

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA KARACİĞER VE BÖBREK DOKUSUNDA KADMIYUM
TOKSİSİTESİ İLE DEĞİŞEN BCL2-BAX ÜZERİNE USNİK ASİT VE
ALFALİPOİK ASİT'İN ETKİSİ**

Sefa AK

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU

KARS – 2019

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA KARACİĞER VE BÖBREK DOKUSUNDA KADMIYUM
TOKSİSİTESİ İLE DEĞİŞEN BCL2-BAX ÜZERİNE USNİK ASİT VE
ALFALİPOİK ASİT'İN ETKİSİ**

Sefa AK

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU

**Bu tez çalışması 2017-TS-31 nolu proje ile Kafkas Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.**

KARS – 2019

TC
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Sefa AK tarafından hazırlanmış olan **“Ratlarda Karaciğer ve Böbrek Dokusunda Kadmiyum Toksisitesi ile Değişen Bcl2-Bax Üzerine Usnik Asit ve Alfalipoik Asit'in Etkisi”** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmenliği uyarınca değerlendirilerek *oy.bic.kipi* ile *kabul* edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/06/2019

Adı Soyadı:

Başkan: Prof.Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU

Üye: Doç.Dr. Aysel GÜVEN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Evren KOÇ

İmza:

[Handwritten signatures in blue ink]

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Kainatta bulunan bütün canlı varlıklar yaşama eğilimindedirler. Canlılar yaşamak için beslenip enerji ihtiyaçlarını karşılamak durumundadırlar. Bu ihtiyaçlar ışığında canlılar kendi aralarında rekabet halinde birbirleriyle beslenmişler ve yaşamları için gerek duydukları enerjiyi sağlamışlardır. Dünyadaki varoluşumuzdan bugüne kadar insanlar, kendileri için yararlı olan bitkilerle ve hayvanlarla beslenerek kendileri için ihtiyaç duydukları enerjileri sağlamışlardır (Sürmeli 2003, Akgün 2011).

1850’li yıllardan sonra tarım alanında gerçekleştirilen modernleşme hareketinin yanında yüksek sanayi teknolojilerinin gelişmesi doğada çeşitli problemler ortaya çıkarmıştır. Gelişen teknolojiyle birlikte artan hızlı nüfuslaşma da, beslenme için gerekli olan ihtiyaçların çoğalmasına neden olmaktadır. Modernleşme hareketiyle yerleşik hayata geçmenin getirdiği çevresel kirliliğin toplum sağlığı açısından kritik seviyelere ulaşması elzemdir. Toprağın kirlenmesi besin zinciri için en önemli etkenlerin başında gelirken bu kirlenmeyi de en çok ağır metaller sağlamaktadır (Sresty ve Madhava Rao 1999).

İnsanlar kentleşmeyle birlikte çiftçilikten çok hazır gıdalara olan yönelimin de artması teknolojik gelişmeleri de beraberinde getirmektedir. Tarım alanında yaşanan gelişmeler neticesinde minimum çalışmalarda maksimum verim elde edebilme gayesidir. Bu gelişmeler için de tarımsal ilaçlama ve kontrolsüz pestisit kullanımı toprak kirliliği için tehlikeli boyutlara ulaşmıştır. Nehir kenarlarında gelişen sanayileşmeyle birlikte elde edilen soğutma çalışmalarında suyun kullanılması ortaya su kirliliğini de beraberinde getirmektedir. Tarım alanında da kirli nehir sularının kullanılması toprak kirliliğini ve bu aşamada metal birikiminin seviyeleri de hat safhalara çıkmaktadır. Toksik etkilere sebebiyet veren ağır metallerin çoğu bitkisel, hayvansal ve hava yoluyla canlıların doku ve organlarında birikmektedir. Canlı vücudunda biriken biriken bu toksik etkileri olan ağır metallerin etki mekanizmalarının belirlenerek bu toksikasyona karşı tedavi edici ve koruyucu etkilerin tespit edilmesi için çok fazla bilimsel çalışmalar yapılmıştır.

Canlıların doku ve organlarında biriken ağır metallerin içinde Kadmiyum ön sıralarda yer almaktadır. Kadmiyum’nin bitki ve canlıların doku ve organlarında

gözenmesine paralel buldukları alanda toprakta da tespit edilmesi, bu toprakların sanayileşmede soğutma için kullanılan sular ile sulanması, fosfor bileşenli gübrelerin kullanılması, madencilik esnasında elde edilen kadmiyumlu bileşiklerin doğaya salınımı ve lağimsal birikintilerin artılmadan doğaya bırakılması ile insan faktörünün de etkisiyle atmosferde kadmiyumun birikmesidir (Assche ve Clijsters 1990).

Kadmiyum çeşitli etkenlerle topraktan süzülerek yer altı sularına karışmakta ve su kirliliği ile canlılara geçmektedir (Köleli ve Kantar 2005). Yarılanma ömrü 15 yıldan 1100 yıla kadar değişen kadmiyum ağır metale karşı toksisitenin önlenmesi veya etkisinin en aza indirilmesi bir zorunluluk halini almaktadır (Lopez ve ark. 2006). Kadmiyum ağır metal olarak sitotoksik etki göstererek serbest radikallerin de etkisiyle oksidatif stresi arttırmak suretiyle canlılarda bulunan ve bağışıklık sisteminin temeline yer alan savunma sisteminde antioksidan savunmasına yönelik sistem yetmezliği gelişmektedir (Casalino ve ark. 2002).

Gün geçtikçe kadmiyumun kullanım alanlarının yaygınlaşması ile ortaya çıkan toksikasyona maruziyet de artmaktadır. Artan kadmiyum toksikasyonuna yönelik alınması gereken önlemlerin ve etkilerinin daha özgül ve daha kapsamlı araştırılması gerektiği kaçınılmaz hale gelmiştir. Canlıların vücuduna çeşitli etkenlerle alınan kadmiyum'un çoğunluğu böbreklerde ve karaciğerde biriktiği bilinmektedir. Sitotoksik etkiler, gerçekleşen oksidatif stresin de etkisiyle olduğu tahmin edilmektedir (Tsuruoka ve ark. 2000).

Bu tez konusunun belirlenmesinde ve tezin yürütülmesinde bana her zaman yön ve destek veren, çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve aynı zamanda akademik gelişimimde büyük emeği geçen danışmanım Prof. Dr. Nadide Nabil KAMİLOĞLU'na çok teşekkür ederim. Her zaman yardıma ihtiyacım olduğunda gözünü kırpmadan koşan sevgili Dr. Barış YILDIZ ve ailesine, her karamsarlığa kapıldığımda ilham ve motivasyon kaynağım sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Evren KOÇ'a ve ailesine, teşekkür ederim. Her fırsatta desteğine ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖNEN, Araş. Gör. Semine DALĞA, Uzm. Fatih UZUN'a, iyi günde kötü günde gerçekten yanımda duran ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Tayibe AK'a, doğduğum günden beri her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili

annem Neriman AK ve babam Kerim AK'a ve ikinci annem gibi beni yetiştiren büyüten biran olsun dualarını üzerimden eksik etmeyen, yakın zamanda dünya hayatından özlediği sonsuzluğa gcen babaannem Ayşe AK'a sonsuz sevgimi, saygımı ve şükranlarımı sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
RESİMLER LİSTESİ	XI
TABLolar LİSTESİ	XII
ÖZET	XIII
SUMMARY	XV
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ağır Metaller	5
2.2. Kadmiyum	8
2.2.1. Kadmiyum'un Toksik Etkileri	10
2.2.3. Cd'un Apoptotik ve Karsinojenik Etkileri	12
2.2.4. Cd toksikasyonu ve Bax–Bcl2 İlişkisi	13
2.2.5. Kadmiyumun Metabolizması ve Fizyolojik Etkileri	14
2.3. Usnik Asit	15
2.4. Alfalipoik Asit	17
2.4.1. Alfalipoik Asit ve Kadmiyum İlişkisi	17
2.5. Bax Ailesi	20
2.6. Bcl-2 Ailesi	22
2.7. Apoptoz mu Hücre Çoğalması mı?	25
2.7.1. Apoptotik Hücre Ölümünün Evreleri	28
2.7.2. Apoptotik Mekanizmalar	29
2.7.3. Hücre İçi Apoptotik Sinyaller	29

2.7.4. Apoptoz Nasıl Oluşur?	29
2.7.5. Bcl-2 Proteinleri	30
2.7.6. Mitokondri ve Endoplazmik Retikulumun Apoptozda Önemi	31
2.7.7. Apoptozda Hücre Dışı Etkiler	31
2.7.8. Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonu	32
2.7.9. Sitotoksik T Lenfosit ile Oluşan Apoptoz	32
2.7.10. Apoptozda Glukokortikoidlerin Etkileri	32
3. MATERYAL ve METOT	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	34
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	34
3.1.3. Hayvan Materyali	35
3.2. Metot	35
3.2.1. Grupların Oluşturulması	35
3.2.2. Dokuların Homojenizasyonu	36
3.2.3. Bax ve Bcl-2 Protein Miktarlarının Belirlenmesi	36
3.2.3.1. Bax Protein Miktarının Belirlenmesi	36
3.2.3.1. Bcl-2 Protein Miktarının Belirlenmesi	37
3.2.4. İstatistiksel Analizler	38
4.1. BULGULAR	39
4.1.1. Karaciğer ve Böbrek Dokularına Ait Bcl-2 Protein Miktarları	39
4.1.2. Karaciğer ve Böbrek Dokularına Ait Bax Protein Miktarları	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
6. KAYNAKLAR	52
7. ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	: Adenozin Difosfat
AİF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
ALA	: Alfa Lipoik Asit
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktörü 1
As	: Arsenik
Bad	: Bcl-2 ile ilişkili ölüm destekçisi
Bak	: BCL-2 antagonist katil
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2
Bcl-XL	: B hücreli lenfoma-ekstra geniş
BH3	: Bcl-2 Homoloji 3
Bmf	: Bax ailesine ait protein
Bid	: BH3 etkileşimli alanlı ölüm
Bik	: BCL2 etkileşimli katil
Bim	: Proapoptotik protein
Cd	: Kadmiyum
CdCl₂	: Kadmiyum Klorür
CdO	: Kadmiyum Oksit
CdS	: Kadmiyum Sülfür
CMC	: Karboksimetisellüloz
CSF	: Koloni uyaran faktörler
Cu	: Bakır
DHLA	: Dihidro Lipoik Asit
DISC	: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EPA	: Amerikan Çevre Koruma Ajansı
ER	: Endoplazmik Retikulum
FAS	: Hücre Membranında Bulunana Apoptoz Sinyal Reseptör Molekülü

FasL	: Hücre Membranında Bulunana Apoptoz Sinyal Reseptör Molekülü
Fe	: Demir
g/cm³	: Gram Bölü Santimetreküp
Hg	: Cıva
HIF-1	: Hipoksi ile uyarılan faktör
HIV	: İmmün Yetmezlik Virüsü
HSP	: Isı Şok Proteini
GSH	: Glutasyon
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IGF	: İnsülin büyüme faktörü
IL	: İnterlökin
LA	: Lipoik Asit
MCL-1	: Miyeloid Hücre Lösemi 1
MT	: Metalloprotein
Na	: Sodyum
NAC	: N- asetilsistein
Noxa	: Bcl-2 ailesine ait antiapoptotik protein
NADH	: β-Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH	: Nikotin Amid Adenin dinükleotit
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa-B
NGF	: Nöron büyüme faktörü
PARP	: Poli ADP Riboz Polimeraz
Pb	: Kurşun
PheeCad	: Halk Sağlığı ve Çevresel Kadmiyuma Maruz Kalma Topluluğu
PUMA	: Apoptosisin Düzenlenmiş Modülatörü
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Se	: Selenyum
SMAC	: İkinci Mitokondriyal Aktivatör
Sit-c	: Sitokrom-c
Smac/DİABLO	: Kaspazın İkinci Mitokondri Türevi Aktivatörü/Düşük P1 İle Doğrudan Apoptoz Bağlayıcı Protein İnhibitörü

STL	: Sitotik T Lenfosit
TAU	: Taurin
TEF-1δ	: Çevirici Uyarıcı Faktör
TIF-3	: Çeviri Başlatıcı Faktör
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNRF-1	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör-1
UA	: Üsnik Asit
USF	: Geri Uyarıcı Faktör
Vb	: Vebenzi
VDAC	: Voltaj Duyarlı Anyon Kanalı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Ağır metallerin hücre içi etkileri.	6
Şekil 2.	Bcl-2 ailesine ait proteinlerin intrinsek yolağındaki regülasyonu.	13
Şekil 3.	Bcl-2 ailesine ait proteinlerin intrinsek yolak.	21
Şekil 4.	Bcl-2 protein ailesinin hücrelerde bulunduğu yerler. Hücre içerisinde bulunan antiapoptotik Bcl-2 Protein ailesi ve Proapoptotik Bax proteini.	23
Şekil 5.	Bcl-2 ailesinin şematik olarak çizimi.	27
Şekil 6.	Apoptozomun ana yolakları ve apoptoz sırasında meydana gelen temel proteinler	30
Şekil 7.	Apoptozom oluşumu.	31
Şekil 8.	Kadmiyum aracılı olarak IP3R1 üzerinden ER'de şekillenen apoptotik yol.	39
Şekil 9.	Bcl-2 düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi.	39
Şekil 10.	Böbrek dokusuna ait Bcl-2 protein miktarları.	40
Şekil 11.	Karaciğer dokusuna ait Bcl-2 protein miktarları.	40
Şekil 12.	Bax düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi.	42
Şekil 13.	Böbrek dokusuna ait Bax protein miktarları.	42
Şekil 14.	Karaciğer dokusuna ait Bax protein miktarları.	42

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1.	Kadmiyum elementi	8
Resim 2.	Liken resmi	16



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Ağır Metallerin Kaynakları ve İnsanlara Olan Etkileri.	7
Tablo 2. Apoptozun morfolojik ve kimyasal yapısında meydana gelen değişimler	26
Tablo 3. Bax protein miktarının belirlenme basamakları	37
Tablo 4. Bcl-2 protein miktarının belirlenme basamakları	38



ÖZET

Kadmiyum içeren malzemelerin kullanımının artışı, kadmiyum toksikasyon riskini ciddi bir sağlık problemi haline getirmiştir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Enstitüsü kadmiyumu birinci sınıf karsinojen olarak sınıflandırmıştır. Bu sebeple kadmiyum toksikasyonunu önleyici farklı metal tutucu maddelerin kullanımının alternatif bir seçenek olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Alfa lipoik asit (ALA) ve usnik asit (UA) ise, metal şelatlama özelliği olduğu bilinen iki farklı metabolittir. Bcl-2 ve Bax hücre içi apoptotik süreçlerde rol alan ve sırasıyla antiapoptotik ve proapoptotik proteinlerdir. Kadmiyum toksikasyonunun da hücre içerisinde apoptotik veya proliferatif etki gösterdiği bilinmektedir. ALA ve UA'nın kadmiyum toksikasyonundaki apoptotik/proliferatif yetenekleri hakkında ise literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 200-250 gram ağırlığa sahip 40 adet Wistar albino rat kullanılmıştır. Hayvanlar 5 gruba ayrılmış (n=8) ve ilk grup kontrol grubu olarak değerlendirilip, on gün süreyle besleme kanülü yardımıyla oral yolla içme suyu verilmiştir. 2. gruba on gün süreyle %1 carboximetilselüloze (CMC) solüsyonu, 3. gruba on gün süreyle 1 mg/kg/gün CdCl₂, 4. gruba on gün süreyle 1 mg/kg/gün CdCl₂ + 50 mg/kg UA 5 mg/dl %1 CMC içinde sulandırılarak, 5. gruba ise on gün 1 mg/kg/gün CdCl₂ +50 mg/kg ALA 5 mg/dl %1 CMC içinde sulandırılarak besleme kanülü ile verilmiştir. Toksikasyon oluşturulmadan on gün önce UA ve ALA toksikasyon gruplarına uygulanmaya başlanmış ve toksikasyonla birlikte uygulamaya on gün daha devam edilmiştir. Yirmi günlük deney süresi sonucunda deneklerden sevofluran anestezisi altında karaciğer ve böbrek doku örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler homojenize edilerek -80°C'de saklanmıştır. Ratlardan alınan karaciğer ve böbrek dokularında Bax ve Bcl-2 protein miktarları ticari ELISA kitleri ile spektrofotometrik yöntemle araştırılmıştır.

Elde etmiş olduğumuz veriler, ALA'nın kadmiyum toksikasyonuna maruz kalmış böbrek dokusunda Bcl-2 ve Bax protein miktarına, UA'dan daha fazla azaltıcı etki gösterdiğini ve bu yönüyle böbrek dokusundaki hücreleri apoptoza uğrama eğiliminden koruduğunu; karaciğer dokusunda ise Bcl-2 protein miktarı üzerinde ALA ile UA'nın benzer etki göstermelerinin yanında, ALA'nın UA'ya nazaran Bax protein

miktarını kontrol seviyelerine çekerek karaciğer dokusunu antiapoptotik eğiliminden koruduğunu göstermektedir. UA ve ALA'nın, dokulara göre bu farklı etkilerinin, sahip oldukları farklı şelatlayıcı özelliklerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Bax, Bcl-2, CdCl₂ Toksikasyonu, Usnik Asit, Alfa Lipoik Asit, Apoptozis, Hücre Proliferasyonu



SUMMARY

The increased use of cadmium-containing materials has made cadmium toxicity a serious health problem risk. International Agency for Research on Cancer classified cadmium as first-class carcinogen. Therefore, it is considered that the use of different metal chelator agents that prevent cadmium toxicity may be considered as an alternative option. Alpha lipoic acid (ALA) and usnic acid (UA) are two different metabolites known to have metal chelating properties. Bcl-2 and Bax are antiapoptotic and proapoptotic proteins that play a role in intracellular apoptotic processes. Cadmium toxicity is also known to have apoptotic or proliferative effect in the cells. There is not enough information about the apoptotic / proliferative ability of ALA and UA in cadmium toxicity in the literature.

In this study, 40 Wistar albino rats weighs 200-250 grams were used. The animals were divided into 5 groups (n = 8) and, the first group was evaluated as the control group and drinking water was given orally via feeding cannula for ten days. The second group modulated with 1% carboxymethylcellulose (CMC) solution for ten days, the third group modulated with 1mg/kg/day CdCl₂ for ten days, the fourth group modulated with 1 mg/kg/day CdCl₂ + 50 mg/kg UA 5 mg/day for ten days and the fifth group modulated with 1 mg/kg/day CdCl₂ +50 mg/kg ALA for ten days by feeding cannula. All mixes was diluted in 1% CMC. Ten days before toxication, UA and ALA were started to be applied to toxication groups and, continued for ten days with toxication. Liver and kidney tissue samples were taken from the rats under sevoflurane anesthesia at the end of the twentieth day. The samples were homogenized and stored at -80°C. The level of Bax and Bcl-2 proteins in liver and kidney tissues of rats were evaluated by commercial ELISA kits by spectrophotometric method.

Our data show that ALA has more decreasing effect on the level of Bcl-2 and Bax protein in cadmium-exposed kidney tissue than UA, and protects cells in kidney tissues from apoptosis; Also, in addition to the similar effects of ALA and UA on the level of Bcl-2 protein in liver tissue, it shows that, ALA protects liver tissue from antiapoptotic tendency by decreasing Bax protein levels to the control levels compared with UA. We think that these different effects of UA and ALA according to tissues are due to their different chelating properties.

Keywords: Bax, Bcl-2, CdCl₂ Toxicity, Usnic Acid, Alpha Lipoic Acid, Apoptosis, Cell Proliferation



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Metaller, insanoğlu için bilinen en eski toksinlerdir. Metalleri diğer toksik maddelerden ayıran en önemli özellikleri, insanlar tarafından ne oluşturulabiliyor ne de yok edilebilir olmalarıdır. Metaller, çevresel taşınım sonucu besinler ve içme suları ile insanlar tarafından veya doğal olarak hava, su, toprak ve besinlerle organizmaya girebilme kabiliyetine sahiptirler. Periyodik cetvelde bulunan 105 elementin yaklaşık 80'ini metaller oluşturmakta ve bunların 30 kadarının insanlarda toksisite oluşturduğu bilinmektedir (Altındag ve ark. 2003). Bu metaller arasında yer alan kadmiyum, selenyum, arsenik, molibden, kurşun ve cıva toksisitelerinin yüksek olduğu bilinen ağır metallerdir. Ağır metallerin tanımlanmasında belirteç olarak yoğunluğu kullanılmakta ve 5 g/cm^3 den daha yoğun olan metaller ağır metal olarak tanımlanmaktadır (Duruibe ve ark. 2007). Ağır metaller arasında, canlı sağlığının önemi açısından araştırma yapılanların başında kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), cıva (Hg) ve arsenik (As) gelmektedir. Bu metaller insanlar tarafından yüzyıllardır kullanılmaktadır. Uzun zamandır sağlık açısından sakıncalı oldukları bilinmesine rağmen çeşitli amaçlarla kullanılmaya devam edilmesi sebebiyle maruziyet günümüzde de önemli bir husustur. Ağır metallerin çevreye yayılımı çoğunlukla hava, su ve toprak aracılığı ile olmaktadır. Canlılar belirtilen metalleri sıklıkla solunum, oral veya deri yoluyla almaktadırlar (Järup 2002). Cd ise tarımsal alanlarda, mineral madenciliğinde, otomotiv ve metal endüstrisinde kullanılan toksik bir ağır metaldir. Özellikle deniz ve alkali ortam aşınmasına karşı mukavemeti nedeniyle demir, çelik, pirinç ve alüminyum kaplamasında kullanıldığı gibi elektrik elektronik ve uzay sanayisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Günlük hayatta Cd pil, boya, plastik, sentetik elyaf, televizyon tüpü ve florasan lamba yapımında, nükleer reaktör kontrol sistemlerinde ve alaşımlarda kullanılmaktadır (Boğa 2007). Yapılan bazı çalışmalarda Cd'a bağlı akciğer hastalıklarının da görüldüğü belirtilmiştir (Demirezen ve Aksoy 2005, Boğa 2007, Johri ve ark. 2010). Cd gıda yolu ile yüksek miktarlarda vücuda alınması durumunda, akut toksikasyonlara neden olarak, kardiovasküler sistemin ve iskelet sistemin bozulmasına yol açmaktadır (Demirezen ve Aksoy 2005). Çeşitli gıdaların yanı sıra içme suyundan, havadan, sigaradan ve metal endüstrisi işyerlerinde solunan hava ile canlı vücuduna girmektedir. Deriden Cd emilimi yoktur. Canlı vücuduna giren

kadmiyum ağır bir şekilde böbrekler ve dışkı yoluyla dışarı atılmaktadır. Böbreklerden ve karaciğerden emilmeye çalışılırken karaciğer ve böbrekler oldukça fazla zarar görmektedirler. Diğer yandan karaciğer ile böbrekler Cd ve Hg gibi çevresel toksik etki gösteren ağır metallerin kirletici etkilerine son derece duyarlı organların başında gelmektedir (Stohs ve Bagchi 1995). Bu aşırı duyarlılıkta subklinik veya klinik açısından erken teşhiste bir yol gösterici olarak dikkate alınabileceği düşünülmektedir (Satarug ve ark. 2003).

Toksik özelliğe sahip ağır metaller gibi materyallerin çeşitli yollarla hücre sel mekanizmalarda apoptotik sinyalleri bozarak ve hücre çoğalmasını uyarıcı sinyalleri aktive ederek kanser gibi hücre sel yapım yıkım dengesinin bozulduğu durumlar için temel oluşturduğu bilinmektedir. Apoptozis çok hücre li canlılarda programlı olarak gerçekleşen hücre ölümüdür. Metabolizma açısından yapım ve yıkım olaylarının dengelenmesi ve can lının normal gelişimi ve potansiyel tehlikelerin giderilmesi açısından önemlidir. Bu yapım ve yıkım arasındaki dengenin bozulması araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda pek çok önemli hastalığın nedeni olarak gösterilmektedir (Rani ve ark. 2014). Hücre ye gelen apoptotik sinyaller ise birçok proapoptotik (Bax) ve antiapoptotik (Bcl-2) proteinleri içererek apoptozda kilit görev üstlenen mitokondri ile yakından ilişkilidir. Bcl-2 ailesi ise, mitokondri üzerine lokalize olmuş birçok antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W ve A1) ve proapoptotik (Bax, Bak ve Bok) üyelerine sahiptir. Antiapoptotik üyeler dışındaki Bax grubu (Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Puma, Noxa ve Hrk) Bcl-2 homologudur ve ortak olarak BH3 interaksiyon bölgesine sahiptirler. Proapoptotik üyeler olan Bax ve Bak mitokondri permeabilitesi üzerinde membran porları düzenleyici etkileri sayesinde geçirgenliğin artmasına ve böylece apoptozis oluşmasına yardımcı olarak düzenleyici işlev görmektedirler (Willis ve Adams 2005, Keinan ve ark. 2010). Bunun yanında mitokondri dışı membranında bulunan VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) voltaj duyarlı kanallardır ve Bax bu kanallar ile etkileşimi sonucunda mitokondri permeabilitesini değiştirmektedir. Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri ise sitokrom-c'nin sitoplazmaya geçişi üzerinde engelleyicidir ve Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu hücre nin apoptoza uğramasını engellediğinden bir proto-onkojen olarak değerlendirilmektedir (Keinan ve ark. 2010). Ağır metallerden olan Cd'nin ise Bcl-2 aracılı apoptik süreçte rol aldığı bilinmektedir (Ishido ve ark. 2002).

Alglerin mantarlar ile birlikte oluşturdıkları simbiyotik canlılar olan likenler; dünyada geniş yayılım alanına sahiptirler. Dünya üzerinde geniş bir yaşam alanına sahip olan likenler, çeşitli alanlarla kullanılmasının yanında tıbbi amaçla, zehir olarak, deri tabaklamada, bira yapımında, parfümeri ve kozmetik gibi birçok alanda kullanılmasının yanında besin olarak da değerlendirilmektedir. Tıbbi alanlarda hastalıklara çözüm amacıyla pek çok araştırmada kullanılan likenlerin antibakteriyel, antiviral, kanamayı durdurucu, balgam söktürücü ve ülser tedavisinde antiparaziter özellikleri gösterilmiştir (Odabasoglu ve ark. 2006). Geçmişten günümüze doğal ürünlerden meydana getirilen bileşikler, tıpta eczacılıkta ilaç geliştirmede kullanılmıştır (Şekerli ve ark. 2017). Liken türlerinden biri de *Usnea longissima*'dan izole edilerek elde edilen UA ise biyolojik olarak oldukça aktif bir antioksidan tümör inhibitörü, antibakteriyel etkilere sahip bir polifenol ikincil metabolit olduğu belirtilmektedir (Cocchietto ve ark. 2002). Bitkilerden elde edilen fenolik bileşikler en büyük eksojen antioksidan grubudur. Organizmada serbest radikallerin artışıyla şekillenen oksidasyon reaksiyonları ise antioksidan savunmayı bozmakta ve hücre sel yağ, protein ve DNA'yı hasara uğratarak fonksiyon kaybına neden olmaktadır (Tutel 1986). Serbest radikallerin oluşturduğu bu metabolik dengesizlik pek çok hastalığın alt yapısını hazırlamakta ve hücre içi enzim reaksiyonlarında değişiklikler oluşmasına yol açmaktadır. UA'nın etkili bir antioksidan olmasıyla birlikte hücre koruyucu kabiliyete de sahip olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Brodo ve ark. 2001). Ayrıca UA'nın güçlü bir antiproliferatif, antitümör, antimikrobiyal, antibiyotik, antioksidan ve antitromboz ajan olduğu da belirtilmektedir (Sokolov ve ark. 2012).

Yapılan çalışmalar (Hauck ve Huneck 2006, Bačkor ve Loppi 2009) genel olarak likenlerin ağır metalleri de tutma kabiliyetlerinin olduğunu göstermektedir. Dünyada likenlerin bol bulunması ve atmosferde serbest halde bulunan metalleri tutma eğiliminin bilinmesinden dolayı ekofizyolojik ve biyolojik izolasyonda çoğunlukla kullanılan bir model olarak karşılaşılmaktadır. Çeşitli çevresel kirleticilere karşı hassaslığının bilinmesinin yanında özellikle hava kalitesinin tespit edilmesinde etkin rol oynamasından dolayı likenler biyomonitörler olarak kullanılmaktadır (Bačkor ve Loppi 2009). Antibiyotik maddeler genellikle likenlerin *Cetraria*, *Cladonia*, *Evernia*, *Alectoria*, *Ramalina*, *Usnea* türlerinden elde edilen Usnik asit, evernik asit, vulpinik asit gibi ikincil metabolitler likenlerin yağ asitlerinden elde edilmektedir. Likenlerden

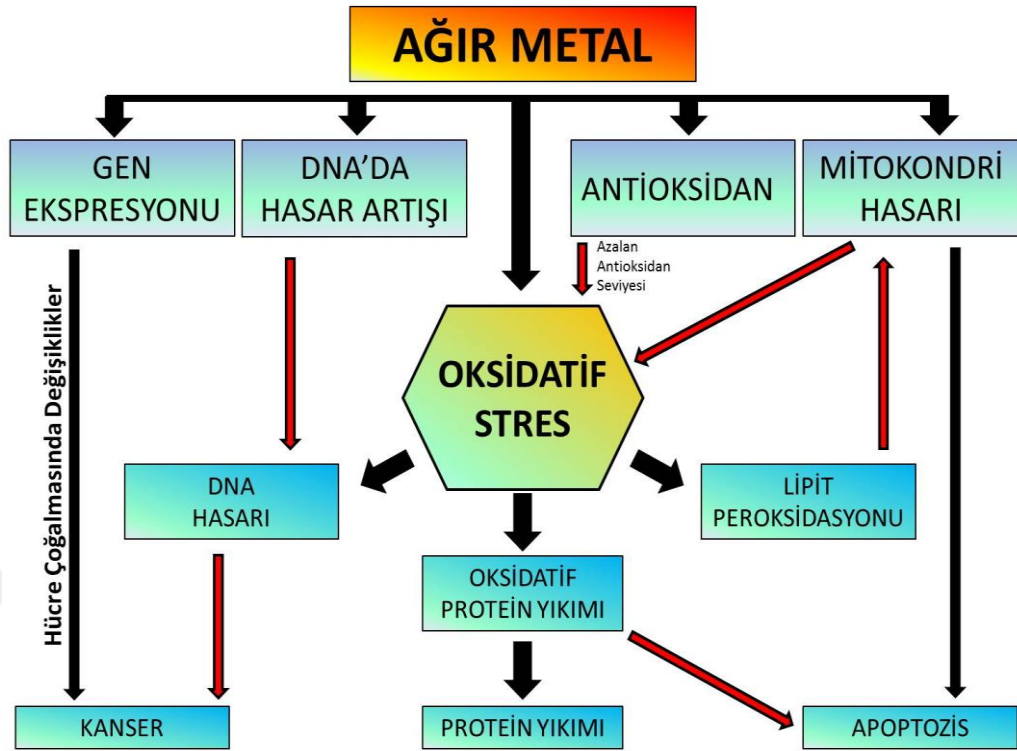
elde edilen ikincil metabolitlerin başında gelen ve usnik asit ile evernik asitin karıştırılmasıyla oluşturulan Evosin maddesi kuvvetli bir antibiyotiktir (Tutel 1986). Gram (+) coccuslara, *Mycobacterium tuberculosis* (verem basili) ve *Corynebacterium diphtheria* (difteri basili)'ye karşı etkilidir. UA'nın Na tuzlarının da etkisiyle *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Mycobacterium* karşı kuvvetli bir antibiyotik etkisi olduğu tespit edilmiştir (Tutel 1986). Geçmişte bin dokuz yüz kırklı yıllarda likenlerin antibiyotik özellikleri ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Solgun sarımsı renkli likenlerde, özellikle de *Usnea* cinsinde, bulunan usnik asidin ekonomik değer taşıyacak kadar önemli olduğu tespit edilmiştir. Orta Avrupa'da yüzeysel enfeksiyon kremlerinde, diğer antibiyotiklerle birlikte veya tek başına da hala kullanılmaktadır (Brodo ve ark. 2001). Dünyada ciddi bir insan patojeni olan ve yüksek endikasyonlara sebebiyet veren grip enfeksiyonuyla mücadele için, ilaç geliştirilmesinde ve daha etkili bir aşının üretilmesinde de önemli bir antiviral olarak kullanılmaktadır (Sokolov ve ark. 2012, Shtro ve ark. 2014). Likenlerin anti kanserojen özelliği için apoptoz yolağıyla gerçekleşen kanser hücrelerinin nasıl ve hangi yolla değiştiği araştırılmıştır. Likenlerden elde edilen ikincil metabolitlerin birçok kanser hücresi üzerinde antiproliferatif etkileri ortaya çıkmıştır (Ozenoglu ve ark. 2013). Kanser vakalarında likenlerden elde edilen metabolitler için, kanserin etki mekanizmasına göre geliştirilecek yeni ilaçların daha etkili ve olumlu sonuçlar ortaya çıkaracağı ümit edilmektedir (Şekerli ve ark. 2017).

Yapacağımız araştırma ile kadmiyum toksikasyonuna maruz kalan rat karaciğer ve böbrek dokusunda Bax ve Bcl-2 yolu (apoptotik/mitojenik yol) üzerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ve bu değişiklikler üzerine Alfalipoik Asit ve Usnik Asit'in etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Metaller

Kelime anlamı olarak tam bir karşılığı bulunmayan (Özdemir ve ark. 2012) ancak yoğunluğu 5 g/cm^3 ten daha yüksek olan ve sağlık alanında bazı elementlerinin düşük miktarlardaki seviyeleri bile organizma için toksik etki oluşturan, sistemlerin işleyişinde aksaklıklara neden olan metaller ‘ağır metaller’ olarak isimlendirilmektedir (Duruibe ve ark. 2007). Bu gruba periyodik cetvelde 60’dan fazla metal dâhil olmaktadır (Bakar ve Alper 2009). En sık karşılaşılan ağır metallerin başında; kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), cıva (Hg), arsenik (As) gibi elementler gelmektedir. Bu elementler, ağır metal tutan preperat ilaçları ve pestisit olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Güley ve ark. 1978). Aynı zamanda bu dört element ise, on dokuzuncu yüzyılın ikinci yarısında, havanın, suyun, toprağın ve gıda kirliliğinin, insan ırkı da dâhil olmak üzere, bitkilerin ve hayvan topluluklarının tamamı için büyük bir tehdit haline geldiği belirtilmektedir (Roy ve Saha 2002, Tucer 2015). Bununla beraber eser miktarda organizma için yararlı olan fakat yüksek seviyelerde alındığında toksik etkilere neden olan ağır metallerin de varlığı bilinmektedir. Bunlar arasında; Çinko (Zn), selenyum (Se), bakır (Cu) gibi elementler yer almaktadır (Duruibe ve ark. 2007, Hercan 2012, Kara ve ark. 2016). Bu elementler yapıları gereği doğada karbonat, oksit, silikat ve sülfür bileşikleri halinde bulunmaktadırlar. Metallere bağlı olarak gelişen sağlık sorunları insanoğlunun metalleri gündelik hayatında kullanmasıyla birlikte ortaya çıkmaya başlamıştır (Yarsan ve ark. 2000, Hercan 2012). Ağır metaller; fiziksel, kimyasal ve biyolojik bir sürü yöntemlerle sudan ayrıştırılabilmektedir fakat, çok yüksek hacimlerin söz konusu olduğu zamanlarda bu işlemlerin oldukça fazla pahalıya mal olması ve yetersiz kalması söz konusudur (Üçüncü Tunca 2014). Ağır metallerin insanların vücutlarında birikme özelliği vardır. Ağır metallerin insan vücuduna girmeleri sindirim yoluyla, solunum yoluyla ve deri yoluyla gerçekleşmektedir (İstanbuluoğlu ve ark. 2013, Şekil 1). Sanayi sektörünün gelişmesiyle birlikte metallere bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklar daha sık görülmeye başlamıştır (Bakar ve Alper 2009, Doğan 2010).



Şekil 1. Ağır metallerin hücre içi etkileri (Özbolet ve Tuli 2016)

İnsanoğlunun doğaya bıraktığı toksik etkiye sahip metallerin tekrar hayvansal ve bitkisel besinlerle ya da içme sularına karışarak organizmaya geri dönmesi sonucu kronik hastalıkların ortaya çıktığı ve ilerleyen aşamalarda kanser vakalarına kadar gelişebilen süreçlerin olduğu hastalıkların sayılarında çok ciddi artışların gözleendiği bilinmektedir (Tablo1).

Tablo 1. Ağır Metallerin Kaynakları ve İnsanlara Olan Etkileri (Sıbiç 2014)

Kirletici	Kaynağı	Etkisi
Arsenik	Maden İşletmeciliği, Anti mikrobik Dezenfektan	Deri ve Cilt Yapısında Kanserler
Bakır	Antimikrobiyal Dezenfektanlar, Madencilik	Solunum Yolları ve Sistemleri Enfeksiyonları
Çinko	Kaynakçılık, Bronz İşletmeciliği	Solunum Yolları ve Sistemleri Enfeksiyonları
Nikel	Endüstriyel İşletmecilik, Maden İşletmeciliği, Kaynakçılık	Solunum Sistemi Enfeksiyonları, Boğaz Ve Gırtlak Kanseri, Allerji
Kurşun	Endüstriyel İşletmecilik, Motor Yakıtları, Altın Vb. Madencilikleri	Kansızlık, beyin ve Duyu, Motor Sistemlerinde Bozulmalar
Kadmiyum	Endüstriyel İşletmecilik, Altın Vb. Madencilikleri	Böbreklerin Yapısında Bozulma, Akciğerlerde Kanseri
Krom	Endüstriyel İşletmecilik, Kaynakçılık	Deri ve Cilt Yapısında Kanserler, Solunum Sistemi Enfeksiyonları, Allerji
Uranyum	Radyoaktif Madde Atıkları	Teması Halinde Doğrudan Kanseri

Ortaya çıkan bu hastalıklar ileri derecede tanı ve tedavi yöntemleri gerektirmektedir. İnsanları, bu tanı ve tedavi yöntemlerine karşı hem çok pahalı hem de ileri teknoloji ürünlerine sahip olmaya zorlamaktadır. Hastalıkların ortaya çıkmasından sonra ileri derece tanı ve tedavi yöntemleri için, çok fazla zaman kaybı da söz konusudur. Ortaya çıkan bu zorluklar nedeniyle toksikasyona karşı korunma önlemlerinin alınması, daha başarılı sonuçlar elde etmemizi sağlayacaktır (Özbolet ve Tuli 2016). Bu sayede ülke ekonomisinde hem sağlık alanında sadece hastalık tedavisine harcanan parayı geri kazanmakla kalmaz hem de can kayıplarının önüne de geçilmiş olabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan ülkemizin coğrafik konumu itibariyle üç tarafının denizlerle çevrili olması ve denizel mahsullerin ülke ekonomisinde önemli bir yer tutması sebebiyle, ağır metallerin denizlerimize etkisinin de araştırılması önemli ve mutlak bir değere sahiptir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar mevcuttur ve daha da geliştirilmesinin gerekliliği kaçınılmazdır. Karadeniz

bölgemizde uzun vadeli yapılan bir çalışmada bölgemizde ağır metallerin oldukça yoğun olduğu ve daha kapsamlı yeni çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmektedir (Topcuoglu ve ark. 2004). Kadmiyum, insanların sağlıklarını büyük ölçüde tehdit eden ve bununla birlikte esansiyel olmayan toksik ağır metaller arasındadır. Kadmiyum çeşitli gıdaların yanı sıra içme suyundan, havadan, sigaradan ve işyerinde solunan hava yolu ile canlı vücuduna girmektedir. Deriden kadmiyumun emilimi yoktur. Canlı vücuduna giren kadmiyum böbrekler ve dışkı yoluyla dışarı atılmaktadır. Böbreklerden ve karaciğerden emilmeye çalışılırken karaciğer ve böbrekler çok ciddi şekilde zarar görmektedirler. Kadmiyumlu toza maruz kalma, aerosol üretilen yerde çalışanlarda, maden cevheri rafinerisinde, elektrot, kaplama kaynak ve pigment üretimi ile plastik ve batarya yapımında çalışanlarda Cd'a bağlı akciğer hastalıklarının görüldüğü belirtilmiştir (Demirezen ve Aksoy 2005, Boğa 2007, Johri ve ark. 2010).

2.2. Kadmiyum

Kadmiyum (Cd) periyodik cetvelde II B grubunda yer alan, gümüş beyazı renge sahip metaldir. Doğada kadmiyum sülfür (CdS) şeklinde ve çinko cevheri çıkarılan maden ocaklarından yan ürün olarak çıkartılmaktadır. Diğer metallerin aksine kadmiyum suda çözünme oranı en fazla olan ağır metaldir (Lodenus 1989, Resim 1).



Resim.1. Kadmiyum elementi (Anonim 2019a).

Sindirim ile alınan kadmiyumun yaklaşık % 5 kadarı, solunum ile alınan kadmiyumun ise yaklaşık % 30 kadarı organizmaya girip kan dolaşımına karışmaktadır (Çolakoğlu ve ark. 2004, Johri ve ark. 2010). Kadmiyumun vücuttan uzaklaştırılması çok yavaş olduğundan organizmada birikmektedir. Solunum ile anlık ve çok fazla alınması durumunda burunda, boğazda ve akciğerde tahrişlere neden olmaktadır. Kadmiyumun toksikasyonunda öksürük, yutmada zorluk, göğüste ağrı, vücutta terleme ve titreme, aşırı bir çarpıntı gibi bulgular sonrasında ise akciğer ödeminin gelişmesi kaçınılmaz hale gelmektedir. Aşırı miktarda solunum ile kadmiyumun vücuda girişi ölüme sebep olabilir. Ağızdan aşırı kadmiyum alınması ise mide bulantısına, ağrısına, diyareye, baş dönmesine, baş ağrısına, sindirim güçlüğüne hatta devamında baygınlık durumuna kadar gelişebilmektedir. Uzun vadede ve yavaş kontamine sonrasında aşırı yorgunluk, solunum yolu sorunları, nefes darlığı, böbreklerde işlev bozukluğu, sindirim sistemi aksaklıkları ve karaciğer problemleri meydana gelmektedir (Çolakoğlu ve ark. 2004, Johri ve ark. 2010). Diğer yandan karaciğer ile böbrekler, Cd ve Hg gibi çevresel toksik etki gösteren ağır metallerin kirlenici etkilerine son derece duyarlı organlarımızın başında gelmektedir. Oksidatif stres, ağır metallerin patogenezinde etkili olarak öncülük eder. Cd ile Hg'nin tiyol grubu için çok daha yüksek elektron afinitelerine sahip oldukları bilinmektedir. Günümüzde hala mevcut fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yanında ağır metal zehirlenmeleri için biyolojik giderme işlemleri de yetersiz veya çok fazla pahalı olarak karşımıza çıkmaktadır. Oksidatif strese bağlı olarak bozulan prooksidan/antioksidan oranı, C vitamini, karotenoidler, selenyum ve E vitamini gibi antioksidanlar da kullanılarak dengelenebileceği yapılan çalışmada belirtilmiştir (Raghuvanshi ve ark. 2016). Böbreklerin kadmiyum ile zarar gördüğü durumda kemik kırılmalarının daha kolaylaştığı görülmektedir. Romatizma ağrıları gibi ağrılara neden olur ve nöropatik sistemler etkilendiğinden halsizlik meydana gelir. Bu halsizlik durumuna "itau-itau" hastalığı adı verilmektedir. Öte yandan Uluslararası kanser araştırmaları ajansı (IARC) ve Amerikan çevre koruma ajansı (EPA), kadmiyum toksikasyonunun insanlarda karsinogen oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Düşük kadmiyum dozları başta karaciğer ve böbrek olmak üzere kalp, akciğer, mide, hipofiz, hipotalamus, üreme organları ve deri gibi dokularda apoptotik etki göstermekteyken yüksek kadmiyum dozları karsinogenik etki göstermektedir (Alkış 2011, Sarkar ve ark. 2013, Rani ve ark. 2014). WHO (1982 a)'a göre, insanların gıdalarla almalarına izin verilen günlük Cd miktarı,

60 µg gün⁻¹ olarak belirlenmiştir (Demirezen ve Aksoy 2005). Kadmiyumun toksikasyonları meydana geldiğinde çoğunlukla semptomatik tedavi çeşitleri uygulanmaktadır. Öte yandan kadmiyumun toksikasyon etkisinden korunmak veya kadmiyum toksikasyonunun doğrudan önüne geçmek için selenyumun, E vitaminin, C vitaminin, likopenin, taurinin, melatoninin, asetil sisteinin, progesteron hormonunun, β-karoten ve glutasyonun kullanıldığı bildirilmektedir (Koyuturk ve ark. 2006). Yine yapılan bir çalışmada kadmiyumun toksik etkisinden korunmak için klorpromazin maddesi toksikasyonla eş zamanlı kullanılmışsa da tedavide olumlu sonuç ulaşılamamıştır (Erdem ve Hatipoğlu 2011).

2.2.1. Kadmiyum'un Toksik Etkileri

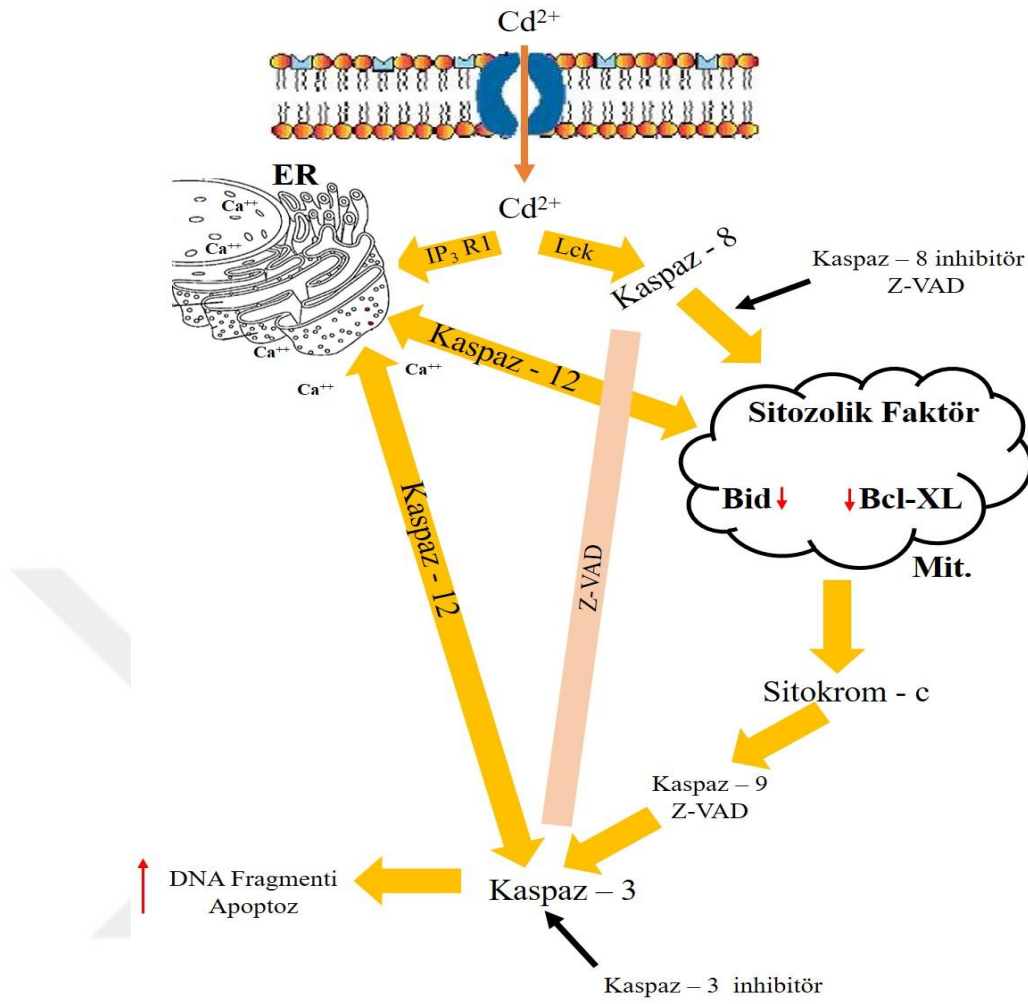
Kadmiyum tehlikeli sağlık sorunlarının oluşmasına zemin hazırlayan ortak kirleticilerin başında gelen ağır metallerin en zehirlilerinden biridir (Järup 2002). Canlıların aldıkları besinler ve bu besinlerin kalitesinin toksikasyona karşı gösterdiği direnci etkilemektedir. Alınan bazı temel besinlerinin eksikliği kadmiyum ağır metale karşı bağışıklığı düşürdüğü gözlemlenmektedir. Eksik alınan bu besin maddelerinin takviyesi sağlandığı zaman kadmiyum ağır metale karşı bağışıklığın da arttığı gözlemlenmiştir. Cd ağır metali gibi toksik elementlere maruz kalan canlılarda oluşan etkilerin, değişen konsantrasyonlardaki başka elementlerle farklı etkileşimlere göre değişiklik gösterdiği belirtilmektedir (Fox 1979). Cd ağır metalinin uzun zaman maruziyetinin bir sonucu olarak canlı vücudunda ilk önce etkilenen doku ve organların başında kemik dokusu ve böbrek gelmektedir. Cd'ye uzun süre maruz kalan kemik ve böbreklerde ciddi hasarların meydana geldiği bilinmektedir. Bu maruziyetin sonucunda, canlılarda sıklıkla osteomalazi, osteopenia, osteoporoz, kırık insidansı veya patolojik kırık gibi iskelet sorunlarının artmasının yanında bazı kanser türlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Cd ağır metalinin kemik iliğinde oluşturduğu toksik etkiler bilinirken oluşan bu toksikasyonun etki mekanizması hala net bir şekilde çözülememektedir (Kjellström 1992, Järup ve ark. 1998, Järup 2002, Galicka ve ark. 2004). Cd toksikasyonunun mineral ve matriksin azalmasına neden olan kemik metabolizmasına doğrudan ya da dolaylı etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Miyahara ve ark. 1980, Jurczuk ve ark. 2004). Bu etkilere kollajen metabolizmasında bulunan bozuklukların eşlik ettiği tahmin edilmektedir (Kucharz 1988). Jinzu nehri havzasındaki Itau - itau hastalığı, PheeCad topluluğu tarafından düşük düzey Cd

maruziyetinin sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Cd yavaş yavaş kemiklerde birikir, osteomalazi ve osteoporozun oluşumunu hızlandırarak kemiklerde meydana gelen şekil bozukluklarının ve çoklu kemik kırıklarının artmasına neden olmaktadır (Friberg ve ark. 1986). Krom, lanthanum, stronsiyum ve çinko gibi diğer kemik görünümlü eser elementlerden de, düşük düzeyde çevresel, mesleki veya klinik maruziyeti nedeniyle endişe duyulmaktadır. Teknikler, vücuttaki çeşitli dokularda daha az miktarda eser element tespit etmek için mükemmelleştirildiğinden, araştırmacılar eser elementlerden gelen toksisite eşiğinin beklenenden çok daha düşük olduğunu bulmaktadırlar (Palmer ve ark. 1987). Uzun süre Cd'ye maruz kalan ratların kemiklerinde bulunan kollajen yapılardan kollajen tip I ve kollajen tip V miktarlarında belirgin seviyelerde düşüşler gözlenmektedir. Sonrasında bu da gösteriyor ki Cd'ye maruz kalan kemik kollajenleri önemli ölçülerde olumsuz etkilenmektedir (Galicka ve ark. 2004). Yapılan bazı çalışmalarda karaciğer dokusunda Cd konsantrasyonunun arttığı dönemlerde Zn ve Fe eksikliği gibi sorunlarla da karşılaşmaktadır (Richardson ve ark. 1974, Winge ve ark. 1978). Cd konsantrasyonunun arttığı dönemlerde çinkonun bir kısmının dışkı yoluyla atılımının arttığı gözlemlenmiştir. Canlı vücudunda bulunan tiyoninin Cd atılımı üzerindeki etkisi ve karaciğerde çinko tutulumunun çinko metabolizmasındaki tiyonin için fizyolojik bir rolünün olduğunu göstermektedir (Winge ve ark. 1978). Oksidatif stres, ağır metallerin patogeneze etkili olarak öncülük eder. Cd ile Hg'nin tiyol grubu için çok daha yüksek elektron afinitelerine sahip oldukları bilinmektedir. Cd ile Hg antioksidan enzimleri içeren tiyolü bağlayarak etkisiz hale getirmektedir (Müller ve Menzel 1990). Yapılan bazı çalışmalar renal tübüler hasarın, daha önce düşünülen çok daha düşük maruziyet seviyelerinde geliştiği gösterilmiştir. Cd ile indüklenen tübüler proteinüri geri dönüşümsüzdür ve sürekli maruziyet glomerüler filtrasyon hızının azalmasıyla glomerüler hasara yol açabilir. Yapılan bir çalışmada Japon bildircinleri Cd içeren diyet besinlerle beslendiğinde şiddetli anemi, bunun yanında ileri derecede kemik iliği hiperplazisinin ortaya çıktığı belirtilmektedir. Ayrıca kandaki eritrositlerin morfolojik olarak görünümü de anormal durumda gözlemlenmiştir (Richardson ve ark. 1974). Yine kuşlarda yapılan başka bir çalışmada aşırı olmayacak şekilde metal toksisitesine maruz kalma sonucunda meydana gelen etkenlerin başında makroskobik olarak yumurta verimliliğinde düşüşler, yumurtadan ölü civcivlerin çıkmasında belirgin bir artış ve orantısız kilo alımları şeklinde gözlemlenmektedir. Öte yandan yeni üreyen

genç bireylerin ise metal toksisitesine daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu gelişmelerden sonra kuşlarda çevresel olarak metal maruziyetini değerlendirmek üzere çeşitli izleme stratejileri değerlendirilmeye başlanmıştır (Scheuhammer 1987). Yapılan başka bir çalışmada farelere Cd ve çinko toksisitesinde antioksidanın metal tutucu etkisi araştırılmış ve uzun vadeli zamana bağlı metallothioneine bağlı Cd miktarında önemli derecede bir artış olduğu gözlenmiştir (Leber ve Miya 1976).

2.2.3. Cd'un Apoptotik ve Karsinojenik Etkileri

Mitokondriyal hasara sebep olan Cd toksikasyonu ile apoptoz ya da nekroz ile hücre ölümü gerçekleşebilir (McPherson ve Brown 2001, Sancho ve ark. 2006). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi sonucu lipid peroksidasyonu ile mitokondriye zarar veren Cd iyonları, yalnız mitokondri değil tüm enerji üreten bölgelerdeki apoptoz kabul edilir düzeydedir (Orrenius 2004, Ott ve ark. 2007, Li ve ark. 2011, Kim ve ark. 2013). ROS üretiminin normalden çok olması mitokondri membranında depolarizasyon oluşumunu etkileyebilmektedir (Ott ve ark. 2007). Mitokondrinin dış çeperindeki membranların permeabilitesinin apoptoz için önemli bir yol olduğu düşünülmektedir (Chipuk ve ark. 2006). Mitokondrinin dış çeperinin açılması sonucu serbest kalan proapoptotik proteinler, sitokrom-c, apoptoz-indükleyici faktör (AİF) ve ikinci mitokondriyal aktivatör (SMAC) gibi durumlar mitokondrinin iç membranından salınırlar (Du ve ark. 2000, Kim ve Soh 2009). Çekirdeğe yapışan AİF parçalarıyla DNA'nın kırılmalarının aktif kaspazların etkilerinin dışında olduğu görülmektedir (Lemarié ve ark. 2004). Kaspaz 3 ile kaspaz 9'un yanında PARP (poli (ADP- riboz) polimeraz), mitokondrideki apoptoz yolunun etkileriyle aktif hale gelebilir ve bu etkinin sonucunda mitokondriyal apoptoz yolu yarılabilir (Li ve Lim 2007). Bu anlamda yapılan çalışmalarda mitokondriyal yolların bazılarında kaspazların etkisiyle apoptoz gerçekleşirken bazı mitokondriyal yollarda ise kaspazdan bağımsız olarak apoptozun oluştuğu düşünülmektedir (Du ve ark. 2000, Kim ve Soh 2009).



Şekil 2. Cd²⁺ kaynaklı apoptoza aracılık eden hücre sinyal yolağının şeması.

2.2.4. Cd toksikasyonu ve Bax-Bcl2 İlişkisi

Cd, mitokondri ve endoplazmik retikulumda tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) vasıtasıyla hücre içinde apoptotik süreci etkilemektedir. Na kanalları ile hücre içine giren Cd apoptozu tetikleyebilmektedir. Hücre içinde bulunan ölüm reseptörleri kaspaz-8'in ligant reseptörlere bağlanmasını sağlamaktadır. Ölüm reseptörlerini ve prokaspazı birlikte barındıran sinyal kompleksine ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) denilmektedir. DISC kompleksi ise prokaspaz-8'i birtirip kaspaz-8'i aktifleştirerek hücre apoptozunu başlatan efektör kaspazlara iletilmektedir. Sitokrom-c ile SMAC/Diablo'nun mitokondriden serbest kalmasını sağlamaktadır (Danial ve Korsmeyer 2004). Cd toksikasyonu ile oluşan DNA hasarının endoplazmik retikulum (ER) stresi Bcl-2 proteinlerinin düzenlenmesi için apoptozu oluşturan yolun ortak sinyallerini aktif hale getirmektedir. Bcl-2 ailesinden proapoptotik proteinler ve

antiapoptotik proteinler standart büyüme esnasında ya da ölüm reseptörlerinin aktif hale gelmesinde farklılık göstermektedir. Cd'nin etki ettiği geri uyarıcı faktör (USF) ile etkileşime giren Bax ile Bak proteinleri apoptozu etkilemektedir. Mitokondriden serbest kalan sitokrom-c'nin sitoplazmada bulunan Apaf-1 ile kaspaz-9 bir araya gelerek apoptozu oluşturan enzimlerin aktifleşmesi hücre ölümünü hızlandırmaktadır (Sarvothaman ve ark. 2015, Şekil 2).

2.2.5. Kadmiyumun Metabolizması ve Fizyolojik Etkileri

Cd'nin vücuda alınımı sıklıkla oral ve solunum yoluyla olmaktadır. Cd'nin yüksek oranda suda çözünen başlıca formu olan CdCl₂'nin ağızdan ve sindirim sisteminde emilimi oldukça yüksektir. Solunum yoluyla sıklıkla maruz kalınan şekli ise kadmiyum oksit (CdO)'dir. Cd'nin kontaminasyon şekline göre değişiklik gösterebilir solunum yolu ile alınan miktarının, oral alım miktarından fazla olabileceği ve Cd'nin solunum yolu ile emiliminin, mide-bağırsak kanalındaki emiliminden daha fazla olduğu bildirilmektedir (Jumarie 2002). Cd canlılarda böbrek, karaciğer başta olmak üzere akciğer, pankreas, testis gibi organların yanında plasentayı bile olumsuz yönde etkileyen çevresel bir kirletici ve endüstriyel bir madde olarak da kabul edilmektedir. Canlı vücudunda Cd'nin atılması için çalışan öncül organlar arasında karaciğer ve böbrekler gelmektedir. Sülfidril gruplarının yanında tiyolat anyonları Cd için afiniteleri yüksek olduğundan hedefteki organlarda Cd tutunmasına ve toksik etkisine dâhil olan moleküler ve hücresel mekanizmalar, sülfidril molekülleri ile Cd iyonları arasındaki etkileşim ile ayırt edilebilmektedirler. Ancak epitel hücrelerden Cd'nin emilmesinde görev alan hücresel yapılar veya moleküler olgular hakkında çok fazla ayırt edici bilgiye rastlanmamaktadır. İnce bağırsaktan Cd'nin emilmesinde enterositler, hepatositler önemli bir etkiye sahipken nefronların proksimal ve distal kısımlarında bulunan tübüler epitelyum hücreler oldukça etkili rol almaktadırlar (Zalups ve Ahmad 2003). Oral olarak vücuda alınan Cd'nin sindirim sisteminden geçerken emilimi oldukça düşük olup sadece % 5-8 oranındadır. Cd'nin bağırsak lumeninden eritrositler içine geçişi, luminal plazma membranına Cd'nin bağlanması ya da aktif taşıma ile luminal plazma membranından eritrositler içine geçmesi şeklindedir. Alyuvar hücrelerine Cd geçişinde özel taşıyıcı proteinler önemli rol oynamaktadır. Sistemik dolaşımdaki serbest Cd oranının düşük olması sistemik dolaşıma geçtikten sonra yüksek oranda eritrositlerde birikiyor olmasıdır (Bergeron ve

Jumarie 2006). Cd'nin inhalasyon ile vücuda alınması durumunda emilim oranı sindirim sistemindekinin aksine çok daha yüksektir ki bu oran % 40'a kadar çıkmaktadır (Cannino ve ark. 2009).

Cd vücuda alındıktan sonra absorbe olmasıyla birlikte kan hücrelerine ve albümine bağlanarak taşınır. Hücre içerisine ise membranda bulunan taşıyıcı proteinlerle alınır. Cd hücre içine alınırken taşıyıcı proteinlere bağlanması sırasında kalsiyum, çinko, demir ve bakır gibi esansiyel elementlerle aynı mekanizmayla alındığından bu elementlerle bir yarış içerisinde olmaktadır. Bu elementlerden yoksun ve düşük miktarda protein içeren diyetlerle beslenilmesi sonucu Cd emilimi artmaktadır (Jurczuk ve ark. 2004). Cd kanda Metallothionein (MT), albumin ya da tiyol grupları olan proteinlerle taşınmaktadır. Son zamanlarda, Cd iyonunu bağlayan MT, albumin ya da diğer proteinlerin, Cd'yle konjüгат oluşturdukları zaman emici veya reseptör aracılı endositoz taşıyıcısının substratı gibi davrandığı da düşünülmektedir (Zalups ve Ahmad 2003). Molekül ağırlığı yaklaşık 6000 kDa olan MT, molekül ağırlığı düşük bir protein olmasına karşın Cd metabolizmasında anahtar rol oynamaktadır (Xu ve ark. 2016). Yapılan hayvan çalışmaları ve in vitro çalışmalarda, MT'nin Cd toksisitesine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Bobillier-Chaumont ve ark. 2006).

2.3. Usnik Asit

Alg ve mantarların bir araya gelerek oluşturdukları simbiyoz canlılar olan likenler dünyanın hemen her yerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Yaygın bir yaşam alanına sahip olan likenler tıbbi amaçla kullanımının yanında zehir olarak, deri tabaklamada, bira yapımında, parfümeri ve kozmetik alanında kullanımıyla birlikte besin olarak da değerlendirilmektedir (Odabasoglu ve ark. 2006, Resim 2).



Resim.2. Liken resmi (Anonim 2019b)

Tıbbi amaçlarla da pek çok araştırmada kullanılan likenlerin antibakteriyal, antiviral, kanamayı durdurucu, balgam söktürücü ve ülser tedavisinde ve antiparaziter özelliklerinin olduğu belirtilmiştir. Liken türlerinden biri olan *Usnea longissima*’dan izole edilen UA ise biyolojik olarak oldukça aktif bir antioksidan tümör inhibitörü, antibakteriyel etkilere sahip bir polifenoldür (Brodo ve ark. 2001, Cocchietto ve ark. 2002, Baćkor ve Loppi 2009, Sokolov ve ark. 2012). Likenlerin yađ asitlerinden meydana getirilen evernik asit, vulpinik asit ve usnik asit gibi antibiyotikler genelde *Cetraria*, *Cladonia*, *Evernia*, *Alectoria*, *Ramalina* ve *Usnea* gibi türlerden elde edilmektedir. Usnik asit ile evernik asitin birleşiminden de ‘‘Evosin’’ elde edilmektedir. Evosinin etkili bir antibiyotik olduğu da bilinmektedir (Tutel 1986). Bunun yanı sıra patojenlere karşı antiviral özellik gösterdiği de bildirilmektedir (Sokolov ve ark. 2012, Shtro ve ark. 2014).

UA’nının güçlü bir antioksidan olmasının yanında ise hücre koruyucu kabiliyete sahip olduğu da araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Brodo ve ark. 2001). Yapılan alışmalar (Hauck ve Huneck 2006, Baćkor ve Loppi 2009) genel olarak likenlerin ağır metal tutucu özeliğinin olduğunu göstermektedir. Likenlerin bolluğu ve

atmosferde asılı duran metalleri tutma eğiliminin bilinmesinden dolayı ekofizyolojik ve biyolojik izolasyonda sıklıkla kullanılan bir model olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli kirleticilere karşı hassaslığının bilinmesi ve özellikle hava kalitesinin belirlenmesinde etkin rol oynamasından dolayı likenler biyomonitörler olarak kullanılmaktadır (Bačkor ve Loppi 2009).

2.4. Alfalipoik Asit

Mitokondriyal dehidrogenaz reaksiyonlarında önemli bir rol oynayan ALA (Lipoat veya indirgenmiş şekli dihidrolipoat) ise süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri, hipokloröz asit, peroksil kökleri ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girerek antioksidan aktivite göstermektedir (Müller ve Menzel 1990, Karaca 2015). Dihidrolipoatın, antioksidan aktivitesine ilaveten, demiri indirgeyerek prooksidan etki oluşturduğu da gösterilmiştir (Biewenga ve ark. 1997). Alfa lipoikasit uygulamasının, iskemi-perfüzyon yaralanması, diyabet (albümin gibi proteinlere hidrofobik bağlanma ile glikasyon reaksiyonlarını önlemek suretiyle) gibi bir dizi oksidatif stres modelinde etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, alfa lipoikasitin miyogloblin, prolaktin, tioredoksin ve NfκB transkripsiyon faktörü gibi proteinlerin redoks regülâtörü olarak işlev görebildiği de bildirilmektedir (Biewenga ve ark. 1997).

2.4.1. Alfalipoik Asit ve Kadmiyum İlişkisi

Antioksidan kavramı bağlantılı olarak genel bir aktiviteyi ifade eder, bu da oksidatif stres ve oksidatif substratın tipine bağlı olmaktadır. Vücutta doğal olarak üretilen Lipoik asit (LA) ilk defa 1930'larda varlığı fark edilmiştir. 1951 yılında ise ilk defa karaciğer dokusundan lipoik asit saflaştırılmıştır (Biewenga ve ark. 1997, Karaca 2015). Yağda ve suda çözünebilen tek antioksidan olma özelliğine sahip lipoik asit serbest radikal hasarını büyük ölçüde önleyen evrensel bir antioksidandır. Alfa lipoik asidin okside lipoik asit ve redükte lipoik asit şeklinde adlandırılan 2 formu bulunmaktadır. Redükte lipoik asit aynı zamanda dihidrolipoik asit olarak da adlandırılmaktadır. Dihidrolipoik asitin biyolojik olarak daha aktif olduğu bilinmektedir. Lipoik asitin sentezlendiği yerler bir sülfür kaynağı ve mitokondrideki oktanoik asittir. Canlıya oral olarak verilen Lipoik asit'in % 93'den fazlası barsaktan emilirken, karaciğerde ise bu emilim % 20-30 civarındadır (Karaca 2008). Packer ve

ark.(1995) bir maddenin biyolojik sistemdeki antioksidan kabiliyetini değerlendirirken aşağıdaki kriterler belirleyici olarak rol oynamaktadır.

- 1- Reaktif oksijen turleri ile reaksiyonları ve serbest radikalleri uzaklaştırmadaki spesifikliği,
- 2- Diğer antioksidanlarla etkileşimi ve endojen antioksidanları tekrar üretme kabiliyeti
- 3- Metal şelatlama aktivitesi,
- 4- Gen ekspresyonundaki etkileri,
- 5- Biyoyararlanımı,
- 6- Lokalizasyonu,
- 7- Oksidatif stres modellerinde veya klinik koşullarda oksidatif hasarı tamir edebilme kabiliyeti.

İdeal bir antioksidandan beklenen bu kriterlerin hepsini ya da en azından tamamına yakınına karşılık gelmektedir. Bu bakımdan LA/DHLA redoks çifti oldukça ideale yaklaşmaktadır ve bu yüzden evrensel antioksidan olarak sayılabilir (Packer ve ark. 1995, Biewenga ve ark. 1997, Karaca 2015). Lipoik asit ve onun indirgenmiş hali olan DHLA serbest halde dokularda bulunabilir. DHLA güçlü bir indirgeyicidir ve böylece okside antioksidanları yeniden rejenere edebilir. Antioksidanlar, radikalleri uzaklaştırdıklarında kendileride radikal hale gelirler. DHLA ise direkt ve indirekt olarak glutatyon, koenzim Q10, askorbat ve vitamin E'yi rahtlıkla rejenere edebilecek kabiliyete sahiptir (Karaca 2015).

ALA ve DHLA'in ağır metallere karşı koruyucu etkisi kadmiyum, mangan, çinko, kurşun, kobalt, nikel ve demir iyonları ile kompleks oluşturarak enzim inaktivasyonu ve doku hasarına sebep olan serbest radikallerin oluşmasını engellemektedir (Navari-Izzo ve ark. 2002, Karaca 2008). Lipoik asit aynı zamanda diyet takviyesi olarak kullanılmasının yanında oksidatif stresin oluşturduğu bozuklukların iyileştirilmesinde olumlu etkileri bulunan terapötik bir madde olarak da kullanılmaktadır. Bunun yanında hala tam olarak etki mekanizması belirlenememiştir (Han ve ark. 1997). Lipoik asitte dihidrolipoik asitte hidrofobik ortamlarda veya

sitozolde aktif oksijenin türevlerini azaltır. Dihidrolipoik asit, normal olarak lipoik asitten çok daha fazla antioksidan etkiye sahiptir. Bunun yanında glutasyon, tokoferol ve askorbat gibi diğer önemli oksitlenmiş radikal temizleyicilerin geri dönüştürülmesinde önemli derecede etkileri vardır (Navari-Izzo ve ark. 2002). Öte yandan oksidatif stresin türlerine ve oksitlenebilen alt tabakaya (DNA, lipidler, proteinler) bağlı olarak alfalipoik asidin antioksidan işlevlerinin göreceli olarak değiştiği de belirtilmektedir. Ayrıca in vitro olarak, alfalipoik asitin antioksidan aktivitesinin kullanılan miktarın konsantrasyonuna da bağlı olduğu düşünülmektedir (Biewenga ve ark. 1997). Alfalipoik asidin, insan kültür Jurkat T hücrelerinde, eritrositlerinde, glial C6 hücrelerinin miktarında, NB41A3 nöroblastom hücrelerinin miktarında ve periferik kan lenfositlerinde azalmış glutasyon düzeylerinde önemli oranda arttırdığı bildirilmiştir (Müller ve Menzel 1990, Han ve ark. 1997).

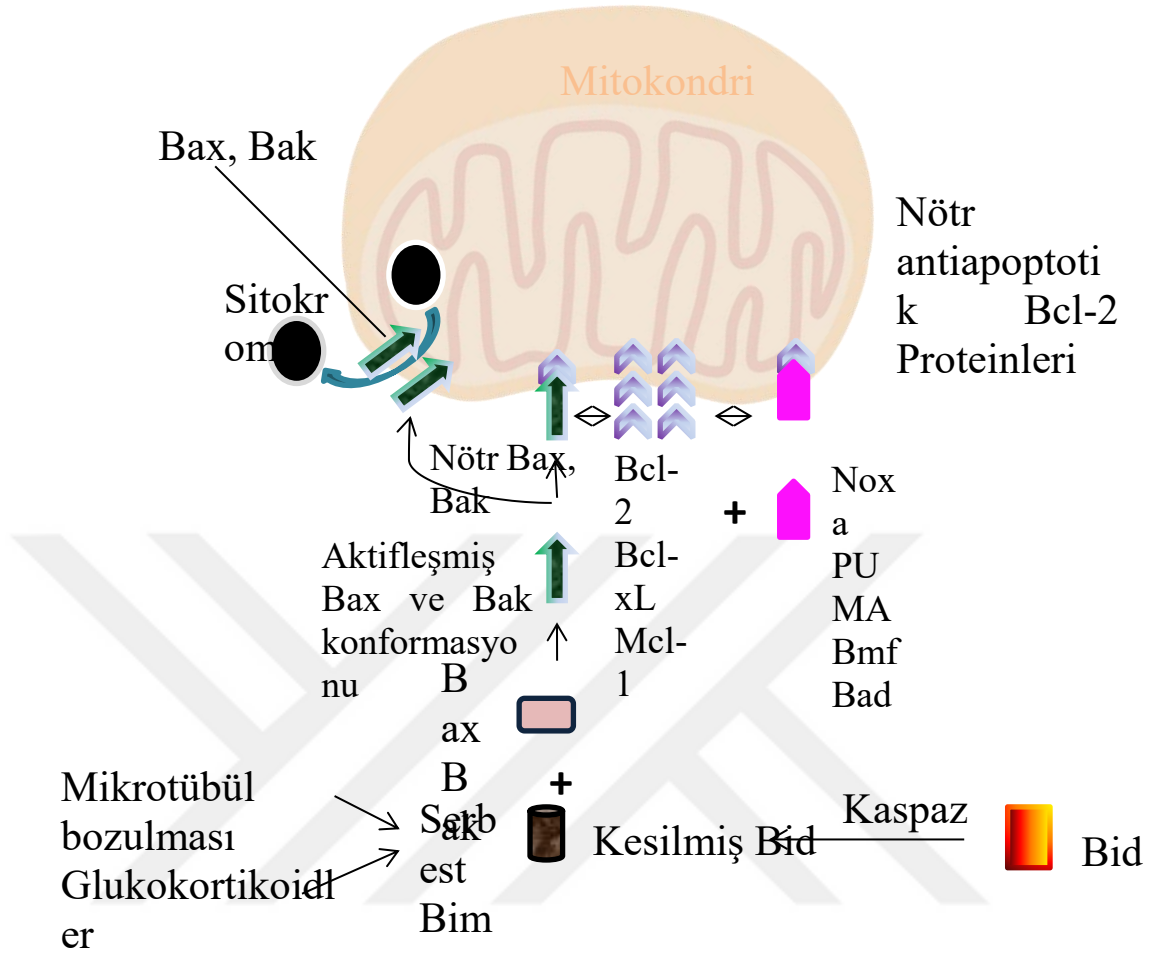
Bir metal tutucu olarak, alfa lipoikasitin, Fe ve Cu'yu şelatlayarak antioksidan aktivite gösterdiği ve bunun yanında indirgenmiş formu olan dihidrolipoik asitin iyi bir Cd²⁺ şelatlama kabiliyetine sahip olduğu da bildirilmektedir (Navari-Izzo ve ark. 2002). Arsenit zehirlenmesi sırasında, Arsenitin 2-okso asit dehidrojenaz vasıtasıyla alfa lipoikasit ile kompleks oluşturarak inaktif hale geldiği gösterilmiştir. Diğer taraftan, dehidrojenaz kompleksinin yakınında seyreden oksidatif stresin hasara neden olarak, kofaktör olan alfalipoik asitin işleyişini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (Correa ve Stoppani 1996). Araştırmalar (Biewenga ve ark. 1997, Müller ve Menzel 1990) ROS temizleyicisi ve antioksidan olduğu tespit edilen alfalipoik asitin, glutatyondan farklı tiollerin ekstrasellüler alanda artışını indüklediğini bildirmektedir. Aynı zamanda, alfa lipoikasit, peptid metiyonin sülfoksit redüktaza ROS ürünlerine aktararak, α -1 antiproteazı gibi oksidatif olarak hasar görmüş proteinlerin onarımını sağladığı gösterilmiştir (Packer ve ark. 1995, Biewenga ve ark. 1997). Alfalipoik asitin lipoamide dehidrojenezle ilgili olarak indirgenmesi yoluyla hücrelerin oksidatif stres sırasında kullandığı NADH ve NADPH havuzlarını antioksidan olarak kullanılabildiği tespit edilmiştir (Biewenga ve ark. 1997). Yapılan bir çalışmada Mukherjee ve ark. (2011) melatonin ve ALA'nın birlikte uygulanması, Cd toksikasyonu sonucu meydana gelen ve artan kardiyak hasar lezyonlarının düzeylerini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca kalpteki serbest radikal oluşumunu azaltırken, antioksidan düzeyini normal seviyelere çektiğini ve metalloprotein düzeyini de arttırdığını belirtmişlerdir.

Yaptığımız literatür taramalarında ALA'nın Cd toksikasyonunda apoptotik süreçler üzerine etkisine dair bir araştırmaya rastlamamakla birlikte, ALA ve UA'nın metal tutucu özelliklerinin karşılaştırıldığı herhangi bir bilgiye de rastlanmamıştır.

2.5. Bax Ailesi

Bax proteinleri apoptoza uğramamış normal hücrelerde serbest halde sitoplazmada bulunurlar veya mitokondrinin yüzeyine çok zayıf bağlarla tutunmaktadırlar fakat apoptoz başladığında bax proteini mitokondrinin dış çeperine göç etmektedirler (Wolter ve ark. 1997). Bax proteini mitokondrinin dış membranına translokasyonu gerçekleştirirken konformasyonu değişirken aynı zamanda oligomerizasyona da uğramaktadırlar (Antonsson ve ark. 2001). Genellikle mitokondrinin dış membranında bulunan Bak proteini apoptoz başladığı sırada konformasyonel bir başkalaşım sonucunda mitokondrinin membranının içine translokasyonu gerçekleşmektedir (Griffiths ve ark. 1999). Mitokondrinin dış membranında oluşan porların Bax ve Bak proteinleri tarafından sitokrom-c salgılanmasını gerçekleştirmek için oluşturulduğu da tahmin edilmektedir. Bunun yanında mitokondrinin dış membranında oluşan bu porların nasıl oluştukları ve por yapısı hakkında geniş bilgiler bulunmamaktadır (Epad ve ark. 2002).

Bax yada Bak proteinlerinin mitokondrinin dış membranına taşınmasının ilk önce sitokrom-c ve bunun yanında apoptozun aktif hale gelmesinde etkili olan bazı proteinlerin membranların arasında kalan alandan sitoplazmaya geçişinde direkt etkili olabileceği öngörülmektedir. I. gruba mensup elemanların da II. gruba mensup elemanlara bağlanarak sitokrom-c'nin sentezinin engellendiği ortaya konulmaktadır. III. gruba mensup bazı (Bim, tBid gibi) elemanların Bax ile Bak proteinlerinin taşınmasına sebep olan konformasyonun değişmesini doğrudan başlattığını, bazı III. grup elemanlarının (PUMA, Bmf, Bad gibi) ise I. gruba mensup elemanları etkisiz hale getirerek Bax ile Bak proteinlerinin aktif hale gelmelerini sağladığı tahmin edilmektedir (Gewirtz ve ark. 2007).



Şekil 3. Bcl-2 ailesine ait proteinlerin intrinsek yolak.

Uzun zamandır I. gruba mensup elemanlarının apoptozu durdurucu etkileri hakkında birçok teori geliştirilmeye çalışılmıştır. Yapılan bazı çalışmalar I. gruba ait elemanların Bax ile Bak proteinlerini bağlayarak etkisiz hale getirmektedir ve sitokrom-c salgısının engellendiği düşünülmektedir (Oltvai ve Korsmeyer 1994, Şekil 3). Öte yandan Bax ile Bak proteinlerine bağlanamayan Bcl-xL mutant proteinin apoptozu durdurucu etkisi bu düşünceye karşı gelmektedir (Cheng ve ark. 1996). Başka bir teoriye göre ise Bcl-2 proteininin hücrelerin antioksidan etkiyi artırarak apoptozun durdurulmasında etkili olduğu ileri sürmektedirler (Hockenbery ve ark. 1990). ROS'un etkisinin kaspaz 3'ün salgısının çoğaldığı sitokrom-c'nin salınımından sonra artabileceğini ileri sürmektedir. Bu durumlar Bcl-2 proteininin antioksidan etkisinin yanında apoptozu durdurucu mekanizmada etkisiz olabileceğini

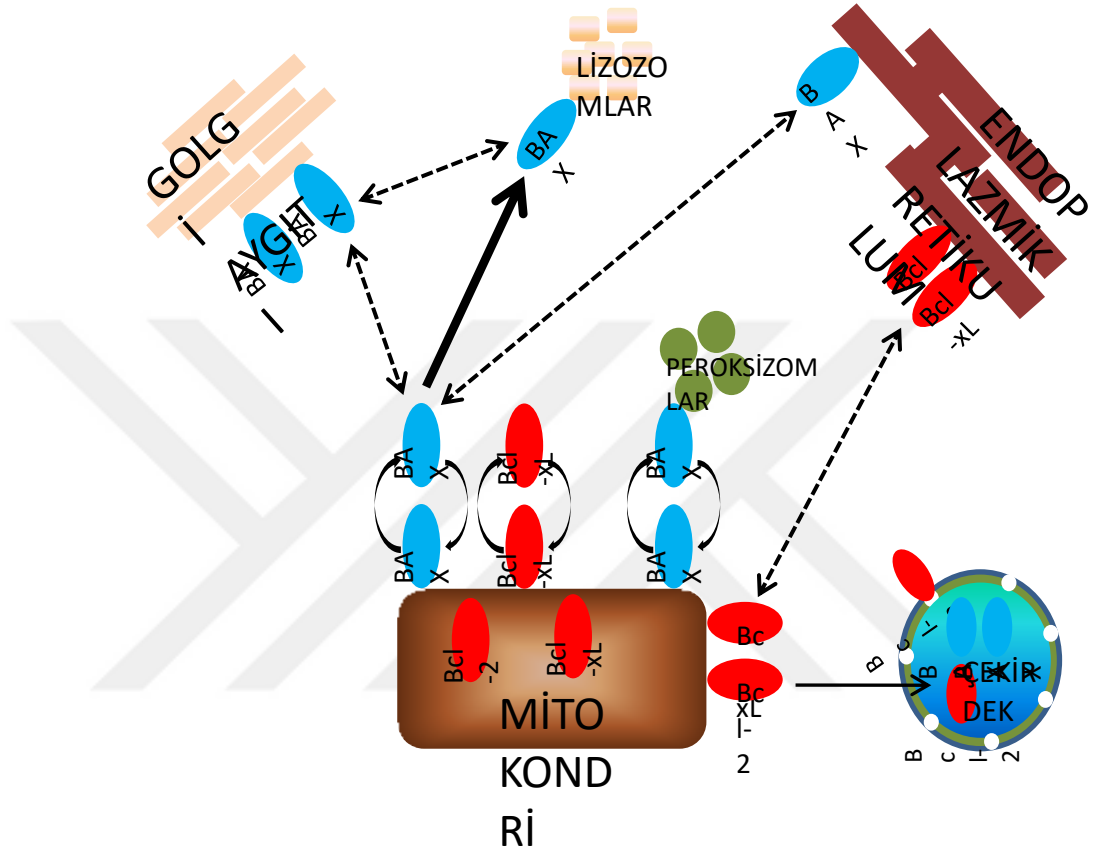
göstermektedir (Bossy-Wetzel ve ark.1998). Bir diğer teori de Bcl-2 proteininin ER'den kalsiyum salgılanmasını durdurarak apoptozu inaktif hale getirmektedir (Baffy ve ark. 1993). Bcl-2 proteini ile durdurulan bütün apoptozlarda kalsiyum salgısının etkili olmadığı gösterilmesi bu mekanizmada Bcl-2'nin apoptoz durdurucu etkisinin belirlenmesinde yalnız başına yetemeyeceğini ortaya koymuştur. I. gruba ait elemanların III. gruba ait elemanlar ile birlikte sitokrom-c'nin salgılanmasını ve bununla birlikte apoptozu durdurabildiği tezi ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalarda I. gruba ait elemanların BH3 alanından III. gruba ait elemanlara tutunabildiklerini göstermektedir. I.gruba ait elemanların apoptoz durdurucu etkilerinin tam olarak belirlenebilmesi tartışmaya açık bir konudur (Yang ve ark. 1997).

2.6. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 proteini B cell lymphoma-2 genine verilen isimdir. Bcl-2 adı verilen gen 18. Kromozoma ait uzun kolda (18q21) bulunurken kendi adını alan ve moleküler ağırlığı 25kD olan proteini kodlamaktadır. Bcl-2'nin bulunduğu yerler ER'de, hücre dışı membranda, nükleusun membranında, mitokondrinin iç membranında antioksidan yollar şeklinde sıralanabilmektedirler (Monaghan ve ark. 1992). Bcl-2 proteininin oluşması esansiyel olarak büyümesini etkileyen faktörlerin eksikliğinde hücrelerin G0 fazında minimum aktivasyon altında yaşayabilmesini ve apoptozu uğramış hücrelerin nekrozunun engellenmesine sebebiyet vermektedir (Şekil 4).

Hücrelerin çoğalmasından ziyade yaşamını uzatarak gelişiminin artmasına neden olmaktadır . Apoptozu durduran Bcl-2 karsinogenezin ilk evrelerinde normalin dışındaki genlerin taşınmasını sağlayan hücrelerin apoptoz regülatör sisteminden çıkarak artmasına neden olmaktadır. Bcl-2 proteini fazla üretimi neoplastik taşınımaya yol açmaktadır (Korsmeyer 1992). Akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri ve malign melanoma gibi kanser çeşitleri ile Bcl-2 proteini bağdaştırılmıştır. Endometriyumun gland epideri Bcl-2 proteini gen ifadesinin çeşitli hormonlarla kısmende olsa kontrol altında tutulduğu belirtilmektedir. Bcl-2 proteinin gen ifadesi östrojen hormonu bağımlı proliferatif endometriyumlarda çoğalırken, hiperplastik endometriyum ve kanserlerinde azalma gözlenmektedir (Gompel ve ark. 1994, Henderson ve ark. 1996). Yüksek seviyelerdeki siklik endometriyumda Bcl-2, apoptozu durdurarak hücre ölümü gerçekleşmeden yaşam süresini arttırmaktadır.

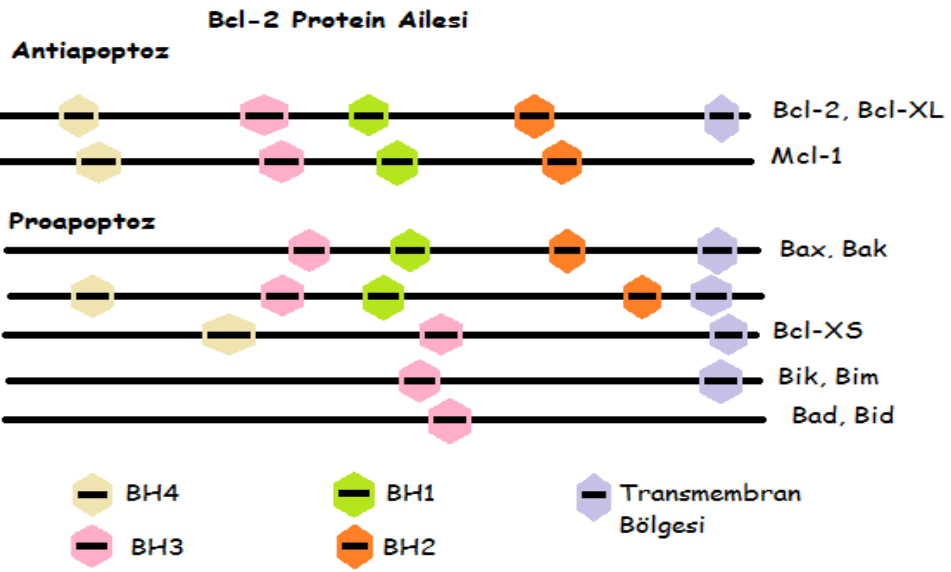
Bazal endometriyumda menstrual döngü sırasında dökülmemesini sağlayan etkenlerden birinde Bcl-2 olduğu tahmin edilmektedir. Aynı şekilde fonksiyonel endometriyuma göre artan Bcl-2 protein düzeyinin endometriyal poliplerde de olduğu tespit edilmiştir (Taylor ve ark. 2003).



Şekil 4. Bcl-2 protein ailesinin hücrelerde bulunduğu yerler. Hücre içerisinde bulunan antiapoptotik Bcl-2 Protein ailesi ve Proapoptotik Bax proteinini

Mitokondride bulunan sitokrom-c salınımını kontrol altında tutan Bcl-2, bir protein grubu ailesidir. Bu protein ailesinin içinden ilk keşfedilen üye Bcl-2'dir ve hücre ölümünü durdurucu bir görevi olduğu tespit edilmiştir (Hockenbery ve ark. 1990). Günümüze kadar yapılan çalışmalar bu aileye ait olduğu tahmin edilen ve yakın homolojiyi gösteren 20 kadar gen tanımlanabilmiştir. Bcl-2 protein ailesine ait olan gruplar yapısal olarak ve fonksiyonel olarak üç ayrı grupta incelenebilmektedirler (Adams ve Cory 2001):

- I. grup antiapoptotik özelliğe sahip olan (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-B, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva ve Nrf3),
- II. grup proapoptotik etki gösteren (Bax, Bak, Bok/Mtd),
- III. grup (Bid, Bak, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA ve Bcl-G) gibi;



Şekil 5. Bcl-2 ailesinin şematik olarak çizimi.

I. grup, antiapoptotik elemanlar 4 BH bölgesini (Mcl-1 dışında) ve transmembran bölgeyi de dâhil içinde barındırırlar. Mcl-1'de ise BH4'ün dışında prolin, glutamat, serin, treonin amino grup asitleri bakımından zengin olan bölge (PEST) bulunmaktadır.

II. grup üyeleri proapoptotik elemanlar BH4'ün dışındaki bütün BH bölgeleri ve transmembran bölgeyi içine almaktadır.

III. grup elemanlarından ise yalnızca BH3 bölgesinde birlikte dirler. BH3 bölgesi dışında kalan bütün bölgelerde oldukça düzensiz bir dağılıma sahiptirler (Gewirtz ve ark. 2007).

İlk grup antiapoptotik gruba ait elemanlar çoğunlukla koruma altına alınmış mitokondri dış çeperi ve dört BH alanını (Bcl-2 kökenine sahip üyeleri), ER membranı gibi farklı hücre içi membranlarına bağlanabilen c-terminal transmembran bölgesini içinde barındırmaktadır. II. gruba ait proapoptotik elemanlar ise N-terminal BH4 alanının dışındaki bütün BH alanlarını ve transmembran bölgesini içinde barındırmaktadır. Sonucu olarak III. gruba ait elemanlar ise I. ve II. gruba göre çok fazla düzensiz dağılıma sahiptirler ve sadece BH3 alanında kökendeniz olarak 15 aminoasit ortaktır (Gewirtz ve ark. 2007, Şekil.4).

Günümüzde elde edilen en güncel bilgilere göre ilk Bax ve Bak elemanları II. grup elemanlarının doğruca sitokrom-c salgılanmasına yol açtığı gösterilmektedir (Gross ve ark. 1999). II. grup elemanlarından Bax ve Bad proteinlerinin reasgele birinin defisiyensi apoptozu yüzeysel de olsa engellemektedir. Bu proteinlerin ikisinin birlikte defisiyensi ise apoptozu tamamen durdurmaktadır. Bu durum da gösteriyor ki apoptoz için intrensek yolakta iki proteine ait genlerin etkileri oldukça önemlidir (Wei ve ark. 2001).

2.7. Apoptoz mu Hücre Çoğalması mı?

Programlanan hücre ölümünün gelişimi sırasında belirli yerlerde ve zamanlarda hücrelerin ölümü için gelişen durumları ifade etmektedir. Hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere iki ayrı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Nekroz; ani ısısı değişimleri, hipoksi, çeşitli toksik madde etkileri, vb gibi hücre dışı etmenler ve kimyasal etmenlerin etkileri sonucu travmatik olarak gelişen pasif hücre ölümleri olarak bilinmektedir. Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlayan, fonksiyonlarını yitirmiş, yaşlı, düzensiz olgunlaşan ya da genetiği hasarlı olarak gelişen hücrelerin organizmaya zarar gelmeyecek şekilde yok edilmesini sağlayan, genetiksel olarak kontrol altında güvenli bir şekilde gerçekleşen hücre ölümlerine apoptoz denilmektedir. Apoptoz patolojik veya fizyolojik uyarılar sonucunda gelişebilmektedir (Thompson 1995, Ameisen 1996, Cohen 1997, Renehan ve ark. 2001). Fizyolojik hücre ölümleri çok uzun zamandır bilinirken “apoptosis” terimini ilk defa Kerr, Wyllie ve Currie isimindeki bilim insanları 1972 yılında kullanmışlardır. Bunu da Yunanca ‘apo’; ayrı ve ‘ptosis’; düşen kelimeleriyle ifade etmişlerdir. Ayrıca yine 1983’lü yıllarda Duke ve arkadaşları, jel elektroforez

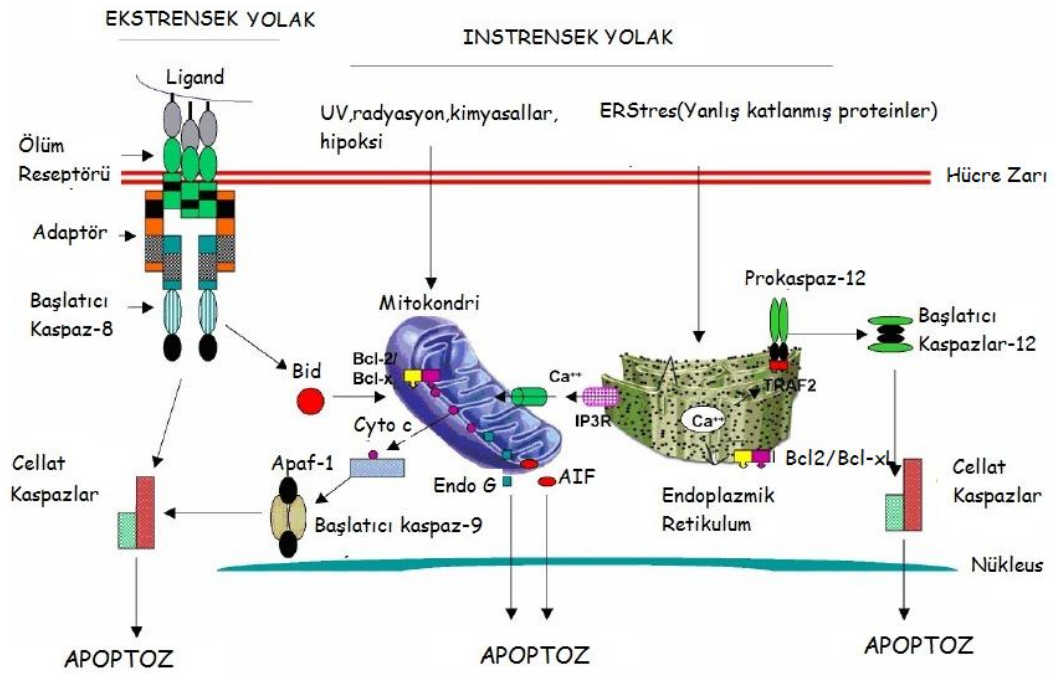
yöntemiyle apoptozis ile endonükleazlar aktif olarak DNA kırıklarının oluşmasına neden olduğunu göstermişlerdir (Wyllie 1992, Thompson 1995). Apoptoz sırasında birçok aşamalarda morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelmektedir. Bunlar tabloda belirtildiği gibi sıralanabilir (Milam 2008).

Tablo 2. Apoptozun morfolojik ve kimyasal yapısında meydana gelen değişimler (Milam 2008).

Morfolojik değişimler	Biyokimyasal ve fonksiyonel değişimler
Hücrelerin boyutunda küçülme	Serbest iyonize kalsiyum miktarında artma
Sitoplâzmada yoğunluk artışı	Bcl2/Bax birlikteliği
ER kalınlığında artış	Hücrelerde su kaybının artışı
Nükleer parçalanmanın gözlenmesi	Mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı
Hücre yüzeyinde yapısal kayıpların gözlenmesi	DNA yapısının bozulması
Apoptotik cisimlerin oluşması	İnternükleozomal bozulmanın gerçekleşmesi
Hücrelerin hızlı gelişen fagositozu	DNA yapısının 50-300 kb'lik parçalara ayrılması
İnflamatuar reaksiyonun oluşmaması	Polipeptit ve aminoasitlere parçalanması

Apoptoz ile gerçekleşen hücre ölümü 2'ye ayrılır. Birinci aşamada hücre içindeki genler ve biyokimyasal maddeler hücreleri tamir etmeye çalışırlar. Bu aşamada hücre tamiri sağlanamazsa hücrelerin ölümüne sebep olan değişimlerin meydana geldiği ikinci aşamaya geçer (Milam 2008). Apoptotik hücrelerin kromatin ve nükleer membranında değişimler oluşmaktadır. Nükleer proteinlerin yoğunlaşması sonucu nükleus zarının altında kresentimsi görünümde oluşmaktadır (Narula ve ark. 1997). Normal şartlarda bir hücre döngüsünde birbiri ardına gerçekleşen 7 kırılma tamir edilirken apoptozda yaklaşık olarak 300 000 kırılma gerçekleşmektedir. Yıkım olayları yapım olaylarından çok daha fazla olduğu için hücre onarıma yetişemez ve hücre zarının yapısı tomurcuklanmalar şeklinde bozulmaya başlamaktadır. Hücreler sitoplâzma ile kromatin parçalarının oluşturduğu apoptotik cisimlere kadar parçalanmaktadır (Akşit ve Bildik 2008). Apoptozu gerçekleştiren hücreler, komşu

hücrelerinin yanında makrofajlar tarafından da tanınarak fagositoza uğramaktadırlar. Apoptozun başlaması için gerekli olan 2 yoldan birincisi ekstrinsik yol olarak bilinen ve ölüm reseptörleri tarafından kontrol edilen yoldur. Bu yolu etkileyen en önemli grupta ise Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) ailesi vardır. Diğer yol ise intrinsik yol olarak da bilinen bcl-2 ailesinin dâhil olduğu kontrollü yoldur. Bu yolların başlangıçları farklı olsalar da proteolitik enzim ve kaspazlar ile aktif olan bu iki yol da aynı şekilde sonlanmaktadır (Marsden ve Strasser 2003). Diğer yandan apoptoz sonucu ölen hücreler fagositoza uğramaktadırlar. Apoptoza uğrayan hücrelerin zarlarında meydana gelen değişimler, komşu hücrelerin ölen hücreyi fagositozu için gerekli olan bütün uyarımları aktifleştirecek şekilde düzenlemektedirler (Bellamy ve ark. 1995, Milam 2008).



Şekil 6. Apoptozomun ana yolları ve apoptoz sırasında meydana gelen temel proteinler (Sarvothaman ve ark. 2015).

Hücrelerin siklusu ise ‘hücre bölünmesi’ şeklinde birbirini takip eden olaylar zincirine verilen isimdir. Sağlıklı hücrelerin hücre siklusuna dahil olabilmeleri için hücre dışından büyüme sinyallerini hücre içindeki çekirdeğe iletmesi gerekmektedir. Kanserli hücreler sağlıklı hücreler kadar hızlı büyümeler de sağlıklı hücrelerden çok daha hızlı bölünmektedirler. Bu durum daha geniş kitleli kanser hücrelerinin bir araya

geldiği oluşumları ortaya çıkarmaktadır. Bu duruma hücre proliferasyonu da denilmektedir. Canlılar yaşamsal faaliyetlerine devam edebilmeleri için hücrelerin devamlı olarak kendilerini yenilemeleri gerekmektedir. Yaşlanan hücreler yerlerini yeni oluşan hücrelere bırakarak apoptotik dengeyi korumaktadırlar. Bu durum hücrede bulunan denge genleriyle gerçekleşmektedir. Denge genlerinin bir kısmı hücre bölünmesini başlatırken bir kısmı da aşırı hücre bölünmesini engellemektedir.

Bazı durumlarda hücreler, dışarıdan gelen etkiler ile birden çok süreçlerin de dahil olduğu, hücrelerin DNA'sının yanında kromozomlarda bulunan genlerin meydana getirdiği farklılıklardan sonra aşırı bir hücre bölünmesi gerçekleşir ve anormal kitleleri meydana getirmektedir. Bu anormal kitleler yakınındaki dokulara zarar verme kabiliyetinin yanında farklı organları da etkileyebilmektedirler. Kontrolsüz bir Şekilde çoğalan bu anormal hücrelerin büyümesi ve yayılması ile gelişen hastalığa kanser denilmektedir. Bu anlamda kanser hastalığı için sadece çoğalma değil aynı zamanda hücre invazyonu (sağlıklı hücre istilası)'nın yanında metastaz (sağlıklı başka doku ve organlara yayılma) gibi malign özelliklerinin beraberinde gerçekleşmesi gerekmektedir. Hücre döngüsünde meydana gelen kontrol mekanizmasındaki değişiklikler kanserin gelişmesini sağlamaktadır. Kanser hücrelerinin gelişmesinde tümör baskılayıcı faktör ile DNA'nın onarılması ve gerçekleşen apoptoz kritik öneme sahiptirler. Bu aşamadan sonra hücre döngüsü sırasında siklinler ve siklinlere bağımlı kinazlar, tümör baskılayıcı genlere yaptıkları etkileşimler sayesinde, büyüyen ve çoğalan hücreler bazen de nekroza gitmektedirler. Hücreler nekroza gitmezlerse hızlı bir Şekilde prolifer olmaktadırlar. Hücreler çoğalırken daha çok büyüyebilmeleri için tümör dokuları anjiogeneze uğramaktadırlar. İhtiyaç duyduğu kan akımını aldıktan sonra hücre nekrozu azalır tümör hızla çoğalır ve metastaz gelişebilmektedir (Aliustaoğlu 2009).

2.7.1. Apoptotik Hücre lmlerinin Evreleri

Apoptoz hücre içi ya da hücre dışı sinyaller ile başlayıp birbiri ardı sıra takip eden olaylar ile gerçekleşmektedir. Apoptoza uğrayan bu hücreler fagositoza uğrayarak döngüyü sonlandırmaktadırlar. Hücre içi ve hücre dışı sinyalleri ile aktif olan kaspazlar hedeflerdeki proteinleri yıkıma uğratarak hücre içinde değişimlerin

oluşmasına neden olmaktadır. Apoptoza uğrayan bu hücreler, apoptotik cisimlere kadar parçalanarak fagositoz ile yok olmaktadır (Duksal 2008).

2.7.2. Apoptotik Mekanizmalar

Apoptotik hücre ölümleri sırasında mekanizma basamaklarının neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. 1986 yılında yapılan bir çalışmaya göre glukokortikoid verilerek çalışılan kemirgen hayvanlarda timus timositlerinin apoptoz ile öldüğünü göstermiştir (Narula ve ark. 1997). Apoptoz primer hücrelerde başlatılırken uyarıcı yardımıyla sekonder olarak da gelişebilmektedir. Hücre dışından gelen tümör nekroz faktör (TNF), interlökin-2 (IL-2), insülin büyüme faktörü (IGF), koloni uyaran faktörler (CSF) ve nöron büyüme faktörü (NGF) gibi uyarıcıların azalması, glukokortikoidler, ilaçlar, radyasyon, çeşitli antijenler gibi pozitif uyarıcılar olarak sıralanabilmektedir. Bazı otoimmün hastalıkların oluşmasında etkili olduğu bilinen Fas/FasL, sFas proteinleriyle virüsler (gp120 proteinini etkileyen influenza virüsü, HIV, TNF reseptörlerinde bulunan adenovirüs) hücreleri apoptotik sona sürüklemektedirler (Duksal 2008).

2.7.3. Hücre İçi Apoptotik Sinyaller

Hücre içindeki Ca^{++} miktarındaki artış, hücre içinin pH'sinin düşmesi, DNA'da meydana gelen hasarlar ve metabolik olarak gelişen bozukluklar hücreleri apoptoza götüren hücre içi ölüm sinyallerinin aktif olmasını sağlamaktadırlar (Bosman ve ark. 1996).

2.7.4. Apoptoz Nasıl Oluşur?

Omurgalı canlılarda apoptoz mitokondriyal sitokrom-c'nin salınmasıyla başlamaktadır. Apaf-1 sitokrom-c'yi bağlarken, sitozolde pasif olarak monomer yapıda bulunmaktadır. Sit-c, apaf-1'i C-terminal alanına bağladığında apaf-1'i aktif hale getirmektedir (Chen ve Wang 2002). Sit-c ile apaf-1 bileşimi apoptozomu oluşturmaktadır. Apoptozom prokaspaz-9'u aktifleştirerek kaspaz-9'u oluşturur. Aktif hale gelen kaspaz-9'da işlemi yürütmeye yarayan prokaspaz-3'ü aktif hale getirerek hücre sitoplâzmalarında kromozomal DNA'nın ayrışmasını, yapısal proteinlerin

sindirilmesini ve hücrelerin fagositozunu gerçekleştirmektedir (Kato ve ark. 1996, Nakatsuka ve ark. 1999, Şekil 5).



Şekil 7. Apoptozom oluşumu (Duksal 2008).

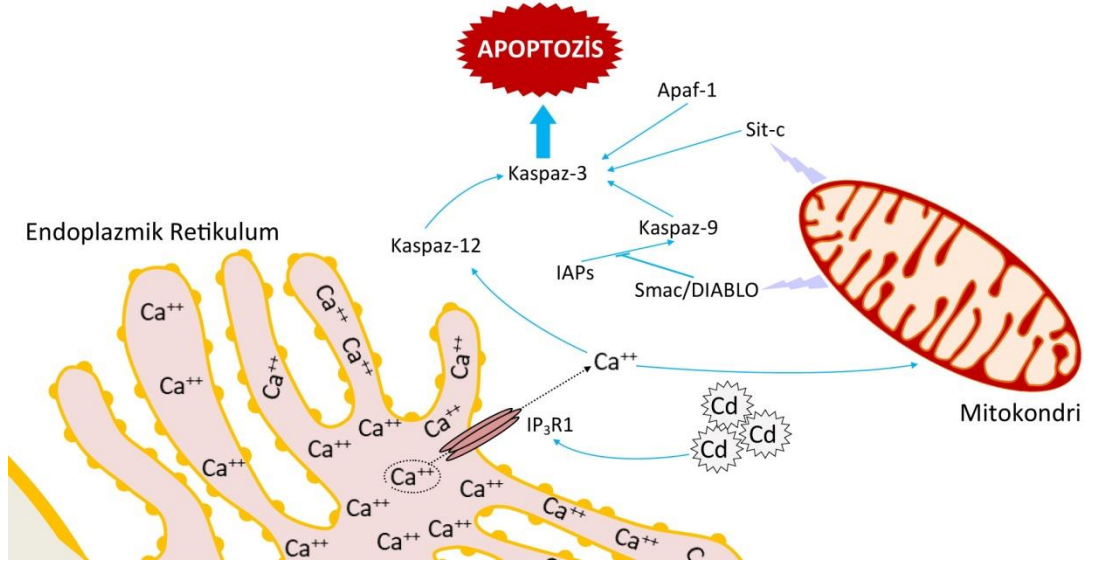
2.7.5. Bcl-2 Proteinleri

Apoptoz oluşumu düzenlenirken Bcl-2 ailesi oldukça önemli bir rol almaktadırlar. Bcl-2 ailesi çalışma sistemine göre proapoptotik grup ve anti-apoptotik grup olarak 2'ye ayrılmaktadır. Bu gruplar bcl-2, bcl-x1 ve mc1-1 proteinlerini içerirken hücre ölümünü engellemektedir (Yin ve ark. 1994). Çok güçlü bir hücre ölüm inhibitörü olan Bcl-2 en çok mitokondride, Endoplazmik Retikulumda ve çekirdeğin etrafındaki zarlarda bulunmaktadır. Bcl-2 antiapoptotik etkiyi, mitokondriden sit-c salınmasını durdurarak göstermektedir. Bcl-x1 mitokondrinin zarında bulunurken bcl-2'yle beraber mitokondrinin zar yapısının geçirgenliğini korumaktadırlar. Apoptozisi proapoptotik bcl-2 ve üyelerinin inhibisyonuyla engellemektedir. Bcl-x1, kaspaz'ın aktivasyonunu ise apaf-1 ile engellemektedir (Hu ve ark. 1999, Nakamura ve ark. 2000, Atvar 2006). Yapılan çalışmalar pro-apoptotik

proteinlerin (bax, bak, bcl-xs) 2 bazen 3 BH alanı içerip hücre apoptozu için oldukça önemli olduğunu göstermektedir (Lindsten ve ark. 2000, Rathmell ve ark. 2002).

2.7.6. Mitokondri ve Endoplazmik Retikulumun Apoptozda Önemi

Hücre ölümleri gerçekleşirken mitokondrinin düzenleyici rolü oldukça fazladır. Mitokondri içerisinde sitokrom-c, Smac/DIABLO ve Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF) gibi bir sürü pro-apoptotik proteinleri barındırmaktadır. Bu pro-apoptotik proteinler mitokondride bulunan küçük porlardan salınmayla oluşmaktadır (Erlacher ve ark. 2005). Endoplazmik retikulumda ise kalsiyum kanalından inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü-1 (IP₃R1) ile Cd'nin hücre içine girmesiyle DNA'nın parçalanmasını engellemektedir. Kalpainler ile kaspazları ve mitokondriye giden yol boyunca apoptozu baskılamaktadır (Li ve ark. 2000, Şekil 6).



Şekil 8. Kadmiyum aracılı olarak IP₃R1 üzerinden ER'de şekillenen apoptotik yol .

2.7.7. Apoptozda Hücre Dışı Etkiler

Apoptozu neden olan dış etkenlerin başında UV ışınlar, gama ışınları, radyasyon, antikanser ilaçlar, yüksek ısı ve hipoksi gelmektedir. Hücreler hayatta kalmak için etrafındaki diğer hücrelerden ve ekstra sellüler matriksten gelen büyüme faktörleri ve yaşamsal uyarılara ihtiyaç duymaktadırlar. Hücrelerin hayatta kalabilmeleri için bu uyarıların düzenli bir şekilde devam etmeleri gerekmektedir.

Bu uyarılar durmasıyla hücre ölümünün tam olarak nasıl başladığı bilinmemektedir. Hücre kültürüyle yapılan çalışmalarda büyüme faktörü çıkarıldığında hücre metabolizmalarında ani ve hücre döngüsünde yavaşlamaların olduğu gözlenmiştir (Bosman ve ark. 1996).

2.7.8. Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonu

Sitokinlerden bazıları hücre zarı reseptörlerine, ölüm programını başlatmak için bağlanmaktadır (Bosman ve ark. 1996, Fox ve ark. 2001). Apoptozda en önemli zar reseptörleri Tümör Nekrozis Faktör (TNF) reseptör ailesidir. Bu ailenin en az 19 çeşit üyesi bulunmaktadır. Biyolojik etkileri oldukça çok çeşitli olan bu aileye mensup reseptörlerin etkileri sadece apoptozla sınırlı değildir. TNF grubu bir taraftan apoptoz oluştururken diğer taraftan da proliferasyonun oluşumunu sağlamaktadır. TNF grubunun bazı üyeleri ise her ikisini de birden meydana getirmektedir. TNF reseptörleri uyarıldığı zaman hücre sitoplazmasındaki adaptör proteinlere bağlanırken bu proteinlerin ölüm efektör parçacıkları apoptozu başlatan kaspazlara bağlanmaktadır (Bosman ve ark. 1996, Jerzak ve Bischof 2002).

2.7.9. Sitotoksik T Lenfosit ile Oluşan Apoptoz

Enfeksiyona uğramış konakçı hücrelerde bulunan yabancı antijenler Sitotoksik T Lenfositler (STL) tarafından tanınmaktadır. Bu lenfositlerin asıl görevleri malign yada virüs ile enfeksiyona uğrayan hücrelerin ölümünü sağlamaktır (Bosman ve ark. 1996, Budd 2002). Perforin ve granzyme B (serin proteaz) proteinleri STL'lerin sitoplazmasında bulunur ve apoptoz oluşturan sitoplazmik granüllere tutunmaktadır (Budd 2002). Apoptozu başlatan hücrelerin zarlarına perforin sayesinde açılan transmembran delikçikleri ile STL'ler sitoplazmaya granzyme B salgılayarak kaspazları aktif hale getirmektedirler (Bosman ve ark. 1996).

2.7.10. Apoptozda Glukokortikoidlerin Etkileri

Hipokampüste bulunan granüler hücrelerin apoptozunu glukokortikoid reseptörleri durdurmaktadır. Ratların hipokampusünün glukokortikoid reseptör aktivasyonu antiapoptotik bcl-2 veya bcl-x1'in, proapoptotik bax molekülüne oranını değiştirerek hücrenin ölümünü uyarılmaktadır. Mineralokortikoid reseptörleri aktif

olduktan sonra ters etki oluşmaktadır. Glukokortikoid reseptörünün etkileri ile meydana gelen hücre ölümlerinde Bax etkili olmalıdır. Glukokortikoid reseptörlerinin aktivasyonunun gerçekleşmesi için bax ile bcl-2 gen ailesinin uyarılmasını sağlayan tümör supressör geni olan p53'ü azaltmaktadır (Almeida ve ark. 2000).



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- ✓ Deiyonize su cihazı (Nüve, NS-108, Türkiye)
- ✓ Homojenizatör (Scilogex, D160, USA)
- ✓ Hassas terazi (Precisa, 205A SCS, İsviçre)
- ✓ Manyetik karıştırıcı (Labinco-532, Endonezya)
- ✓ Vortex (ISO Lab, MX-S, Almanya)
- ✓ Derin dondurucu (Beko, 3400 CF, Türkiye)
- ✓ -86°C derin dondurucu (Nüve, DF-290, Türkiye)
- ✓ Soğutmalı santrifüj (Heraeus, Almanya)
- ✓ 0,5-2,5µl, 2-20µl, 100-1000µl ayarlanabilir otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
- ✓ Buzdolabı (Bosch)
- ✓ Spektrofotometre (PowerWave XS, BioTek, Instruments, USA)
- ✓ Etüv (Nüve, FN-400, Türkiye)

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- ✓ Sevofluran:(Sevorane 4456)
- ✓ Usnic acid (Sigma, 329967-5gr)
- ✓ Alfalipoik acid (Sigma, 07039-50mgr)
- ✓ Cadmium chloride (Sigma, 202908-10g)
- ✓ Carboximethylcellulose sodium salt medium (Sigma, 21902 100gr)
- ✓ Sodium salt buffer (Sigma, 4417 100 tab)
- ✓ Bcl2 rat eliza kit (Sunred, DZE201110038)

- ✓ Bax rat eliza kit (USCN, SEB343Ra)
- ✓ Steril enjektör (Hayat)
- ✓ Steril insülin enjektörü (Hayat)
- ✓ EDTA'lı kan tüpü (Venoject)
- ✓ Eppendorf tüpü (Eppendorf)
- ✓ Otomatik pipet uçları (Isolab)
- ✓ Dispender uçları (Eppendorf)

3.1.3. Hayvan Materyali

Çalışmada Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Deneysel Hayvanları Birimi'nden temin edilen 200-250 g ağırlığa sahip 40 adet Wistar Albino erkek rat kullanılmıştır. Hayvanlar 25 ± 2 °C'lik oda sıcaklığı, % 60-65 nem ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda *ad libitum* olarak beslenmiştir. Çalışma için gerekli etik kurul onayı, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na (KAÜ-HADYEK) yapılan başvuruya müteakip alınan 2017/100 izin numarası ile sağlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Grupların Oluşturulması

Kontrol ve deney grupları her grupta 8 adet hayvan (n=8) olacak şekilde aşağıdaki gibi oluşturulmuştur. Uygulamalarının tamamı çelik oral gavaj ile yapılmıştır. Verilen Cd dozajı (Ye ve ark. 2007)'den uyarlanmıştır. Usnik asit ile carboximetilsellüloz (Odabasoglu ve ark. 2006)'dan uyarlanmıştır. Alfa lipoik asit ise (Sevgiler ve ark. 2011)'den uyarlanmıştır.

1. Grup (Kontrol): 20 gün boyunca serum fizyolojik uygulandı
2. Grup (CMC): 20 gün boyunca %1'lik CMC solüsyonundan 1 ml/kg oranında uygulandı.
3. Grup (CdCl₂): 20 gün boyunca CdCl₂ (1 mg/kg/gün) uygulandı.
4. Grup (UA + CdCl₂): 10 gün boyunca UA (50 mg/kg/gün) + 10 gün boyunca da UA + (CdCl₂ (1 mg/kg/gün))

5. Grup (ALA + CdCl₂): 10 gün boyunca ALA (1 mg/kg/gün) + 10 gün boyunca da ALA + CdCl₂ (1 mg/kg/gün)

Deney süresi sonunda sevofluran ventilasyonu ile anestezi edilen hayvanların yaşamına servikal dislokasyon yöntemi ile son verilerek gerekli olan doku örnekleri toplanmış ve hızlı bir şekilde -80°C’de saklanmıştır.

3.2.2. Dokuların Homojenizasyonu

Hayvanların öldürülmesinden sonra uygun koşullar altında saklanmış olan dokular, oda ısısına gelmesine izin verilmeden, buz üzerinde 1'er gram kesilerek tartılmış ve akabinde, öncesinde hazırlanmış fosfat tampon tuz çözeltisinin (7,4 pH) içerisine 1:9 oranında konularak homojenizatör yardımıyla, buz üzerinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş örnekler, ilgili ELISA kitleri prosedürü doğrultusunda, soğutmalı santrifüj kullanılarak +4°C sıcaklıkta 10000xG’de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda süpernatantlar alınarak ELISA analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Bax ve Bcl-2 Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Karaciğer ve böbrek doku homojenizatlarından Bax ve Bcl-2 protein miktarları, ticari ELISA kitler kullanılarak belirlenmiştir. ELISA kitlerinin tüm aşamaları, üretici firmaların ilgili kit prosedürlerine uyularak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Bax Protein Miktarının Belirlenmesi

Bax protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılmış reaktifler ve uygulanmış prosedür Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Bax protein miktarının belirlenme basamakları

Analiz İşlemleri	
1.	Antikor kaplamalı ELISA plate'inin ilk kuyucuğuna kör olarak distile su, sonraki 7 kuyucuğuna standart solüsyon serisi ve geri kalan kuyucuklara ise örnek homojenizatlarından 100'er µl eklenmiştir.
2.	Plate, plate cover ile kapatılıp etüv içerisinde 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
3.	İnkübasyonun ardından plate içerisindeki örnekler çıkartılarak, 100 µl reaktif-A eklenmiş ve plate cover ile kapatılıp etüv içerisinde 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
4.	Sürenin ardından plate içerisindekiler çıkartılarak, 3 kez 350 µl yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
5.	Yıkama işleminin ardından 100 µl reaktif-B solüsyonu eklenerek plate cover ile kapatılıp etüv içerisinde 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
6.	Süre sonunda plate içerisindekiler çıkartılarak, 5 kez 350 µl yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
7.	Yıkama işleminin ardından her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklenerek plate yeni bir plate cover ile kapatılıp etüv içerisinde 37°C'de 20 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir.
8.	Süre sonunda 50'şer µl stop solüsyonu eklenerek 2-3 dakika boyunca plate shakerda çalkalanmıştır.
9.	İşlem sonunda plate spektrofotometre cihazında köre karşı 450 nm dalga boyunca ölçülerek absorbans değerleri elde edilmiştir.
10.	Elde edilen standart absorbans değerleri, üretici firma prosedüründe belirtilmiş yoğunluk değerleri kullanılarak, eğim grafiği ve akabinde eğim formülü elde edilmiştir.

3.2.3.1. Bcl-2 Protein Miktarının Belirlenmesi

Bcl2 protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılmış reaktifle ve uygulanmış prosedür Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Bcl-2 protein miktarının belirlenme basamakları

Analiz Basamakları	
1.	Plate kuyucuklarına kör, standart ve örnekler 50'şer µl olacak şekilde eklenmiştir.
2.	Geri kalan kuyucuklara 40 µl örnekler eklenip üzerine 10 µl anti Bcl-2 antibody eklenmiştir.
3.	50 µl Biotin, HRP-streptavidin solüsyonu ve standart solüsyonları eklenerek çalkalayıcıda karıştırılıp 60 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir.
4.	Sürenin ardından plate içerisindekiler çıkartılarak, 5 kez wash buffer ile 350 µl'de 30 saniye ile 1 dakika arasında bekletilerek yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
5.	Yıkama işleminin ardından 50 µl substrat-A ve 50 µl substrat-B solüsyonu eklenerek plate cover ile kapatılıp karanlık ortamda etüv içerisinde 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
6.	Süre sonunda plate içerisindekiler çıkartılarak, 50 µl stop solüsyonu eklenen kuyulardaki mavi rengin sarıya döndüğü gözlenmiştir.
7.	İşlem sonunda 10 dakika içinde plate spektrofotometre cihazında köre karşı 450 nm dalga boyunca ölçülerek absorbans değerleri elde edilmiştir.

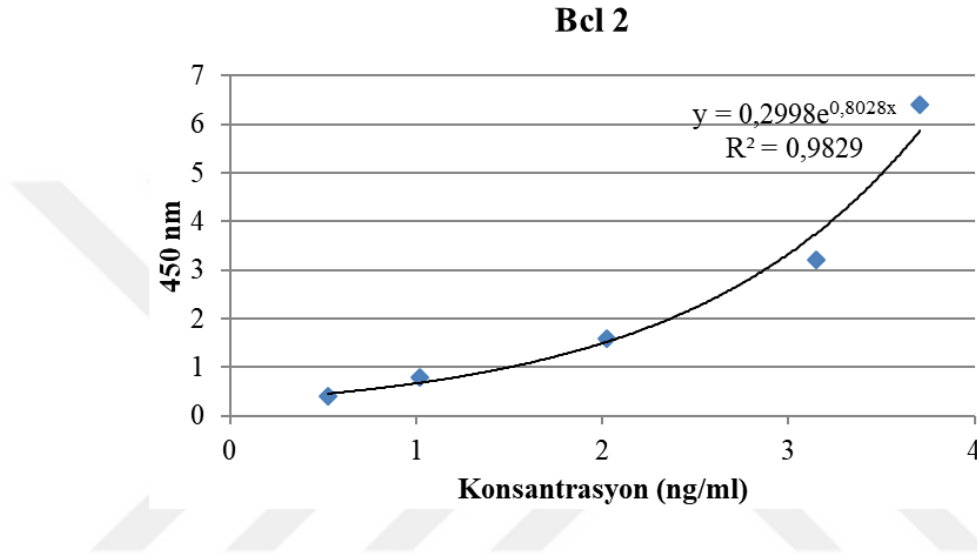
3.2.4. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilere IBM SPSS Statistics 20.0 yazılımı yardımıyla One-Way ANOVA ve Tukey Testi uygulanmıştır. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak belirlenmiş ve $p < 0.05$ istatistiksel farklılığı göstermiştir.

4.1. BULGULAR

4.1.1. Karaciğer ve Böbrek Dokularına Ait Bcl-2 Protein Miktarları

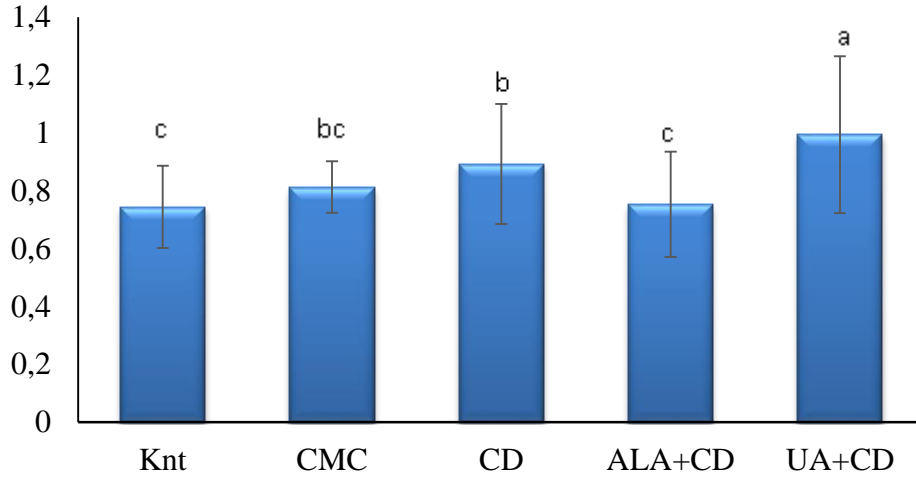
Bcl-2 protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standartların spektrofotometrik ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon eğrisi ve R^2 değeri Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Bcl-2 düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi.

Böbrek dokusu Bcl-2 protein değerleri Şekil 10'da gösterilmiştir. CD grubu böbrek Bcl-2 protein miktarlarının Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin şekilde yükseldiği ($p<0,01$) görülmüştür. Bununla beraber, CD ve UA+CD grubu böbrek dokusu Bcl-2 protein miktarlarının kontrol grubu'na göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür ($p<0,001$). Kontrol grubu ile ALA+CD grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. CD grubuna göre ALA+CD grubu böbrek dokusu Bcl-2 protein miktarlarının istatistiksel olarak azaldığı ($p<0,01$), UA+CD grubu böbrek dokusu Bcl-2 protein miktarlarının ise istatistiksel olarak belirgin şekilde yükseldiği ($p<0,05$) belirlendi.

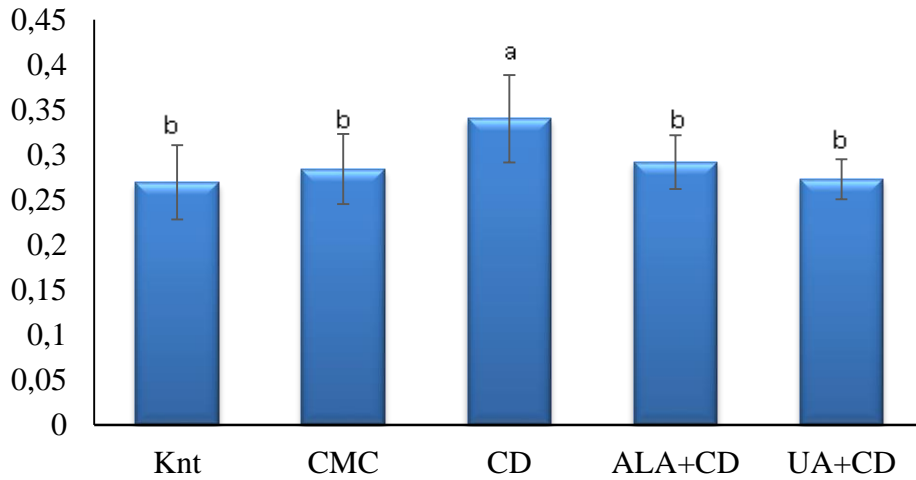
Bcl-2 Böbrek



Şekil 10. Böbrek dokusuna ait Bcl-2 protein miktarları (^{a-c}, ^{a-bc}: $p < 0,001$, ^{b-c}: $p < 0,01$, ^{a-b}: $p < 0,05$).

Karaciğer dokusu Bcl-2 protein değerleri Şekil 11’de gösterilmiştir. CD grubu karaciğer Bcl-2 protein miktarlarının Kontrol grubuna, CMC grubuna, ALA+CD grubuna ve UA+CD grubu göre istatistiksel olarak yükseldiği ($p < 0,05$) görülmüştür. Kontrol’e göre ise CMC grubunun, ALA+CD grubunun ve UA+CD grubunun istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edildi.

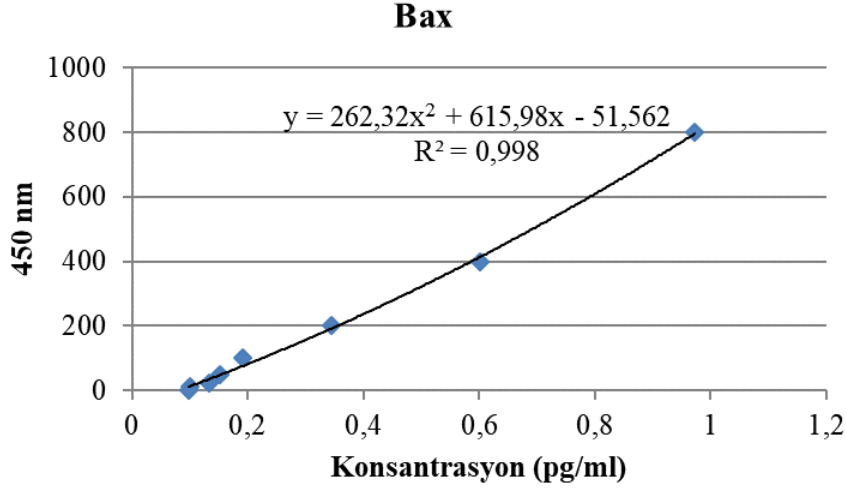
Bcl-2 Karaciğer



Şekil 11. Karaciğer dokusuna ait Bcl-2 protein miktarları (^{a-b}: $p < 0,05$).

4.1.2. Karaciğer ve Böbrek Dokularına Ait Bax Protein Miktarları

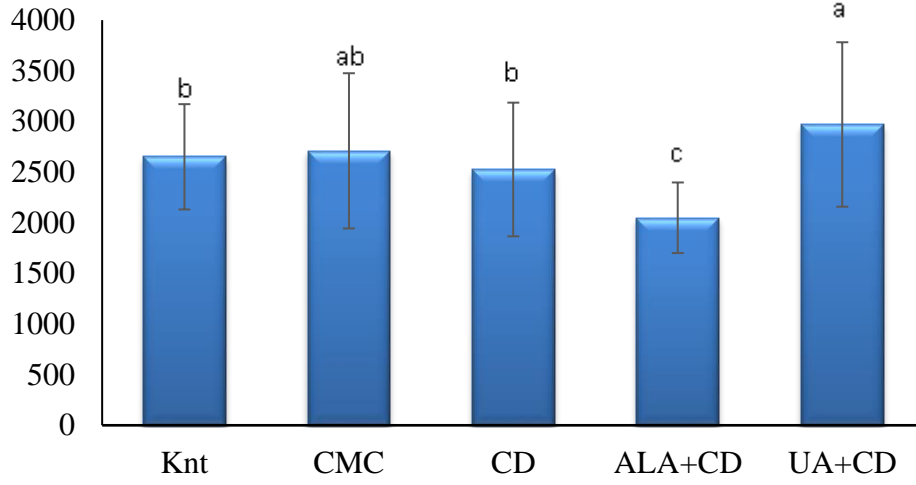
Bax protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standartların spektrofotometrik ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon eğrisi ve R^2 değeri Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Bax düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi.

Böbrek dokusuna ait Bax protein verileri ise Şekil 13’te gösterilmiştir. CD grubu böbrek Bax protein miktarlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak değişmediği görülmüştür. Böbrek dokusuna ait Bax protein değerlerinin UA+CD grubunda kontrol ve CD grubu’na kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer taraftan ALA+CD grubunda Bax protein değerlerinin CD, CMC, UA+CD ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,001$).

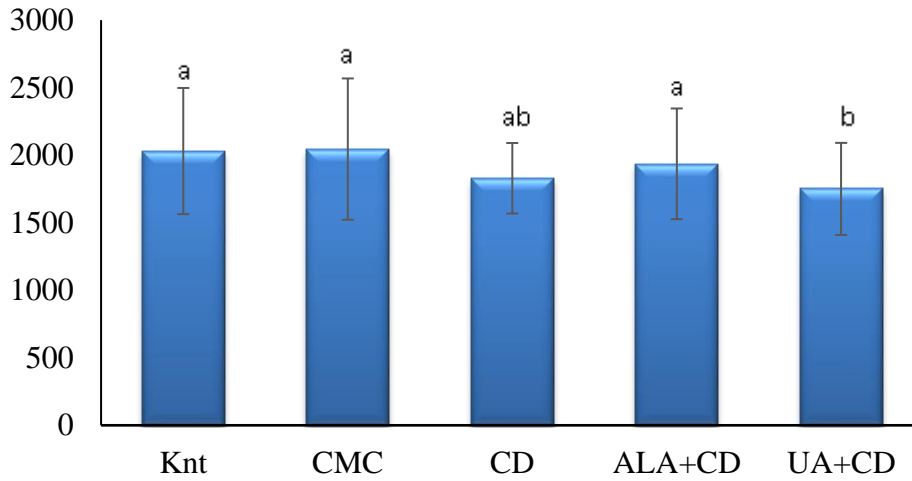
Bax Böbrek



Şekil 13. Böbrek dokusuna ait Bax protein miktarları (^{a-b}: $p<0,05$, ^{b-c, a-c, ab-c}: $p<0,001$).

Karaciğer dokusuna ait Bax protein değerleri Şekil 14'te gösterilmiştir. CD grubu karaciğer Bax protein miktarlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak değişmediği görülmüştür. Karaciğer dokusunda kontrol grubu'na kıyasla UA+CD grubu Bax protein miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilirken ($p<0,05$), CD grubu ile UA+CD grubu Bax protein miktarı arasında önemlilik belirlenmemiştir. ALA+CD grubu Bax protein miktarının kontrol ve CD grubu'na göre istatistiksel olarak değişmediği belirlendi.

Bax Karaciğer



Şekil 14. Karaciğer dokusuna ait Bax protein miktarları (^{a-b}: $p<0,05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Apoptozis hücrelerin, dış uyaranlar veya iç uyaranlar aracılı, kontrollü ve programlı bir biçimde intiharı olarak tanımlanabilir (Su ve ark. 2015). Hücrelerin apoptozise uğramaları için gerekli sinyaller her nereden alınmış olursa olsun, belirli bir hücre içi protein aktivasyon zincirinin oluşması gerekmektedir. Bu zincir esas olarak, kaspaz gruplarının mitokondri-aracılı veya mitokondri-bağımsız yollarla, DNA fragmentasyonuna ve hücre içi protein parçalanmasına neden olacak proteinlerin aktifleştirilmesine dayanmaktadır (Savitskaya ve Onishchenko 2015). Farklı uyaranlar ile kaspaz temelli yollarla apoptozis şekillenebileceği gibi kaspaz bağımsız yollarla da apoptozisin oluşabildiği bilinmektedir (Pathak ve ark. 2013). Tüm hücre tiplerinde apoptozisin oluşması için mitokondri bir zorunluluk olmamakla birlikte, intrinsek apoptotik sinyallerin oluşmasında mitokondri kilit bir rol oynamaktadır (Westphal ve ark. 2011). Mitokondrinin bu rolü ise çoğunlukla, üzerine lokalize çeşitli protein gruplarının ifadelerindeki farklılıklara dayanmaktadır. Apoptotik sinyaller mitokondri üzerinden bir dizi aksiyon sonucu hücreyi programlı ölüme sürüklemektedir. Bu süreçte mitokondriden salınan sitokrom-c sitoplazmada Apaf-1 ve kaspas 9 ile birleşerek apoptozom ünitelerini oluşturur. Oluşan apoptozom hücrede apoptozisin oluşmasını sağlayan enzimlerin aktivasyonu ile hücre ölümünü gerçekleştirecek adımı attırır. Sitokrom-c'nin mitokondriden salınması Bcl-2 ailesi proteinlerinin denetimi altındadır. Bcl-2 ailesi anti apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W ve A1) ve pro-apoptotik (Bax, Bak ve Bok) üyelere sahiptir. Anti-apoptotik üyeler dışındaki Bax grubu (Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Puma, Noxa ve Hrk) Bcl-2 homologudur ve ortak olarak BH3 interaksiyon bölgesine sahiptirler. Bcl-2 proteinleri mitokondri dışı geçirgenliğini kontrol altına alan anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki etkileşimi düzenlemektedir. Pro-apoptotik üyeler olan Bax ve Bak mitokondri permeabilitesi üzerinde membran porları düzenleyici etkileri sayesinde geçirgenliğin artmasına ve böylece apoptozis oluşmasına yardımcı olarak düzenleyici işlev görürler (Willis ve Adams 2005, Keinan ve ark. 2010). Bunun yanında mitokondri dışı membranında bulunan VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) voltaj duyarlı kanallardır ve Bax ve Bad'ın bu kanallar ile etkileşimi sonucunda mitokondri permeabilitesi değişmektedir. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri ise sitokrom-c'nin sitoplazmaya geçişi üzerinde engelleyicidir ve Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu hücrenin

apoptoza uğramasını engellediğinden bir proto-onkojen olarak değerlendirilmektedir (Keinan ve ark. 2010). İnsan sağlığı açısından etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için ilk önce Bcl-2 protein ailesinin ölüm dansı denilen yapısını niceliksel olarak modellemek gerekmektedir. Bu elde edilen modelleme ile apoptozun nasıl kontrol altına alındığı tespit edilerek daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilebileceği öngörülmüştür (Kale ve ark. 2018). Bu sebeple Bax/Bcl-2 oranının, apoptotik/mitojenik aktivite hakkında bilgi verdiği, birçok farklı araştırmayla ileri sürülmüştür (Chresta ve ark. 1996, Raisova ve ark. 2001, Salakou ve ark. 2007, Jafarinejad-Farsangi ve ark. 2015).

Çevremizde doğal olarak bulunan, atom ağırlığı yüksek ve yoğunluğu suyun yoğunluğundan beş kat daha fazla olan elementlere genel olarak ağır metaller denilmektedir (Tchounwou ve ark. 2012). Günümüzde kullanım alanı oldukça geniş olan bu elementler çevre kirliliğini arttırmasının yanında insan sağlığını da olumsuz yönde etkilemesi sebebiyle endişe verici hale gelmiştir (Nighat ve ark. 2019). Ağır metallerin sebep olduğu toksikasyonun etkileri maruz kalınan doza, maruz kalma şekliyle birlikte maruziyete sebep olan ağır metalin türüne göre değişmektedir. Canlının yaşının, cinsiyetinin, genetik yatkınlığının yanında beslenme alışkanlıklarının da toksikasyona maruz kalmada oldukça etkili olduğu bilinmektedir (Jaishankar ve ark. 2014). Toksisitesinin yüksek olmasıyla bilinen ve sırasıyla arsenik, cıva, çinko kadmiyum, kurşun gibi elementler insan sağlığını tehdit eden öncelikli ağır metal elementleri arasında bulunmaktadır. Düşük miktarlarında bile başta karaciğer ve böbrek olmak üzere doku ve organlara büyük hasarlar verebilen bu elementler sistemik toksik elementler olarak sınıflandırılmaktadır (Nardiello ve ark. 2019). Kadmiyum da Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı ile ABD Çevre Koruma Ajansı'na göre insanlar için (bilinen veya olması mümkün olan) yüksek kanser oluşturma riskine sahip toksik bir ağır metal olarak kabul edilmektedir (Zhang 2003). Kadmiyumlu bileşikler sırasıyla böbrek ve karaciğerde birikip hipertansiyona ve kansızlığa, akciğerde birikip akciğer kanserine, kemiklerde birikip osteoporoz gibi hastalıklara öncülük ettiği bilinmektedir (Asri ve ark. 2014). Vücudu dolaşan kadmiyumun %70 kadarı karaciğerden süzöldükten sonra böbrekler tarafından emilmektedir. Bu emilim sırasında böbreklerin proksimal tübülleri hasar görerek kortekste Kadmiyum birikmesiyle Na⁺glikoz ile Na⁺aminoasit taşıyıcı proteinler baskılanır ve bazolateral

Na⁺K⁺ATPaz aktivitesi azalır. Bu sayede geri dönüşü olmayacak değerlere fosfat seviyeleri düştüğü için böbreklerde fonksiyon kaybına neden olurken %30'lara varan küçülmeye de sebep olmaktadır (Tsuruoka ve ark. 2000). Kadmiyum hücre içerisinde birçok farklı etkiye sebep olabilmesinin yanında, programlı hücre ölümü veya kanser gibi birçok sonuca neden olduğu da bilinmektedir (Messner ve ark. 2016). Bu etkilerin nedeni olarak, Kadmiyumun karşılıklı hücre kompartımanlarının vermiş olduğu farklı cevaplar sayılabilir. Kadmiyumun bu etkilerine örnek olarak erken yanıt sistemleri ((IEG'ler) c-fos, c-jun, c-myc), metalloprotein (MT)'yi sentezleyen stres yanıt geni, ısı şoku proteinlerini aktifleştiren (HSP) genleri, glutatyon (GSH)'ı sentezlenmesini sağlayan genler, transkripsiyon faktörünü etkileyen metal düzenleyici transkripsiyon faktörü-1 (MTF-1), geri uyarıcı faktör (USF), nükleer faktör B (NF-B) ile NF-E2 geniyle bağlantılı (NRF2), hipoksi indükleyici faktör-1 (HIF-1) genlerinin yanında translasyon genlerinden çeviri başlatıcı faktör-3 (TIF-3) ile çeviri uzatıcı faktör-1δ (TEF-1δ) gibi birçok unsur gösterilebilir (Waisberg ve ark. 2003, Olszowski ve ark. 2015). Tüm bunlara ek olarak, Kadmiyumun hücrelerde programlı hücre ölümünü tetiklemesinde mitokondri önemli bir yere sahiptir (Pulido ve Parrish 2003). Literatürdeki bilgiler Kadmiyumun mitokondriyi, membran permabilite kaybına uğratarak hücreyi apoptoza sürüklediği üzerinde birleşmektedir. Ye ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada Kadmiyum kontaminasyon süresinin Bcl-2 protein yoğunluğu azalması ve mitokondriyal membran geçirgenliğinin bozulması ile ilgili olduğu ve bu alakanın, artan hücre içi Ca⁺⁺ miktarı ile paralel seyrederken Bapta-AM Ca⁺⁺ şelatörünün, Kadmiyum aracılı apoptozisi engellediği gösterilmiştir (Ye ve ark. 2007). Bu bulgu Kadmiyumun mitokondri üzerindeki etkisinin kalsiyum aracılı olarak şekillendiğini ve kalsiyumun bu süreçteki önemini ortaya koymaktadır. Fakat bunun yanında Kadmiyum aracılı apoptozisin, kaspaz kaskadından bağımsız olarak, mitokondri üzerine etki eden ROS artışı ile de şekillenebildiği bilinmektedir (Shih ve ark. 2004). Kadmiyum toksikasyonu için farklı şelatör ajanların kullanılabilirliği biliniyor olsa da (Rafati Rahimzadeh ve ark. 2017) hâlihazırda etkili bir terapinin olmadığı belirtilmektedir (Ye ve ark. 2007). Bizim çalışmamızda ise Kadmiyum grubu böbrek Bcl-2 protein miktarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin şekilde yükseldiği gözlemlenirken aynı grubun böbrek Bax protein miktarı ise kontrol grubuna göre değişmediği tespit edilmiştir. Ayrıca Kadmiyum toksikasyonu oluşturulan rat karaciğer dokusunda ise Bcl-2 protein miktarı kontrol grubuna göre

istatistiksel olarak artarken Bax proteininin ise deđiřmediđi tespit edilmiřtir. Bu durum Kadmiyum toksikasyonu ile geliřen apoptotik sūrece proapoptotik etkisi olan Bax proteinin sabit kalırken toksikasyonla antiapoptotik Bcl-2 proteininin çođaldıđı ve yapılan diđer çalıřmaları destekler nitelikte proliferatif sūreci bařlattıđı dūřunūlmektedir.

Yeřil alglerle mantarların ya da siyanobakteriler arasında geçiř formu olan likenler ise, yapısında bulundurduđu birincil ve ikincil metabolitlerle birçok toksikasyon sonucu meydana gelen lezyonlara karřı koruyucu etki gōstermektedir (Xu ve ark. 2016). Antioksidan (Fernández-Moriano ve ark. 2016), antimitotik (Cardarelli ve ark. 1997), antibakteriyal (Yūcel ve Őzyiđitođlu 2018.), antitūmōr (Ozenoglu ve ark. 2013), antikanser (Mayer ve ark. 2005), antiapoptotik Őzelliđinin yanında antiproliferatif (Haraldsdōttir ve ark. 2004) Őzelliđinin de olduđunu yapılan çalıřmalar gōstermektedir (Araūjo ve ark. 2015). Son zamanlarda likenlerden elde edilen sekonder metabolitlerin antiapoptotik etkisinden dolayı kanser tedavisinde kullanılabileceđi dūřūncesi dikkati çekmektedir. Kanser arařtırmalarında en Őnemli adımlardan birinin apoptoz yolađıyla ilgili ařamaların arařtırılarak açıklıđa kavuřturulması olduđu bilinmektedir (řekerli ve ark. 2017). Likenlerin, yapısında bulunan asidik etkili fenolik yapıya sahip depsit, depsidon ve tūrevleri gibi liken metabolitleri nedeniyle pek çok bilimsel çalıřmada hastalıkların dūzeltilmesi maksadıyla (Vartia 1973). yapılan çalıřmalarda ikincil metabolitlerin antitūmōral etkilerinin bađıřıklık sistemini aktifleřtirerek telomerlerin bađlanmasını yavařlatıp, telomeraz aktivasyonunu durdurduđu ve canlılıđın devemliliđini sađladıđı gōsterilmiřtir. Ayrıca vaskūler endotelial būyūme faktōrū (VEGF)'nin sinyalini durdurarak, apoptoza yol açan etkilerinin de olduđu bildirilmiřtir (Kim ve ark. 2015). Likenlerden elde edilen ikincil metabolitlerin bařında usnik asit, jiroforik asit, izo-usnik gibi maddeler gelmektedir. Bu ikincil metabolitler metallerle kompleks oluřturma eđilimindedirler. Tūm dūnyada ve Tūrkiye'de tıbbi amaçla en çok kullanılan ikincil metabolitlerin bařında usnik asit gelmektedir. 1844 yılında ilk defa izolasyon edildiđinden gūnūmūze en sık çalıřılan ve ticari olarak Őretilen liken meteboliti usnik asittir (Mitrović ve ark. 2011). Likenlerin etkili bir antioksidan olduđunun bilinmesinin yanında çođunlukla apoptoz yolakları Őzerine etkileri arařtırılmıřtır. Likenlerin içerdiđi antioksidanların iyi birer metal tutucu olduđu

bilinmektedir. Likenden elde edilen ikincil bileşiklerin (parietinin, atranorin, usnik asit ve jiroforik asit) Kadmiyum maruziyetine karşı doğal bir bariyer gibi oldukça etkili bir hücre koruyucu olduğu gözlenmiştir (Pavlovic ve ark. 2013, Kalinowska ve ark. 2015). İnsan akciğer kanser hücre kültürlerinde usnik asitin mitokondrial apoptotik genler olan TNF, AIF M1, Bcl-2 ve Bcl-2L1 gen ekspresyonlarında gerçekleştirdiği apoptotik etki ile antitümöral etkiyi desteklediği bildirilmiştir (Çoban ve ark. 2017). Yapılan başka bir araştırmada ise usnik asitin siklin bağımlı kinazların ifadelerini azaltıp siklin bağımlı kinaz inhibitörlerin ifadelerini arttırarak, akciğer karsinom hücrelerinde hücre ölümünü arttırdığı ve koloni formasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Singh ve ark. 2013). Yine benzer şekilde farelerde kanser hücrelerine karşı etkisinin gözlenmesi amacıyla verilen usnik asitin kanser hücreleri ile birlikte anjiogenezi de inhibe ettiği, ayrıca kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği gözlenmiştir (Song ve ark. 2012). İkincil metabolitlerin içerisinde usnik asitin apoptotik etkisinin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir (Bačkorová ve ark. 2012). Likenlerden elde edilen ekstraktlar ile insan kolon kanser hücrelerinde bulunan kaspaz 8 ile kaspaz 9 aktivitesinin arttığı tespit edilmektedir (Li ve ark. 1998). Kaspazların aktivasyonu apoptoz için önemli bir aşama olarak kabul edilmektedir. Kaspaz 8'in Bcl-2 üyelerinden Bid proteininin peptitlerin hidrolizi ile kaspaz 9'u aktive ederek apoptozu sağladığı belirtilmektedir (Li ve ark. 1998). Likenlerden elde edilen stiktik asit, alazinik asit gibi ikincil metabolit ekstraktlarının Bid proteininin bölünmesini arttırdığı gözlenmiştir (Ren ve ark. 2009). Usnik asitin doz artışıyla kanserli hücrelerde apoptoz oluşumunun paralel seyrettiği tespit edilmiştir (Kinoshita 2005). İnsan kolon kanser hücrelerinde kaspaza bağımlı kaskadın usnik asit ile aktive edilmesini takiben Bcl-2 proteininin inhibisyonu ve Bax proteininin aktivasyonunun apoptoz şekillenmesini sağladığı belirtilmektedir (Ren ve ark. 2009, Bačkorová ve ark. 2012). Usnik asitin Bcl-x1 ile kaspaz 3'ün aktivasyonunu yavaşlattığı, böylece tümör büyümesinin yanında anjiyogenezi de önemli ölçüde baskıladığı bildirilmiştir (Song ve ark. 2012). Bunun yanı sıra, usnik asitin antiproliferatif etkisinin de olduğu, bu etkinin p53, Bax, kaspaz 3 ile kaspaz 9 gen ekspresyonlarının artışı ve Bcl-2 proteininin gen ekspresyonunun baskılanmasıyla gerçekleştiği belirtilmektedir (Dericci ve ark. 2018).

Yaptığımız literatür taramalarında ağır metal toksikasyonu ile apoptotik sinyal yolağı elemanları olan Bax/Bcl-2 üzerine usnik asitin etkilerine dair literatür bilgiye

rastlayamadık. Bizim çalışmamızda Kadmiyum toksikasyonu oluşturulan rat böbrek dokuları Kadmiyum ile birlikte usnik asit verilen gruplar ile karşılaştırıldığında benzer şekilde Bcl-2 ve Bax proteinlerinde anlamlı bir artışın olduğunu gözlemledik. Toksikasyon gruplarıyla kadmiyum + usnik asit grupları kontrol grubuna göre de belirgin bir şekilde yükselmiştir. Usnik asitin bu hücrelerdeki artan apoptotik etkiyi azaltmamasındaki durumun, yapılan bazı çalışmalarda da olduğu gibi usnik asite yönelik dozaj miktarlarında yapılan artışlarla yinelenmesinin daha anlamlı bir sonuç ortaya koyacağını düşündürmektedir (Kinoshita 2005).

Kadmiyum toksikasyonu oluşturulan rat karaciğer dokuları kadmiyumla birlikte usnik asit verilen gruplar ile karşılaştırıldığında Bcl-2 protein miktarlarını kontrol grubuna yakın seviyelere anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Bunun yanında Bax protein miktarları da kadmiyum toksikasyonu oluşturulan gruba kıyasla kontrolden daha aşağı seviyelere anlamlı bir şekilde azaltıldığını gözlemledik. Usnik asitin karaciğer dokusunda anti apoptotik etkisinin daha etkin olarak işlev görmesiyle proapoptotik Bax proteinlerinin ekspresyonunu azaltıldığını tespit ettik. Kadmiyum toksikasyonu oluşturulan karaciğer dokusunda Bcl-2 proteininin seviyesindeki artış hücre apoptozunu azaltırken Bax protein miktarındaki azalma ise kontrollü hücre ölümünü azaltmış ve hücreyi proliferasyona sürüklemiştir. Usnik asit ile alfa lipoik asit'in antiapoptotik etkisinin yanında hücre çoğalmasını kontrol seviyelerine yaklaştırması anti proliferatif etkisinin de olabileceğini göstermektedir.

Alfa lipoik asidin ise mitokondride gerçekleşen dehidrogenaz reaksiyonları için antioksidan olarak etki gösterdiği bilinmektedir. Alfa lipoik asit insülin sinyal yollarının, miyoglobinin, tiyoredoksinin, prolaktinin, NF κ -B, gibi transkripsiyon faktör proteinlerinin yanında metal bağlayıcı ajanların indirgeyicisi ve düzenleyicisi olarak görev yaptığı bilinmektedir (Packer ve ark. 1995, Yürük ve Ayaz 2014). Lipoatın direk ya da dolaylı olarak glutasyonu, koenzimQ10'u ve vitamin E'yi yenilediği tespit edilmiştir (Karaca 2015). Rat karaciğer mikrozomları kullanılarak yapılan çalışmada Glutasyon (GSH) sentezlenirken sisteinin kullanılması sentezi yavaşlatan faktör olarak etki göstermektedir. Alfa lipoik asit hücreye hızla alınırken serbest haldeki dihidro lipoik asite indirgenir. Dihidrolipoik asit ise sistini sistine dönüştürmektedir. Sistein sistinden çok daha hızlı hücre içine alınır ve glutasyonun biyosentezini gerçekleştirmektedir (Ou ve ark. 1995). Kadmiyum toksikasyonu

oluşturulan farelere verilen N-asetilsistein (NAC), alfa-lipoik asit (LA), taurin (TAU) ve kurkumin (CUR) gibi maddelerin etkileri analiz edilmek için kas dokusundan alınan örneklerde yapılan antioksidan ölçümlere göre kadmiyum toksikasyonunu düşürme etkileri sırasıyla LA ve NAC, bunu TAU ve CUR şeklinde sıralanmıştır. Kadmiyum toksikasyonunu azaltan bu enzimlerin yanı sıra hayvanların kendi vücut direncinin de etkili olabileceği bildirilmektedir. Ayrıca bu enzimler tedavi edici özelliğinin yanında koruyucu olarak kullanılmasının daha etkili sonuçlar vereceği belirtilmektedir (Sevgiler ve ark. 2011). Chen ve ark. (2018) Alfa lipoik asitin kadmiyum toksikasyonuna karşı koruyucu etkisinin kaspaz yollarının aktifleşmesiyle gerçekleşebileceğini göstermektedir. Ayrıca kadmiyum ile gerçekleşen toksikasyon cyc'nin sitoplâzmaya mitokondriden geçişini ve kaspaz 3 ile kaspaz 9'un salınımını durdurmaktadır. Bunun yanında alfalipoik asitin Bcl-2 proteinlerini regüle ederek kaspazların aktif hale gelmesini ve apoptozu baskıladığı bildirilmektedir (Moungjaroen ve ark. 2006). Kadmiyum toksikasyonu sonucu aktifleşen kaspazın alfa lipoik asit tarafından engellenebileceğini ve alfalipoik asitin Bcl-2/Bax oranında da bir artışın olabileceği sonucuna varıldığı ileri sürülmektedir. Öte yandan AIF/Endo G yolu olarak da tanımlanan kaspazlardan ayrı apoptoz yolu ise böbreklerin hasar görmesinde kritik öneme sahip mitokondrial apoptoz yoludur. Sonuçta kadmiyum maruziyeti mitokondrideki hem kaspaza bağımlı hem de kaspazdan bağımsız apoptotik yolların aktifleştiği gibi rat böbrek dokularında meydana gelen sitotoksik etkiyi de indüklediği belirtilmektedir. Elde edilen bu sonuca göre kadmiyum toksisitesinin oluşturduğu böbrek dokusu harabiyetini, alfa lipoik asitin azaltabileceği ileri sürülmektedir (Chen ve ark. 2018). Liang ve ark. (2016) yaptığı hücre kültürü çalışmasında metal toksikasyonu ile apoptoza mitokondrideki kaspaz 9 ve kaspaz 3 yolağının aracılık ederek Bax/Bcl-2 ile Fas/ kaspaz 8'in etki ettiği ölüm reseptör yolunun indüklendiğini belirtmiştir. Bunun yanı sıra gelişen oksidatif stresin apoptozu baskılamada etkin bir rol aldığı ve lipoik asitin de apoptozu tamamen durdurduğu bildirilmiştir (Liang ve ark. 2016). Benzer çalışmalarda da, alfa lipoik asitin oksidatif stresi azalttığı, mitokondriyal Bax proteinine ait translokasyon ile mitokondriden sitokrom-c salınmasını, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonunu azalttığı belirtilmektedir (Lee ve ark. 2009, Kim ve ark. 2013, Wei ve ark. 2015).

Bizim çalışmamızda kadmiyum toksikasyonuna maruz kalan rat böbrek dokusunda Bcl-2 protein miktarındaki artışın alfalipoik asitin etkisiyle anlamlı bir şekilde azalarak kontrol grubu seviyelerine gerilediğini tespit ettik. Kadmiyum toksikasyonuna maruz kalan böbrek dokularında Bax protein miktarlarında tespit edilen anlamlı düşüş ise alfa lipoik asitin antiapoptotik etkisinden çok antiproliferatif etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Kadmiyum toksikasyonu oluşturulan rat karaciğer dokusunda antiapoptotik Bcl-2 protein miktarlarındaki artışın yanında Bax protein miktarlarındaki düşüş de hücrenin apoptozdan çok proliferasyona yöneldiğini ancak verilen alfa lipoik asitin bu proliferatif etkiyi tersine çevirerek hücrelerde antiapoptotik etkiden çok antiproliferatif etki ile kontrol seviyelerinde tuttuğu tespit edilmiştir. Bu aşamada verilen alfa lipoik asitin dokulara göre farklı etki kapasitesinin olmasının yanında antiapoptotik etkisiyle birlikte güçlü bir antiproliferatif etkisinin de olabileceğini göstermektedir. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında alfa lipoik asit ile usnik asitin kadmiyum toksikasyonuna karşı etki mekanizması ayrıntılı olarak bilinmese de Ca^{++} kanalları ile hücre içine giren kadmiyumu yapılarında bulunan hidroksil bağlarıyla bağlayarak kadmiyumu şelatladığı düşünülmektedir. Burada hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını Bcl-2 proteininin baskılanmasıyla engellerken Bax proteininin artması da hücreyi proliferasyondan çok apoptoza sürüklediği bilinmektedir. Çalışmamızda ise, ilk defa kadmiyum toksikasyonu sonucu gelişen apoptotik ve proliferatif etkiye karşı usnik asit ile alfa lipoik asitin karşılaştırmalı etkisi ortaya konularak, Bax/Bcl-2 proteinlerinde meydana gelen değişimler tespit edilmiştir. Elde etmiş olduğumuz verilere göre, alfa lipoik asitin kadmiyum toksikasyonuna maruz kalmış böbrek dokusunda Bcl-2 ve Bax protein miktarına, usnik asitten daha fazla azaltıcı etki gösterdiğini ve bu yönüyle böbrek dokusundaki hücreleri apoptoza uğrama eğiliminden koruduğunu; karaciğer dokusunda ise Bcl-2 protein miktarı üzerinde alfa lipoik asit ile usnik asitin benzer etki göstermelerinin yanında, alfa lipoik asitin usnik asite nazaran Bax protein miktarını kontrol seviyelerine çekerek karaciğer dokusunu antiapoptotik eğiliminden koruduğunu belirledik. Usnik asit ve alfa lipoik asitin, dokulara göre bu farklı etkilerinin, sahip oldukları farklı şelatlayıcı özelliklerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu bağlamda, oldukça etkili antiapoptotik ve antiproliferatif etkilerinin olduğu tespit edilen bu iki metal şelatörünün kadmiyum toksikasyonu ile

mücadelede önemli bir pozitif etkisinin olabileceğini ortaya koyarak, bilimsel literatüre katkı sağlamış olduk. Fakat, kadmiyum toksikasyonu üzerine alfalipoik asit ve usnik asitin etki mekanizmalarına yönelik yapılacak ileri çalışmaların bu mekanizmayı etkili bir şekilde aydınlatacağını düşünmekteyiz. Bu yönüyle çalışmamız, kadmiyum toksikasyonu sonucu artan apoptotik ve proliferatif süreçleri kontrol altına almaya yönelik, yapılacak yeni çalışmalara bir ön bilgi sağlamış olacaktır.



6. KAYNAKLAR

1. Adams JM ve Cory S: Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (1):61-66,2001.
2. Akşit H ve Bildik A: Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (1): 55-63, 2008.
3. Alkış İM: Türk Şaraplarında Ağır Metallerin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2011.
4. Almeida OFX, Condé GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AHS, Meyer M, Holsboer F, Michaelidis TM: Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *The FASEB Journal*, 14 (5): 779-790, 2000.
5. Altındag ZZ, Baydar T, Engin AB, Sahin G: Effects of the metals on dihydropteridine reductase activity. *Toxicology in Vitro*, 17 (5): 533-537, 2003.
6. Ameisen JC: The Origin of Programmed Cell Death. *Science*, 272 (5266): 1278-1279, 1996.
7. Anonim: MTA Genel Müdürlüğü, <http://www.mta.gov.tr/v3.0/bilgi-merkezi/kadmiyum>.Erişim tarihi: 11.06. 2019.
8. Anonim: T-Rex Green Tree Liken Kayıtlar, <https://tr.miscota.com/sueruengenler/t-rex/p-11245>. Erişim tarihi: 11.06.2019.
9. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC: Bax Is Present as a High Molecular Weight Oligomer/Complex in the Mitochondrial Membrane of Apoptotic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (15): 11615-11623, 2001.
10. Araújo AAS, de Melo MGD, Rabelo TK, Nunes PS, Santos SL, Serafini MR, Santos MRV, Quintans-Júnior LJ, Gelain DP: Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Natural Product Research*, 29 (23): 2167-2180, 2015.
11. Asri FÖ, Sönmez S, Çıtak S: Kadmiyumun çevre ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Derim*, 24 (1): 32-39, 2014.
12. Atvar Ö: İnsan endometriyal kanser hücrelerinde östrojenin konsantrasyona bağlı etkilerinin incelenmesi. İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2006.
13. Bačkor M. ve Loppi S: Interactions of lichens with heavy metals. *Biologia Plantarum*, 53 (2): 214-222, 2009.
14. Bačkorová M, Jendželovský R, Kello M, Bačkor M, Mikeš J, Fedoročko P: Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 26 (3): 462-468, 2012.
15. Baffy G, Miyashita T, Williamson JR, Reed JC: Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (9): 6511-6519, 1993.

16. Bakar C ve Alper B: Metaller ve İnsan Sağlığı: Yirminci Yüzyıldan Bugüne ve Geleceğe Miras Kalan Çevre Sağlığı Sorunu. 1.Tıbbi Jeoloji Çalıştayı, Nevşehir, 25, 2009.
17. Bellamy COC, Malcolmson RDG, Harrison DJ, Wyllie AH: Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminars in Cancer Biology*, 6 (1): 3-16, 1995.
18. Bergeron PM ve JumarieC: Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation. *Toxicology*, 219 (1): 156-166, 2006.
19. Biewenga GPh, Haenen GRMM, Bast A: The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29 (3): 315-331, 1997.
20. Boğa A: 2007. Ağır Metallerin Özellikleri ve Etki Yolları. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/arsiv/article/view/5000072664>. Erişim tarihi:17.01.2018.
21. Bosman FT, Visser BC, Van Oeveren J: Apoptosis: Pathophysiology of Programmed Cell Death. *Pathology - Research and Practice*, 192 (7): 676-683, 1996.
22. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR: Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *The EMBO Journal*, 17 (1): 37-49, 1998.
23. Brodo IM, Sharnoff SD, Sharnoff S: Lichens of north America. Yale University Press. 2001.
24. Budd RC: Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 109 (4): 437-442, 2002.
25. Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM: Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*, 9 (6): 377-384, 2009.
26. Cardarelli M, Serino G, Campanella L, Ercole P, De Cicco Nardone F, Alesiani O, Rossiello F: Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53 (8): 667-672, 1997.
27. Chen M ve Wang J: Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis*, 7 (4): 313-319, 2002.
28. Chen S, Liu G, Long M, Zou H, Cui H: Alpha lipoic acid attenuates cadmium-induced nephrotoxicity via the mitochondrial apoptotic pathways in rat. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 184, 19-26, 2018.
29. Cheng EH-Y, Levine B, Boise LH, Thompson CB, Hardwick JM: Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-X L. *Nature*, 379 (6565): 554, 1996.
30. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR: Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death and Differentiation*, 13 (8): 1396-1402, 2006.

31. Chresta CM, Masters JRW, Hickman JA: Hypersensitivity of Human Testicular Tumors to Etoposide-induced Apoptosis Is Associated with Functional p53 and a High Bax:Bcl-2 Ratio. *Cancer Research*, 56 (8): 1834-1841, 1996.
32. Cocchietto M, Skert N, Nimis P, Sava G: A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89 (4): 137-146, 2002.
33. Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 326 (1): 1-16,1997.
34. Correa JG ve Stoppani O: Catecholamines enhance dihydrolipoamide dehydrogenase inactivation by the copper Fenton system. Enzyme protection by copper chelators. *Free Radical Research*, 24 (4):311-322,1996.
35. Çoban ZD, Karaer T, Atmaca B, Demir HK, Güran Ş: Usnic Acid Uses Mitochondrial Apoptotic Pathway: It's Antitumoral Role. *Cumhuriyet Medical Journal*,39 (3): 2017.
36. Çolakoğlu N,Kükner A, Enver O: Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum Klorür'ün Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine Metallothionein'nin Etkileri. *Işık Mikroskopik Çalışma. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 24 (3): 201,2004.
37. Danial N, Korsmeyer N, Cell Death SJ: Critical Control Points. *Cell*, 116 (2): 205-219,2004.
38. Demirezen D. ve Aksoy A: Determination of Heavy Metals in Bee Honey Using by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). *Gazi University Journal of Science*, 18 (4): 569-575, 2005.
39. Derici MK, Cansaran Duman D, Taylan Özkan A: Usnic acid causes apoptotic-like death in *Leishmania major*, *L. infantum* and *L. tropica*. *3 Biotech*, 8 (9): 384. 2018
40. Doğan N: Park, Oyun ve Piknik Alanlarındaki Toprakların Yutulmasına Bağlı Olarak Ağır Metallerin Olası Alınımı ve Risk Karakterizasyonu. *Boğaziçi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2010.*
41. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X: Smac a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102 (1): 33-42, 2000.
42. Duksal F: Farklı kortikosteroidlerin yenidoğan ratlarda hipokampusta nöron kaybına ve beyin ağırlığına etkisi.<http://acikerisim.pau.edu.tr:8080/xmlui/handle/11499/2293>.Erişim tarihi: 25.04.2019, 2008.
43. Duruibe J, Ogwuegbu O, MOC, Egwurugwu JN: Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects. *International Journal of Physical Sciences*, 2 (5): 112-118, 2007.
44. Epand RF, Martinou, JC, Montessuit S, Epand RM, Yip C M: Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298 (5): 744-749, 2002.
45. Erdem T. ve Hatipoğlu F: Ratlarda Tek Doz Uygulanan Kadmiyum Toksikasyonunun Patolojisi ve Eş Zamanlı Uygulanan Klorpromazinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması. *Eurasian J Vet Sci*, 27 (1): 45-58, 2011.

46. Erlacher M, Michalak E, Kelly MPN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A: BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for γ -radiation and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*, 106 (13): 4131-4138, 2005.
47. Fernández-Moriano C, Gómez-Serranillos MP, Crespo A: Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharmaceutical Biology*, 54 (1): 1-17, 2016.
48. Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, Martinez OM, Krams SM: Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Liver*, 21 (4): 272-279, 2001.
49. Fox M: Nutritional influences on metal toxicity: cadmium as a model toxic element. *Environmental health perspectives*, 29, 95, 1979.
50. Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T, Nordberg GF: *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal; Volume 2: Effects and Response*. Boca Raton, Florida, CRC Press, Incorporated. 1986.
51. Galicka A, Brzóška MM, Sredzinska K, Gindzienski A: Effect of cadmium on collagen content and solubility in rat bone. *Acta Biochimica Polonica*, 51 (3): 825-829, 2004.
52. Gewirtz DA, Holt SE, Grant S: *Apoptosis, Senescence and Cancer*. Springer Science & Business Media. 2007.
53. Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, Poitout P: Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *The American Journal of Pathology*, 144 (6): 1195-1202, 1994.
54. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan C P, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman J. A: Cell Damage-induced Conformational Changes of the Proapoptotic Protein Bak In Vivo Precede the Onset of Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 144 (5): 903-914. 1999.
55. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 13 (15): 1899-1911, 1999.
56. Güley M, Vural N, Kürsüsü T: Genel Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 38. 1978.
57. Han D, Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Tritschler H J, Flohé L, Packer L: Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors*, 6 (3): 321-33, 1997.
58. Haraldsdóttir S, Guðlaugsdóttir E, Ingólfssdóttir K, Ögmundsdóttir HM: Anti-Proliferative Effects of Lichen-Derived Lipoxigenase Inhibitors on Twelve Human Cancer Cell Lines of Different Tissue Origin in vitro. *Planta Medica*, 70 (11): 1098-1100, 2004.
59. Hauck M ve Huneck S: Lichen Substances Affect Metal Adsorption in Hypogymnia physodes. *Journal of Chemical Ecology*, 33 (1): 219-223, 2006.

60. Henderso GS, Brown KA, Perkins SL, Abbott TM, Clayton F: bcl-2 is down-regulated in atypical endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology. Inc*, 9 (4): 430-438, 1996.
61. Hercan M: Çörek Otu (*Nigella Sativa L.*) ile Ağır Metallerin Uzaklaştırılması. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli, 2012.
62. Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348 (6299): 334, 1990.
63. Hu Y, Benedict MA, Ding L, Núñez G: Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *The EMBO Journal*, 18 (13): 3586-3595, 1999.
64. Ishido M, Ohtsubo R, Adachi T, Kunitomo M: Attenuation of both apoptotic and necrotic actions of cadmium by Bcl-2. *Environmental health perspectives*, 110 (1): 37, 2002.
65. İstanbulluoğlu H, Recai O, Tekbaş Ö F, Bakır B: Süt ve Süt Ürünlerinde Ağır Metal Kirliliği. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 33 (2): 410-419, 2013.
66. Jafarinejad-Farsangi S, Farazmand A, Mahmoudi M, Gharibdoost F, Karimizadeh E, Noorbakhsh F, Faridani H, Jamshidi AR: MicroRNA-29a induces apoptosis via increasing the Bax:Bcl-2 ratio in dermal fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity*, 48 (6): 369-378, 2015.
67. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew, BB, Beeregowda K.N: Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7 (2): 60-72, 2014.
68. Järup L: Cadmium overload and toxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17 (suppl_2): 35-39, 2002.
69. Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vanter M: Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 1-51, 1998.
70. Jerzak M. ve Bischof P: Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal–foetal interface and in the trophoblast remodelling. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 100 (2): 138-142, 2002
71. Johri N, Jacquillet G, Unwin R: Heavy Metal Poisoning: the Effects of Cadmium on the Kidney. *Biometals*, 23 (5): 783-792, 2010.
72. Jumarie C: Cadmium transport through type II alveolar cell monolayers, contribution of transcellular and paracellular pathways in the rat A11 and the human A549 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1564 (2): 487-499, 2002.
73. Jurczuk M1, Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Gałążyn-Sidorczuk M, Kulikowska-Karpińska E: Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver

- and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and chemical toxicology*, 42 (3): 429-438, 2004.
74. Kahveci Ö, Kartal G, Güven A: t.y Metallerin Çevresel Etkileri -I, 12.
 75. Kale J, Osterlund E J, Andrews D W: BCL-2 family proteins changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, 25 (1): 65-80. 2018.
 76. Kalinowska R, Bačkor M, Pawlik-Skowrońska B: Parietin in the tolerant lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. increases protection of *Trebouxia* photobionts from cadmium excess. *Ecological Indicators*, 58, 132-138, 2015.
 77. Kara H, Kürşad Daş, Y, Aksoy A: Veteriner Hekimliği Alanında Civa, Kurşun, Kadmiyum, Arsenik ve Bakır Toksikasyonları. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 2 (3): 30-7, 2016.
 78. Karaca EG: Lipoik asit: Evrensel antioksidan. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8 (1) :231-245, 2008.
 79. Karaca EG: Lipoik Asit: Evrensel Antioksidan. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8 (1): 231-245, 2015.
 80. Katoh K, Ikata T, Katoh S, Hamada Y, Nakauchi K., Sano T, Niwa M: Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neuroscience Letters*, 216 (1): 9-12, 1996.
 81. Keinan N, Tyomkin D, Shoshan-Barmatz V: Oligomerization of the Mitochondrial Protein Voltage-Dependent Anion Channel Is Coupled to the Induction of Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 30 (24): 5698-5709, 2010.
 82. Kim H, Kim KK, Hur JS: Anticancer Activity of Lichen Metabolites and Their Mechanisms at the Molecular Level. İçinde. Upreti, D. K., Divakar, P. K., Shukla, V, Bajpai,R., ed. *Recent Advances in Lichenology [çevrimiçi]*. New Delhi: Springer India, 201-208. 2015. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-2235-4_11 [Erişim 9 Haz 2019].
 83. Kim J. ve Soh J: Cadmium-induced apoptosis is mediated by the translocation of AIF to the nucleus in rat testes. *Toxicology Letters*, 188 (1): 45-51, 2009.
 84. Kim S, Cheon HS, Kim SY, Juhnn YS, Kim YY: Cadmium induces neuronal cell death through reactive oxygen species activated by GADD153. *BMC cell biology*, 14, 4, 2013.
 85. Kinoshita K.: Secondary metabolites from *Lethariella sernanderi*. *Lichenology*, 4, 7-11, 2005.
 86. Kjellström T: Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *IARC Scientific publications*, (118): 301-310, 1992.
 87. Korsmeyer SJ: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 80 (4): 879-886, 1992.
 88. Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, Tunali S: Influence of Combined Antioxidants Against Cadmium Induced Testicular Damage. *Environmental toxicology and pharmacology*, 21 (3): 235-240, 2006.

89. Kucharz EJ: Effect of cadmium intoxication on collagen and elastin content in tissues of the rat. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 40 (2): 273-279, 1988.
90. Leber AP ve Miya TS: A mechanism for cadmium-and zinc-induced tolerance to cadmium toxicity: Involvement of metallothionein. *Toxicology and applied pharmacology*, 37 (3): 403-414, 1976.
91. Lee YM, Bae SY, Won N H, Pyo H J, Kwon Y J: Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced tubulointerstitial injuries through inhibition of mitochondrial bax translocation in rats. *Nephron. Experimental Nephrology*, 113 (4): e104-112, 2009.
92. Lemarié A, Lagadic-Gossmann D, Morzadec C, Allain N, Fardel O, Vernhet L: Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (12): 1517-153, 2004.
93. Li, H, Zhu, H, Xu, C, Yuan J: Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, 94 (4): 491-501,1998.
94. Li M, Kondo T, Zhao, QL, Li, FJ, Tanabe K, Ara, Y, Zhou Z.C, Kasuya M: Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca²⁺-calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (50): 39702-39709, 2000.
95. Li, R, Zhou Y, Ji, J, Wang L: Oxidative damages by cadmium and the protective effects of low-molecular-weight chitosan in the freshwater crab (*Sinopotamon yangtsekiense* Bott 1967). *Aquaculture Research*, 42 (4): 506-515, 2011.
96. Li Y ve Lim S-C: Cadmium-induced apoptosis of hepatocytes is not associated with death receptor-related caspase-dependent pathways in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24 (3): 231-238, 2007.
97. Liang S, Sun K, Wang Y, Dong S, Wang C, Liu L, Wu Y: Role of Cyt-C/caspases-9,3, Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid. *Chemico-Biological Interactions*, 258, 40-51, 2016.
98. Lindsten T, Ross A J, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB: The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues. *Molecular Cell*, 6 (6): 1389-1399, 2000.
99. Marsden VS ve Strasser A: Control of Apoptosis in the Immune System. Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. *Annual Review of Immunology*, 21 (1): 71-105, 2003.
100. Mayer M, O'Neill MA, Murray KE, Santos-Magalhães NS, Carneiro-Leão AMA, Thompson AM, Appleyard VC: Usnic acid a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anti-cancer drugs*, 16 (8): 805-809. 2005.

101. McPherson R ve Brown K: The bioaccumulation of cadmium by the Blue Swimmer Crab *Portunus pelagicus* L. *Science of The Total Environment*, 279 (1): 223-230, 2001.
102. Messner B, Türkcan A, Ploner C, Laufer G, Bernhard D: Cadmium overkill: autophagy, apoptosis and necrosis signalling in endothelial cells exposed to cadmium. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73 (8): 1699-1713, 2016.
103. Milam SL: Kinetic folding studies of Apaf-1 Card And Procaspase-3. North Carolina State University Libraries. Available from: <http://europepmc.org/abstract/eth/3037> Erişim tarihi: 25.04.2019, 2008.
104. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Čomić L, Đačić D, Ćurčić M, Marković S: Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (8): 5428-5448, 2011.
105. Miyahara T, Miyakoshi M, Kozuka H: Inhibitory effect of cadmium on the mineralization of embryonic chick femurs in tissue culture. *Jpn J Public Health*, 27, 323-8, 1980.
106. Monaghan P, Robertson D, Amos T A, Dyer M J, Mason DY, Greaves MF: Bcl-2 proteininin yapısal yapısı. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40 (12): 1819-1825, 1992.
107. Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery P S, Wang L, Azad N, Lipipun V, Chanvorachote P, Rojanasakul Y: Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319 (3): 1062-1069, 2006.
108. Mukherjee R, Banerjee S, Joshi N, Singh PK., Baxi D, Ramachandran AV: A Combination of Melatonin and Alpha Lipoic Acid has Greater Cardioprotective Effect than Either of them Singly Against Cadmium-Induced Oxidative Damage. *Cardiovascular Toxicology*, 11 (1): 78-88. 2011.
109. Müller L. ve Menzel H: Studies on the efficacy of lipoate and dihydrolipoate in the alteration of cadmium²⁺ toxicity in isolated hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1052 (3): 386-391. 1990.
110. Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M: Changes in Endoplasmic Reticulum Luminal Environment Affect Cell Sensitivity to Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 150 (4): 731-740, 2000.
111. Nakatsuka H, Ohta S, Tanaka J, Toku K., Kumon Y, Maeda N, Sakanaka M, Sakaki S: Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Research*, 849 (1): 216-219, 1999.
112. Nardiello V, Fidalgo LE, López-Beceiro A, Bertero A, Martínez-Morcillo S, Míguez MP, Soler F, Caloni F, Pérez-López M: Metal content in the liver, kidney, and

- feathers of Northern gannets, *Morus bassanus*, sampled on the Spanish coast. *Environmental Science and Pollution Research* <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05356-y> Erişim tarihi: 26. 05.2019, 2019.
113. Narula J, Kharbanda S, Khaw BA: Apoptosis and the Heart. *Chest*, 112 (5): 1358-1362, 1997.
114. Navari-Izzo, F Quartacci, MF, Sgherri C, Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (6-8): 463-470, 2002.
115. Nighat S, Nadeem MS, Shah S I, Bhatti RZ, Akhter N, Mahmood T, Aihetasham A, Asif M, Javid A: Estimation Of Heavy Metals (Cd, Cu, Pb, Zn) From Six Species Of Vesper Bats. *Japs: Journal of Animal & Plant Sciences*, 29 (2): 619-624, 2019.
116. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C: Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103 (1): 59-65,2006.
117. Olszowski T, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Piotrowska K., Mierzejewska K., Korbecki J, Kurzawski M, Tarnowski M, Chlubek D: The Effects of Cadmium at Low Environmental Concentrations on THP-1 Macrophage Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (9): 21410-21427, 2015.
118. Oltvai Z N, Korsmeyer SJ: Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*, 79 (2): 189-192, 1994.
119. Orrenius S: Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters*, 149 (1-3): 19-23,2004.
120. Ott M, Gogvadze V, Orreniusb S, Zhivotovsky B: Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12 (5): 913-922, 2007.
121. Ou, P, Tritschler H J, Wolff SP: Thiocctic (lipoic) acid a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochemical Pharmacology*, 50 (1): 123-126, 1995.
122. Ozenoglu S, Aydogdu G, Dincsoy AB, Taghidizaj AA, Derici K., Yilmaz E., Aras S, Cansaran - Duman D: Evaluation of the impact on different types of human cancer cell of lichen secondary compounds. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 70 (4):215-226, 2013.
123. Özbolat G ve Tuli A: Ağır Metal Toksisitesinin İnsan Sağlığına Etkileri. <http://dergipark.gov.tr/aktd/issue/23783/253562> Erişim tarihi:17.04.2017, 2016.
124. Özdemir D, Çakır B, Ersoy R: Ağır Metallerin Endokrin Organlarda Birikimi ve Hormonlar Üzerindeki Etkileri. *Journal of Dialog in Endocrinology/Endokrinolide Diyalog Dergisi*, 9 (3): 2012.
125. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ: Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 19 (2): 227-250, 1995.
126. Palmer RJ, Butenhoff JL, Stevens JB: Cytotoxicity of the rare earth metals cerium, lanthanum, and neodymium in vitro: comparisons with cadmium in a

- pulmonary macrophage primary culture system. *Environmental research*, 43 (1): 142-156,1987.
127. Pathak N, Mitra S, Khandelwal S: Cadmium Induces Thymocyte Apoptosis via Caspase-Dependent and Caspase-Independent Pathways. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27 (3): 193-203, 2013.
 128. Pavlovic V, Stojanovic I, Jadraninm M, Vajs V, Djordjević I, Smelcerovic A, Stojanovic G: Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 160-164, 2013.
 129. Pulido MD ve Parrish AR: Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533 (1): 227-241, 2003.
 130. Rafati Rahimzadeh M, Rafati Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia A: Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 8 (3): 135-145,2017.
 131. Raghuvanshi R, Chaudhari A, Kumar GN: Amelioration of Cadmium Mercury-Induced Liver and Kidney Damage in Rats by Genetically Engineered Probiotic *Escherichia Coli* Nissle 1917 Producing Pyrroloquinoline Quinone With Oral Supplementation of Citric Acid. *Nutrition*, 32 (11-12):1285-1294, 2016.
 132. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Orfanos CE., Geilen C C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT : The Bax/Bcl-2 Ratio Determines the Susceptibility of Human Melanoma Cells to CD95/Fas-Mediated Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 117 (2): 333-340, 2001
 133. Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M: Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicita review. *International Journal of Environmental Health Research*, 24 (4): 378-399, 2014.
 134. Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson C B.: Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nature Immunology*, 3, 932, 2002
 135. Ren MR, Hur JS, Kim JY, Park KW, Park SC , Seong CN , Jeong IY, Byun MW, Lee MK., Seo K.I: Anti-proliferative effects of *Lethariella zahlbruckneri* extracts in human HT-29 human colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (9): 2157-2162, 2009.
 136. Renehan AG, Booth C, Potten CS: What is apoptosis, and why is it important? Education and debate. *BMJ*, 322 (7301): 1536-1538, 2001.
 137. Richardson ME, Fox MS, Fry Jr BE: Pathological changes produced in Japanese quail by ingestion of cadmium. *The Journal of nutrition*, 104 (3): 323-338, 1974.
 138. Roy P ve Saha A: Metabolism and Toxicity of Arsenic: A Human Carcinogen. *Current Science*, 82 (1): 38-45, 2002
 139. Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V, Papathanasopoulos P, Bonikos D S, Papapetropoulos T, Petsas T. Dougeni D :

- Increased Bax/Bcl-2 Ratio Up-regulates Caspase-3 Increases Apoptosis in the Thymus of Patients with Myasthenia Gravis. *In Vivo*, 21 (1): 123-132, 2007.
140. Sancho P, Fernández C, Yuste VJ, Amrán D, Ramos, A M, Blas E, Susin SA, Aller P: Regulation of apoptosis/necrosis execution in cadmium-treated human promonocytic cells under different forms of oxidative stress. *Apoptosis*, 11 (5): 673-686, 2006.
141. Sarkar A, Ravindran G, Krishnamurthy V: A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *International Journal of Bio-Technology and Research (IJBTR)*, 3 (1):17-36, 2013.
142. Sarvothaman S, Undi RB, Pasupuleti SR, Gutti U, Gutti RK: Apoptosis: role in myeloid cell development. *Blood Research*, 50 (2): 73,2015.
143. Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-Elkins M, Reilly P E, Williams DJ, Moore MR: A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology letters*, 137 (1-2): 65-8, 2003.
144. Savitskaya MA, Onishchenko GE: Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 80 (11): 1393-1405 2015.
145. Scheuhammer AM: The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds a review. *Environmental Pollution*, 46 (4): 263-295, 1987.
146. Sevgiler Y, Karaytug S, Karayakar F: Antioxidative Effects of N-acetylcysteine, Lipoic Acid, Taurine, and Curcumin in the Muscle of *Cyprinus carpio* L. Exposed to Cadmium. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 62 (1): 1-9, 2011.
147. Shih CM, Ko WC, Wu JS, Wei YH, Wang LF, Chang EE, Lo TY, Cheng HH, Chen CT: Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria-ROS pathway in MRC-5 fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 91 (2): 384-397,2004.
148. Shtro A A, ZarubaeV VV, Luzina OA, Sokolov DN, Kiselev O I, Salakhutdinov NF: Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22 (24): 6826-6836. 2014.
149. Sıbiç L: Giresun İlinde Farklı Bölgelerden Toplanan Tavuk Yumurtalarındaki Bazı Ağır Metaller ve Selenyum Düzeyleri. Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi Giresun, 2014.
150. Singh N, Nambiar D, Kale RK, Singh RP: Usnic Acid Inhibits Growth and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma A549 Cells. *Nutrition and Cancer*, 65 (sup1): 36-43, 2013.
151. Sokolov DN, ZarubaeV VV, Shtro AA, Polovinka MP, Luzina OA, Komarova NI, Salakhutdinov NF, Kiselev OI: Antiviral activity of (-)- and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22 (23): 7060-7064, 2012.

152. Song Y, Dai F, Zhai D, Dong Y, Zhang J, Lu B, Luo J, Liu M, Yi Z: Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis*, 15 (3): 421-432, 2012.
153. Stohs SJ, Bagchi D: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology and medicine*, 18 (2): 321-336, 1995.
154. Su Z, Yang, Z, Xu Y, Che Y, Yu Q: Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14 (1): 48, 2015.
155. Şekerli M, Kılıç N, Cansaran Duman D: The Molecular Mechanisms of the effect of anticancer activity on lichen metabolites. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 74 (1): 95-102, 2017.
156. Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, Duffy SRG: The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *BJOG: An International Journal of Obstetrics Gynaecology*, 110 (9): 794-798, 2003.
157. Tchounwou PB, Yedjou C G, Patlolla AK., Sutton DJ: Heavy Metal Toxicity and the Environment. İçinde: Luch, A., ed. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology Volume 3: Environmental Toxicology* Basel: Springer Basel, 133-164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6 Erişim tarihi: 26 .05. 2019,2012.
158. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267 (5203): 1456-1462, 1995.
159. Topcuoglu S, Kirbasoglu Ç, Balkis N: Heavy Metal Concentrations in Marine Algae From the Turkish Coast of the, Black Sea, During 1979-2001. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 10 (1): 2004.
160. Tsuruoka S, Sugimoto K, Muto S, Nomiya K., Fujimura A, Imai M.: Acute Effect of Cadmium-Metallothionein on Glucose and Amino Acid Transport across the Apical Membrane of the Rabbit Proximal Tubule Perfused In Vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292 (2): 769-777, 2000.
161. Tucer D: Gıda Zehirlenmeleri ve Toksik Hepatit, 19 (3): 188-196, 2015.
162. Tutel B: Liken biyolojisi ve faydaları. 1986.
163. Üçüncü Tunca E: Doğal Su Sistemlerinde Ağır Metallerin Lemna Minor l. Tarafından Biyoremediasyonu ve Belirlenen Ağır Metaller ile Seçilen Nanopartikülün (enp) l.Minor Üzerindeki Toksik Etkilerinin Karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, ANKARA, 2014.
164. Vartia K. O: Chapter 17 - ANTIBIOTICS IN LICHENS. İçinde: Ahmadjian, V. ve Hale, M. E., ed. *The Lichens*. Academic Press, 547-561. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120449507500222> [Erişim 9 Haz 2019].
165. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., ve Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192 (2-3), 95-117. 1973
166. Wei MC, Zong WX, Cheng, E HY, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ: Proapoptotic BAX and

- BAK A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*, 292 (5517: 727-730, 2001.
167. Wei W, Wang H, Wu Y, Ding K, Li T, Cong Z, Xu J, Zhou M, Huang L, Ding H, Wu, H: Alpha lipoic acid inhibits neural apoptosis via a mitochondrial pathway in rats following traumatic brain injury. *Neurochemistry International*, 87, 85-91, 2015.
168. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck, RM: Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*, 1813 (4): 521-531, 2011.
169. Willis SN, Adams JM: Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 17 (6): 617-625, 2005.
170. Winge DR, Premakumar R, Rajagopalan KV: Studies on the zinc content of Cd-induced thionein. *Archives of biochemistry and biophysics*, 188 (2): 466-475, 1978.
171. Wolter KG, Hsu YT, Smith C L, Nechushtan, A Xi, XG Youle RJ: Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 139 (5): 1281-1292,1997.
172. Wyllie A: Cell injury and death. *Oxford Textbook of Pathology* <https://ci.nii.ac.jp/naid/10019539313> Erişim tarihi: 25.04. 2019. 1992.
173. Xu M, Heidmarsson S, Olafsdottir ES, Buonfiglio R, Kogej T, Omarsdottir S: Secondary metabolites from cetrarioid lichens. *Chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential. Phytomedicine*, 23 (5): 441-459, 2016.
174. Yarsa E, Bilgili A, Türel: Van Gölü'nden Toplanan Midye (*Unio Stevenianus Krynicky*) Örneklerindeki Ağır Metal Düzeyleri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 24, 93-96, 2000.
175. Ye JL, Mao WP, Wu AL, Zhang NN, Zhang C, Yu YJ, Zhou L, Wei C: Cadmium-induced apoptosis in human normal liver L-02 cells by acting on mitochondria and regulating Ca²⁺ signals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24 (1): 45-54, 2007.
176. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ: BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 369 (6478): 321, 1994
177. Yücel DG ve Özyiğitoğlu G: *Ramalina calicaris* (L.) Fr. Liken Türünün Antibakteriyel ve Antioksidan Aktivitesi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 30 (3): 269-275.
178. Yürük A, Ayaz A: Alfa Lipoik asidin sağlık üzerine etkileri. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 1 (1): 11-23, 2014.
179. Zalups RK. ve Ahmad S: Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186 (3): 163-188, 2003.
180. Zhang W: Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: an Overview. *Journal of nanoparticle Research*, 5 (3): 323-33, 2003.

ÖZGEÇMİŞ

KİMLİK ve İLETİŞİM BİLGİLERİ

Doğum Yılı	: 01.01.1990
Doğum Yeri	: Mersin/Silifke
Yazışma Adresi	: Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Paşaçayırı/KARS
Telefon	: 05375139642
e-posta	: sefa18ak@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2008-2012	- Lisans	Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
2012-2019	- Yüksek Lisans	Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı