. ÖZGEÇMİŞ.....	31

**KADMIYUM'UN İNSAN ERİTROSİTLERİ ÜZERİNE *İN VİTRO*
TOKSİK ETKİSİ VE
VİTAMİN C VE E'NİN KORUYUCU ROLÜ**

Özlem TEZCAN

Bozok Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

2011; Sayfa: 31

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Dilek PANDIR

ÖZET

Bu tez çalışmasında, ağır bir metal olan kadmiyumun insan eritrositleri üzerinde oluşturduğu toksik etkiler ve vitamin C ve E'nin lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimler üzerine koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmada, *in vitro* şartlarda farklı dozlarda kadmiyum (1, 50, 150 µM) ve vitamin C (VC; 10 µM) ve vitamin E (VE; 30 µM) kombinasyonunun insan eritrositlerindeki malondialdehit (MDA) seviyesi ile süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Eritrositler farklı uygulamalarda (sadece kadmiyum, sadece vitaminler ve kadmiyum+vitaminler) 37 °C'de 60 dk inkübe edilmiş ve MDA seviyesi ile antioksidan enzim aktiviteleri spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 model, Japon) cihazında ölçülmüştür. MDA seviyesi Ohkawa ve ark'nın (1979), SOD aktivitesi Marklund ve Marklund'un (1974), GPx aktivitesi Paglia ve Valentine'nin (1967), CAT aktivitesi ise Aebi'nin (1984) yöntemlerine göre tespit edilmiştir.

Kadmiyum tek başına uygulandığında eritrositlerde MDA seviyesini arttırdığı, SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde ise azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir (P<0,05). VC+VE uygulaması ile, uygulama yapılmayan kontrol hücreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak yararlı etki sadece kadmiyum'un düşük ve orta düzeydeki uygulama dozlarında (1 ve 50 µM) görülmüş

ve plazma düzeyindeki VC+VE kombinasyonunun koruyucu etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Kadmiyum'un düşük dozunda CAT enzim aktivitesi VC+VE uygulamalı eritrositlerle uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Bu dozdaki kadmiyuma karşı CAT enzim aktivitesinin korunması için plazma seviyesindeki VC+VE uygulamasına gerek kalmamıştır. Elde edilen bu sonuçlar, vitaminlerin plazmada bulunan konsantrasyonlarının, kadmiyum'un yüksek dozlarının (150 µM) eritrositlerde oluşturduğu zararlı etkiler üzerine koruyucu olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, *In vitro*, Eritrosit, Antioksidan aktivite, Vitamin C ve Vitamin E.

**CADMIUM IN HUMAN ERYTHROCYTES *IN VITRO* TOXIC
EFFECTS AND PROTECTIVE ROLE
OF VITAMIN C AND E**

Özlem TEZCAN

Bozok University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

M. Sc. Thesis

2011; Page: 31

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Dilek PANDIR

ABSTRACT

Toxic effect of cadmium, which is a heavy metal, in human erythrocytes and protective role of Vitamins C and E on lipid peroxidation and antioxidant enzymes have been shown in this thesis study.

In this study, the effect of different doses of cadmium (1, 50, 150 μM) and Vitamin C (VC; 10 μM) and E (VE; 30 μM) were examined on the levels of malondialdehyde (MDA) superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzyme activities in human erythrocytes *in vitro*. Erythrocytes were incubated under various treatment conditions (cadmium alone, vitamins alone and cadmium+vitamins) at 37 °C for 60 min than the levels of MDA and antioxidant enzyme activities were determined by spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan). MDA content assayed was described by Ohkawa et al. (1979); SOD activity was determined according to the method described by Marklund and Marklund (1974), GPx activity was measured according to the Paglia and Valentine (1967), and for determination of CAT activity used the method described by Aebi (1984).

Treatment with cadmium alone increased the levels of MDA, and decreased SOD, CAT and GPx activities in erythrocytes ($P < 0,05$). There were no statistically different among cadmium+VC+VE-treated erythrocytes, as compared with non-treated control and VC+VE-treated cells. However, this efficient was seen only at

low and moderate concentrations of cadmium (1 and 50 μM), and combination of VC+VE had protective effect. CAT activity have not changed statistically as compared with non-treated control and VC+VE-treated cells in low concentration. Treatment of plasma level of VC+VE has not necessary for protection CAT activity in low concentration of cadmium. These results indicated that the presence of vitamins at concentrations that are similar to the levels found in plasma have no effect on cadmium-induced toxicity in erythrocytes at high concentration of cadmium (150 μM).

Key words: Cadmium, *In vitro*, Erythrocytes, Antioxidant activity, Vitamin C and Vitamin E.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımnda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaőarak ihtiyaç duyduğum her konuda yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Doç. Dr. Dilek PANDIR'a içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalıőmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Araő. Gör. Hatice BAŞ'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri I.F.E-2011/47 No'lu projesiyle desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Bozok Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Hücre İçi Enzim Savunma Mekanizması	9
Şekil 4.1: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit MDA düzeyleri	15
Şekil 4.2: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit SOD düzeyleri	16
Şekil 4.3: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit CAT düzeyleri	17
Şekil 4.4: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit GPx düzeyleri	18

KISALTMALAR LİSTESİ

MDA: Malondialdehit

CAT: Katalaz

SOD: Süperoksit Dismutaz

GPx: Glutatyon peroksidaz

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

PBS: Fosfat Tamponu

LO•: Lipid alkoksil radikali

L•: Lipid radikali

LPO: Lipid peroksidayon

G-6-PD: Glukoz- 6- fosfat dehidrogenaz

ROT: Reaktif Oksijen Türevleri

VC: Vitamin C

VE: Vitamin E

TBA: Tiyobarbitürik Asit

1.GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı kadmiyum'un insan eritrositleri üzerine *in vitro* olarak toksisitesini spektrofotometrik olarak değerlendirmek ve bu toksik hasar üzerine plazma düzeyindeki VC ve VE kombinasyonunun koruyucu etkisini araştırmaktır.

1.2. Tezin Konusu ve Önemi

Ağır metallerin neden olduğu oksidatif stresi azaltmak ya da tamamen ortadan kaldırmak için çeşitli antioksidan maddeler uygulanmaktadır. Bu antioksidan maddelerin en önemlileri arasında VC ve VE yer almaktadır. Bu tez, ağır metal olan kadmiyum'un uygulanması sonucu insan eritrositlerinde meydana gelen hasarın belirlenmesi, antioksidan enzim sistemlerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi ve plazma düzeyindeki VC ve VE'nin koruyuculuğunun gözlenmesi ve benzer çalışmalara temel oluşturması açısından önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

Ekolojik dengeyi bozan kirletici unsurlar; bazı organik maddeler, endüstriyel atıklar, petrol ve türevleri, yapay tarımsal gübreler, deterjanlar, radyoaktivite, pestisitler, inorganik tuzlar, yapay organik kimyasal maddeler, ağır metaller ve atık ısı olarak bilinen maddelerdir. Bu maddeler doğal dengeyi olumsuz yönde tehdit eden unsurlardır. Birçok ağır metal sanayide kullanılmakta ve atık olarak doğaya terk edilmektedir. Özellikle son on yıldaki endüstriyel gelişmeler deniz çevrelerinin ağır metaller tarafından kirletildiği ve bu kirlenmenin besin zincirine de yansıdığı gerçeğini ortaya koymaktadır. Su ve besinler ile bünyeye alınan ağır metaller canlılarda birikerek tüm yaşam aktivitelerine zarar verebilme ve değiştirebilme potansiyeline sahiptirler [1]. Çevre ve besin kirlenmesine yol açan metaller arasında arsenik, cıva, kadmiyum, kurşun ve çinko gibi metaller kirletici özelliklerine göre ilk sırada yer alırlar.

Normal koşullarda ağır metallerin doğadaki oranı düşüktür. Doğal ortamdaki konsantrasyon oranı arttığında, gümüş, cıva, bakır, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metaller özellikle organizmalar üzerinde toksik etki yapmakta ve enzimleri inhibe etmektedir. Canlılardaki bazı enzimatik aktiviteler için bazı metaller belli konsantrasyonlarda olmak şartı ile gereklidir. Organik maddeye bağlı olan metaller biyolojik aktiviteler sırasında kullanılabilir ve organik maddelerin bozunması ile çözülmüş olarak tekrar serbest hale geçebilir [2]. Çevre kirliliğinin bir göstergesi olarak canlılarda ölçülen metalik kirleticiler özellikle su ürünlerinde sıklıkla yüksek seviyelere ulaşabilir [3]. Ağır metaller, subletal ortam derişimlerinin etkisinde balıkların karaciğer, böbrek ve dalak gibi metal metabolizması ve metal detoksifikasyonu ile ilgili organlarda yüksek düzeyde birikmektedir. Balıklarda karaciğer, ağır metalleri bağlayarak toksik etkilerinin azaltılmasında işlev gören metallothionein ve glutatyon gibi metal bağlayıcı proteinlerin başlıca sentez yerlerinden biridir [4].

2.1. Kadmiyum

Kadmiyum 1817 yılında keşfedilmiş toksik bir metaldir. Endüstriyel kullanımı 50 yıl öncesine dayanır. Genellikle kaplama ve galvanizasyon sanayinde kullanılır. Ayrıca nükleer santrallerde nötron absorblayıcı olarak, uçak sanayinde, insektisit formülasyonlarında, plastik yapımında stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Bunlardan başka boya ve nikel kadmiyumlu pil sanayinde de yaygın olarak kullanım alanı bulunmaktadır. Kurşun üretiminde ise yan ürün olarak oluşur. Bu kullanım alanlarının yanı sıra çevre kirlenmesi açısından önemlidir [5, 6].

1946'da Japonya'da "İtai-İtai" hastalığı olarak belirtilen epidemik olayın kadmiyumdan kaynaklandığı anlaşılmıştır. Hastalığın görüldüğü bölgede bulunan Jintzu Nehri'nin, çinko, kurşun ve kadmiyum filizlerinin çıkarıldığı maden ocaklarının atık suları ile kirlendiği belirlenmiştir. Bölge halkının bu suları sulama ve günlük ihtiyaçlarında kullanması sonucu şiddetli romatizmal ağrılarla karakterize hastalık tablosunun ortaya çıktığı kaydedilmektedir [7].

Endüstriyel atık ve artık maddeler yoluyla toprak ve suya geçen kadmiyum, su ve toprağı kirlendirir. Toprak ve suda biriken kadmiyum, önce sudaki mikroorganizmalara, buradan da besinlerle hayvan ve insanlara yansımaktadır [8].

Pil imalathaneleri civarında bulunan havadaki kadmiyum yoğunluğu 4-5 mg/m³ gibi yüksek düzeylere ulaşabilir. Normalde havadaki yoğunluğu 0,02 mcg/m³'tür. Bu değerler kırsal kesimlerde 0,001-0,005 mcg/m³ değerdedir. Et, balık ve sebzelerde 1-50 mcg/kg, tahıllarda 10-150 mcg/kg ve daha yoğun konsantrasyonlarda da hayvan karaciğer ve böbreklerinde bulunur. Öte yandan midye, istiridye gibi kabuklular için bu değerler 100-1000 mcg/kg'a kadar çıkabilir. Kabuklulardaki kadmiyum birikimi, kadmiyumu bağlayan peptidlerden ve sudaki kadmiyum konsantrasyonundan kaynaklanır [4].

Kadmiyum, vücuda solunum ve sindirim yolu ile girer. Solunum ile alınan kadmiyumun % 15-30'u absorbe edilir. En önemli kadmiyum kaynaklarından biriside sigaradır. Bir sigara 1-2 mcg kadmiyum içerir. Bu miktarın % 10'u (0.1-0.2 mcg) inhalasyon yolu ile alınır [9, 10].

2.1.1. Toksik Etkileri

Gıdalarla alınan yüksek düzeylerde kadmiyum akut toksikasyona neden olur. 16 mg/lt kadmiyum içeren suların içilmesi ile abdominal ağrı, kusma ve bulantı gibi semptomlar şekillenir. Kadmiyumun teneffüs edilmesi ile de akut pnömoni ve pulmoner ödem oluşur. Düşük miktarda kadmiyum alınmasına bağlı olarak kronik obstrüktif akciğer hastalıkları amfizem ve kronik renal tübüler bozukluklar şekillenir. Ayrıca kardiovasküler sistem ve iskelet sisteminde de bozukluklar oluşur [11, 12].

2.1.2. Kronik Pulmoner Bozukluklar

Solunum sistemindeki etkileri, alınan kadmiyum miktarı ile orantılıdır. Obstrüktif akciğer hastalıklarının başlıcaları kronik bronşit, progressif fibrozis ve alveoler tahribata bağlı olarak oluşan amfizemdir. Akciğer hastalıkları dispne, vital kapasitenin azalması ve rezidüel volümün artması ile kendini belli eder. Akciğer lezyonları alveoler makrofajların nekrozisi ile başlar [13].

2.1.3. Renal Bozukluklar

Kadmiyumun etkisi en çok proksimal tübüler fonksiyon üzerinde görülür. Etki sonucu idrar ile atılan kadmiyum miktarı artar; proteinüri, aminoasidüri, glikozüri ve renal tübüler fosfat absorpsiyonunda azalma görülür. Tübülüs hücrelerinde dejenerasyon, bağ dokuda yangı ve fibrozis oluşur [14, 15].

2.1.4. İskelet Sistemi

Kadmiyum toksisitesi sonucu kalsiyum metabolizması etkilenir. Bireylerde şiddetli kalsiyum nefropatileri meydana gelir. Bununla birlikte kronik olaylarda idrardaki kalsiyum seviyesi normalden daha az olabilir. İskelet sistemindeki bozukluklar osteoperozis ve/veya osteomalasi ile neticelenir [13, 16].

2.1.5. Karsinojenite

1965'te İngiltere'de pil yapımında çalışan işçilerde prostat karsinomlarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda, kadmiyumun karsinojenik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [7, 8, 9]. Metalik kadmiyum, kadmiyum sülfat veya

kadmiyum sülfid subkutan ve intramuskuler olarak verildiğinde enjeksiyon bölgesinde tümör oluşumu dikkati çekmiştir. Oluşan tümörlerin malignant karakterde olduğu gözlenmiştir. Bunlar akciğer lenf düğümlerine metastaz yoluyla ulaşabilirler [17].

Her ne kadar kadmiyum organizmada bulunan esansiyel metallere birisi değilse de, günümüzde sanayi ürün artıkları ve gübreleme yöntemleri alınan besinlerdeki kadmiyum düzeyini etkilemekte ve bu nedenle sentetik gübreli toprak yetiştirilen sebze, meyve ve hububatların diyetle alınmaları sonucunda kadmiyumun organizmaya girişi her geçen gün artmaktadır. Yiyecek, içecek, zooteknolojik ürünlere ilaveten sigara ve atmosfer havası ile de kadmiyum bol miktarda vücuda girmektedir [18, 19, 20, 21].

Kadmiyum, biyolojik sistemlerde herhangi bir işlevi olmayan, metal bağlayıcı bileşiklere kolayca bağlanarak organizmadan uzaklaştırılmadığı için birikim bakımından kümülatif etkili, biyolojik yarılanma süresi oldukça uzun toksik bir ağır metaldir [22, 23, 24].

Kadmiyumla ilgili *in vivo* ve *in vitro* çok sayıda deneysel çalışma çeşitli canlılar üzerinde yapılmıştır. Örneğin, kadmiyumun *Gobius niger*'in (kömürücü kaya balıkları) eritrosit yapısı üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla laboratuvar koşullarında 24 gün süreyle birikim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Mikroskopik çalışmalar sırasında kadmiyumun etkisi sonucu bazı histolojik değişiklikler ortaya çıkmıştır. İmmature ve dejenere olmuş eritrosit sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir. Normal eritrositlerde görülen nukleuslar değişikliğe uğrayarak küresel şekil almıştır ve hücre zarı dikensi yapı kazanmıştır (spiküllü eritrosit). Ayrıca, hipokromik anemi, parçalı eritrosit yapısı ve mikronukleus sayısında artış gözlenmiştir [25].

Çalışmalar kronik olarak kadmiyuma maruz kalan insan ve hayvanlarda kadmiyumun öncelikle eritrositlerde lokalize olduğunu göstermiştir [26, 27]. Ayrıca kadmiyum'un *Cyprinus carpio*'da en fazla solungaç dokusunda [28], *Oreochromis aureus*'da böbrek dokusunda [29] biriktiği de görülmüştür. Tavşanlardan alınan kadmiyumun %90'dan fazlasının eritrositlerde biriktiği bildirilmiş [27], tek doz

kadmiyumla yapılan çalışmaların sonuçları da bu bilgiyi doğrulamıştır. Kadmiyumun tek dozda intravenöz olarak verilmesinden sonra eritrositlerin membran ve sitozollerinde arttığı ve eritrosit yaşam süresinin kısaldığı gösterilmiştir. Kadmiyumun eritrosit fonksiyonuna olumsuz etkisi tiyol-reaktif bir metal olması nedeni ile hücre iskeleti ve hücre membranı komponentlerindeki sulfidril gruplar arasında çapraz bağ oluşturması ile açıklanmaktadır [21, 30].

Metaller, özellikle geçiş metalleri biyolojik moleküllerin oksidatif reaksiyonlarında katalizör olarak hareket eder; böylece metal toksisiteleri oksidatif doku harabiyetine bağlı olabilir. Kadmiyum demir, bakır ve krom gibi bir redoks-aktif metal değildir. Hücre içi reaktif oksijen türlerinin üretimini (ROT) mitokondrial elektron transport sistemi [31] üzerindeki inhibitör etkisi nedeniyle uyardığı gösterilmiştir. Bu inhibisyonun bir sonucu olarak, elektron taşıma zinciri son derece azalmış olur; elektronlar mevcut oksijeni doğrudan aktarır ve ROT oluşumuna yol açar [32, 33].

Aerobik koşullarda yaşayan tüm hücreler çeşitli dış ve iç kaynaklardan köken alan çok sayıda oksidana sürekli olarak maruz kalırlar. Ancak sağlıklı bir organizmada ROT ile enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır. Ancak eritrositler gibi bazı hücreler oksidatif süreçlere diğerlerinden daha açık olabilirler. Eritrositlerin sürekli olarak yüksek oksijene maruz kalmaları, hemoglobinin otooksidasyona açık olması ve bir oksidaz/peroksidaz gibi davranabilmesi eritrositleri oksidatif ortama açık hale getirir. Ayrıca eritrositler hasarlı bileşenlerini yeniden sentez ederek onarma yeteneğinden yoksundurlar. Dolayısıyla eritrositler 120 günlük yaşam süreleri zarfında antioksidan bileşenlerine bağımlıdırlar [34].

Kadmiyum, metallothionein kompleksleri tarafından tecrit edilir. Bu proteinler yüksek oranda kükürt içeren aminoasitlerdir ve bağlanan kadmiyumun hücre içi reseptörlerle etkileşimi kesilmektedir [4]. Kan ve dokularda, kadmiyum metallothionein oluşumunu uyarır ve böylece ROT membran fonksiyon kaybına yol açarak eritrositlerde ve çeşitli dokularda oksidatif hasara neden olur [35].

Biyolojik bir sistemde kadmiyum'un meydana getirdiği oksidatif stres lipid peroksidasyonun artmasına ve antioksidan savunma sisteminde değişikliklere neden

olmaktadır [36, 37, 38, 39]. Bu savunma sistemi glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin yanı sıra non-enzimatik antioksidanlardan olan glutatyonu içerir (GSH) [40].

Daha önceki *in vitro* çalışmalarda kadmiyum'un antioksidan enzimler üzerine [41, 42], deney hayvanları üzerine [43, 44, 45] ve insanlar üzerine [46, 47] etkisi incelenmiştir. Çalışma koşullarına bağlı olarak antioksidan enzimler üzerine kadmiyum'un etkileri ile ilgili olarak çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Mikhailova ve ark., (1997) [41] kadmiyum'un insan lenfoblastoid hücrelerinde SOD aktivasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Sarkar ve ark., (1998) [44] kadmiyum zehirlenmesinin lipit peroksidasyonunu (LPO) arttırdığını, sıçan eritrositlerinde antioksidan enzim miktarını düşürdüğünü göstermiştir. Mitsuo ve ark. (2004) [48] yaptıkları çalışmalar sonucunda uzun süreli oral kadmiyuma maruz kalan eritrositlerin antioksidan enzim aktivitelerini inhibe ettiğini göstermiştir.

Kadmiyum klorür, erkek albino sıçanlara (220-240 g) 4 hafta süreyle verilerek, kadmiyum'un eritrosit glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Verilen dozların eritrositlerin antioksidan indikatörü olan G-6-PD aktivitesini önemli derecede azalttığı bulunmuştur [21].

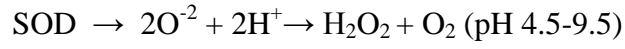
Kadmiyumla beslenen (30 gün için 15 mg CdCl₂/gün/kg) yetişkin sıçanlarda kronik anemi ve trombositoz gelişimine yol açmıştır. Anemi, retikülositlerin belirli değişimi (%13.1±1.0), anizositoz, poikilositoz, demir eksikliği, antioksidanların değişimi ve kırmızı kan hücrelerinin metabolik durumu ile kendini belli etmektedir. Kadmiyum uygulanan sıçanların kırmızı kan hücrelerinde SOD, CAT, GPx enzim aktivitelerinde önemli ölçüde artış saptanmıştır [43].

Bazı fonksiyonel gruplar enzimlerin aktivitelerini göstermelerinde önemli rol oynarlar. Bunlar arasında sulfidril grupları da vardır. Bu grupların karakteristik özelliği, ağır metallerle birleşerek merkaptidleri oluşturması ve enzimlerin aktivitelerinde kayıplara yol açmasıdır [30]. Sulfidril grupları yönünden zengin bir enzim olan G-6-PD'nin aktivitesi öncelikle ağır metallerden etkilenmektedir. Sheabar ve Yannai (1989)'nin [49] G-6-PD ve GPx enzim aktivitelerinin kadmiyum ve arsenik mevcudiyetinde azaldığını ortaya çıkaran *in vitro* çalışmaları bu görüşü

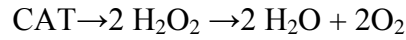
desteklemektedir. Ancak kadmiyumun antioksidan enzim aktiviteleri üzerine yapılan araştırmaların sonuçları arasında çelişkiler vardır. Gill ve ark., (1989) [27]; Sheabar ve Yannai (1989) [49] kadmiyumun G-6-PD aktivitesini azalttığını bildirirken, Boudreau ve ark., (1988) [18] aksini savunmuştur.

Antioksidanlar, genel olarak serbest radikal oluşumunu engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır [50]. Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır. Hücre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları, SOD, CAT ve GPx'tir (şekil 2.1). Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; Glutasyon (GSH), membranlara bağlanabilen α -tokoferol (vitamin E), vitamin C, β -karoten, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir [51].

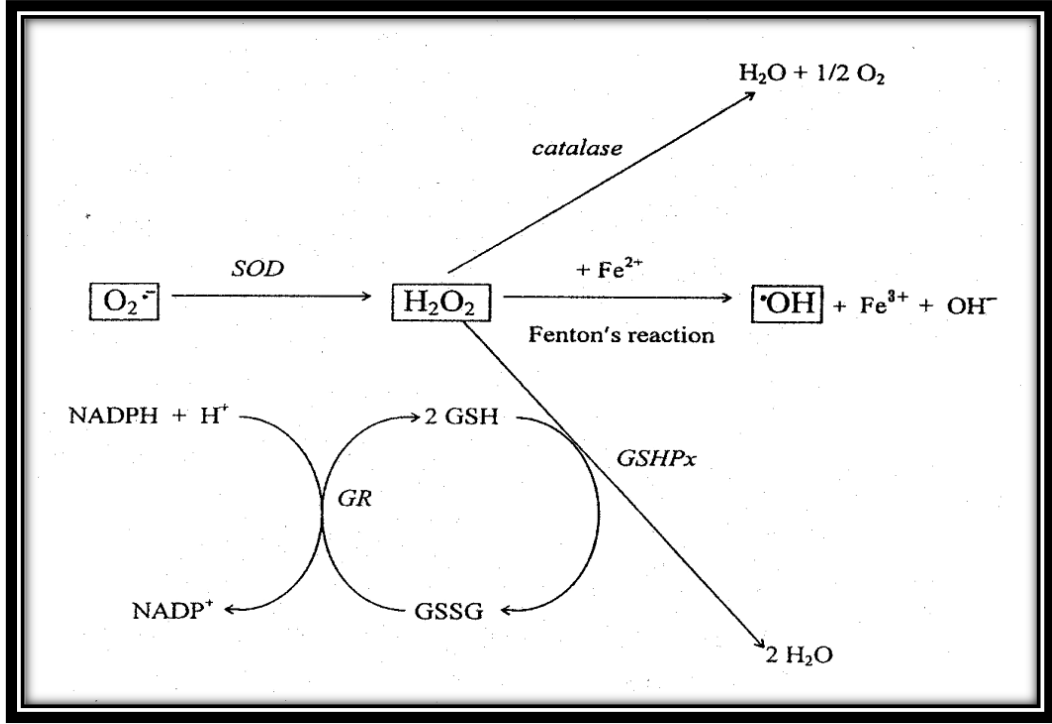
Antioksidan enzimlerden en önemli olan SOD, eritrositlerde, hepatositlerin ve beyin hücrelerinin mitokondri matriksinde bulunur. Kararlı bir yapıya sahiptir. O^{2-} 'i H_2O_2 'ye dönüştüren reaksiyonu katalizler [52].



CAT enzimi ise, hepatositlerin mitokondrisinde ve eritrositlerin sitoplazmasında bulunurken, diğer hücrelerin peroksizomlarında yer alır [52].



GPx, antioksidan enzimlerin en etkin olanıdır. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumludur [52]. H_2O_2 'i suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller [53] ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korur.



Şekil 2.1: Hücre İçi Enzim Savunma Mekanizması [54].

VC ve VE kombinasyonu uygulamalarının çeşitli oksidanların neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu olduğuna ilişkin birçok çalışma mevcuttur [55, 56].

Vitamin C hidrofilik özelliktedir ve ekstrasellüler sıvıdaki serbest radikalleri ve sıvı fazdaki radikalleri temizler ve biyomembranları peroksidatif hasardan korumak üzere hareket eder [57, 58]. Süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Aynı zamanda vitamin C membrandaki tokoferoksil radikalının tokoferole redüklenmesini sağlar [59, 60, 61]. Vitamin C ve E sinerjistik etki gösteren antioksidanlardır [61, 63].

Vitamin E tokoferol yapısına sahiptir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır. D-alfa-tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol de alfa tokoferoldür. Alfa tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur ve lipit peroksidasyonunu inhibe eder. Alfa tokoferol, lipit peroksit radikallerini yıkarak lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir [64].

Durak ve ark., (2010) [56] ağır metallerden cıva klorürün insan eritrositlerinde lipit peroksidasyonunu arttırdığını ve antioksidan enzim aktivitesini de azalttığını ancak plazma düzeyindeki VC+VE kombinasyonlarının cıva klorürün meydana getirdiği değişiklikleri düzelttiğini bildirmişlerdir.

Ağır metal zehirlenmesinin en çok etkilediği hücreler eritrositlerdir, *in vitro* çalışmalarda kadmiyum'un eritrositlerde oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir [65]. Eritrositler, oksidatif zedelenmeye karşı oksijenle yüksek konsantrasyonda karşılaşmaları, yapılarındaki hemoglobinin kolayca otooksidasyona uğraması, membranlarının lipit peroksidasyonuna duyarlı olması ve zedelenen yapı taşlarını tamir etme yeteneklerinin sınırlı olması nedeniyle oldukça duyarlıdır [66].

Bu çalışmada ağır metallerden kadmiyumun belirli aralıklardaki dozlarının eritrositlerdeki oksidan-antioksidan sistem üzerinde tek başına ve plazma düzeyindeki VC ve VE ile birlikte ne gibi etkilere yol açtığının araştırılması amaçlanmıştır. Orijinal olarak tanımlandığı üzere oksidatif stres hücresel ya da bireysel düzeyde oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasıdır [67]. Çalışmada lipit peroksidasyonun bir göstergesi olduğu bilinen Malondialdehit (MDA) düzeyleri, antioksidan enzimler olan SOD, GPx ve CAT aktiviteleri oksijen taşıyıcı rolü nedeniyle oksidatif hasara yatkın olan kadmiyum uygulamalı ve kadmiyum+VC+VE uygulamalı eritrositlerde ölçülmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

% 99 saflıkta CdCl₂ (1, 50 ve 150 µM) [68] kullanılmış ve bu madde Merck'den temin edilmiştir.

Vitamin E (DL-a-tokoferol) (30 µM) Merck, vitamin C (L-askorbik asit) (10 µM) Carlo Erba marka kullanılmış ve bu maddeler Dizdärer'den temin edilmiştir.

Biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasal maddelerin tümü Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'ten temin edildi.

3.2. İnsan Eritrositlerinin Hazırlanması

Bu çalışma için sigara-alkol kullanmayan, çalıştığı ortamda herhangi bir kimyasal maddeye maruz kalmayan sağlıklı 6 erkek bireyden 20 ml kan örneği heparinli tüplere alınmıştır.

Heparinleşmiş tam kan 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Plazma ve lökositler uzaklaştırılmış ve eritrositler fizyolojik tuz çözeltisi (% 0,9'luk NaCl) ile üç kez yıkandıktan sonra aynı çözeltiyle %50 (v/v) oranlı hücre süspansiyonları PBS ile hazırlanmıştır.

3.3. Eritrositlere Uygulama Planı

Eritrositler kontrol grubu (n=6) ve muamele grubu (n=18) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Muamele grubu da kendi içinde üç gruba ayrılmıştır. Bunlar;

1. Grup: Kadmiyum muameleli grup (n=6),
2. Grup: VC+VE muameleli grup (n=6),
3. Grup: VC+VE+kadmiyum muameleli grup (n=6).

Maddeler eritrositlere eklenerek 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma saatine kadar -20 °C'de bekleyen eritrositler soğuk deiyonize su ile 4 kat

sulandırılarak hemolizati elde edilmiştir. Hemolizat örneklerinden antioksidan savunma sistemi enzimlerinden SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri ve MDA seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak spektroskopik (Shimadzu 1800, UV/VIS Spektrofotometre, Kyoto, Japan) yöntem ile belirlenmiştir.

3.4. Malondialdehid Miktarının Belirlenmesi, Antioksidan Enzimlerin Tayinleri

3.4.1. Malondialdehit (MDA) miktarının tayini

MDA, aerobik şartlarda TBA ile 90°C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu kompleksin absorbansı spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okunur. Analizler ve analize ait hesaplamalar, Ohkawa ve ark., 1979'a [69] göre yapılmıştır. Her deney tüpüne % 15'lik TCA içinde % 0,375'lik hazırlanmış olan TBA dan 2 ml alınarak 1 ml homojenat (300 µL+700 µL distile su) üzerine konuldu. Vorteksle karıştırıldıktan sonra, tüpün ağzı kapatılıp 95°C' deki su banyosunda 30 dakika bekletildi. Su banyosundan alınan tüpler, buz içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi ve spektrofotometrede 532 nm'de kör tüpüne karşı absorbansları okundu. Sabit sayı, $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarı nmol/mgHb olarak hesaplandı.

3.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi

Toplam SOD (EC 1.15.1.1) tayininde Marklund ve Marklund (1974) [70] metodu kullanılarak pyrogallol'ün 3 dakikada 440 nm'de alkali ortamda otooksidasyonu ile yükselen absorbansı ölçüldü. Bu enzim aktivitesinin ölçülmesinde 3 ml'lik 7 adet plastik küvete 2,80 ml Tris-EDTA tamponu (50mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,2) ve 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50 µl'lik değişen hacimlerde süpernatant konularak enzim kaynağı ilave edildi. Her küvetin son hacmi Tris-EDTA tamponu ile 2,90 ml'ye tamamlandı. Bu karışımların üzerlerine 100 µl 15 mM pyrogallol ilave edilerek pyrogallol'un otooksidasyonu başlatıldı. Her bir karışımın % inhibisyon miktarları hesaplanarak bir grafik elde edildi ve bu grafik kullanılarak bir ünite toplam SOD aktivitesi pyrogallol'un otooksidasyonun %50 inhibisyonuna sebep olan protein miktarı olarak hesaplandı. Daha sonra homojenattaki 1 mg protein başına toplam

SOD aktivitesini bulmak için 1/ (mg prot.pyrogallolun otooksidasyonun %50 inhibisyonu) eşitliği kullanılarak enzim aktivitesi U/mgHb olarak verildi.

3.4.3. Katalaz (CAT) enzimi

Katalaz (EC 1.11.1.6) enziminin aktivite tayini Aebi (1984) [71] tarafından belirtilen metot ile yapılmıştır. Spektrofotometrede absorbans okumadan önce elde edilen süpernantanda peroksizomlardaki katalazı açığa çıkarmak için %1'lik Triton X-100 (h/h) ilave edildi, daha sonra 50 mM fosfat tamponu (pH 7) eklenerek seyreltme yapıldı. Daha sonra spektrofotometrede (UV dalga boyunda) kullanacağımız cam küvete en son sulandırılmış örnekten 2 ml konarak üzerine 1 ml % 30'luk hidrojen peroksit eklendi ve enzimatik reaksiyon başlatıldı. Üç dakika boyunca 240 nm'de H₂O₂'in parçalanmasını gösteren azalan absorbans ölçüldü. Sabit sayı, (ϵ_{240} : 0,0394 mM/cm) kullanılarak birim zaman başına absorbansdaki değişimler CAT aktivitesinin ölçümü olarak alındı. Enzim aktivitesi U/mgHb birimiyle verildi.

3.4.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi

Glutasyon peroksidaz (EC 1.11.1.9) tayini Paglia ve Valentine (1967) [72] tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. Bu metot okside glutasyon (GS-SG) ve NADPH'ı substrat olarak kullanan glutasyon redüktazın 340 nm'de Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat (NADPH)'ı okside etmesi ile meydana gelen azalan absorbansın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Okside glutasyon, glutasyon peroksidaz tarafından oluşturulduğu için NADPH'ın azalması GPx aktivitesi ile doğru orantılıdır. NADPH'ın Nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat (NADP)'a yükseltgenmesi 340 nm'de absorbansın azalmasına sebep olur, böylece dolaylı olarak GPx'in aktivitesinin tespitinde kullanılmaktadır. Bu enzimin spesifik aktivitesini ölçmek için 3 ml'lik cam küvetlere 2,525 ml 0,1 M'lık Tris-HCl tamponu, 75 µl 80 mM redükte glutasyon, 100 µl seyreltilmiş süpernatant, 100 µl 2 Mm NADPH, 100 µl 0,24 ünite glutasyon redüktaz ilave edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu karışımın üzerine 100 µl 1,5 µM hidrojen peroksit eklenerek enzimatik reaksiyon başlatıldı ve 3 dakika boyunca 340 nm'de azalan absorbanslar okundu. GPx aktivitesi (ϵ_{340} : 6220 M/cm) 1 dakikada 1 mg protein

tarafından harcanan NADPH miktarı olarak hesaplandı ve enziminin spesifik aktivitesi U/mgHb olarak verildi.

3.5. Ferrosiyanomethemoglobin Metodu ile Hemoglobin Tayini

Hemoglobindeki Fe^{+2} , ferrisiyanür ile Fe^{+3} e okside edilir ve potasyum siyanür eklenmesiyle stabil siyanomethemoglobine dönüşür. Siyanomethemoglobinin 540 nm'de ölçülen absorbansı hemoglobin ile doğru orantılıdır [73]. Drapkin çözeltisi için 0.198 g $K_3Fe(CN)_6$, 0.052 g KCN, 1 g NaHCO ayrı ayrı hassas terazide tartıldıktan sonra 1 litrelik balon joje içine konuldu. Bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı. Örnek tüpüne 5 ml Drapkin çözeltisi konuldu. Üzerine 20 µl hemolizat eklenip iyice karıştırıldı. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra Drapkin çözeltisi kör olarak kullanılarak spektrofotometrede 540 nm'de okundu.

Hesaplama işlemi ise;

Hb Konsantrasyonu (g Hb/100 ml kan) = A (Okunan Absorbans Değeri) \times 36,8
(Sabit Katsayı)

3.6. İstatistikî Analizler

Tezde kullanılan istatistiksel veriler Windows SPSS 11.0 bilgisayar programında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

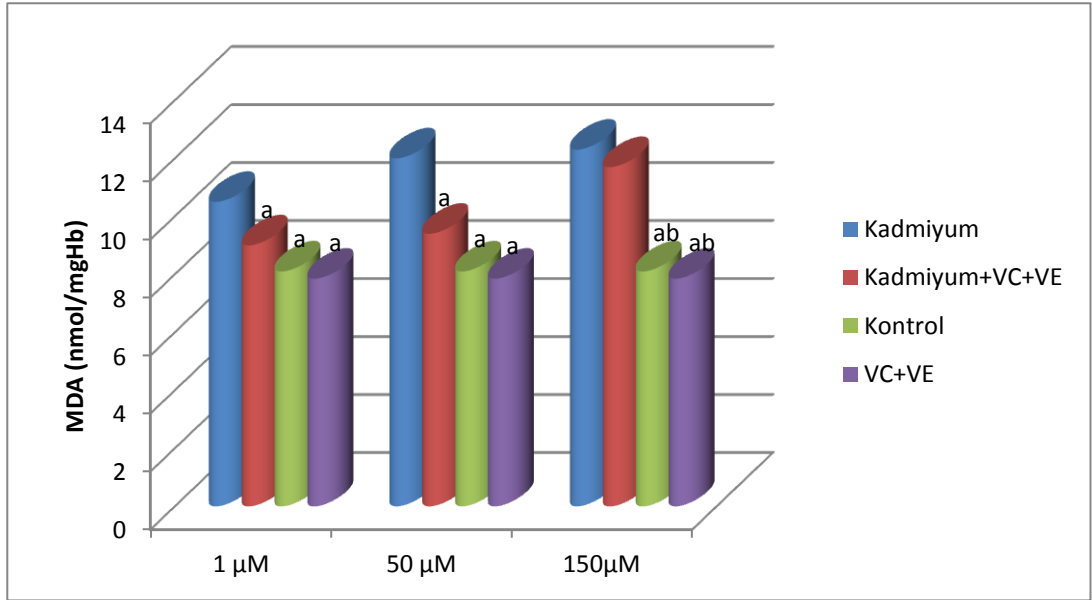
4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

4.1. Kadmiyum'un Malondialdehit (MDA) Miktarına ve Enzim Aktivitelerine Etkisi

Kontrol grubu ile plazma düzeyindeki VC ve VE uygulanan gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir.

4.1.1. Kadmiyum'un Malondialdehit (MDA) Miktarına Etkisi

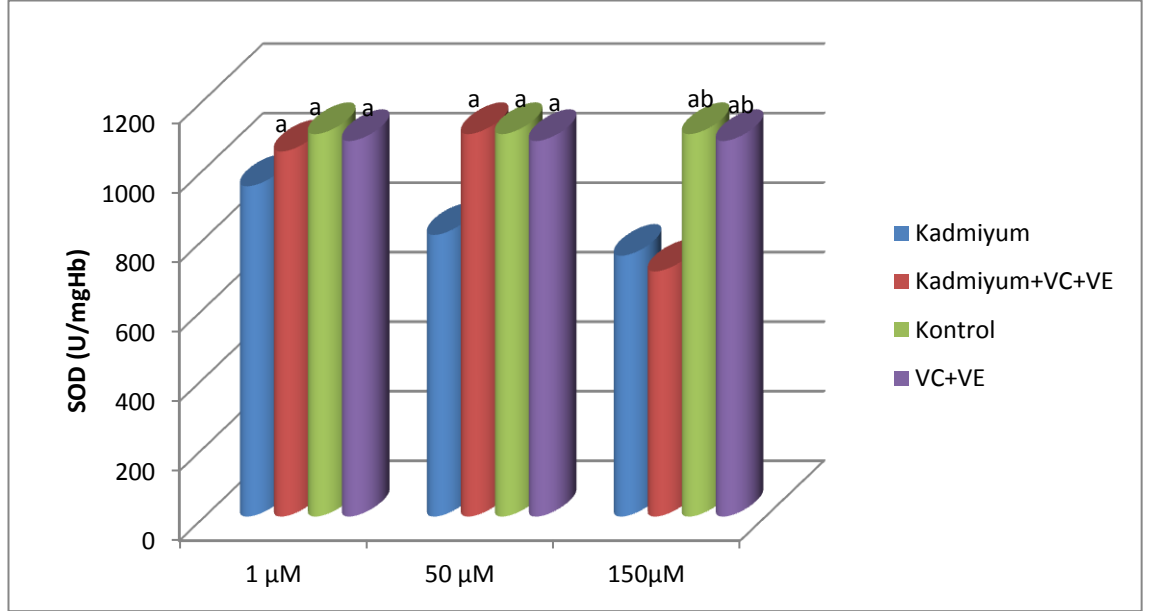
Kadmiyum'un 1, 50 ve 150 μM uygulanan gruplarında MDA değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Kadmiyum'un 1 ve 50 μM dozlarında VC+VE ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu ve VC ve VE uygulanan grup karşılaştırıldığında MDA miktarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 150 μM kadmiyum, VC+VE ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu ve VC+VE uygulanan grup karşılaştırıldığında aynı koruyucu etki gözlenmemiştir.



Şekil 4.1: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit MDA düzeyleri, ^aKadmiyum ile diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bKadmiyum+VC+VE uygulanan grupla kontrol ve VC+VE gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$).

4.1.2. Kadmiyum'un Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesine Etkisi

Kadmiyum'un 1 ve 50 μM uygulanan gruplarında SOD değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelirken kadmiyum'un plazma düzeyindeki VC ve VE uygulamalı gruplarında değişme gözlenmemiştir. Kadmiyum'un 150 μM uygulanan gruplarında SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$) ve kadmiyum'un 150 μM uygulanan grupları ile kadmiyum+VC+VE ile birlikte uygulandığı grupla karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde azalmayı değiştiremediği gözlenmiştir.

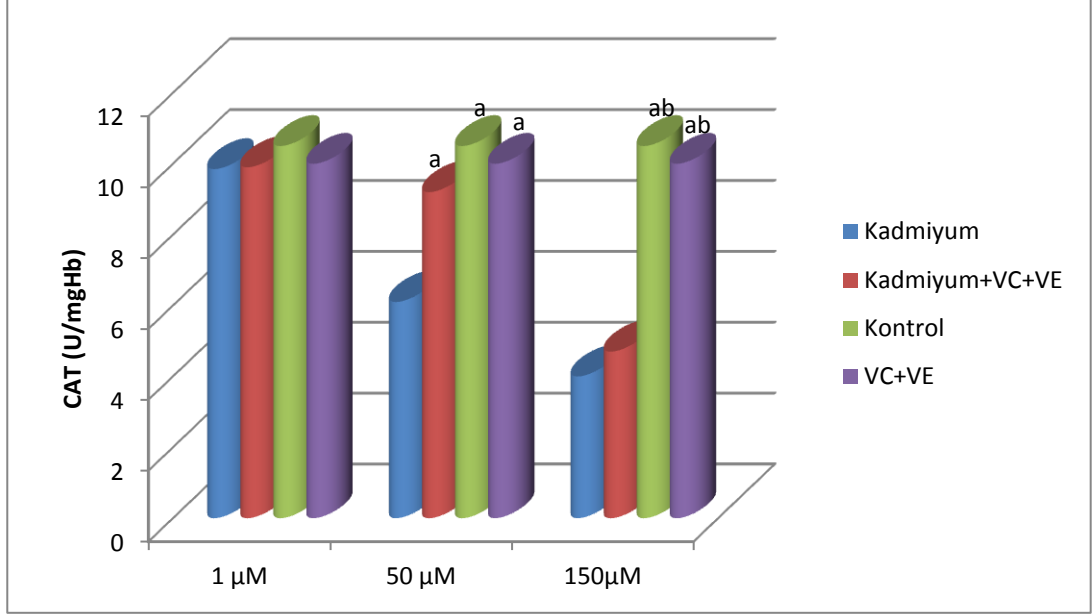


Şekil 4.2: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit SOD düzeyleri, ^aKadmiyum ile diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bKadmiyum+VC+VE uygulanan grupla kontrol ve VC+VE gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$).

4.1.3. Kadmiyum'un Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesine Etkisi

Kadmiyum'un 1 μM uygulanan gruplarında CAT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gözlenmemiştir. Kadmiyum'un 50 ve 150 μM uygulanan gruplarında CAT aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$). Kadmiyum'un 50 μM dozlarında VC+VE ile birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu ve VC ve VE uygulanan grup karşılaştırıldığında CAT aktivitesinde istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 150 μM kadmiyum ve VC+VE ile

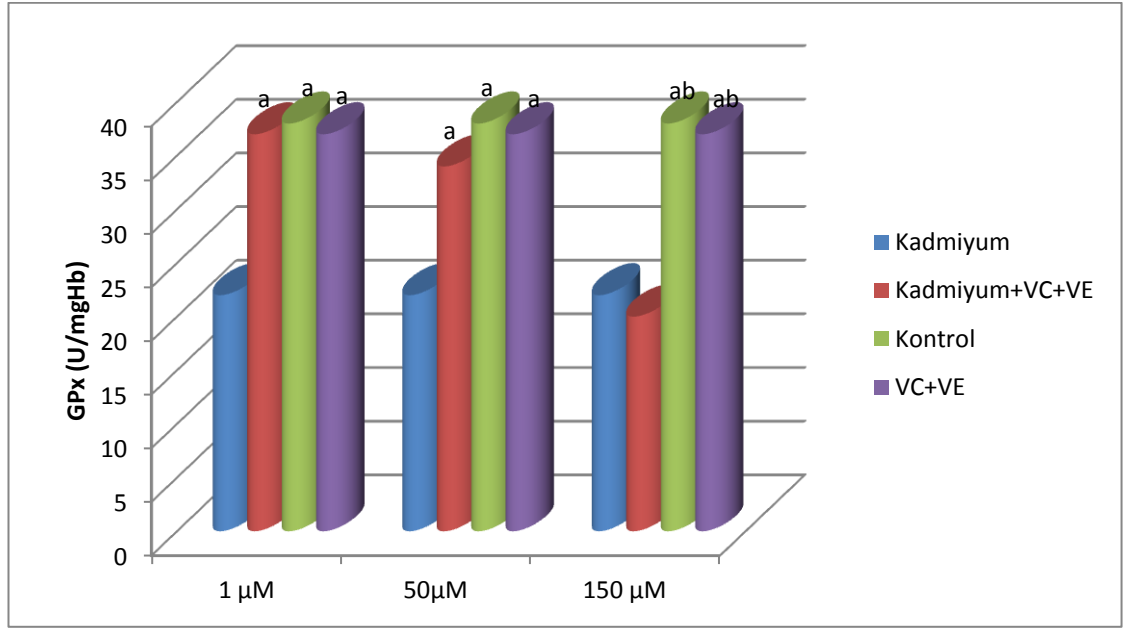
birlikte uygulandığı grupla kontrol grubu ve VC ve VE uygulanan grup karşılaştırıldığında aynı koruyucu etki gözlenmemiştir.



Şekil 4.3: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit CAT düzeyleri, ^aKadmiyum ile diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bKadmiyum+VC+VE uygulanan grupla kontrol ve VC+VE gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$).

4.1.4. Kadmiyum'un Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine Etkisi

Kadmiyum'un 1 ve 50 µM uygulanan gruplarında GPx değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelirken kadmiyum'un plazma düzeyindeki VC ve VE uygulamalı gruplarında değişme gözlenmemiştir. Kadmiyum'un 150 µM uygulanan gruplarında GPx aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$) ve kadmiyum'un 150 µM uygulanan grupları ile kadmiyum+VC+VE ile birlikte uygulandığı grupla karşılaştırıldığında GPx aktivitesinde azalmayı değiştiremediği gözlenmiştir.



Şekil 4.4: Kontrol ve deney gruplarında eritrosit GPx düzeyleri, ^aKadmiyum ile diğer grupların karşılaştırılması ($P<0,05$), ^bKadmiyum+VC+VE uygulanan grupla kontrol ve VC+VE gruplarının karşılaştırılması ($P<0,05$).

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Son yıllarda antropojenik aktivitenin artmasından dolayı özellikle deniz çevresinde toksik metal seviyesinin artışı bu metallerin toksisite mekanizmalarının çalışmasını önemli hale getirmiştir. Ağır metaller ve tuzları çevresel kirleticilerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Bir metalin toksisitesi, makro molekül, metabolit ve hücre organelleriyle birlikte biyolojik sistemlerdeki dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine dayanır [1]. Ağır bir metal olan kadmiyum dolaşım sistemindeki eritrosit hücrelerini birçok açıdan etkilemektedir. Bunları, eritrosit zarlarında bulunan bazı fosfolipid moleküllerine bağlanarak, lipit-protein tabakasındaki iyon kanallarına ve enzimlerine bağlanarak lipit tabakasının moleküler yapısını değiştirerek yapar. Bunu hücre zarının fiziksel özelliklerini yani akıcılığını sinyal iletimi kanal fonksiyonlarını ve protein aktivitesini değiştirerek yapar [74]. Bu çalışmada insan eritrositleri üzerine ağır metallerden kadmiyum'un farklı dozları (1, 50, 150 μM) plazma konsantrasyonundaki VC+VE (10+30 μM) [75, 76] ile birlikte *in vitro* olarak uygulanmıştır.

Moleküler mekanizma kadmiyum'un toksik etkilerinden sorumlu değildir. Çeşitli çalışmalarda kadmiyum'un oksidatif strese ve antioksidan savunma sistemlerini bozarak oksidatif hasara neden olduğu ileri sürülmüştür [77, 78, 79]. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu hasara karşı hücrel koruma sağlayan enzimlerdir. Bu enzim aktiviteleri ölçümü oksidan stresi değerlendirmek için kullanılabilir dolaylı bir yöntemdir. Bu çalışmada kullanılan kadmiyum enzimatik antioksidanlardan GPx, CAT ve SOD'un aktivitesini uygulanan dozlarda azaltma etkisi göstermiştir. Bu antioksidan enzimler eritrositlerde ve diğer dokularda meydana gelen oksidatif stresi nötralize etmektedirler.

Reaktif oksijen türleri çoklu doymamış yağ asidi molekülünden bir hidrojen atomu çıkardığı zaman bir lipit radikali ($\text{L}\cdot$) meydana gelir. Bu lipit radikaline bir oksijen molekülü katılırsa lipit peroksil radikali oluşur. Oluşan lipit peroksil radikali bir biyomembrandan bir hidrojen atomu alıp kendisi lipit hidroperoksite dönüşür. Bu arada yeni bir lipit radikali oluşur. Lipit hidroperoksit bölünerek lipit alkoksil

radikali (LO•) haline gelir. Bir dizi ilerleme ve yıkım evresi sonucunda lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA oluşur. Bu reaksiyonlar antioksidan ajanların fenolik hidrojenini vermesi veya iki peroksil radikalının birleşmesiyle sona erer [80]. Bu çalışmada kadmiyum uygulanan gruplardaki eritrositlerde ölçülen MDA düzeyinin, kontrol ve vitaminli gruplardaki düzeylere göre artmış olması, uygulanan metalin eritrositlerin hücre zarlarının lipit peroksidasyonunu arttırdığını göstermektedir. Vitaminlerin insan eritrositlerinin lipit peroksidasyonunu azaltarak yapmış olduğu antioksidan etki, bu grupta ölçülen MDA düzeyleri ile kontrol grubunda ölçülen veriler arasında anlamlı bir fark olmamasıyla kendini göstermektedir. İnsan eritrositlerinde vitaminlerin ve diğer koruyucu maddelerin (vit E, vit C, B-karoten, coenzyme Q10 gibi), lipit peroksidasyonunu azalttığını bildiren çalışmalarda MDA verileri [81, 82, 83, 84] bulgularımızı destekleyecek niteliktedir. Durak ve ark. (2010) [56] tarafından yapılan bir çalışmada HgCl₂'nin zararlı etkilerine karşı VC ve VE'nin koruyucu etkileri araştırılmış, bu maddenin neden olduğu MDA artışına karşı plazma düzeyindeki VC ve VE'nin koruyucu etkilerinin olduğu saptanmıştır. Eritrositlerde artan MDA miktarı uygulanan kadmiyum miktarına bağlı olarak reaktif oksijen radikallerinin üretiminin artması ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin zayıflamasından ileri gelebilmektedir [56]. Yüksek metal konsantrasyonlarında eritrositlerde MDA miktarında artış görülmesi bu görüşü desteklemektedir.

Çeşitli kimyasal maddelerin ve insektisitlerin memeli hayvanlar üzerinde sebep olduğu hasar üzerinde vitamin C, vitamin E ve VC+VE kombinasyonunun koruyucu etkileri ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır [85]. Vitamin E çok önemli lipofilik antioksidan bir maddedir. En yüksek vitamin E konsantrasyonu mitokondri ve mikrozomlar gibi membranlardan zengin hücre kısımlarında bulunmaktadır ve böylece membran kararlılığını sağlamaya yardımcı olmaktadır. Vitamin E, süperoksit, hidroksil radikalleri tekli (singlet) oksijen, lipit peroksil radikalleri ve diğer radikal örneklerini indirger [86, 87]. Vitamin E lipit peroksidasyonunun erken aşamalarında biyomembrandaki serbest radikal toplayıcı aktivitesi sonucu hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak, lipit peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur ve böylece lipit peroksidasyonunu inhibe eder. Lipit peroksil radikallerini yıkarak lipit

peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir [88]. Vitamin C güçlü indirgeyici aktivitesiyle güçlü bir antioksidandır. Vitamin C hidrofilik özelliktedir. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girer. Vitamin C tokoferoksil radikalının tokoferole redüklenmesini sağlar [60, 61]. Vitamin C ve E sinerjistik etki gösteren antioksidanlardır [63, 89, 90, 91]. Yapılan çalışmalarda VC ve VE kombinasyonunun toksik maddeler tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonunu azaltabileceği ifade edilmiştir [57, 66, 75, 92, 93, 94, 95, 96]. Bu tez çalışmasında VC+VE beraber uygulandıklarında eritrositlerdeki MDA seviyesi, SOD, CAT ve GPx aktiviteleri üzerine yüksek konsantrasyondaki kadmiyuma karşı herhangi bir koruyucu etkileri olmadığı tesbit edilmiştir. Ayrıca düşük dozda (1 µM) uygulanan ağır metalin sadece MDA seviyesinde artışa SOD ve GPx'te azalmaya neden olurken incelenen CAT parametresi üzerinde herhangi bir zararlı etkisi görülmemiştir.

SOD, süperoksit radikallerini hidrojen perokside katalizleyen bir enzimdir. CAT, hidrojen peroksidi suya dönüştürmekle görevli olan bir enzimdir [97]. CAT bütün hücrelerde bulunur ve hidrojen peroksidi suya dönüştürerek hücre içi hidrojen peroksit seviyesini belirli bir düzeyde tutar. GPx, glutasyonu substrat olarak kullanır ve temel görevi hidrojen peroksit ve alkil peroksitlerinin çözünürlüğünü azaltmaktır [98]. Ağır metaller SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde de değişikliklere neden olmaktadır [99, 100, 101, 102]. SOD ve CAT'ın antioksidan aktivitelerinin birbirleri ile denge halinde olması gerektiği [52] ve GPx aktivitesinin de SOD miktarıyla pozitif ilişkili olduğu bildirilmektedir [103]. Yapılan çalışmada, SOD, CAT ve GPx'in kadmiyum uygulanan eritrositlerdeki düzeyleri, kontrol grubunda ölçülen enzim düzeylerine göre daha az bulunmuştur. Bu antioksidan enzimlerin, artan kadmiyum konsantrasyonlarında azaldığını bildiren ve bu nedenle çalışmamızdaki verilerle paralellik gösteren araştırmalar da bulunmaktadır [65, 104, 105, 106, 107, 108]. Bu azalışın, artan konsantrasyonlardaki ağır metalin neden olduğu artan oksidatif stres sonucu meydana geldiği ifade edilmektedir [65]. Sarkar ve ark. (1997) [35] kadmiyumun eritrositler üzerine *in vivo* etkisinde MDA değerinin arttığını, SOD ve CAT enzim aktivitelerinin azaldığını belirtmişlerdir. Vitamin E ve selenyumun beraber uygulandığı gruplarda MDA değerinde azalma, enzim aktivitelerinde ise artma görüldüğü ortaya konmuştur. Yine Sarkar ve ark., (1995)

[81] kadmiyumun çeşitli dokuların antioksidan enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırdıkları bir başka çalışmada CAT aktivitesinin kalp dokusunda azaldığı, böbrek ve karaciğerde herhangi bir değişme göstermediği tespit edilmiştir. Ognjanovic ve ark., (2009) [83] kadmiyumun testis dokusunun antioksidan enzim aktivitesi üzerine etkisi konulu çalışmalarında SOD, CAT, GPx, GR ve GST enzim aktivitelerini azalttığını, lipid peroksidasyonunu arttırdığını ortaya koymuşlardır. CoQ(10) ve Vitamin E'nin koruyucu olarak bu etkileri tam tersine çevirdiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada ağır metal olan kadmiyum'un eritrositlerde 1 µM dozlarında MDA seviyesinde artma olurken SOD ve GPx antioksidan enzim aktivitelerinde azalma, CAT'ta herhangi bir değişme görülmemiştir. Plazma seviyesindeki VC ve VE MDA değerinde, SOD ve GPx aktivitelerinde meydana gelen değişmeyi düzeltmiştir. CAT aktivitesinde herhangi bir değişme olmadığından vitamin etkisine gerek kalmamıştır. Kadmiyum 50 µM dozunda uygulandığında oluşturduğu SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde meydana gelen hasara karşı VC ve VE'nin koruyucu etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Kadmiyum MDA düzeyinde artışa; SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. Uygulanan vitaminler araştırılan bu parametreler üzerinde koruyucu etkiye neden olmuş, artan MDA düzeyinde azalma; azalmış olan antioksidan enzim aktivitelerinde ise artma meydana getirmişlerdir. Uygulanan kadmiyum 150 µM dozunda eritrositlere uygulandığında MDA seviyesinde artış; SOD, CAT, GPx aktivitelerinde ise anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Kadmiyum aynı dozda VC ve VE ile birlikte uygulandığında ise MDA seviyesi ve antioksidan enzim aktiviteleri bakımından karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu dozlarda uygulanan kadmiyum'un araştırılan parametreler üzerine oluşturduğu zararlı etki üzerine VC ve VE'nin herhangi bir koruyucu etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasında ağır metal olan kadmiyumun insan eritrositleri üzerine olan toksik etkisi ve oluşan bu toksik etki üzerine plazma seviyesindeki VC ve VE'nin koruyucu etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda görülmüştür ki plazma seviyesindeki VC ve VE uygulamasının, kadmiyumun eritrositler üzerine neden olduğu toksik etkiyi kısmen azalttığı fakat tam olarak önleyemediği görülmüştür.

Bu nedenle kadmiyum'un ağır metal olarak kullanılması son derece tehlike yaratmaktadır. Dolayısıyla kadmiyum'un sanayide kullanılması kontrol altına alınmalı, bilinçli olarak kullanılması sağlanmalı, kullanımını asgari seviyeye indirilmeli ve zirai çalışmalarda kullanılan sentetik gübreli topraklarda yetiştirilen ürünlerle giderek artan miktarlarda alınan kadmiyum için engelleme yöntemleri geliştirilmelidir. Kadmiyum'la oluşan bu değişiklikler üzerine vitaminlerin kadmiyum'un belirli bir toksisitesine kadar koruyucu olduğu kabul edilebilir. Dolayısıyla, plazma seviyesindeki VC ve VE kadmiyum'un toksik etkilerini azaltmak için faydalı rol oynamaktadır. Diyetlerde vitamin C ve E içeren besinlere yer verilmelidir.

6. KAYNAKLAR

1. Hu, H., Exposure to metals Occup. Environ. Med. 27(4) 983- 996, 2000.
2. Balkıs, N., Algan, O., Marmara Denizi yüzey sedimentlerinde metallerin birikimi ve denetleyen mekanizmalar. Deniz Kirliliği, 21, TÜDAV Yayınları, İstanbul, 2005.
3. Kayhan, F.E., Muşlu, M.N., Koç, N.D., Bazı Ağır Metallerin Sucul Organizmalar Üzerinde Yarattığı Stres Ve Biyolojik Yanıtlar 3(2): 153-162, 2009.
4. Kayhan, F.E., Su Ürünlerinde Kadmiyumun Biyobirikimi ve Toksisitesi E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences Cilt/Volume 23, Sayı/Issue (1-2): 215–220, 2006.
5. Aberhart, A.R., Larson, G.L., Mathews, J.R., Heavy Metals In Surficial Sediments Of Fontana Lake, North Carolina. 18, (13), 351-354, 1984.
6. Eduljee, G., Badsha, K., Price, L., Enviromental Monitoring And Heavy Metals In The Vicinity Of A Chemical Waste Disposal Facility-1. Chemosphere. 14, (9), 1371-1382, 1985
7. Castaing, P., Assor, R., Jouanneau, J.M., Weber, O., Heavy Metal Origin And Concentration In The Sediments Of The Pointe A Pitre Bay (Guadeloupe-Lesser Antilles). Environ. Geol. Water Sci. 8, (4), 175-184, 1986.
8. Massoud, A.K.S., Ezzat, A.A., El-Rayis, O.A., Hayez, H., Occurence And Distriention Of Chemical Pollutants In Lake Maruit, Egypt. II. Heavy Metals. Water, A.R. And Soil Pollution. 16, 401- 407, 1981.
9. Klassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J., Toxicology. 3th Ed. Macmillan Publishing Company, NevvYork, USA, 1986.
10. Nishida, H., Miyai, M., Distribution Function Of Heavy Metals In River Sediment. Bull. Environ. Toxicol. 32, 212-219, 1984.
11. Pearson, C., Lamar, P., Prozialeck, W., Effects Of Cadmium On E-Cadherin And Vecadherin In Mouse Lung. Life Sci 72, (11), 1303-1320, 2003.
12. Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G.F., Kjellström, T., Cadmium In The Environment. 2nd Ed.” CRC Pres, Cleveland, Ohio, 1976.
13. Kirschvink, N., Vincke, G., Fievez, L., Onclinx, C., Wirth, D., Belleflamme, M., Louis, R., Cataldo, D., Peck, M.J., Gustin, Pascal., Repeated Cadmium Nebulizations Induce Pulmonary MMP-2 and MMP-9 Production And Enphysema In Rats. Toxicology 211, (1-2), 36- 48, 2005.
14. Inaba, T., Kobayashi, E., Suwazono, Yasushi., Uetani, M., Oishi, Mitsuhiro., Nakagawa, H., Nogawa, K., Estimation Of Cumulative Cadmium İntake Causing İtai-İtai Disease. Toxicol Lett 159, (2), 192-201, 2005.
15. Vahter, M., Akesson, A., Liden, C., Ceccatelli, S., Berglund, M., Gender Differences In The Disposition And Toxicity Of Metals. Environ Res 104, (1), 85-95, 2007.
16. Nordberg, G.F., Lung Cancer And Exposure To Environmental Cadmium. The Lancet Oncology 7, (2), 99-101, 2006.
17. Baş, L., Demet, Ö., Sayı: 5 Ekoloji, 1992.
18. Boudreau, J., Vincent, R., Nadeau, D., Toxicity Of İnhaled Cadmium Chloride: Early Responses Of The Antioxidant And Surfactant Systems In Rat Lung. J Toxicol Environ Health. 23:241-56, 1988.

19. Faeder, E.J., Chaney, S., King, L., Biochemical And Ultrastructural Changes In Livers Of Cadmium-Treated Rats. *Toxicol Pharmacol.* 39:473-87, 1977.
20. Kunimoto, M., Miura, T., Density Increment And Decreased Survival Of Rat Red Blood Cells Induced By Cadmium. *Environ Res.* 39:86-95, 1986.
21. Gümüşlü, S., Öner, G., Kadmiyumun Eritrosit Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-PD) Aktivitesine Etkisi *Türk Tıp Araştırma.* 10 (5), 1992.
22. Chmielnicka, J., Cherian, M.G., “Environmental Exposure To Cadmium And Factors Affecting Trace-Element Metabolism And Metal Toxicity”, *Biol. Trace Element Res.* 10. 243-262, 1986.
23. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) “Environmental Quality Criteria For Water”, EPA Report No: 440/5-86-001, USEPA, Washington, DC. 1986.
24. Deb, S.C., Fukushima, T., “Metals in Aquatic Ecosystems Mechanisms of Uptake, 1999.
25. Katalay, S., Parlak, H., Kadmiyum’un *Gobius niger* L., 1758 (Pisces: Gobiidae)’in Eritrosit Yapısı Üzerine Etkileri *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences Cilt/Volume 21, Sayı/Issue (1-2):* 99 – 102, 2004.
26. Foulkes, E., Absorption of cadmium. In: Faulkes E C , ed. *Handbook of experimental pharmacology.* New York. Springer Verlag, 75-100, 1986.
27. Gill, K., Pal, R., Nath, R., Effect Of Cadmium On Lipid Peroxidation And Antioxidant Enzymes In Undernourished Weanling Rat Brain. *Pharmacol Toxicol.* 65:73-7, 1989.
28. Suresh, A., Sivaramakrishna, B., Radhakrishnaiah, K., Effect Of Lethal And Sublethal Concentrations Of Cadmium On Energetics In The Gills Of Fry And Fingerlings Of *C. Carpio.* *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51(6): 920-926 pp, 1993.
29. Woo, P.T.K., Yoke, M.S., Wong, M.K., The Effects Of Short-Term Acute Cadmium Exposure On Blue Tilapia *Oreochromis Aureus,* *Environ. Biol. Fish.,* 37: 67-74 pp, 1993.
30. Albert, L., *Biochemistry* 2nd ed. Worth, 85-6, 1970.
31. Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., Oxidative Mechanisms In The Toxicity Of Chromium And Cadmium İons. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19, 201–213, 2000.
32. Ochi, T., Takahashi, K., Ohsawa, M., Indirect Evidence For The İnduction A Pro-Oxidant State By Cadmium Chloride İn Cultured Mamalian Cells And A Possible Mechanism For The İnduction. *Mutat. Res.* 180, 257–266, 1987.
33. Tatrai, E., Kovacicova, Z., Hudak, A., Adamis, Z., Ungvary, G., Comparative In Vitro Toxicity Of Cadmium And Lead On Redox Cycling In Type II Pneumocytes. *J. Appl. Toxicol.* 21, 479–483, 2001.
34. Codandabany, U., Erythrocyte lipid peroxidation and antioxidants in cigarette smokers. *Cell Biochem Funct.* 18: 99-102, 2000.
35. Sarkar, S., Yadav, P., Bhatnagar, D., *Cadmium-induced lipid peroxidation and the antioxidant system in rat erythrocytes: The role of antioxidants.* In: *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,* 11 (1). pp. 8-13, 1997.
36. Manca, D., Ricard, A.C., Trottier, B., Chevalier, G., Studies On Lipid Peroxidation In Rat Tissues Following Administration Of Low And Moderate Doses Of Cadmium Chloride. *Toxicology.* 67:303–23, 1991.

37. Calderoni, A.M., Oliveros, L., Jahn, G., Anton, R., Luco, J., Gimenez, M.S., Alterations In The Lipid Content Of Pituitary Gland And Serum Prolactin And Growth Hormone In Cadmium Treated Rats. *Biometals*. 183:213–20, 2005.
38. Jemai, H., Messaoudi, I., Chaouch, A., Kerkeni, A., Protective Effect Of Zinc Supplementation On Blood Antioxidant Defense System In Rats Exposed To Cadmium. *J Trace Elem Med Biol*. 21:269–73, 2007.
39. El-Sharaky, A.S., Newairy, A.A., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M., Sheweita, S.A., Böbreğe Karşı Selenyum Koruyucu Rolü Toksisitesi Sıçanlarda Kadmiyum İle İndüklenen. *Toksikoloji*. 235:185-93, 2007.
40. Taysi, S., Oxidant/Antioxidant Status In Liver Tissue Of Vitamin B6 Deficient Rats. *Clin Nutr*. 24:385–9, 2005.
41. Mikhailova, M.V., Littlefield, N.A., Hass, B.S., Poirier, L.A., Chou, M.W., Cadmium-Induced 8-Hydroxydeoxyguanosine Formation, DNA Strand Breaks And Antioxidant Enzyme Activities In Lymphoblastoid Cells. *Cancer Lett*. 115, 141– 148, 1997.
42. Hatcher, E.L., Chen, Y., Kang, Y.J., Cadmium Resistance In A549 Cells Correlates With Elevated Glutathione Content But Not Antioxidant Enzymatic Activities. *Free Radic. Biol. Med*. 19, 805–812, 1995.
43. Kostic, M.M., Ognjanovic, B., Dimitrijevic, S., Zikic, R.V., Stajn, A., Rosic, G.L., Zivkovic, R.V., Cadmium-İnduced Changes Of Antioxidant And Metabolic Status In Red Blood Cells Of Rats: In Vivo Effects. *Eur. J. Haematol*. 51, 86–92, 1993.
44. Sarkar, S., Yadav, P., Bhatnagar, D., Lipid Peroxidative Damage On Cadmium Exposure And Alterations In Antioxidant System In Rat Erythrocytes: A Study With Relation To Time. *Biometals*. 11, 153–157, 1998.
45. Casalino, E., Calazaretti, G., Sblano, C., Landriscina, C., Molecular Inhibitory Mechanisms Of Antioxidant Enzymes In Rat Liver And Kidney By Cadmium. *Toxicology* 179, 37–50, 2002.
46. Roels, H.A., Buchet, J.P., Lauwerys, R.R., Sonnet, J., Comparison Of In Vivo Effect Of Inorganic Lead And Cadmium On Glutathione Reductase System And Delta-Aminolevulinate Dehydratase In Human Erythrocytes. *Br. J. Ind. Med*. 32, 181– 192, 1975.
47. Wasowicz, W., Gromadzinska, J., Rydzynski, K., Blood Concentration Of Essential Trace Elements And Heavy Metals In Workers Exposed To Lead And Cadmium. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*. 14, 223–229, 2001.
48. Mitsuo, U., Hidetoyo, T., Keiko, A., Terutaka, K., Minoru, K., Hidekuni Inadera Reduction of erythrocyte catalase and superoxide dismutase activities in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Jinzu river basin, Japan *Toxicology Letters*. 151, 451–457, 2004.
49. Sheabar, F.Z., Yannai, S., *In Vitro* Effects Of Cadmium And Arsenite On Glutathione Peroxidase, Aspartate And Alanine Aminotransferases, Cholinesterase And Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activities In Blood. *Vet Hum Toxicol*. 31(6):528-31, 1989.
50. Powell, S.R., The Antioxidant Properties of Zinc, *J. Nutr.*, 130, 1447–1454, 2000.
51. Koçyiğit, A., Erel, Ö., Gür, S., Effects Of Tobacco Smoking On Plasma Selenium, Zinc, Copper And Iron Concentrations And Related Antioxidative Enzyme Activities. *Clin. Biochem*. 34, 629 – 633, 2002.

52. McIntyre, M., Bohr, D.F., ve Dominiczak, A.F., Endothelial Function In Hypertension: The Role Of Superoxide Anion, Hypertension. 34, 539-545, 1999.
53. Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Baspınar, N. ve Tiftik, A. M., 1. baskı, Konya, Konya Selçuk Üniv. Vet. Fak. Yay. Ünit., Biyokimya Kitabı, 1998.
54. Armstrong, D.A., Aragno, M., Tamagno, E., Gato, V., Brignardello, E., Parola, S., ve Danni, O., Methods in Molecular Biology. Volume 108, Toronto, Humana Pres, 1998.
55. Biri, H., Öztürk, H.S., Büyükkoçak, S., Kaçmaz, M., Çimen, M.Y., Unal, D., Birey, M., Bozkirli, I., Durak, I., Antioxidant Defense Potential of Rabbit Renal Tissues After ESWL: Protective Effects of Antioxidant Vitamins, Nephron. 79 (2): 181-185, 1998.
56. Durak, D., Kalender, S., Uzun, F.G., Demir, F., Kalender, Y., Mercury chloride Induced Oxidative Stress and the Protective Effect of Vitamins C and E in human erythrocytes *in vitro*, African J. of Biotech., 9(4): 488-495, 2010.
57. Yavuz, T., Delibaş, N., Yıldırım, B., Altuntaş, İ., Candır, Ö., Cora, A., Karahan, N., İbrişim, E., Kutsal, A., Vascular Wall Damage in Rats Induced by Methidathion and Ameliorating Effect of Vitamins E and C, Arch. Toxicol., 78: 655-659, 2004.
58. Sulak, O., Altuntaş, İ., Karahan, N., Yıldırım, B., Aktürk, O., Yılmaz, H. R., Delibaş, N., Nephrotoxicity In Rats Induced By Organophosphate Insecticide Methidathion And Ameliorating Effects Of Vitamin E And C, Pestic Biochem And Phys, 83, 21-287, 2005.
59. Stoyanovsky, D., Goldman, R., Darrow, R.İ., Organisciak, D., Kagan, V., Endogenous ascorbate Regenerates Vitamin E In The Retina Directly And In Combination With Dihydrolipoic Acid, Curr Ey Res. 14, 181-189, 1995.
60. Lunec, J., Blake, D., Oxygen Free Radicals: Their Relevance To Disease Processes, In: Cohen, R.D., Lewis, B., Albert, K.G.M.M. The Metabolic And Molecular Basis Of Acquired Disease, Bailliere Tindall, London. 189-212, 1990.
61. Jialal, I., Fuller, C.J., Oxidized LDL And Antioxidants, Clin. Cardiol. 16, 1-9, 1993.
62. Machlin, B.L.J., Scandurra, B., The Antioxidant Role Of Vitamin C, Adv Free Radical Bio Med. 2, 419-444, 1987.
63. Ingers, H., Sies, H., The Production By Ascorbate And Glutathione Against Microsomal Lipid Peroxidation Is In Depended On Vitamin, Eur. J. Biochem. 174, 353-357, 1988.
64. Akkuş, İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınevi, Sağlık dizisi. 5, 43, 68-73, Konya, 1995.
65. Bansal, A.K., and Bhatnagar, D., Cadmium induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vitro in human erythrocytes. Fresenius Envir Bull 5: 460-465, 1996.
66. Kılınç, I., Altuntaş, I., Kaptanağası, M., Doğuç D., Mollaoğlu, H. ve Kaleli, S., Chlorpyrifos-ethyl'in Rat Plazmasında *in Vivo* Lipoperoksidatif Etkisi ile Melatonin ve Vitamin C+Vitamin E'nin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması, SDÜ Tıp. Fak. Derg., 10 (2): 24-28, 2003.

67. Sies, H., Stahl, W., Sundquist, A.R., Antioxidant Function Of Vitamin: Vitamins C & E, B-Carotene And Other Carotenoids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 669: 7-12, 1992.
68. Misra, R., Smith, G.T., Michael, P., Waalkes Evaluation Of The Direct Genotoxic Potential Of Cadmium In Four Different Rodent Cell Lines <http://www.google.com/gwt/n?u=http%3A%2F%2Fwww.sciencedirect.com%2Fscience%2Farticle%2Fpii%2FS0300483X98000031%3F_alid%3D1762013861%26_rdoc%3D1%26_fmt%3Dhigh%26_origin%3Dsearch%26_docanchor%3D%26_ct%3D16%26_zone%3Drslt_list_item%26md5%3Df2b9250162bd65f45b02b2ad5cf7465b> *Toxicology*, Volume 126, Issue 2, 13 March Pages 103-114, 1998.
69. Ohkawa, H., Ohishi, N., ve Tagi, K., Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Anal. Chim.*, 95:351-362, 1979.
70. Marklund, S., Marklund, G., Involvement of superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474, 1974.
71. Aebi, H., Catalase *in Vitro*, *Meth. Enzymol*, 105:121-126, 1984.
72. Paglia, D.E. ve Valentine, W.N., Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, 70:158-169, 1967.
73. Fairbanks, V.F., Klee, G.G., Biochemical Aspects of Hematology. Kitap: Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Eds., Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd Ed., Philadelphia, WB Saunders Company, 1999.
74. Suwalsky, M., Villena, F., Norris, B., Cuevas, F., Sotomayor, C.P., Cadmium-Induced Changes In The Membrane Of Human Erythrocytes And Molecular Models *Journal Of Inorganic Biochemistry.* 98 1061–1066, 2004.
75. Durak, D., Uzun, F.G., Kalender, S., Ögütçü, A., Uzunhisarcıklı, M., ve Kalender, Y., Malathion-Induced Oxidative Stres in Human Erythrocytes and the Protective Effect of Vitamins C and E *in Vitro*, *Environ. Toxicol.*,24: 235-242, 2009.
76. Blasiak, J., ve Stankowska, D., Genotoxicity of Malaoxon: Induction of Oxidized and Methylated Bases and Protective Effect of a -Tocopherol. *Pestic. Biochem. Physiol.* 71: 88-96, 2001.
77. Galan, A., Garcia-Bermejo, L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., Fernandez, C., Blas, E., Aller, P., The Role Of Intra- Cellular Oxidation In Death Induction (Apoptosis And Necrosis) In Human Promonocytic Cells Treated With Stress Inducers (Cadmium, Heat, X-Rays). *Eur. J. Cell Biol.* 80, 312–320, 2001.
78. Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., Oxidative Mechanisms In The Toxicity Of Chromium And Cadmium Ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20, 77–88, 2001.
79. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., Molecular And Cellular Mechanisms Of Cadmium Carcinogenesis. *Toxicology.* 192, 95–117, 2003.
80. Esterbauer, H., Wag, G., Puhl, H., Lipid Peroxidation And Its Role In Atherogenesis. *Br Med Bull.* 49: 566-576, 1993.
81. Sarkar, S., Yadav, P., Trivedi, R., Bansal, A.K., Bhatnagar, D., Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. *J Trace Elem Med Biol.* Oct;9(3):144-9, 1995.

82. El-Demerdash, F., k-Cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidant. *Toxicol in vitro* 21:392–397, 2007.
83. Ognjanovic, B.I., Markovic, S. D., Ethordevic, N. Z., Trbojevic, I.S., Stajn, A.S., Saicic, Z.S. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q₁₀ and Vitamin E. *Reproductive Toxicology* 29 191–197, 2010.
84. Sen Gupta, R., Kim, J., Gomes, C., Oh, S., Park, J., Im, W.B., Seong, J.Y., Ahn, R.S., Kwon, H.B., Soh, J., Effect Of Ascorbic Acid Supplementation On Testicular Steroidogenesis And Germ Cell Death In Cadmium-Treated Male Rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 221, 57–66, 2004.
85. Giray, B., Gürbay, A., Hincal, F., Cypermethrin-Induced Oxidative Stress In Rat Brain And Liver Is Prevented By Vitamin E Or Allopurinol, *Toxicol. Lett.* 118: 139-146, 2001.
86. Mayes, P.A., Structure and Function of the Water-soluble Vitamins, In: Murray R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., Harper's Biochemistry. 23. ed. Lange Medical Publication, London, 573-587, 1993.
87. Gey, K.F., Prospects For The Prevention Of Radical Disease, Regarding Cancer And Cardiovascular Disease, *Br. Med. Bull.* 49 (3): 679-699, 1993.
88. Kumar, J.S., Banudevi, S., Sharmila, M., Murugesan, P., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldhas, M.M., Arunakaran, J., Effects of vitamin C and E on PCB (Arochlor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. *Reprod Toxicol* 19:201–208, 2004.
89. Bendich Machlin, L.J. ve Scandurra, B., The Antioxidant Role of Vitamin C, *Adv. Free Radic. Biol. Med.*, 2: 419-444, 1987.
90. Chatterjee, I.B., Anuradaha, N., Ascorbic acid: A Scavenger of Oxy Radical, *Indian J. Biochem. Biophys*, 28: 233-226, 1991.
91. Prakasam, A., Sethupathy, S. ve Lalitha, S., Plasma and RBCs Antioxidant Status in Occupational Male Pesticide Sprayers, *Clin. Chim. Acta*, 20: 107-112, 2001.
92. Gültekin, F., Delibas, N., Yasar, S., ve Kilinc, I., In Vivo Changes in Antioxidant Systems and Protective Role of Melatonin and a Combination of Vitamin C and Vitamin E on Oxidative Damage in Erythrocytes Induced by Chlorpyrifos-ethyl in Rats, *Arch. Toxicol.*, 75: 88–96, 2001.
93. Karaöz, E., Gültekin, F., Akdoğan, M., Öncü, M., ve Gökçimen, A., Protective Role of Melatonin and a Combination of Vitamin C and Vitamin E on Lung Toxicity Induced by Chlorpyrifos-ethyl in Rats, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 54: 97-108, 2002.
94. Altuntaş, İ., ve Delibaş, N., The Effects of Fenthion on Lipid Peroxidation and some Liver Enzymes: The Possible Protective Role of Vitamins E and C, *Turk. J. Med. Sci.*, 32: 293-297, 2002.
95. Mishra, M., ve Acharya, U.R., Protective Action of Vitamins on the Spermatogenesis in Lead-treated Swiss Mice, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18: 173-178, 2004.
96. De la Asuncion, J.C., Del Olmo, M.L., Gomez-Cambronero, L.G., Sastre, J., Pallardo, F.V., ve Vina, J., AZT Induces Oxidative Damage to Cardiac Mitochondria: Protective Effect of Vitamins C and E, *Life Sci.*, 76: 47-56, 2004.

97. Mansour, S.A., ve Mossa, A.H., Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in Rat Erythrocytes Induced by Chlorpyrifos and the Protective Effect of Zinc, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 93: 34-39, 2009.
98. Bebe, F.N., Panemangalore, M., Exposure to Low Doses of Endosulfan and Chlorpyrifos Modifies Endogenous Antioxidants in Tissues of Rats, *J. Environ. Sci. Health B*, 38: 349–363, 2003.
99. Soares, F.A., Brandao, R., Lara, F.S., Pagliosa, L.B., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Farina M Hemolytic Effects Of Sodium Selenite And Mercuric Chloride In Human Blood. *Drug Chem. Toxicol.* 28(4): 397- 407, 2005.
100. Sinha, S., Datta, K., Chattopadhyay, P., Reactive Oxygen Species In Health And Disease. *Natl. Med. J. India.* 13, 304–310, 2000.
101. Mahaboob Khan, S., ve Kour, G., Subacute Oral Toxicity of Chlorpyrifos and Protective Effect of Green Tea Extract, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 89: 118-123, 2007.
102. Çelik, I., Süzek, H., Subacute Effects of Methyl Parathion on Antioxidant Defense Systems and Lipid Peroxidation in Rats, *Food and Chem. Toxicol.*, 46: 2796-2801, 2008.
103. Aragno, M., Tamagno, E., Gato, V., Brignardello, E., Parola, S., Danni, O. Ve Boccuzzi, G., Dehydroepiandrosterone Protects Tissues of Streptozotocin-Treated Rats Against Oxidative Stress, *Free 31 Radic. Biol. Med.*, 26(11/12), 1467-1474, 1999.
104. Uchida, M., et all. / *Toxicology Letters.* 151, 451–457, 2004.
105. Atalay, M., Laaksonen, D.E., Niskanen, L., Uusitupa, M., Hanninen, O. Ve Sen, C. K., Altered Antioxidant Enzyme Defences in Insülin Dependent Diabetic Men with Increased Resting and Exercise–induced Oxidative Stres, *Acta Physiol. Scand.*, 161(2),195–201, 1997.
106. El-Missiry, M.A., ve El-Gindy, A.M., Amelioration of Alloxan Induced Diabetes Mellitus and Oxidative Stress in Rats by Oil Eruca Sativa Seeds, *Ann. Nutr. Metab.*, 44, 97-100, 2000.
107. Anderson, R.A., Roussel, A.M., Zouari, N., Mahjoub, S., Matheu, J.M. Ve Kekreni, A., Potential Antioxidant Effect of Zinc and Chromium Supplementation in People with Type II Diabetes Mellitus, *J. Am. Coll. Nutr.*, 20(3), 212–218, 2001.
108. Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., Mert, N., Effect of Nigella sativa on Glucose Concentration, Lipid Peroxidation, Antioksidant Defence System and Livern Damage in Experimentally-induced Diabetic Rabbits, *J. Vet. Med.*, 48, 593-599, 2001.

7. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Aydın'da doğan Özlem TEZCAN, orta ve lise öğrenimini sırasıyla Mehmet Akif Ersoy İlkokulu ve Mehmet Akif Ersoy Lisesinde tamamladı. 2005 yılında kazandığı Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2009 yılında başarıyla bitirdi. 2009 yılında Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen aynı enstitüde yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.