

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KADMIYUM UYGULANAN FARELERDE OLUŞTURULAN
OKSİDATİF STRESE KARŞI RESVERATROLÜN KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Canan IŞIK BİRCAN

Danışman
Doç. Dr. Oğuz MERHAN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KARS-2019

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KADMİYUM UYGULANAN FARELERDE OLUŞTURULAN
OKSİDATİF STRESE KARŞI RESVERATROLÜN KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Canan IŞIK BİRCAN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Oğuz MERHAN

Bu Çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından Desteklenmiştir. Proje
No: 2016-TS-33

KARS-2019

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Canan IŞIK BİRCAN tarafından hazırlanmış olan “*Kadmiyum Uygulanan Farelerde Oluşturulan Oksidatif Strese Karşı Resveratrolün Koruyucu Etkisinin Araştırılması*” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy *birliği*..... ile *kabul*... edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19.06.2019

Adı Soyadı:

İmza

Başkan: Prof. Dr. Emine ATAKİŞİ

Üye: Doç. Dr. Oğuz MERHAN

Üye: Doç. Dr. Hacı Ahmet DEVECİ

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

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

ÖNSÖZ

Kadmiyum ve diğer ağır metaller hem çevresel hem de mesleki maruziyetlerle insan sağlığını tehdit etmektedir. Kadmiyum, yiyecekler ve su gibi doğal kaynaklara karışmakta ve bu yolla da besin zincirine girebilmektedir. Kadmiyum, yarı ömrünün uzun olması ve hemen hemen tüm sistemlere toksik etki gösterebilmesi sebebiyle ayrı bir öneme sahiptir. İnsan yaşamını etkileyen önemli kadmiyum kaynakları; sigara dumanı, rafine edilmiş yiyecek maddeleri, su boruları, kahve, çay, kömür yakılması, kabuklu deniz ürünleri, kullanılan gübreler ve endüstriyel üretim aşamalarında oluşan baca gazlarıdır. Kadmiyumun karsinojenik etkisinin yanı sıra, hem akut hem de kronik maruziyetiyle birçok organda hasara neden olduğu gösterilmiştir. Akut kadmiyum zehirlenmesinde, kadmiyumun dolaylı olarak reaktif oksijen türleri ve radikallerin üretimine neden olduğu düşünülmektedir. Oksidan düzeyini arttıran etmenlere karşı hücrenin yaşamını sürdürebilmesi, organizmanın serbest radikallerden koruyucu biyokimyasal savunma mekanizmalarına sahip olmasına bağlıdır. Aslında organizmamız endojen antioksidan enzimler sayesinde kendi kendini koruyabilmektedir. Ancak bu bazı durumlarda yeterli olmamaktadır. Bu nedenle organizmanın dışarıdan antioksidan özelliği olan kimyasalları içeren besin maddeleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Güçlü bir antioksidan olan resveratrol, üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yaprağı, keçi kulağı ve yabanmersininde bulunan doğal polifenolik bir bileşik olup oksidatif strese bağlı olarak oluşan hücresel hasarları ve apoptozu önleyerek süperoksit anyonlarını ve hidrojen peroksiti hücreden uzaklaştırmada oldukça güçlü bir etkiye sahiptir. Bu bilgiler ışığında resveratrolün, toksik bir madde olan kadmiyumun meydana getirdiği zararlı etkilere karşı koruyucu etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, güleryüzü ile bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşan, çalışmama ışık tutan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Oğuz MERHAN'a, desteklerini esirgemeyen değerli kürsü hocalarım Prof. Dr. Şaban MARAŞLI, Prof. Dr. Ayla ÖZCAN, Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN ve Prof. Dr. Emine ATAKİŞİ'ye, aldığım eğitim süresince gerek derslerde, gerekse ders dışında deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Doç. Dr. Metin ÖĞÜN ve Arş. Gör. Dr. Abdulsamed KÜKÜRT'e,

III

laboratuvar çalışmaları sırasındaki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Dinçer ERDAĞ'a, tezimin hazırlanması sırasında beni cesaretlendiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen fedakâr eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekil Dizini	VIII
Grafik Dizini	IX
Tablolar Dizini	X
Özet	XI
Summary	XII
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kadmiyum	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
2.1.2. Çevrede Kadmiyum ve Maruziyet Kaynakları	4
2.1.3. Metabolizması ve Fizyolojik Etkileri	5
2.1.4. Kadmiyum ve Oksidatif Stres	6
2.2. Serbest Radikaller	7
2.3. Antioksidanlar	8
2.4. Resveratrol	9
2.4.1. Resveratrolün Farmalojik Özellikleri	12
2.4.2. Resveratrolün Biyolojik Aktiviteleri	12
2.5. Siyalik Asit	18
2.5.1. Yapısı	19
2.5.2. Metabolizması	20
3.MATERYAL ve METOT	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Kan ile Doku Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi	22
3.2. Metot	23
3.2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler	23
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.2.3. Doku Homojenizasyonu için Kullanılan Tampon Çözelti	24
3.3. Biyokimyasal Analizler	24
3.3.1. Malondialdehit Tayini	24

3.3.1.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler	24
3.3.1.2. Deneyin Yapılışı	25
3.3.1.3. Sonuçların Hesaplanması	25
3.3.2. Nitrik Oksit Tayini	26
3.3.2.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler	26
3.3.2.2. Numunelerin Deproteinize Edilmesi	27
3.3.2.3. Nitrat Analizinin Yapılışı	27
3.3.2.4. Nitrit Analizinin Yapılışı	28
3.3.2.5. Sonuçların Hesaplanması	28
3.3.3. Glutasyon Tayini	29
3.3.3.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler	29
3.3.3.2. Deneyin Yapılışı	29
3.3.3.3. Sonuçların Hesaplanması	30
3.3.4. Total Siyalik Asit Tayini	31
3.3.4.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler	31
3.3.4.2. Deneyin Yapılışı	31
3.3.4.3. Sonuçların Hesaplanması	32
3.4. İstatiksel Analiz	33
4.BULGULAR	34
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	40
6.KAYNAKLAR	45
7.ÖZGEÇMİŞ	56

Simgeler ve Kısaltmalar

Cd: Kadmiyum

CdCl₂: Kadmiyum Klorür

CdO: Kadmiyum Oksit

DMT1: Divalent Metal Taşıyıcı Protein

O₂: Oksijen

OH: Hidroksil

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

RNT: Reaktif Nitrojen Türleri

NO: Nitrik Oksit

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotit

FMN: Flavin Mononükleotit

FAD: Flavin Adenin Dinükleotit

STS: Stilben Sentez

LDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein

PC12: Fare Adrenal Feokromositoma Hücreleri

VLDL: Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler

TNF- α : Tümör Nekrozis α -Faktör

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1

AMP: Adenozin Monofosfat

PGC-1 α : Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1

SIRT-1: Sirtuin

LPS: Lipopolisakkarit

IL-1 β : İnterlökin -1 Beta

IL-6: İnterlökin-6

PMN: Polimorfonükleer Lökositler

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi

MDA: Malondialdehit

GSH: Redükte Glutatyon

TSA: Total Sialik Asit

AST: Aspartat Aminotransferaz

ALT: Alanin Aminotransferaz

GGT: Gamma-Glutamil Transferaz

TBA: Tiyobarbütirik Asit

TCAA: Triklorasetik Asit

HCl: Hidroklorik Asit

NEDD: Naftil Etilen Diaminedihidroklörür

NaNO₂: Sodyum Nitrit

NaCl: Sodyum Klorür

SH: Sülfidril

CMP: Sitidin Monofosfat

CTP: Sitidin Trifosfat

NANA: N-Asetil Nöraminik Asit

Şekiller Dizini

Şekil 1. Kadmiyumun vücuttaki dağılımı	6
Şekil 2. Kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres	6
Şekil 3. Resveratrolün yapısı	10
Şekil 4. Resveratrolün etkili olduğu durumlar	13
Şekil 5. Neu5Ac (NANA) ve Neu5Ac2en'in kimyasal yapıları	19
Şekil 6. Siyalik asidin intrasellüler metabolizması	21
Şekil 7. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusundaki MDA miktarındaki değişimler	36
Şekil 8. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusundaki GSH miktarındaki değişimler	37
Şekil 9. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusundaki NO miktarındaki değişimler	37
Şekil 10. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusundaki TSA miktarındaki değişimler	38
Şekil 11. Plazma AST ve ALT enzim aktivitelerindeki değişimler	38
Şekil 12. Plazma GGT enzim aktivitesindeki değişimler	39

Grafik Dizini

Grafik 1. MDA düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi	25
Grafik 2. Nitrat düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi	27
Grafik 3. Nitrit düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi	28
Grafik 4. GSH düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi	30
Grafik 5. TSA düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi	32

Tablolar Dizini

Tablo 1. Kadmiyum metali ile ilgili genel bilgiler	3
Tablo 2. Resveratrolün temel biyolojik aktiviteleri	15
Tablo 3. MDA ölçüm yöntemi	25
Tablo 4. Nitrat ölçüm yöntemi	27
Tablo 5. Nitrit ölçüm yöntemi	28
Tablo 6 GSH ölçüm yöntemi	30
Tablo 7. TSA ölçüm yöntemi	32
Tablo 8. MDA, GSH, NO ve TSA karaciğer doku düzeyleri	34
Tablo 9. MDA, GSH, NO ve TSA böbrek doku düzeyleri	35
Tablo 10. MDA, GSH, NO ve TSA kalp doku düzeyleri	35
Tablo 11. AST, ALT ve GGT plazma enzim aktiviteleri	36

ÖZET

**Kadmiyum Uygulanan Farelerde Oluşturulan Oksidatif Strese Karşı
Resveratrolün Koruyucu Etkisinin Araştırılması**

Kadmiyum ve diğer ağır metaller hem çevresel hem de mesleki maruziyetlerle insan sağlığını tehdit etmekte ve sanayide yaygın olarak kullanılmaktadır. Resveratrol anti-inflamatuvar, antioksidan, antitümör ve immunomodulator özellikleri olan doğal bir polifenolik bileşiktir. Bu nedenle yapılan çalışmada Swiss albino farelerin plazma, karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda kadmiyum toksisitesine karşı resveratrolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda 35 fare eşit olarak 5 gruba ayrılmıştır. Grup 1: Kontrol grubu (kadmiyuma maruz kalmamış normal *ad libitum* beslenen grup), Grup II: Alkol grubu (% 1 etil alkol) Grup III: Kadmiyum ($CdCl_2$, 1 mg/kg/gün), Grup IV: Resveratrol (10 mg/kg/gün, %1'lik etil alkolde çözündü), Grup V: Kadmiyum+Resveratrol (1 mg/kg/gün + 10 mg/kg/gün). Tüm uygulamalar 21 gün süreyle oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. Uygulama süresi sonunda karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda oksidatif stresin göstergesi olarak malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) miktarları, antioksidan savunmanın biyobelirteci olarak redükte glutatyon (GSH) miktarı, akut faz yanıtın bir göstergesi olan total siyalik asit (TSA) ve plazmada aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), gamma-glutamil transferaz (GGT) enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Kadmiyum verilen grupta MDA, NO, TSA düzeyi ve AST, ALT, GGT enzim aktivitesi karaciğer, böbrek ve kalpte kontrole göre önemli derecede artarken, GSH düzeyi ise kontrole göre önemli derecede azalmıştır. Kadmiyum+resveratrol verilen grupta ise MDA, NO, TSA düzeyi ve AST, ALT, GGT enzim aktivite düzeylerinin kadmiyum verilen gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede azalırken, GSH düzeyi ise önemli derecede artmıştır. Sonuç olarak kadmiyumun toksik etkisine karşı resveratrolün karaciğer, böbrek ve kalpte koruyucu etkisinin olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, Oksidatif Stres, Resveratrol, Siyalik Asit

SUMMARY

The Investigation of the Protective Effect of Resveratrol on Oxidative Stress Levels in Mice Given Cadmium

Cadmium and other heavy metals which are commonly used in industry could threaten human health with both environmental and occupational exposures. Resveratrol, a natural polyphenol, is thought to have some properties such as anti-inflammatory, antioxidant, antitumor and immunomodulatory. Therefore, the present study was designed to examine the protective effect of resveratrol against cadmium toxicity in plasma, liver, kidney and heart tissue of Swiss albino mice. In our study, thirty five mice were equally divided into five groups, namely Groups I-V. Group I: Control group (a normal feeding ad libitum group that has not been exposed to cadmium), Group II: Alcohol group (1 % ethyl alcohol), Group III: Cadmium (CdCl_2 , 1 mg/kg/day), Group IV: Resveratrol (10 mg/kg/day, dissolved in 1 % ethyl alcohol), Group V: Cadmium+Resveratrol (1 mg/kg/day + 10 mg/kg/day). All treatments were administered orally via gavage for 21 days. The amount of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) as an indicator of oxidative stress in liver, kidney, and heart tissue at the end of the application period, the amount of reduced glutathione (GSH) as a biomarker of antioxidant defense, total sialic acid (TSA) as an indicator of acute phase response and aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transferase (GGT) enzyme activities in plasma were determined by spectrophotometric methods. In cadmium group, it was determined that MDA, NO, TSA level and AST, ALT, GGT enzyme activities increased significantly compared to control in the liver, kidney, and heart, while GSH level decreased significantly compared to control. In cadmium+resveratrol group, it was determined that MDA, NO, TSA level and AST, ALT, GGT enzyme activity levels decreased, while GSH level increased statistically significantly compared to cadmium groups. As a result, it was concluded that resveratrol may have a protective effect on the liver, kidney and heart against the toxic effect of cadmium.

Keywords: Cadmium, Oxidative Stress, Resveratrol, Sialic Acid

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Yer kabuğunun doğal bir elementi olan kadmiyum madencilik ve endüstriyel faaliyetler esnasında çevreye yüksek emisyon düzeyinde yayıldığından insan sağlığını tehdit eden önemli bir çevresel kirletici olarak değerlendirilmektedir (Akesson ve ark. 2014). Kadmiyumun insanlarda çeşitli organ kayıpları ve kanseri tetiklediği bilinmektedir. İnsanlar beslenme yoluyla günlük yaklaşık olarak 30 µg kadmiyum alımına maruz kalmakta iken sigara kullananlarda bu durum sigara başına 2 µg olacak şekilde artış göstermektedir (Mannino ve ark. 2004). İnsanlar tarafından alınan kadmiyum vücuttan etkin bir şekilde uzaklaştırılmaz ve kadmiyumun biyolojik yarılanma ömrü 10-30 yıl kadardır. Bu nedenle beslenme yoluyla düşük dozlarda kronik kadmiyum maruziyeti farklı dokularda kadmiyum birikimi ile sonuçlanır. Kadmiyum akciğer, karaciğer, böbrek, hematopoetik doku ve diğer organ sistemlerini etkileyen karsinojen olarak sınıflandırılmaktadır (ATSDR, 2012). Vücuda alınan kadmiyumun büyük bir kısmı karaciğer ve böbreklerde birikmektedir (Kim ve ark. 2013).

Kadmiyumla indüklenen doku hasarları ve hücre ölümlerinin sistemik enflamasyon ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile indüklenen oksidatif stresle ilişkili olabileceği bildirilmektedir. Akut ve kronik kadmiyum maruziyeti sadece reaktif oksijen türleri üretimini arttırmayıp aynı zamanda antioksidan düzeylerinde de azalmaya neden olarak oksidan/antioksidan dengesini bozmaktadır. Yapılan çalışmalarda kadmiyum kaynaklı reaktif oksijen türleri üretiminin hem zaman hem de konsantrasyona bağlı olduğu aynı zamanda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzimlerin yanı sıra antioksidan savunmada önemli rolü olan glutatyon miktarının azalmasını da etkilediği belirtilmiştir (El-Ebiary ve ark. 2016).

Doğal ürünlerin büyük bir bölümü, hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki olası klinik özellikleri açısından araştırılmaktadır. Fitoaleksin olarak bilinen bitki antibiyotiklerini içeren ve güçlü antifungal özellikli olan polimerler (viniferinler) familyası bu doğal ürünler arasındadır. Bu grubun en etkili üyesi olan resveratrol, asma bitkisi de dâhil birçok bitki tarafından travmatik zedelenme, UV ışığına

maruziyet ya da fungal infeksiyona (*Botrytis cinerea*) karşı yanıt olarak sentezlenen bir fitoaleksindir (Pervaiz 2004).

Resveratrol kırmızı meyvelerde bulunan doğal polifenolik bir bileşiktir. Son yıllarda antioksidan, antiproliferatif ve anti-inflamator özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Resveratrolün kardiovasküler hastalıklar, yaşlanma, metabolik hastalıklar ve kansere karşı koruyucu etkileri daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Beijers ve ark. 2018). Resveratrolün en iyi bilinen özelliği reaktif oksijen türleri gibi serbest radikalleri unreaktif bileşiklere dönüştüren antioksidan özelliğidir (Yousef ve ark. 2017).

Buna yönelik olarak bu çalışmada resveratrolün, toksik bir madde olan kadmiyumun meydana getirdiği zararlı etkilerine karşı karaciğer, böbrek ve kalpte olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kadmiyum

1817 yılında Almanya'da Friedrich Stromeyer tarafından keşfedilen kadmiyum, yeryüzünde oldukça nadir olarak bulunmaktadır. Kadmiyum çinko benzeri bir geçiş elementi olup, yumuşak ve gümüş beyazı rengindedir. Periyodik tabloda çinkonun altında civanın ise üzerinde yer alan kadmiyum, bu iki elementle birçok ortak özelliğe sahiptir. Doğada 0 ve +2 değerlikli olmak üzere iki oksidasyon seviyesinde bulunabilmesine karşın; 0 ve metalik hali oldukça nadir görülür (Kahvecioğlu ve ark. 2003).

Günümüzde çeşitli endüstri kollarındaki gelişmeler, modern tekniklere dayalı tarımın yaygınlaşması ve kentleşme sonucu kadmiyum ve benzeri ağır metallerin çevredeki derişimi artış göstermiştir. Bu metalin çok düşük ortam değişimleri bile canlılar üzerinde toksik etki yaptığından, besin zincirinin çeşitli basamaklarındaki dağılımını belirlemek büyük önem taşımaktadır. Kadmiyumun düşük değişimleri duyarlı canlı türlerinde üremenin durmasına, gelişimin yavaşlamasına ve mortaliteye neden olabilmektedirler (Kalay ve Karataş, 1999).

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kadmiyum periyodik tablonun 2B grubunda bulunan, atom numarası 48, atom ağırlığı 112,411 g/mol ve Cd sembolü ile ifade edilen bir elementtir. Bükülüp şekil verilen, mavimsi beyaz renklere sahip ve nadir bulunan bir geçiş metalidir. (Meija ve ark. 2016).

Tablo 1. Kadmiyum metali ile ilgili genel bilgiler (Meija ve ark. 2016).

Sembol	Kadmiyum
Atom numarası	48
Atom ağırlığı	112.411 g/mol
Element serisi	Metaller
Maddenin hali	Katı
Yoğunluk	7.86 g/cm ³
Sıvı haldeki yoğunluk	6.98 g/cm ³
Atom yarıçapı	140 pm
Kaynama noktası	2861 °C
Buharlaşma ısısı	762.5 kJ/mol
Kristal yapısı	Hacim merkezli kübik
Yükseltgenme seviyeleri	2, 3, 4, 6
Görünüş	Metalik gri

Kimyasal olarak çinko ve kalsiyuma benzerlik gösterir. Toksikolojik yönden problem yaratabileceği düşünülmeyen kadmiyum, sanayi sektöründeki kullanımının artması neticesinde kurşun ve civa gibi ekotoksikolojik olarak önem kazanmıştır (Conti ve Cecchetti 2003). Geniş bir yelpazede yayılım gösteren kadmiyum çevresel bir kirlenici olup farklı organlardaki toksisitesi ile karakterize olan bir metaldir (Gunnarson ve ark. 2003). Endüstriyel kirlenme ile doğaya karıştıktan sonra çeşitli yollarla insan bünyesine giren kadmiyum çeşitli kanserler başta olmak üzere, boşaltım sistemi, sindirim sistemi hastalıklarına sebebiyet verebilmektedir. Sigara bağımlılarının kanında içmeyenlere nazaran 4-5 kat fazla, böbreklerinde ise 2-3 kat fazla kadmiyum birikebilmektedir (Mudgal ve ark. 2010).

2.1.2. Çevrede Kadmiyum ve Maruziyet Kaynakları

Günümüzde kadmiyum da çevre kirliliğine sebep olan ağır metaller arasında yerini almıştır. Kadmiyum çevremize üç temel yol ile girer: (i) kadmiyumun rafine edilmesi ve kullanımı esnasında, (ii) çinko, bakır, nikel çıkartılması ve eritilmesinde (iii) yakıtların yanmaları sonucunda.

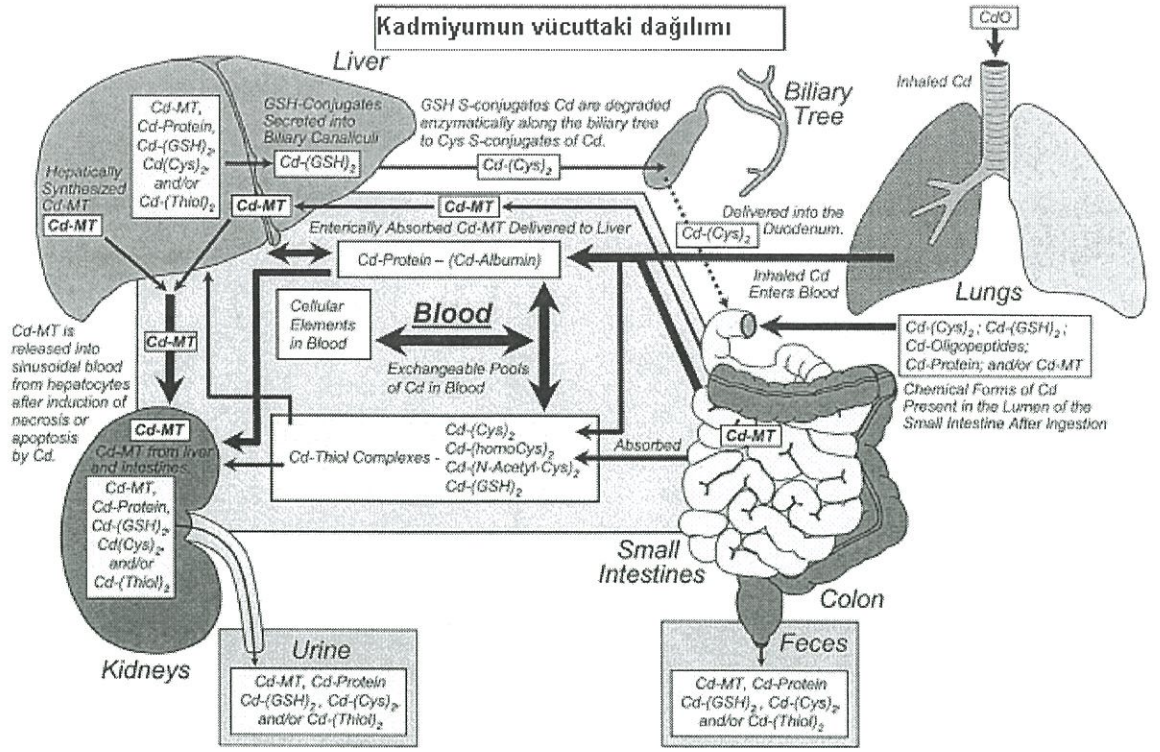
Günümüzde kadmiyum endüstriyel olarak nikel/kadmiyum pillerin, korozyona karşı özellikle deniz koşullarına dayanımı nedeniyle gemi sanayinde, çeliklerin kaplanmasında, boya sanayinde PVC stabilizatörü olarak, alaşımlarda ve elektronik sanayinde kullanılır. Kadmiyum safsızlık maddesi olarak fosfatlı gübrelerde, deterjanlarda ve rafine petrol türevlerinde bulunur ve bunların çok yaygın kullanımı sonucunda da önemli miktarda kadmiyum kirliliği ortaya çıkar. Bunun yanı sıra kadmiyum orman yangınları, rüzgârların getirdiği toprak parçacıkları ve volkanik patlamalarla atmosfere doğal yollardan da karışır. Ancak doğal olmayan yollardan dünya atmosferine yani çevremize karışan kadmiyum miktarı doğal olanın 3-10 katıdır. Birikebilen zehirli madde özelliği taşıyan kadmiyum, insan sağlığına belirgin potansiyel tehlikesi olan 25 zararlı madde arasında da bulunmaktadır. Kadmiyumun yıllık doğaya salınım miktarı 25.000-30.000 tondur ve bunun 4.000-13.000 tonu insan faaliyetlerine bağlı olarak ortaya çıkar. İnsan yaşamını etkileyen önemli kadmiyum kaynakları; sigara dumanı, rafine edilmiş yiyecek maddeleri, su boruları, kahve, çay, kömür yakılması, kabuklu deniz ürünleri, tohum aşamasında kullanılan gübreler ve endüstriyel üretim aşamalarında oluşan baca gazlarıdır. Endüstriyel olarak kadmiyum zehirlenmesi, kaynak yapımı esnasında kullanılan

alaşım bileşimleri, elektrokimyasal kaplamalar, kadmiyum içeren boyalar ve kadmiyumlu piller nedeniyledir. Kadmiyum önemli miktarda gümüş kaynaklarda ve sprey boyalarda da kullanılmaktadır (Kahvecioğlu ve ark. 2003).

2.1.3. Metabolizması ve Fizyolojik Etkileri

Kadmiyumun vücuda alınımı sıklıkla oral ve solunum yoluyla olmaktadır. Deri yoluyla alınımı ise nispeten daha azdır. Kadmiyumun yüksek oranda suda çözünen başlıca formu olan kadmiyum klorür ($CdCl_2$)'ün ağızdan ve sindirim sisteminde emilimi oldukça yüksektir. Solunum yoluyla sıklıkla maruz kalınan şekli ise kadmiyum oksit (CdO)'tir. Kadmiyumun kontaminasyon şekline göre değişiklik gösterebilir solunum yolu ile alınan miktarının, oral alım miktarından fazla olabileceği ve kadmiyumun solunum yolu ile emiliminin, mide bağırsak kanalındaki emiliminden daha fazla olduğu bildirilmektedir (Zalups ve Ahmad 2003).

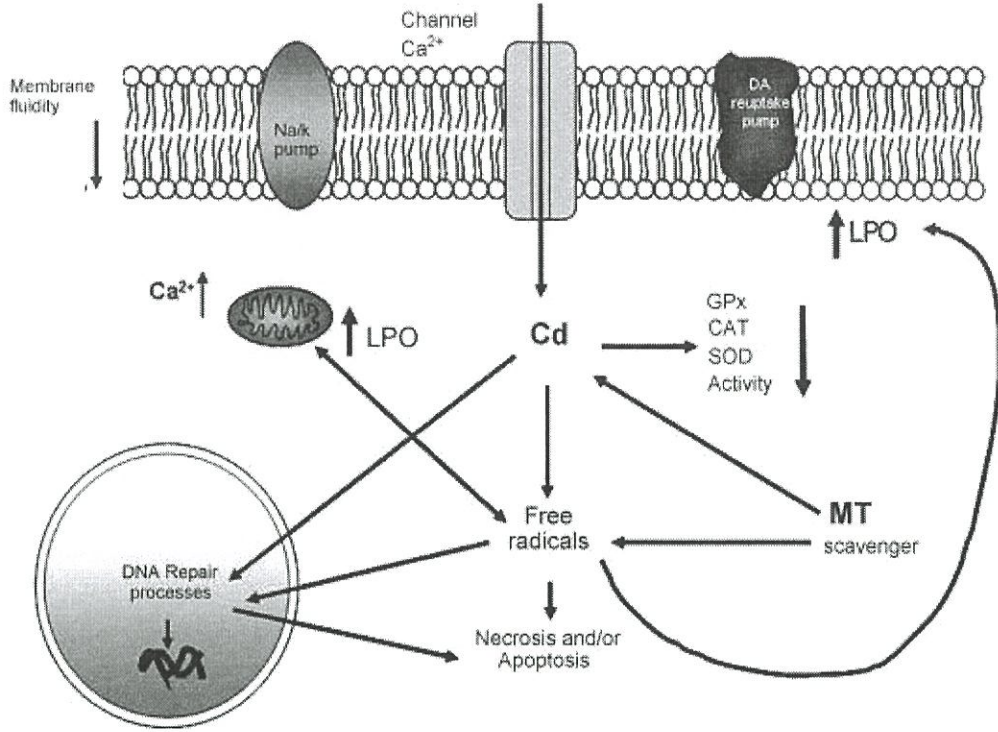
Kadmiyumun sindirim kanalından emiliminden büyük oranda duodenum ve proksimal jejunum sorumludur. Ayrıca demir emiliminin büyük kısmı duodenumda olmaktadır. Bu iki katyon birbirine iyonik yapı bakımından oldukça benzediği için, aynı transport mekanizmalarıyla taşınabilecekleri ileri sürülmüştür. Aslında ratlarda yapılan *in vivo* çalışmalar kadmiyumun demir ile aynı taşıyıcıları kullandığını ve karışık emildiğini göstermiştir. Divalent metal taşıyıcı protein (DMT1) enterositlerin apikal plazma membranlarına yerleşmiş demirin intestinal emiliminde rol alan taşıyıcı bir proteindir. Bu taşıyıcı proteinin gen ekspresyonundaki azalma sonucu demir emilimi azalırken aynı hücrelerde kadmiyum emilimi de azalmıştır. Diğer yandan demir eksikliğinde telafi edici bir mekanizma olarak DMT1 ekspresyonu artımı kadmiyum sindirim kanalından ya da solunum yoluyla vücuda alındıktan sonra kana absorbe olur ve plazmada albümin aracılığıyla taşınır. Kadmiyumun çinko iyonlarına benzer özellikleri nedeniyle çinko taşıyıcı proteinler tarafından hücre içine alınmaktadır (Bridges ve Zalups 2005).



Şekil 1. Kadmiyumun vücuttaki dağılımı (Zalups ve Ahmad 2003).

2.1.4. Kadmiyum ve Oksidatif Stres

Kadmiyumun neden olduğu serbest radikal üretimi için dolaylı bir mekanizma öne sürülmektedir. Kadmiyum metalloenzimlerdeki çinko, kalsiyum, bakır ve demirin yerini alarak bu metallerin bağlı olmayan formlarının miktarını artırır; glutatyon gibi serbest radikal süpürücülerin tiyol gruplarına bağlanır, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimleri inhibe eder. Fenton metali olmamasına rağmen, süperoksit ve nitrik oksidinde içinde olduğu birçok serbest radikalın üretimine neden olduğu ve böylece hücre membranındaki yapıların peroksidasyonuna, DNA hasarına ve protein oksidasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Membran lipitlerinin oksidasyonu, membran yapısının polimerizasyonuna ve çapraz bağlarla bozulmasına neden olur. Mitokondri membranındaki hasar, kalsiyumun mitokondriden hücre içine salıverilmesini sağlar. Bu da DNA hasarına, apoptoza ve nekroza yol açan kaspaz-3 aktivasyonuna neden olur (Bertin ve Averbek 2006).



Şekil 2. Kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres (Mendez-Armenta ve Rios, 2007).

2.2.Serbest Radikaller

Moleküllerdeki atomların uzayda kapladığı yere orbital adı verilir. Her orbitalde biri saat yönünde diğeri de tersi yönde hareket eden iki elektron bulunur. Eğer bir orbitalde yalnızca bir adet elektron bulunuyorsa buna eşleşmemiş elektron denir. Serbest radikaller ise dış orbitalinde tek sayıda eşleşmemiş elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Kimyasal formüllerde bu elektron bir nokta ile (OH[•]) gösterilir (Halliwell 1996). Organizmada normal metabolizma sırasında oluşan serbest radikaller, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Özellikle reaktif oksijen türleri (ROT), kimyasal ve radyasyon yaralanmaları, oksijen ve diğer gaz yaralanmaları, hücre yaşlanması, fagositik hücrelerle mikrobiyal öldürme, enflamatuvar hasar ve makrofajlarla tümör destrüksiyonu gibi pek çok olay sonucu oluşurlar (Nakazawa ve ark. 1996).

Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri (RNT) normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. Hem zararlı hem de yararlı oldukları için, biyolojik sistemde ikili rol oynadıkları düşünülmektedir. Hücrenin normal fonksiyonları için gerekli en önemli moleküller olan oksijen ve nitrojenler, endojen veya ekzojen

etmenlere bağlı olarak hücreye zarar veren serbest radikallere dönüşebilirler. Bu zararlı etkilerine oksidatif stres ve nitrözatif stres denilmektedir (Valko ve ark. 2007).

Lipitler serbest radikallerden en fazla zarar gören moleküllerdir. Hücre zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin çift bağları, serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilmektedirler. Lipit peroksidasyonu membran geçirgenliğini etkileyerek, hücre içinde kalsiyum birikimine yol açmaktadır. Bu da hücre şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Stres varlığı lipit peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesinde artışa yol açmaktadır. Bu nedenle MDA seviyesindeki artış lipit peroksidasyonunun dolayısıyla da stres varlığının göstergesidir (Büyükoğul ve Arslan 2018).

Biyolojik sistemlerde oluşan en önemli RNT olan nitrik oksit (NO), organizmada yaygın olarak bulunan ve birçok hücre ile dokuda doğal olarak sentezlenen, ömrü saniyelerle ifade edilen, eşlenmemiş bir elektronu bulunan serbest radikal gazdır (Jensen 2003). NO, nitrik oksit sentazlar (NOS)'ın L-arjinini okside ederek L-sitrullin oluşturmasıyla sentezlenmektedir (Atakişi ve Merhan 2017). Organizmaya giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sonucu oluşan NO bir tarafa bırakılacak olursa endojen NO'oluşturan tek kaynak NOS enzimidir (Dröge 2002). Memelilerin, damar endoteli, beyin, makrofaj, üriner sistem gibi farklı dokularından nöronal (nNOS), uyarılabilir (iNOS) ve entoteliyal (eNOS) olmak üzere üç farklı tip NOS izoformu izole edilmiştir (Porasuphatana ve ark. 2003, Atakişi ve Merhan 2017). Nitrik oksit sentezlenirken NOS dışında, moleküler oksijene ve dört tane kofaktöre gerek duyulur. Bunlar; Hem, FAD, FMN ve tetrahidrobiopterin (BH4)'dir (Çekmen ve ark. 2001). NO, oksidatif stres altında apoptozisi, sitotoksisiteyi, mutajenezisi ve DNA hasarını artırır, ayrıca lipit oksidasyonuna da neden olur (Jensen 2003).

2.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar, oksidanlara hedef olan biyolojik yapıların oksidasyon hızlarını nispeten düşük konsantrasyonlarda engelleyen maddelerdir (Rangan ve Bulkley 1993, Maxwell 1995). Endojen ve ekzojen olmak üzere iki grup altında toplanabilir. Endojen ve ekzojen antioksidanlar, oksidan/antioksidan dengesini

sağlamak için serbest radikallerden vücudu korur ve serbest radikalleri etkisizleştirmek için kullanılırlar (Sen ve Chakraborty 2011).

Sağlıklı canlılarda serbest radikal üretimi reaksiyonları ile antioksidan savunma mekanizmaları arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin bozulması durumunda ‘oksidatif stres’ meydana gelmektedir. Oksidan ve antioksidan parametreler arasındaki dengenin veya oksidatif stresin şiddetinin belirlenmesi için MDA ve redükte glutasyon (GSH) düzeyleri arasındaki ilişkiye dikkat çekilmektedir. Oksidatif stresin kalıcı olması durumunda organizmanın protein, DNA ve membran lipidleri gibi önemli hücresel elemanlarının tümü etkilenecek ilerleyen süreçte hücre ölümü meydana gelmektedir (Sies 1991).

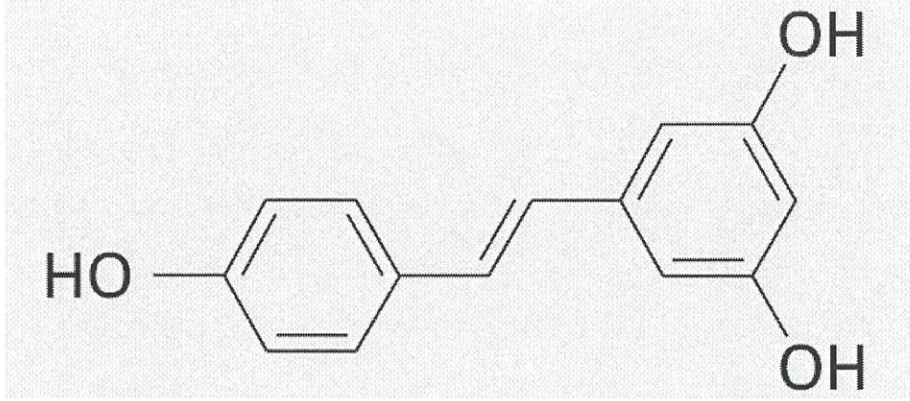
Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen glutasyon (γ -glutamil sisteinil glisin), oksidan atom veya moleküller ile redoks reaksiyonları arasındaki dengenin korunmasında fonksiyon görerek hücreyi oksidatif strese karşı koruyan ve tiyol grubu taşıyan bir tripeptiddir (Masella ve ark. 2005).

2.4.Resveratrol

Stilbenlerin alt grubunda yer alan resveratrol 3.5.4'-hidroksistilben yapısındadır. Resveratrolün trans ve cis olmak üzere iki izomerik formu vardır (Burkitt ve Duncan 2000). Trans izomeri doğada daha yoğun bulunduğundan daha çok çalışmaya konu olmuş ve resveratrol 3.5.4'-trans-hidroksistilben olarak adlandırılmaktadır (Goldberg ve ark. 1996). Trans resveratrol ilk defa 1940 yılında *Veratrum grandiflorum*'un köklerinden elde edilmiştir. Resveratrol kelimesi bu bitkiden gelir. ‘Res’ Latince “ondan gelen” anlamında bir önektir ve “ol” ise yapısında alkol grubu varlığını gösteren bir son ektir. 1963 yılında *polygonum cuspidatum* bitkisinin kurumuş köklerinin aktif bileşeninde tanımlanmış, kojo kon olarak isimlendirilmiş; dermatit, gonore ve hiperlipidemi gibi hastalıkların tedavisinde Asya geleneksel tıbbında kullanılmıştır. 1976 yılında *Vitis vinifera*'nın yapraklarından elde edilen resveratrol 1992 yılında üzüm kabuğundan ve şaraptan da elde edildi (Planas ve ark. 2011).

Resveratrol 72 farklı bitki türünde bulunabilir. Bitkilerin meyvelerinin etli kısmında bulunmayan fakat tohum zarlarında ve yaprakların üst tabakalarında bulunan stilben genlerden resveratrol üretimini sağlayabilirler. Bitkiler güneş

ışığından gelen UV ışına, hayvan zehrine ve ozona maruz kalınca kendisini korumak için bu dış uyaranlara karşı stilben sentez (STS) genini harekete geçirirler ve yeterli miktarda resveratrol üretirler. Bu STS geni yer fıstığı kökü, çilek, yaban mersini, dut, üzüm, okaliptüs, alaçam ve zambak gibi diğer bitkilerde de bulunur (Das ve Das 2007).



Şekil 3. Resveratrolün yapısı (Ignatowicz ve Baer-Dubowska 2001).

Üzüm çeşitleri arasında, *Vitis vinifera* (Akdeniz’de yetişen ve şarap yapılan üzüm), labruska ve misket üzümü maksimum yoğunlukta resveratrol içerir. Bu üzüm türlerinin kabukları ve tohumları 50-100 µg/mg resveratrol içerirler ve normalde yapraklarında yaklaşık olarak 50-400 µg/mg resveratrol bulunur. Bu üzüm çeşitleri aynı zamanda kırmızı şarap yapımında da kullanılırlar. Fakat farklı şarap türleri farklı miktarlarda resveratrol içerirler. Çünkü resveratrolün mevcut miktarı kullanılan üzümün çeşidine ve mayalandırılma şekillerine bağlıdır. Resveratrol aynı zamanda üzüm çeşidine ve üzüm bağındaki çevresel faktörlere bağlı olarak farklı üzümleri içerir (Das ve Das 2007).

Günümüzde ‘makul derecede şarap içmenin’ yararları hakkındaki yaygın öneri tarih boyunca çok eskiye dayanır ve ilk Yunan’daki Kos Hipokratı tarafından önerilmiştir. Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, hafif ve orta derecede şarap içmenin, özellikle kırmızı şarap içmenin, kalp-damar ve beyin-damar ile ilgili hastalıkları, periferik damar riskleri, farklı kanser türleri, diyabet ve bazı uzantıları ve sinirsel hastalıkları azalttığını açıklamıştır. 1992’de Renaud ve De Lorgeril ‘Fransız Paradoksu’nu gözlemleyip Fransızların sigara içmek gibi diğer risk faktörlerinin

yaygınlığına ve katı yağların fazla tüketimlerine rağmen Fransızlar arasında iskemik kalp hastalığının neden olduğu ölüm oranının düşük olduğunu bulduktan sonra, kırmızı şarabın kalp-damara olan faydaları araştırmaların merkezi olmuştur. Bu büyük oranda şarap içeren “Akdeniz Diyeti” olarak adlandırılan diyetle dayandırılır (Renaud ve De Lorgeril 1992). Şarabın kalbi koruyan etkisi, şarabın bileşenleri olan hem alkol miktarına daha da önemlisi antioksidanları içeren alkolsüz miktara bağlıdır. Şaraplar resveratrol, kateşin, epikateşin ve pro-antosiyanidin de dâhil olmak üzere çok çeşitli antioksidanları içeren üzümde üretilmektedir. 150-300 mL civarında kırmızı şarabın düzenli olarak tüketilmesinin kalp-damar sağlığına faydalı olduğu bildirmektedir (Renaud ve De Lorgeril 1992, Soleas ve ark. 1997). Ayrıca, Kaldas ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada da diyet takviyelerinde resveratrolün günde 10-20 mg dozda kullanılmasıyla kalp-damar sağlığını korumaya yardımcı olduğunu göstermişlerdir.

Antioksidan olarak resveratrol, oksidatif strese bağlı olarak oluşan hücresel hasarları ve apoptozu önleyebilir. Resveratrol antioksidan özelliğinin yanı sıra damar gevşetici bir ajandır, damarda pıhtı oluşumunu engelleyerek aterosklerozisi önler, lipoprotein metabolizmasını düzenler ve yaşlanmaya karşı etkilidir (Das ve Maulik 2006). Prostaglandin aktivitesini baskılayarak antiinflamatuar etki yaratır, böylece kanser sonrası terapilere karşı koruyucu etkisi vardır. Resveratrol aynı zamanda bir fitoöstrojen gibi davranarak östrojen reseptörlerine bağlanma eğilimindedir. Böylece östrojen bağımlı genlerin transkripsiyonunu tetikler. Östrojene bağımlı kanserlerde ve kalp hastalıklarında resveratrol bu özelliği ile oldukça etkili bir antioksidandır (Gehm ve ark. 1997). Trans resveratrolun dietilstilbestrol ve östrojene olan bu yapısal benzerliği aynı zamanda erkek üreme sistemi ile de ilişkilidir. Östrojen yanıt sistemlerini etkileyerek erkek üreme sistemi nöroendokrin sistemine feedback etkisi ile spermatogenezde dolaylı olarak rol oynar (Gehm ve ark. 1997, Juan ve ark. 2005).

Resveratrol ağız yoluyla alındıktan sonra çoğunlukla bağırsaklardan emilir. Büyük bir bölümü jejunumda az bir kısmı ise ileumda emilir. Daha sonra bir saat gibi kısa bir sürede kana geçer (Signorelli ve Ghidoni 2005).

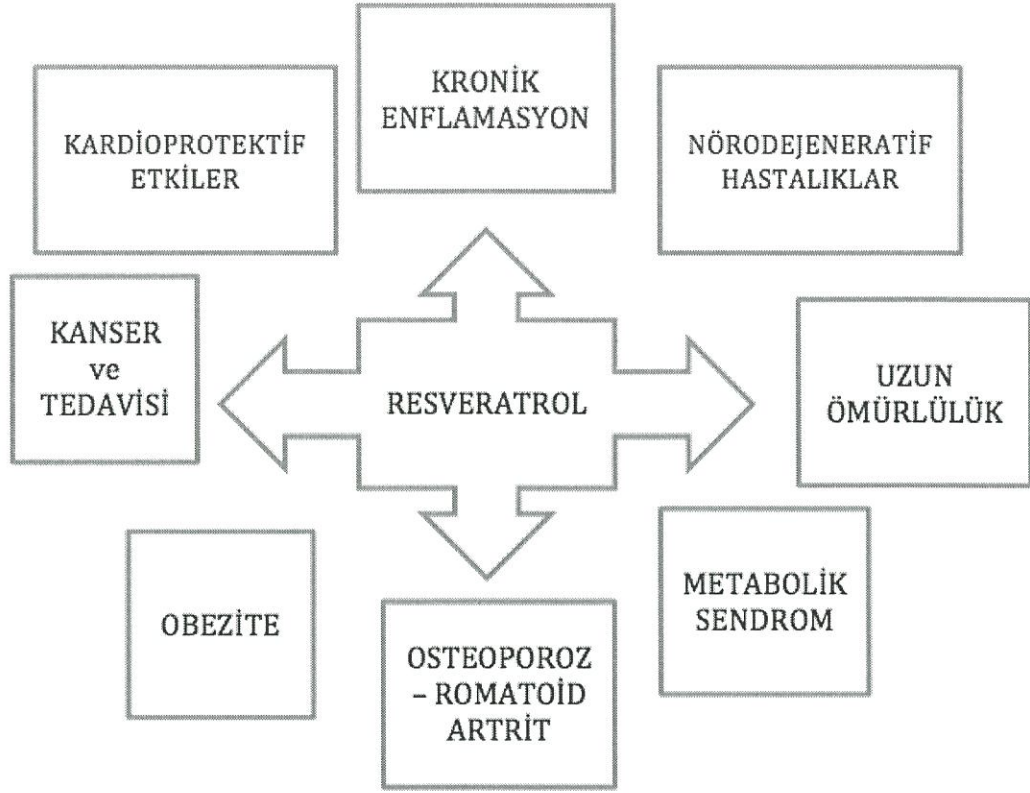
2.4.1. Resveratrolün Farmalojik Özellikleri

Birçok araştırmaya rağmen resveratrolün farmalojisi çok az anlaşılmıştır. Bazı çalışmalarda resveratrolün farklı farmakokinetik alımlarını ve biyoyararlanımını göstermişlerdir. Fare, rat ve köpek gibi farklı türlerin farklı organlarının ve kan dolaşımının resveratrolü önemli bir konsantrasyonda absorbe edebileceğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, resveratrol hem karaciğerde hem de bağırsak epitel hücrelerinde glukuronik asit konjügasyonu (glukuronidasyon) ve sülfat konjügasyonu ile hızlı bir şekilde metabolize olduğunu bildirmektedirler (Bertelli ve ark. 1996). Ayrıca *in vitro* enzimlerini kullanarak hem glukuronidasyon hem de sülfatlamının karaciğer mikrozomları tarafından aynı anda yapılabileceğini gösteren bazı çalışmalar da yapılmıştır (De Santi ve ark. 2000, Aumont ve ark. 2001).

Meng ve ark. (2004) yaptıkları bir çalışmada, toplamda %90'dan fazla resveratrol verilen ratların kan dolaşımında konjüge formlarda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada ratlara damardan (15 mg/kg) ve ağızdan (50 mg/kg) siklodekstrin verildiğinde ise resveratrolün farmakokinetik etkisinin daha da arttığı bulunmuştur (Marier ve ark. 2002). Son olarak, ratlara oral yolla verilen resveratrolün yarı ömrünün, kan dolaşımında hızlı bir şekilde yaklaşık 12-15 dakikada olduğunu göstermişlerdir (Gescher ve Steward 2003).

2.4.2. Resveratrolün Biyolojik Aktiviteleri

Dünya çapında obezite ve metabolik bozukluklar çağımızın pandemisi olarak kabul edilmektedir. Oksidatif stres ve enflamasyona bağlı olduğu kabul edilen bu patolojik durumlar için halen çözüm aranmaktadır. Resveratrolün antioksidan kapasiteyi artırması, antiemflamatuvar ve insülin sinyalizasyon düzenleyici etkisi ile kanser, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar üzerinde tedavi değeri olduğu bilinmektedir (Chachay ve ark. 2011). Yapılan çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma sonuçlarına göre, resveratrolün insan sağlığı üzerinde yararlı etkiler göstermesi beklenir. Resveratrolün etki mekanizması, farklı hücrelerde ve farklı patolojik durumlarda değişiklik göstermektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Resveratrolün etkili olduğu durumlar (Chachay ve ark. 2011).

Resveratrol hiperlipidemi diyetiyle beslenen farelerde, triaçilgliserol ve kolesterolün hepatik birikimini inhibe etmiştir (Arichi ve ark. 1982). Aynı şekilde peroksitlenmiş yağla beslenen farelerdeki karaciğer hasarlarını da engellemişlerdir (Kimura ve ark. 1983). Kırmızı şarapta bulunan bir resveratrol fraksiyonunun (cis ve trans formlarında 6,5 mg/L) farelerde absorbe edildiğini göstermişlerdir. 15 günü geçen sürelerde günlük 13 µg ya da 26 µg akut doz resveratrol alınarak yapılan deneylerle, bileşiğin kan akışına hızla geçtiği, plazma ve bazı organlardaki konsantrasyonlarının tespit edilebildiği gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar yaptıkları başka bir çalışmada da her fare için 28 µg içeriğe sahip intragastrik tüple verilen kırmızı şarabın plazma kinetiğini ve biyolojik yararlılığını incelemişlerdir. Bunun sonucunda önemli bir biyokardiyak yararlılığın, karaciğer ve böbreklerle güçlü bir afinitenin olduğunu belirtmişlerdir (Bertelli ve ark. 1998).

Serbest radikaller, vücudumuzda normal metabolik süreçler sırasında oluşabildiği gibi, farklı dış etkenlerin etkisiyle, değişik kimyasallara maruziyet ile ve

çeşitli patolojik durumlarda da oluşabilmektedirler. Serbest radikaller lipid, protein ve nükleik asitler gibi hücrenin temel bileşenlerinde kimyasal modifikasyona yol açabilmektedir. Özellikle hücre membranında bulunan doymamış yağ asitleri serbest radikallerin oksidatif ataklarına karşı çok duyarlıdır. Bu yüzden, serbest radikallerin kanser, ateroskleroz, artrit, amiloidoz, psikiyatrik bozukluklar, senil demans ve hipertansiyon gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (Bayir 2005). Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu düşük dansiteli lipoproteinler (LDL)'in ateroskleroziste önemli bir rol oynadığı düşünülür. Oksidasyon, regüle apo B/E reseptör sistemiyle katabolizmalarını bozan LDL'nin protein parçasına (apoB) etki eder. Ayrıca fenolik bileşiklerden zengin gıdaların koruyucu rolü, onların antioksidan özelliklerine atfedilmiştir (Rice-Evans ve ark. 1997). Frankel ve ark. (1993) trans-resveratrol eklenmiş LDL'nin, katalize bakır oksidasyonunu indirdiğini ilk kez ispat etmişlerdir.

Resveratrol membran lipidlerinin peroksidasyonunu da inhibe eder. Farelerde karaciğer mikrozomlarında (Blond ve ark. 1995), non-enzimatik ya da NADPH-bağlı peroksidasyonda, % 50 inhibisyon için gereken resveratrol konsantrasyonun kuersetininkinden 3 kat düşük olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, *Vitis vinifera* hücre kültürlerinden elde edilen resveratrol ve piceid ekstratlarını mikrozomlar ve LDL'de metal-indirgenmiş lipid peroksidasyonunu engelleyemediği bildirilmiştir (Fauconneau ve ark. 1997).

Hücre zarı korunmasında resveratrolün, canlı hücrelerdeki oksidatif stresin zararlı etkilerini azalttığı muhtemeldir. Sun ve ark. (1997) demir ve etanolle lipid oksidasyonu sırasında resveratrolün etkilerini incelerken PC12 hücrelerini (fare adrenal feokromositoma) kullanmışlardır. Bu hücreler, dopaminerjik nöronal hücre sayılırlar. Ayrıca ağır metal ve serbest radikal ataklarına karşı çok duyarlıdırlar. Resveratrolün hücreleri peroksidatif stres ve doku hasarından koruduğunu gözlemlemişlerdir. Chanvitayapongs ve ark. (1997) hücre korunmasında, trans-resveratrol, vitamin C ve/veya E kombinasyonunun, her birinin tek başına gerçekleştirdiğinden daha efektif olduğunu göstermişlerdir. Sonuçlar, resveratrolün sadece antioksidan ve antimitojen özellikler taşıyıp, hücre ölümlerini azaltabildiğine de işaret etmiştir. Başka bir çalışmada, doku hasarları ve hücre ölümlerine sebep olan, hücre içinde bir dereceye kadar sitotoksik biçimde okside

olmuş çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) ve LDL'nin olmasıdır. Bu bulgu, nörodejeneratif hastalıkların aydınlatılmasına katkıda bulunabilir. PC12 hücrelerinin inkübasyonunda ortama resveratrol, vitamin C veya vitamin E antioksidanlarının ilave edilmesi, okside olmuş lipoproteinlerin neden olduğu hücre ölümlerini etkili bir şekilde engellemiştir. Resveratrolün etkisi, hücresel ve hücre içi komponentlerin korunmasını sağlayan amfipatik karakteriyle ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (Draczynska-Lusiak ve ark. 1998).

Resveratrol hepatoprotektif aktivite de gösterir. Karaciğer fibrozisinin gelişmesinde önemli bir rol oynayan hücrelerin profilasyonunun oksidatif stresle arttığı bildirilmiştir. Dolayısıyla, bu hücrelerin aktivasyonunu engelleyebilen bileşikler hepatik fibrogenezisi de engelleyebilirler. Resveratrolün, hücre protein döngüsü ve sinyal iletim yolunu keserek hücre aktivasyonunu inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, lipopolisakkarit sitümüle eden kupffer hücreleriyle NO ve tümör nekrozis α -faktörün (TNF- α) üretimini de inhibe ettiğini göstermişlerdir (Kawada ve ark. 1998).

Tablo 2. Resveratrolün temel biyolojik aktiviteleri

- Lipit peroksidasyonunun inhibisyonu (LDL, membranlar)
- Bakırın şelasyonu
- Serbest radikal arıtma
- Eikozanoit sentezin değiştirilmesi
- Platelet kümelenmesinin inhibisyonu
- Antienflamatuvar aktivite
- Damar genişletici etki
- Lipit metabolizmasının modülasyonu
- Anti kanser aktivite
- Östrojenik aktivite

Resveratrol uygulanan tavşanlarda ateroskleroze karşı koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Hiperkolesterolemili tavşanların diyetine trans-resveratrol ilk 5 gün 0,6 mg/kg sonraki 6-60 gün boyunca 1 mg/kg uygulanmış ve plazmalarındaki çok yüksek kolesterolün azalmadığı (normalden 30 kat fazla), 12 saat-hız plazmadan izole edilen elektroforetik LDL mobilitesinin değişmediği gözlenmiştir (Wilson ve ark. 1996).

Uenobe ve ark. (1997) Japonya'da *Yucca schidigera*'dan elde edilen bir ekstratın bakteri hücrelerinde antimutajenik etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Resveratrol olarak tanımlanan aktif bileşiğin hidroksil grupları bu aktiviteyi gerçekleştirmiştir. *Cassia quinquangulata* (Legiminosae)'dan elde edilen resveratrolün, karsinogenezin 3 ana safhasında yapılan deneylerde kanser önleyici kimyasal etkiye sahip olduğu görülmüştür. Antioksidan ve antimutajen olarak davranmış ve karsinogenlerin detoksikasyonunu teşvik etmiştir. Siklooksijenaz-1 ve hidroperoksidazın fonksiyonlarını inhibe ederek anti-enflamatuvar süreçte aracı olmuştur. Resveratrol, hücre farklılaşmasına neden olan kanserin ilerlemesini azaltmıştır. Resveratrolün 'kimyasal-koruyucu' aktivitesinin doğrudan delili, farelerin kanserli meme (süt) bezlerindeki preneoplastik lezyon kültürlerinin yanı sıra farelerde bir deri kanseri türü olan tümorigenezin gelişimini inhibe etme yeteneğinin sahip olmasıdır (Jang ve ark. 1997).

Resveratrolün yaşam süresinin uzanmasına ve sağlıklı yaşlanmada rol oynayabileceği düşünülmektedir. Meyve sineği, farklı nematod türleri, *Saccharomyces cerevisie* gibi mayalar ve *Nothobranchius furzeri* gibi kısa ömürlü balık organizmaları üzerinde yapılan çalışmalarda resveratrolün yaşam süresini etkili bir şekilde uzattığı gösterilmiştir. Bu organizmalarda, ömür uzaması kalori restriksiyonunun etkilerini taklit eden Sir-2 deasetilaz enzimine bağlıdır ve resveratrol etkileri Sir-2 ile etkileşerek göstermektedir. Uzun ömür üzerinde etkili olabilen resveratrol bir takım değişiklikler meydana getirmektedir. Bunlar, insülin duyarlılığının artması, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) düzeylerinin azalması, AMP-aktive edici protein kinaz ve PGC-1 α aktivitesinin artması, mitokondri sayısının artması ve motor fonksiyonlarının gelişmesidir (Baur ve ark. 2006, Catalgol ve ark. 2012).

Antioksidan ve antienflamatuvar özelliklerinden dolayı resveratrol nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde yer alabilir. Örneğin, 45 gün resveratrol uygulanan transgenik farelerde resveratrolün amiloid plakalar üzerindeki etkisi ele alınmıştır. Çalışmada kullanılan resveratrol dozu 70 kg'lık bir insan için 1,68 g resveratrol olarak hesaplanmıştır. Deney hayvanlarının beyinlerinde ne resveratrol ne de onun konjüge metabolitleri tespit edilmemesine rağmen kontrol grubuna göre plak oluşumunun anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır. En büyük azalma mediyal kortekste (% 48), striatumda (% 89) ve hipotalamusta (%90)

görülmüştür. Bu değişimlerin, SIRT-1 sistem aktivasyonu ile ilişkili olmadığı beyinlerde tespit edilen artmış sistein ve azalmış glutatyon içeriği ile bağlı olabileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, resveratrolün Alzheimer hastalığının önlenmesinde etkili olabileceğini düşünmüşlerdir (Karuppagounder ve ark. 2009).

Enflamatuvar parametrelerinin, Parkinson, Alzheimer ya da multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların patojenezinde önemli rol aldıkları bilinmektedir. Bir çalışmada, primer fare astrositlerde lipopolisakarit (LPS) tarafından uyarılmış enflamatuvar moleküllerin üretimine resveratrolün baskılama etkisi incelenmiştir. Resveratrol, LPS- uyarılmış NO, TNF α , interlökin -1 beta (IL-1 β) ve interlökin-6 (IL-6) üretimini inhibe edip doğal bağışıklık sisteminde önemli rol oynayan kemokin monosit kemotaktik protein-1'in oluşumunu engellemiştir. Adaptif bağışıklık için önemli T hücrelerin fenotipini değiştiren IL-12p40 ve IL-23'ün üretimi de resveratrolün etkisiyle azalmıştır. Son olarak, çeşitli kronik enflamatuvar hastalıklarda rol oynayan C-reaktif proteinin astrositlerdeki üretimini inhibe etmiştir. Genel olarak bakıldığında, resveratrol enflamatuvar süreçlerle başlayan ve süren nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili bir bileşik olduğu gösterilmiştir (Wight ve ark. 2012).

Nöroenflamasyonun göstergesi olan mikroglial proliferasyonun inhibisyonu nörolojik bozuklukların tedavisinde önemli bir hedefdir. Yapılan bir çalışmada, resveratrolün rat primer kortikal gliya hücre kültüründe LDL-uyarılmış kortikal nörotoksitesine etkileri değerlendirilmiştir. Resveratrol mikroglial aktivasyonu ve ardından gelen proenflamatuvar ve sitotoksik faktörlerin oluşumunu anlamlı düzeyde inhibe etmiştir. Bu çalışmaya göre, mikroglia hücreleri resveratrol aracılı nöroproteksiyonundan sorumludur (Zhang ve ark. 2013).

Resveratrolün kardiyovasküler hastalıkları engellemesindeki rolü, polimorfonükleer lökositlerin (PMN) fonksiyonlarını düzenleme kapasitesiyle ilgili olabilir. Bu hücreler hastalığın patogenezisine katkıda bulunabilirler. Trans-resveratrolün, *in vitro* aktivasyonda PMN'nin fonksiyonel ve biyokimyasal cevaplarına etkileri incelenmiştir. Resveratrolün PMN tarafından aktive edilmiş enflamasyon vasıtalarından ve PMN'nin trombojenik adezyon bağlama

fonksiyonlarının down regülasyonunu sağladığını göstermişlerdir (Rotondo ve ark. 1998).

2.5.Siyalik Asit

Mannozamin ve piruvatın kondenzasyonu ile oluşan nöraminik asitin asetillenmiş türevlerine genel olarak siyalik asit (SA) adı verilmektedir. Glikoproteinler, glikolipidler, polisakkaritler ve mukoproteinlerin yapısına katılırlar (Reuter ve Schauer 1994, Traving ve Schauer 1998). Hidroksil ve amino gruplarının modifikasyonu sonucu oluşan doğal formları birbirinden farklıdır (Schauer ve ark. 1997). Belli omurgasızlar, bütün omurgalı türleri ve bazı bakterilerde SA varlığı tespit edilmiştir (Şimşek ve Hacısalihoğlu 1986, Rougon 1993). Bitkilerde SA bulunmaz (Traving ve Schauer 1998). İnsan serumunda bulunan α_1 -asit glikoproteinler, α_1 -antitripsin, haptoglobin, seruloplazmin, fibrinojen, C-reaktif protein ve komplement proteinler büyük miktarda SA içerirler (Silver ve ark. 1980).

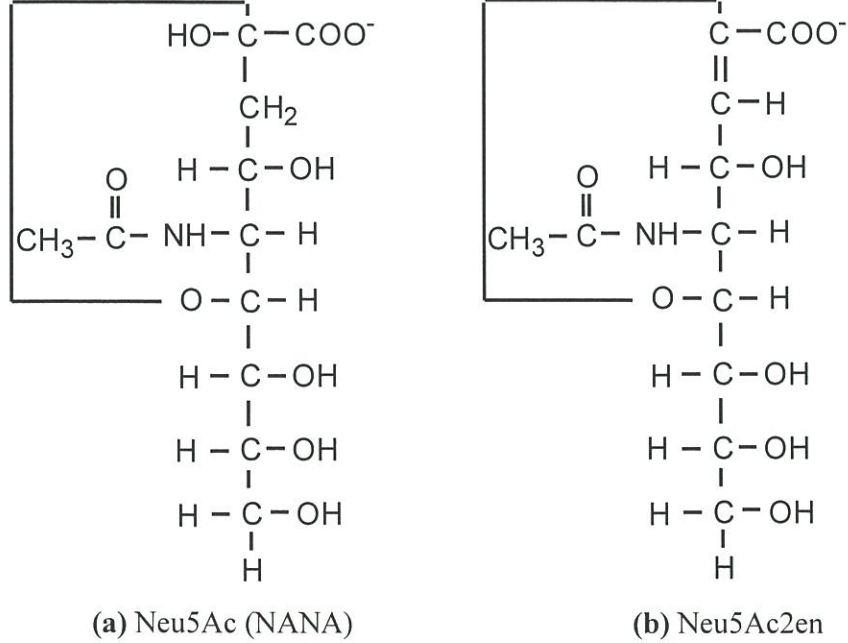
Total siyalik asit (TSA), serbest, proteine bağlı ve lipide bağlı SA'nın toplamını ifade etmektedir. SA'nın, % 85'i glikokonjugatların protein kısmına bağlı, yaklaşık % 15'i lipide bağlı ve çok küçük miktarı da serbest halde bulunur (Muhtaroglu ve ark. 1993). Serbest SA'lar; gastrik sıvıda, alabalık yumurtasında, idrarda, insan serebrospinal sıvısında, proteine bağlı SA'lar; tükürük, mide sıvısı, bronşial ve nasal sekresyonlar, safra kesesi sıvısı, servikal müsinler, domuz ve insan semeninde, lipide bağlı SA'lar ise sinir dokusunda ve beyinde bulunur (Şimşek ve Hacısalihoğlu 1986).

Memelilerin çoğunda SA'lar, N-asetil ve N-glikolil türevleri şeklindedir (Keleş ve ark. 2000). Çeşitli türlerin değişik dokularında bu türevlerin oranları farklıdır. Örneğin sığır, koyun ve domuzların tükürük mukoproteinleri en çok N-asetil türevi içerirken aynı hayvanların eritrosit stromasında daha çok N-glikolil türevi mevcuttur.

Çeşitli faktörlere bağlı olarak (virüsler, mikroorganizmalar) eritrositlerde meydana gelen yıkımlanmalar sonucunda yüzeylerindeki SA'lar serbest bırakılırlar ve eritrositler retikülo endotelial sistemde kolayca fagosit edilirler (Altıntaş ve ark. 1989).

2.5.1. Yapısı

SA'lar, 9 C'lu şeker nöraminik asitin açillenmiş türevleridir (Siskos ve Spyridaki 1999). SA'daki temel molekül doğada serbest formda bulunmayan nöraminik asit (Neu) olup, sistematik ismi 5-amino-3,5-dideoksi-D-glisero-D-galaktononulosonik asittir. Kimyasal olarak bir 2-keto-karboksilik asit, bir deoksi şeker ve bir amino şeker grubu içerir (Schauer 1982, Şimşek ve Hacısalihoğlu 1986). Doğada 25'ten fazla SA bulunur. Bunlardan en yaygın olanı N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac) (Şekil 5a) olup, sistematik ismi 5-asetamido-3,5-dideoksi-D-glisero-D-galaktononulosonik asittir. Diğer bir ifade ile N-asetil nöraminik asit (NANA) denir. SA'lar, 4, 7, 8 ve 9 pozisyonlarda konfigürasyon değişikliği göstererek çok çeşitli bileşikler ve izomerler vermektedirler. 2-deoksi-2,3-dehidro-N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac2en) (Şekil 5b) gibi doymamış ve dehidro formları da gözlenmiştir (Siskos ve Spyridaki 1999). NANA'daki asetil grubu yerine glikolil grubu geldiğinde N-glikolil nöraminik asit (Neu5Gc) oluşur (Şimşek ve Hacısalihoğlu 1986).

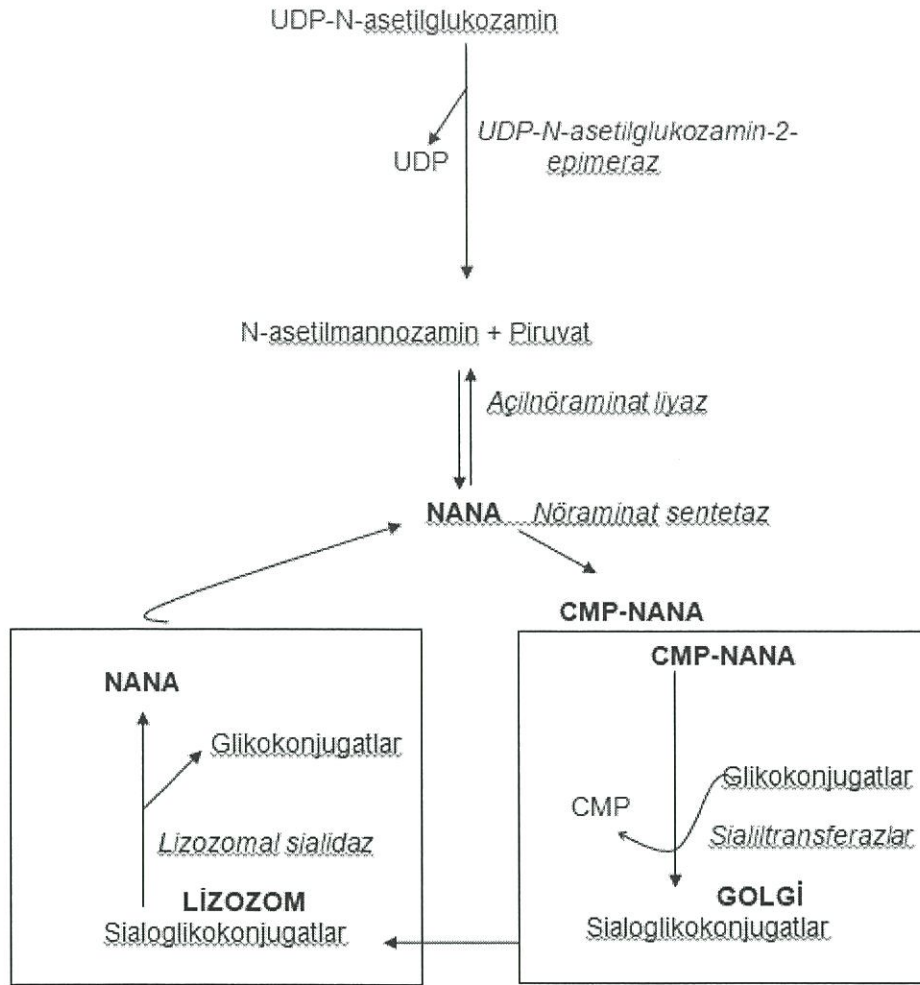


Şekil 5. Neu5Ac (NANA) ve Neu5Ac2en'in kimyasal yapıları (Siskos ve Spyridaki 1999).

2.5.2. Metabolizması

Biyosentezin başlangıç maddesi glukoz olup, ilk reaksiyonda N-asetilglukozamin N-asetilmannozamin'e dönüşür. Fosfat vericisi olarak ATP'nin kullanılması ve asetilmannozamin kinazın katalizörlüğünde N-asetilmannozamin-6-fosfat oluşur (Reuter ve Gabius 1996). Daha sonra sitoplazmada, fosfoenolpiruvat ile birleşerek NANA-9-fosfat'a bu da SA fosfatının katalizi ile NANA'ya dönüşür. Bu molekül nükleusta, sitidin monofosfat (CMP)-SA sentezinin katalizi ile sitidin trifosfat (CTP)'tan bir CMP'nin transferi sonucu CMP-NANA'ya aktive edilir (Traving ve Schauer 1998). Bu basamakta Neu5Gc oluşabilir. İlk incelemelerin aksine, günümüzde CMP-NANA'nın substrat olarak kullanılmasıyla Neu5Gc oluşmasını, N-asetilnöraminat monooksijenaz'ın kataliz ettiği sanılmaktadır (Waters ve ark. 1992, Reuter ve Gabius 1996). Nükleustan golgi içerisine geçen SA, hem glikan akseptörlerine hem de bağlanma formlarına spesifik olan sialiltransferaz enziminin katalizi ile glikokonjugatların oligosakkarit zincirlerine transfer edilir (Waters ve ark. 1992).

SA'nın katabolizmasında sialidaz, açılnöraminat liyaz ve sialiltransferaz görev yapar. SA artıkları, hücre yüzeyi ya da serum sialoglikokonjugatlarından membran bağlı, lizozomlardan ise lizozomal sialidazlarla uzaklaştırılır. Daha sonra serbest SA molekülleri (Neu5Ac ya da Neu5Gc) nöraminat liyazla indirgenerek lizozomal membrandan sitozole transfer edilir. Bu moleküller sialiltransferazın katalizi ile aktive edilir ve golgideki diğer olgunlaşmamış glikokonjugat molekülüne transfer edilirler (Şekil 6) (Waters ve ark. 1992, Reuter ve Schauer 1994).



Şekil 6. Sialik asidin intrasellüler metabolizması (Waters ve ark. 1992).

3.MATERYAL ve METOT

Bu çalışmaya, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HADYEK) Başkanlığının 25.02.2016 tarih ve 2016/030 kodlu etik kurul onayı alındıktan sonra başlanmıştır.

3.1.Materyal

Çalışmada kullanılan Swiss albino fareler (n=35) Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Deneyleer Hayvanları Biriminden temin edilmiştir. Fareler, bir aylık adaptasyon süresi boyunca 25 ± 2 °C oda sıcaklığında, %50±5 nemli ortamda ve 12 saat gece/gündüz ışık periyodunda barındırılarak *ad libitum* standart fare yemi ve su ile beslenmişlerdir.

Fareler ağırlıklarına göre her bir grupta 7 adet olmak üzere toplam 5 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar;

1. **Kontrol grubu:** Normal *ad libitum* beslenen grup (n=7).
2. **Alkol grubu:** Resveratrol etil alkolde çözüldüğü için günlük %1'lik etil alkol verilen grup (n=7).
3. **Kadmiyum grubu:** 1 mg/kg/gün kadmiyum (CdCl₂) verilen grup (n=7).
4. **Resveratrol grubu:** 10 mg/kg/gün resveratrol ile tedavi edilen grup (n=7).
5. **Kadmiyum + Resveratrol grubu:** 1 mg/kg/gün kadmiyum (CdCl₂) ve 10 mg/kg/gün resveratrol verilen grup (n=7).

Tüm uygulamalar 21 gün süreyle oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. Uygulama süresinin sonunda hayvanlara bir gece boyunca besin verilmedi ve çalışmada kullanılmak için gerekli olan kan ve doku (karaciğer, böbrek ve kalp) numuneleri alındı.

3.1.1.Kan ile Doku Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi

Son uygulamalardan 24 saat sonra, kan örnekleri antikuagülanlı (EDTA) tüplere intrakardiyak olarak alındı ve farelere servikal dislokasyon yöntemi uygulandı. Kan örnekleri, 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları elde edildi ve örnekler analiz edilinceye kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı. Plazmada AST, ALT ve GGT enzim aktivite analizleri ticari kitlerle (Biolabo, Fransa) yapıldı.

Karaciğer, böbrek, kalp dokuları hızlı ve hasarsız bir şekilde çıkarıldı. Biyokimyasal analiz için alınan 1 g karaciğer, böbrek, kalp doku örnekleri fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 5 kat sulandırılarak buz üzerinde, 12000 rpm'de 2 dakika boyunca homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenatlar, 14000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar biyokimyasal analizler yapılacağı güne kadar -45 °C'de saklandı. Elde edilen süpernatantlardan MDA, NO, GSH ve TSA analizleri yapıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

1. Spektrofotometre (Microplate Reader Epoch, Shimadzu UV-1201))
2. Deiyonize su cihazı (Heidolpph, type-mono, Dest-3000)
3. Ayarlanabilir otomatik pipetler (Axygen 5-1000 µL)
4. Soğutmalı santrifüj (Heraeus christ)
5. Manyetik karıştırıcı (Labinco-532)
6. Homojenizatör (Wiggen Hauser)
7. Otoanalizör (HumaStar 600)
8. Buzdolabı (-20 °C) (Bosch)
9. Su banyosu (SB100, Nüve)
10. Hassas terazi (Scaltec)
11. pH metre (inoLab)
12. Vorteks (Labinco)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. p-dimetil amino benzaldehid (Merck)
2. Monosodyum hidrojen fosfat (Fluka)
3. Sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich)
4. Kalsiyum klorür (Sigma-Aldrich)
5. Disodyum hidrojen fosfat (Fluka)
6. Sodyum klorür (Sigma-Aldrich)
7. Tris-HCl (Sigma-Aldrich)
8. Hidroklorik asit (Merck)
9. NANA standartı (Sigma)
10. Trisma (Sigma-Aldrich)

11. Aseton (Sigma-Aldrich)

12. Etanol (Sigma-Aldrich)

13. Perklorik asit (Merck)

3.2.3. Doku Homojenizasyonu için Kullanılan Tampon Çözelti

0,1 M Fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH 7,4): 250 mL'lik balon jöjeye, bir miktar distile su konuldu. Üzerine 18,93 g NaCl + 3,075 g Na₂HPO₄.2H₂O + 2,075 g NaH₂PO₄.2H₂O'dan belirtilen miktarlarda hassas terazide tartılıp eklendi. Daha sonra manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözüldürüldü ve hacmi 250 mL'ye tamamlandı. Solüsyonun pH'sı 7,4'e ayarlandı.

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. Malondialdehit Tayini

Malondialdehit tayini Yoshioka ve ark. (1979) bildirdiği yöntemle tayin edildi.

Prensip: Tiyobarbütirik asit (TBA) tepkimesinde lipit içerik, düşük pH ve TBA varlığında ısıtıldığında 535 nm'de maksimum pik oluşturan stabil kırmızı-pembe renk meydana gelir. Kırmızı-pembe renk, MDA molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojenden dolayıdır.

3.3.1.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

Triklorasetik asit (% 20): 20 g triklorasetik asit (TCAA) distile suda çözüldü ve hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Tiyobarbütirik asit (% 0,67): 1,675 g tiyobarbütirik asit (TBA) distile suda çözüldü ve hacim 250 mL'ye tamamlandı.

Stok Standart Çözelti (20 mmol/L): 0,494 mL 1,1 3,3-tetraetoksipropan (d:0,92; % 97; MA: 220,3) 100 mL alkolde çözümlenerek, 20 mmol/L'lik stok standart çözelti hazırlandı.

Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması: 20 mmol/L'lik stok standart çözülden 0,1 mL alınarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 20 µmol/L'lik standart çözelti elde edildi. Bu çözelti ile 10 - 5 - 2,5 - 1,25 - 0,625 - 0,3125 µmol/L'lik dilüsyonlar hazırlanarak aşağıda açıklandığı şekilde çalışıldı. 535 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

3.3.1.2. Deneyin Yapılışı

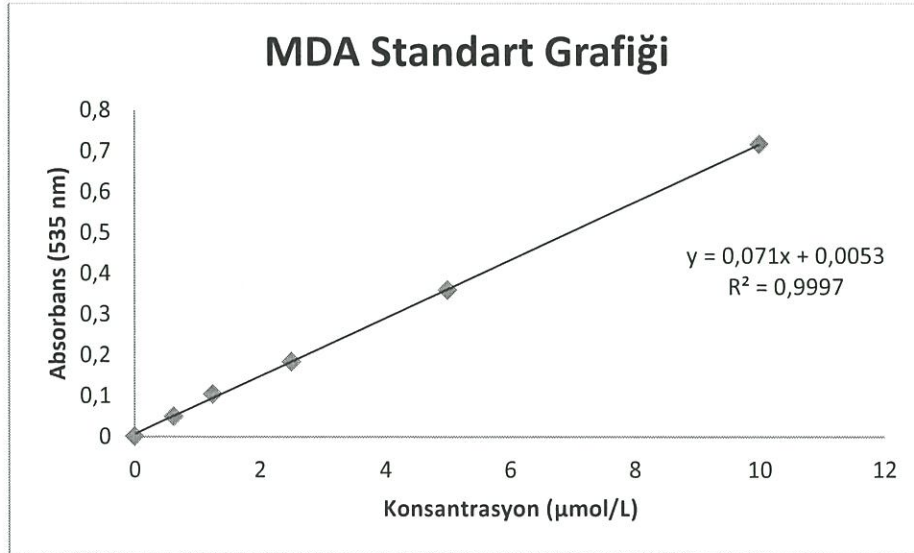
Test ve kör olarak işaretlenen cam deney tüpleri alındı ve test tüpüne 0,5 mL süpernatant, kör tüpüne 0,5 mL distile su pipetlendi. Bütün tüplere 2,5 mL % 20'lik TCAA ve 1 mL TBA ilave edildi. Tüpler 90 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi, soğutuldu ve üzerine 4 mL n-bütanol pipetlenerek 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra n-bütanol tabakası başka bir tüpe aktarılarak 535 nm'de köre karşı testin absorbanansı spektrofotometrede okundu.

Tablo 3. MDA ölçüm yöntemi

	Kör	Test
Süpernatant	-	0,5 mL
Distile su	0,5 mL	-
TCAA	2,5 mL	2,5 mL
TBA	1 mL	1 mL
90 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra tüpler su altında soğutuldu.		
n-Bütanol	4 mL	4 mL
3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.		
Oluşan tabaka ayrılarak 535 nm'de köre karşı optik dansitesi okundu.		

3.3.1.3. Sonuçların Hesaplanması

Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden hesaplanarak bulundu.



Grafik 1. MDA düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi

3.3.2.Nitrik Oksit Tayini

Nitrik oksit düzeyleri Miranda ve ark. (2001) bildirdikleri yöntemle tayin edildi.

Prensip: Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite dönüştürülür. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilen diaminedihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm’de ölçülür. Nitrit ve nitrat ölçümleri ayrı ayrı yapıldıktan sonra ikisinin toplamı NO düzeyini gösterir.

3.3.2.1.Deneyde Kullanılan Çözeltiler

Çinko Sülfat (% 10): 10 g çinko sülfat distile suda çözülerek hacim 100 mL’ye tamamlandı.

Sodyum Hidroksit (0,3 M): 1,2 g sodyum hidroksit distile suda çözülerek hacim 100 mL’ye tamamlandı.

1 M HCl: 8,29 mL HCl (d: 1,19; %37; MA: 36,46) içinde bir miktar distile su bulunan balon jofede çözülerek hacim 100 mL’ye tamamlandı.

Vanadyum (III) Klorür (% 0,8): 800 mg vanadyum (III) klorür 1 M HCl’de çözülerek hacim 100 mL’ye tamamlandı.

Sülfanilamid (% 2): 2 g sülfanilamid % 5’lik HCl’de çözülerek hacim 100 mL’ye tamamlandı.

Naftil Etilen Diamin Dihidroklorür (% 0,1): 100 mg 1-Naftil etilen diaminedihidroklorür (NEDD) distile suda çözülerek hacim 100 mL’ye tamamlandı.

Griess Ayracı: 50 mL % 0,1 NEDD ve 50 mL % 2 sülfanilamid eşit miktarda karıştırıldı.

Stok Nitrit Çözeltisi (1 mM): 6,9 mg NaNO_2 distile suda çözülerek hacim 100 mL’ye tamamlandı.

Stok Nitrat Çözeltisi (1 mM): 8,5 mg NaNO_3 distile suda çözülerek hacim 100 mL’ye tamamlandı.

Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması: 1 mM’lık stok nitrat ve nitrit çözeltilerinden 100 - 50 -25 - 12,5 - 6,25 - 3,125 μM ’lık dilüsyonlar hazırlanarak nitrat ve nitrit analizlerindeki işlemler gerçekleştirildi. 540 nm’de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrileri çizildi.

3.3.2.2. Numunelerin Deproteinize Edilmesi

400 µL doku süpernatantı üzerine 200 µL 0,3 M NaOH ilave edilerek vortekslendi ve 5 dakika beklendikten sonra 200 µL % 10'luk ZnSO₄ eklenerek tekrar vortekslendi. Numuneler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki berrak sıvı analiz için ayrıldı.

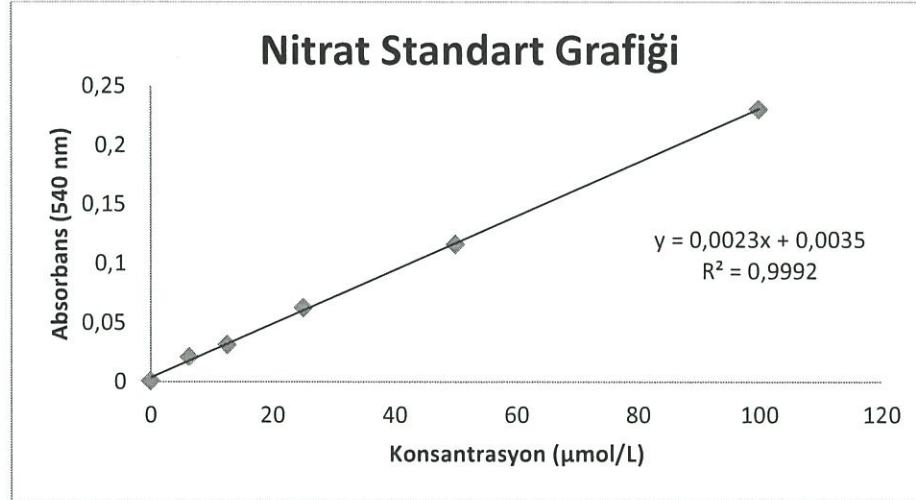
3.3.2.3. Nitrat Analizinin Yapılışı

Mikroplak kuyucuklarına 100 µL süpernatant pipetlendi. Tüm kuyucuklara 100 µL vanadyum (III) klorür ve 100 µL griess ayracı ilave edildi. 30 dakika 37 °C'de etüvde inkübe edildikten sonra 540 nm'lik dalga boyunda absorbanlar okundu.

Tablo 4. Nitrat ölçüm yöntemi

	Kör	Test
Distile su	100 µL	-
Süpernatant	-	100 µL
Vanadyum (III) klorür	100 µL	100 µL
Griess ayracı	100 µL	100 µL

37 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 540 nm'de okundu.



Grafik 2. Nitrat düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi

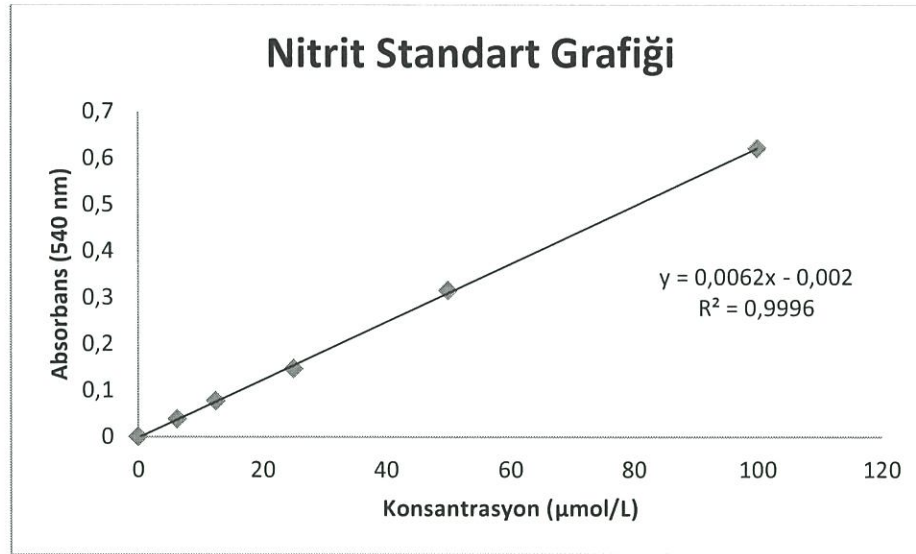
3.3.2.4. Nitrit Analizinin Yapılışı

Mikroplak kuyucuklarına 100 µL süpernatant ve 100 µL griess ayıracı pipetlendi. 30 dakika 37 °C’de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanlar 540 nm’lik dalga boyunda okundu.

Tablo 5. Nitrit ölçüm yöntemi

	Kör	Test
Distile su	100 µL	-
Süpernatant	-	100 µL
Griess ayıracı	100 µL	100 µL

37 °C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra 540 nm’de okundu.



Grafik 3. Nitrit düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi

3.3.2.5. Sonuçların Hesaplanması

Kalibrasyon eğrisinden hesaplanarak bulunan nitrat ve nitrit konsantrasyonları toplandı ve NO konsantrasyonu bulundu.

$$\text{NO } (\mu\text{M}) = \text{Nitrat } (\mu\text{M}) + \text{Nitrit } (\mu\text{M})$$

3.3.3. Glutasyon Tayini

Glutasyon analizi Beutler ve ark. (1963) bildirdikleri yöntemle tayin edildi.

Prensibi: GSH sistein, glutamik asit ve glisinden oluşan bir tripeptittir. Metafosforik asit ile sülfidril (-SH) grupları taşımayan tüm proteinler çöktürülür. GSH, meydana gelen berrak sıvıda -SH gruplarının DTNB (5,5'-2-ditiobis nitrobenzoik asit) ile oluşturduğu sarı renkli kompleks, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülür.

3.3.3.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

Çöktürücü çözelti: 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Fosfat çözeltisi (0.3 M Na₂HPO₄): 53,4 g Na₂HPO₄.2H₂O distile suda çözülerek hacim litreye tamamlandı.

Sodyum sitrat çözeltisi (%1): 1 g sodyum sitrat alınarak hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

DTNB (Ellman's çözeltisi): 40 mg DTNB alındı ve %1'lik sodyum sitrat ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Standart GSH çözeltisi: 20 mg GSH distile suda çözüldü ve hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması:

20 mmol/L'lik stok standart çözeltiden 0,1 mL alınarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 20 µmol/L'lik standart çözelti elde edildi. Bu çözelti ile 20 – 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,3125 µmol/L'lik dilüsyonlar hazırlanarak aşağıda açıklandığı şekilde çalışıldı. 412 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

3.3.3.2. Deneyin Yapılışı

Kör ve test olarak işaretlenen cam deney tüpleri alındı ve test tüpüne 200 µl süpernatant alındı. Üzerine 1800 µl distile su ve 3 mL çöktürücü çözelti eklendi. Kör olarak işaretlenen tüpe 2000 µl distile su üzerine 3 mL çöktürücü çözelti eklendi. Tüpler karıştırıldı ve buzlu suda 5 dk bekletildi, 3000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Kör tüp aynen alındı, test olarak işaretlenen tüplerden yeni tüplere 2'şer mL süpernatanttan alındı. Bütün tüplere 8'er mL fosfat çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. 1 mL DTNB eklenip, 412 nm dalga boyunda köre karşı testlerin optik dansitesi okundu.

Tablo 6. GSH ölçüm yöntemi

	Kör	Test
Süpernatant	-	200 µl
Distile su	2000 µl	1800 µl
Çöktürücü çözelti	3 mL	3 mL

Buzlu suda 5 dakika bekletildi. Ardından 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve başka tüplere süpernatanttan 2 mL aktarıldı.

Fosfat çözeltisi	8 mL	8 mL
------------------	------	------

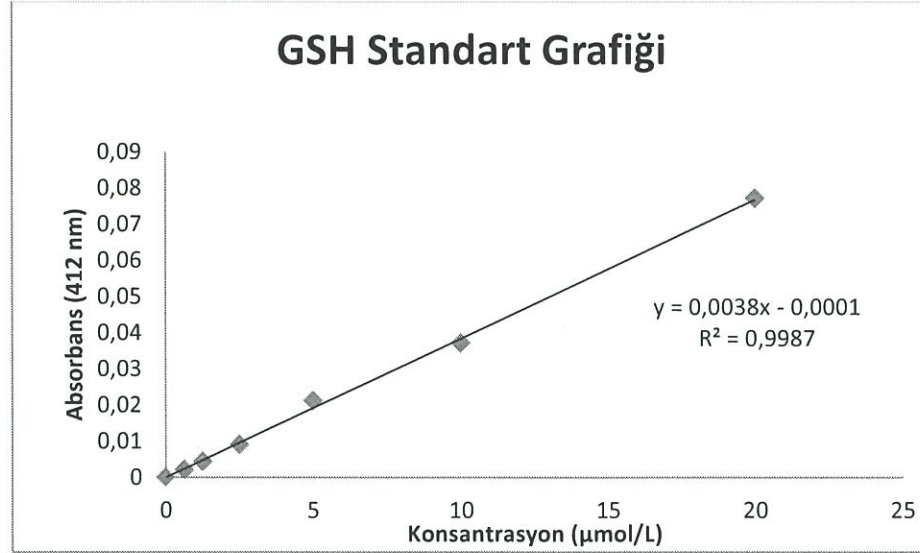
Karıştırıldı

DTNB	1 mL	1 mL
------	------	------

412 nm'de tüplerin optik dansiteleri köre karşı okundu.

3.3.3.3.Sonuçların Hesaplanması

Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden hesaplanarak bulundu.



Grafik 4. GSH düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi

3.3.4.Total Siyalik Asit Tayini

Total siyalik asit tayini Sydow'un (1985) metoduna göre yapıldı.

3.3.4.1.Deneyde Kullanılan Çözeltiler

% 5'lik Perklorik asit çözeltisi: Konsantrasyonu % 71 olan perklorik asitten 7,04 mL alınarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Ehrlich ayraç: 5 g p-dimetilaminobenzaldehit 50 mL yoğun HCl içerisinde çözüldü ve üzerine 50 mL distile su ilave edilerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı (Her analizden önce taze olarak hazırlandı).

Standart N-asetil nöraminik asit (NANA) çözeltisi: 100 mg NANA distile suda çözüldü ve hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması:

100 mg/dL NANA stok standart çözeltisinden 100 – 50 – 25 – 12,5 mg/dL'lik dilüsyonlardan 3 tüp hazırlanarak metot uygulandı ve optik dansiteleri okundu. Elde edilen optik dansitelerin ortalama değerleri alınarak 525 nm'de köre karşı okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

3.3.4.2.Deneyin Yapılışı

Kör ve test olarak işaretlenen cam deney tüpleri alındı. Kör tüpüne 0,2 mL distile su, test tüpüne ise 0,2 mL süpernatant alındı. Sonra kör ve test tüplerinin üzerine 1,5 mL % 5'lik perklorik asit ilave edildi. 100 °C'de 5 dakika kaynatıldı ve hemen soğutuldu. Tüpün dibinde oluşan tortu 2500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 1 mL alınarak diğer temiz tüplere aktarıldı. Üzerine 0,2 mL Ehrlich ayraç ilave edilerek 100 °C'de 15 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra tüpler tekrar soğutuldu ve 1 mL distile su ilave edilerek 525 nm'de köre karşı testlerin optik dansiteleri spektrofotometrik olarak okundu.

Tablo 7. TSA ölçüm yöntemi

	Kör	Test
Distile su	0,2 mL	-
Süpernatant	-	0,2 mL
%5'lik perklorik asit	1,5 mL	1,5 mL

100 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve hemen soğutuldu.

2500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant	1 mL	1 mL
Ehrlich ayraçı	0,2 mL	0,2 mL

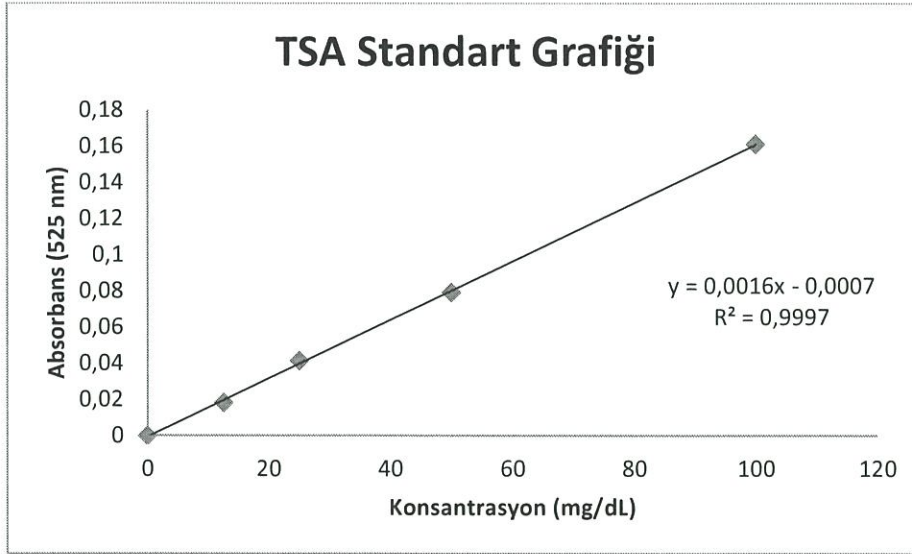
100 °C'de 15 dakika inkübe edildi ve hemen soğutuldu.

Distile su	1 mL	1 mL
-------------------	------	------

525 nm'de köre karşı okundu.

3.3.4.3.Sonuçların Hesaplanması

Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden hesaplanarak bulundu.

**Grafik 5.** TSA düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi

3.4.İstatiksel Analiz

Verilerin analiz sonuçları SPSS 16.0 Paket Programında OneWay ANOVA-SNK testi kullanılarak $p<0.05$ önem derecesinde belirlenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler aritmetik ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada elde edilen karaciğer, böbrek ve kalp doku örneklerinde MDA, NO, GSH, TSA, plazmada ise AST, ALT ve GGT enzim aktivite düzeylerine ait bulgular ve istatistiksel önemi Tablo 8-11'de, bulguların grafiksel değerlendirilmesi ise sırası ile Şekil 7-12'de gösterildi.

Karaciğer dokusu için; kadmiyum verilen grupta kontrole göre, MDA ($P<0.01$), NO ve TSA ($P<0.001$) düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı, GSH ($P<0.05$) düzeylerinin ise azaldığı tespit edildi. Kadmiyum+Resveratrol verilen grupta ise kadmiyumun MDA ve GSH konsantrasyonlarına yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Ayrıca Kadmiyum+Resveratrol grubunda MDA ve GSH konsantrasyonları için kontrole karşı yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Fakat NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görülmekte kontrolle karşı istatistiksel olarak fark görülmektedir.

Tablo 8. MDA, GSH, NO ve TSA karaciğer doku düzeyleri

KARACİĞER	MDA ($\mu\text{mol/g}$ ıslak doku)	GSH ($\mu\text{mol/g}$ ıslak doku)	NO ($\mu\text{mol/g}$ ıslak doku)	TSA (mg/g ıslak doku)
Kontrol	0.51±0.02 ^x	3.84±0.11 ^x	0.73±0.04 ^{xy}	0.65±0.06 ^x
Alkol	0.49±0.01 ^x	3.81±0.06 ^x	0.67±0.04 ^x	0.61±0.04 ^x
Kadmiyum	0.78±0.03 ^y	2.74±0.07 ^y	1.32±0.04 ^z	1.47±0.05 ^y
Resveratrol	0.49±0.01 ^x	3.77±0.08 ^x	0.84±0.03 ^{yt}	0.68±0.03 ^x
Kadmiyum+Resveratrol	0.56±0.02 ^x	3.68±0.05 ^x	0.91±0.05 ^t	0.84±0.03 ^z
P Değeri	$P<0.01$	$P<0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$

^{t,x,y,z}: Her sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir ($p<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$).

Böbrek dokusu için; kadmiyum verilen grupta kontrole göre, MDA, NO ve TSA ($P<0.001$) düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı, GSH ($P<0.01$) düzeylerinin ise azaldığı tespit edildi. Kadmiyum+Resveratrol verilen grupta ise kadmiyumun MDA ve GSH konsantrasyonlarına yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Ayrıca Kadmiyum+Resveratrol grubunda MDA ve GSH konsantrasyonları için kontrole karşı yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Fakat NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak

kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görülmekte kontrolle karşı istatistiksel olarak fark görülmektedir.

Tablo 9. MDA, GSH, NO ve TSA böbrek doku düzeyleri

BÖBREK	MDA ($\mu\text{mol/g}$ ıslak doku)	GSH ($\mu\text{mol/g}$ ıslak doku)	NO ($\mu\text{mol/g}$ ıslak doku)	TSA (mg/g ıslak doku)
Kontrol	1.67 \pm 0.03 ^x	4.58 \pm 0.08 ^x	2.08 \pm 0.07 ^x	5.33 \pm 0.12 ^x
Alkol	1.59 \pm 0.03 ^x	4.61 \pm 0.05 ^x	2.06 \pm 0.08 ^x	5.28 \pm 0.05 ^x
Kadmiyum	2.18 \pm 0.08 ^y	4.12 \pm 0.06 ^y	3.14 \pm 0.09 ^y	8.24 \pm 0.11 ^y
Resveratrol	1.62 \pm 0.05 ^x	4.53 \pm 0.07 ^x	2.27 \pm 0.09 ^{xz}	5.62 \pm 0.07 ^z
Kadmiyum+Resveratrol	1.73 \pm 0.04 ^x	4.47 \pm 0.07 ^x	2.39 \pm 0.07 ^z	5.97 \pm 0.09 ^t
P Değeri	P<0.001	P<0.01	P<0.001	P<0.001

^{t,x,y,z}: Her sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir (P<0.01, P<0.001).

Kalp dokusu için; kadmiyum verilen grupta kontrolle göre, MDA, NO ve TSA (P<0.001) düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı, GSH (P<0.01) düzeylerinin ise azaldığı tespit edildi. Kadmiyum+Resveratrol verilen grupta ise kadmiyumun MDA konsantrasyonuna yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Ayrıca Kadmiyum+Resveratrol grubunda MDA konsantrasyonu için kontrolle karşı yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Fakat GSH, NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görülmekte kontrolle karşı istatistiksel olarak fark görülmektedir.

Tablo 10. MDA, GSH, NO ve TSA kalp doku düzeyleri

KALP	MDA ($\mu\text{mol/g}$ ıslak doku)	GSH ($\mu\text{mol/g}$ ıslak doku)	NO ($\mu\text{mol/g}$ ıslak doku)	TSA (mg/g ıslak doku)
Kontrol	1.09 \pm 0.03 ^x	0.82 \pm 0.06 ^x	1.94 \pm 0.08 ^x	1.35 \pm 0.06 ^x
Alkol	1.12 \pm 0.04 ^x	0.84 \pm 0.04 ^x	1.97 \pm 0.06 ^x	1.33 \pm 0.05 ^x
Kadmiyum	1.96 \pm 0.05 ^y	0.56 \pm 0.04 ^y	2.86 \pm 0.05 ^y	2.94 \pm 0.08 ^y
Resveratrol	1.15 \pm 0.04 ^x	0.79 \pm 0.04 ^{xz}	2.11 \pm 0.05 ^{xz}	2.07 \pm 0.07 ^z
Kadmiyum+Resveratrol	1.27 \pm 0.06 ^x	0.65 \pm 0.04 ^{yz}	2.24 \pm 0.05 ^z	2.26 \pm 0.05 ^z
P Değeri	P<0.001	P<0.01	P<0.001	P<0.001

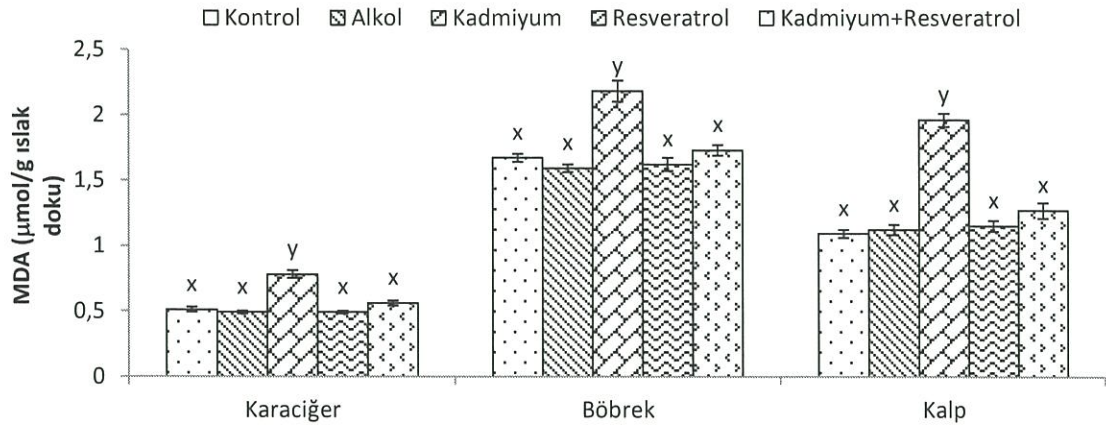
^{x,y,z}: Her sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir (P<0.01, P<0.001).

Plazmada; kadmiyum verilen grupta kontrole göre, AST, ALT ve GGT ($P<0.001$) enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak arttığı tespit edildi. Kadmiyum+Resveratrol verilen grupta ise kadmiyumun AST ve ALT enzim aktivitelerine yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Ayrıca Kadmiyum+Resveratrol grubunda AST ve ALT enzim aktiviteleri için kontrole karşı yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. GGT enzim aktivitesinde ise resveratrolün kadmiyumun olumsuz etkisini tolere ettiği görüldü.

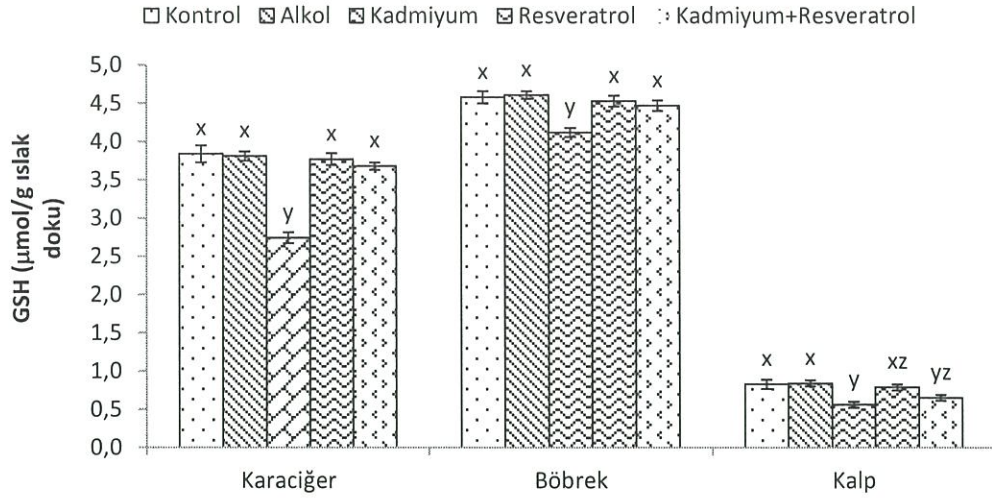
Tablo 11. AST, ALT ve GGT plazma enzim aktiviteleri

PLAZMA	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (IU/L)
Kontrol	142.38±2.86 ^{xy}	53.18±3.85 ^{xy}	2.78±0.04 ^x
Alkol	144.24±6.56 ^{xy}	57.62±2.95 ^{xy}	2.82±0.07 ^x
Kadmiyum	212.78±5.13 ^z	105.31±3.33 ^z	8.63±0.38 ^y
Resveratrol	134.74±3.78 ^x	50.67±2.44 ^x	3.15±0.14 ^x
Kadmiyum+Resveratrol	158.83±6.88 ^y	55.23±1.67 ^y	4.52±0.07 ^z
P Değeri	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$

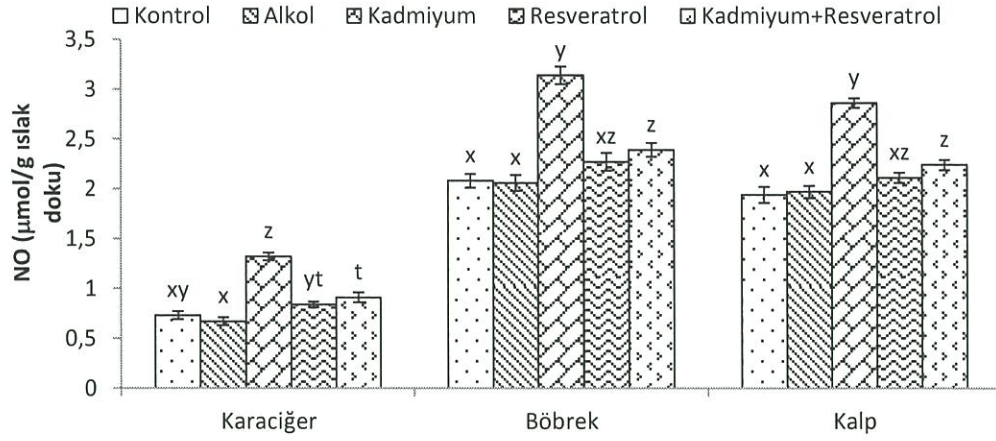
^{x,y,z}: Her sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farkı göstermektedir ($P<0.001$).



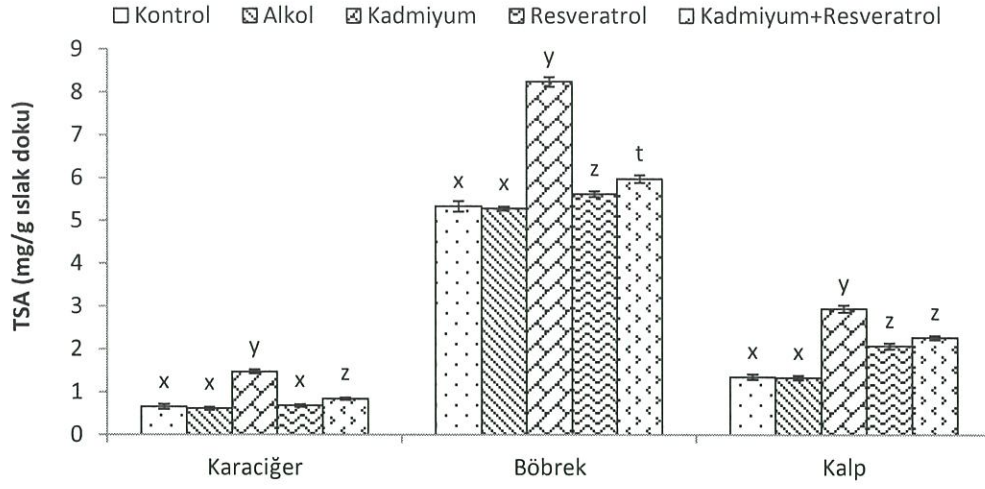
Şekil 7. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusundaki MDA miktarındaki değişimler. ^{x,y}: Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$, $P<0.001$).



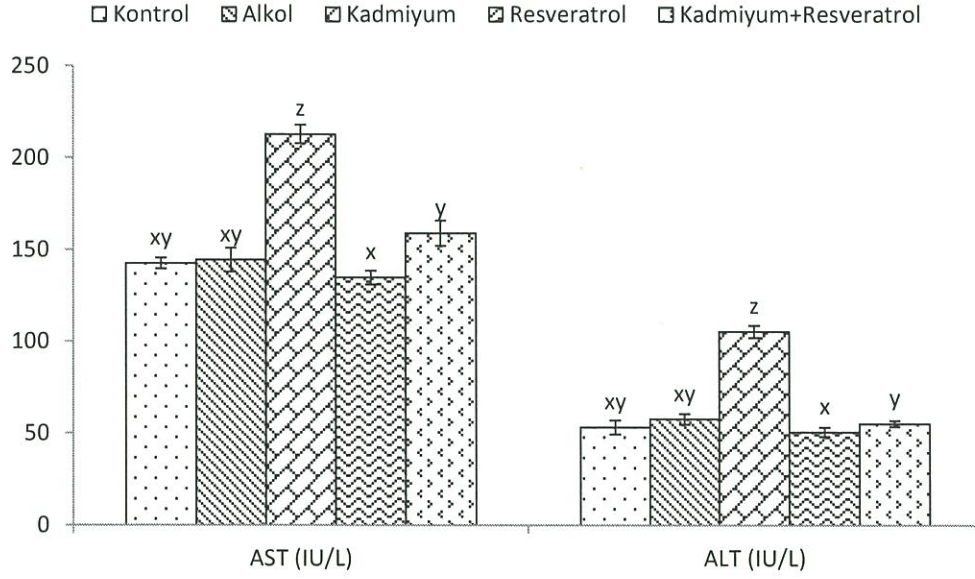
Şekil 8. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusundaki GSH miktarındaki değişimler. ^{x,y,z}: Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir (P<0.05, P<0.01).



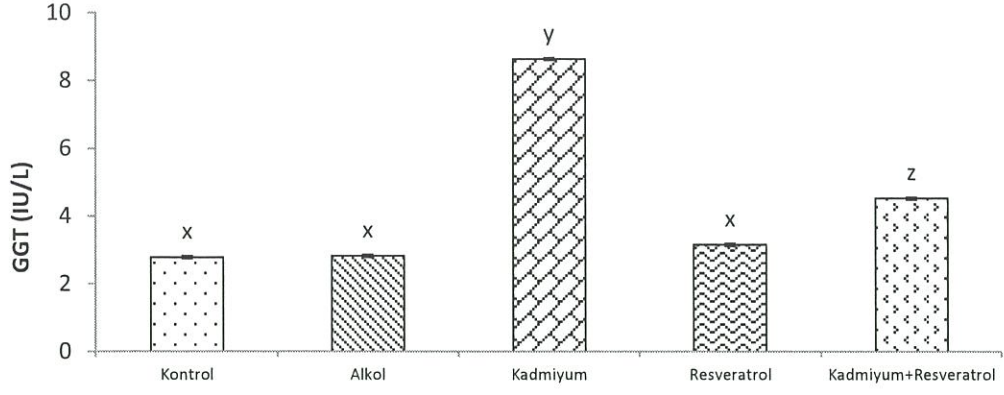
Şekil 9. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusundaki NO miktarındaki değişimler. ^{x,y,z,t}: Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir (P<0.001).



Şekil 10. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusundaki TSA miktarındaki değişimler. ^{x,y,z,t}: Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir (P<0.001).



Şekil 11. Plazma AST ve ALT enzim aktivitelerindeki değişimler. ^{x,y,z}: Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir (P<0.001).



Şekil 12. Plazma GGT enzim aktivitesindeki değişimler. ^{x,y,z}: Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir (P<0.001).

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Kadmiyum ve diğer ağır metaller hem çevresel hem de mesleki maruziyetlerle insan sağlığını tehdit etmektedir. Kadmiyum, yiyecekler ve su gibi doğal kaynaklara karışmakta ve bu yolla da besin zincirine girebilmektedir. Kadmiyumun yarı ömrünün uzun olması ve sanayide yaygın olarak kullanımından dolayı ve hemen hemen tüm sistemlere toksik etki gösterebilmesi sebebiyle ayrı bir öneme sahiptir (Park ve ark. 2001, Waisberg ve ark. 2003, Wang ve Du 2013). İnsan yaşamını etkileyen önemli kadmiyum kaynakları; sigara dumanı, rafine edilmiş yiyecek maddeleri, su boruları, kahve, çay, kömür yakılması, kabuklu deniz ürünleri, kullanılan gübreler ve endüstriyel üretim aşamalarında oluşan baca gazlarıdır (Bridges ve Zalups 2005, Godt ve ark. 2006, Prozialeck ve ark. 2006). Pulmoner ve gastrointestinal absorpsiyonun ardından büyük bir kısmı karaciğer ve böbrekte birikir ve idrarla atılır. Karaciğerde küçük peptidler ve sülfidril grupları aracılığı ile glutasyon veya afinitesi daha yüksek olan metal bağlayıcı protein olan metalloprotein gibi proteinlerle kompleksler oluşturur (Chan ve Cherian 1992, Kim ve ark. 2013, Rafati ve ark. 2015). Oluşan bu kompleksler azot grubu taşıyan moleküllerle veya iz elementlerle etkileşerek antioksidan sistemlerin etkinliğinin azalmasına neden olur. Sonuç olarak, hücre içinde DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve proteinlerde değişiklikler oluşturarak hücrelerin fonksiyonlarını bozarlar (Leonard ve ark. 2004, Valko ve ark. 2007).

Kadmiyumla ilgili yapılan çalışmalarda, kadmiyumun karsinogenik etkisinin yanı sıra, hem akut hem de kronik maruziyetiyle birçok organda hasara neden olduğu gösterilmiştir. Akut kadmiyum zehirlenmesinde, kadmiyumun dolaylı olarak reaktif oksijen türleri ve radikallerin üretimine neden olduğu düşünülmektedir (Liu ve ark. 2002, Murugavel ve ark. 2007). Oksidan düzeyini arttıran etmenlere karşı hücrenin yaşamını sürdürebilmesi, organizmanın serbest radikallerden koruyucu biyokimyasal savunma mekanizmalarına sahip olmasına bağlıdır. Tüm memeli hücreleri zararlı radikallere karşı savunma sistemleriyle donatılmıştır (Droge 2002, Valko ve ark. 2007, Liu ve ark. 2007). Aslında organizmamız, doğuştan var olan antioksidan enzimler sayesinde kendi kendini koruyabilmektedir. Ancak bu bazı durumlarda yeterli olmamaktadır. Bu nedenle organizmanın dışarıdan antioksidan özelliği olan

kimyasalları içeren besin maddeleri ile desteklenmesi gerekmektedir (Nandi ve ark. 2006).

Güçlü bir antioksidan olan resveratrol, stilbenlerin alt grubunda yer alan 3.5.4'-hidroksistilben yapısındadır. Resveratrolün trans ve cis olmak üzere iki izomerik formu vardır (Bertelli ve ark. 1996, Burkitt ve Duncan 2000). Resveratrol üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yaprağı, keçi kulağı, yaban mersininde ve dut gibi birçok bitki türünde bulunan ve antiinflamatuvar, antioksidan, antitümör ve immunomodulatör özellikleri olan doğal bir polifenolik bileşiktir (Pervaiz 2004, Signorelli ve Ghidoni 2005, Gerogiannaki-Christopoulou ve ark. 2006, Planas ve ark. 2011, Ergin ve Yaylalı 2013). Oksidatif strese bağlı olarak oluşan hücresel hasarları ve apoptozu önleyerek süperoksit anyonlarını ve hidrojen peroksiti hücreden uzaklaştırmada oldukça güçlü bir etkiye sahiptir (Das ve Maulik 2006, Valko ve ark. 2007, Liu ve ark. 2007). Ayrıca lipoprotein metabolizmasını düzenler ve yaşlanmaya karşı da etkilidir (Das ve ark. 2006). Yapılan çalışmalarda resveratrolün böbrek, kalp ve beyin dokularında koruyucu özelliği olduğu gösterilmiştir (Giovannini ve ark. 2001). Ek olarak resveratrol hücre içi antioksidan miktarını arttırabilir, glutatyon peroksidaz, glutatyon-s-transferaz ve glutatyon redüktaz gibi birçok antioksidan enzimin de artışına neden olabilir (Pedras ve Ahiahonu 2005). Ratlara uygulanan resveratrolün böbrekte ve plazmada 60 dakikada, kalpte 120 dakikada, karaciğerde 30 dakikada, maksimum derişime ulaştığı gözlenmiştir (Bertelli ve ark. 1996).

Deney hayvanlarında yapılan birçok çalışmanın sonuçlarına göre akut kadmiyuma maruz kalma durumunda oksidatif stresin artarak öncelikle karaciğer hasarı ve kadmiyum toksisitesine neden olduğu bildirilmektedir (Manca ve ark. 1991, Sarkar ve ark. 1995, Bagchi ve ark. 1996). El-Demerdash ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada, 5 mg/kg dozda 15 gün boyunca oral gavaj yoluyla CdCl₂ uygulamasının karaciğer dokusunda hücre hasarı oluşturduğu gösterilmiştir. Yapılan farklı bir çalışmada, kadmiyum uygulaması sonucunda karaciğerde hasar olduğu ve karaciğer homojenatlarında MDA düzeyinin arttığı, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinde ise düşüş saptandığı bildirilmiştir (Koyu ve ark. 2006). NO'in ise hipertansiyon, astım, septik şoka kadar değişken bir dizi hastalıkların patogenezinde rol oynadığına inanılmaktadır. NO'in DNA hasarını arttırdığı, demirsülfür içeren enzimlerin fonksiyonunu değiştirdiği ve mitokondriyal solunumu

bozduğu bildirilmektedir (Gross ve Wolin 1995). *In vitro* bir çalışmada ortamdaki kadmiyumun endotel huceleri tarafından üretilen NO'ı inhibe ettiği (Kishimoto ve ark. 1994), başka bir çalışmada ise kronik kadmiyum maruziyeti sonrasında ratların plazma NO düzeylerini duřrdđđ gösterilmiştir (Skoczynska ve Martynowicz 2005). Çalışmamızda ise karaciğer dokusunda kadmiyum verilen grupta kontrole göre MDA, NO ve TSA düzeyleri artarken, kadmiyum+resveratrol verilen grupta MDA seviyelerinin resveratrol aracılı olarak önlendiği fakat NO ve TSA konsantrasyonlarında istatistiksel olarak bir farkın oluşmadığı grlmuştur.

Karaciğer kadmiyum toksikasyonu için önemli bir hedeftir. Bunun nedeni tiyol gruplarınca zengin ve düşük molekül ağırlıklı metal bağlama özelliğine sahip olan metallothionein proteinlerinin sentezinin karaciğerde olmasıdır (Coyle ve ark. 2000). Shiraishi ve ark. (1994) tek başına kadmiyum uygulaması sonucu karaciğer metallothionein miktarının arttığını göstermiştir (Gawel ve ark. 2004). Metallothioneinlerin yanında hücresel antioksidan savunma sistemlerinin işlevselliği de bir diğer önemli husustur. Ratlarda yapılan bir çalışmada, kadmiyum uygulaması sonucunda karaciğer süperoksit dismutaz ile katalaz aktivitelerinde düşüş saptandığı bildirilmiştir (Koyu ve ark. 2006). Yaptığımız çalışmada da literatürdeki bilgilere paralel olarak kadmiyum verilen grubun karaciğer dokularında kontrole kıyasla GSH düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir ve aynı zamanda kadmiyum+resveratrol verilen grupta GSH konsantrasyonlarının kontrol düzeyine yaklaştığı grlmuştur. Bu koruyucu etkinin, resveratrolün hücresel antioksidan savunmayı güçlendirmesi yoluyla şekillendiği kanaatindeyiz.

Plazmada ALT, AST ve GGT karaciğer enzim belirteçleridir. İlk iki enzim hepatositlerde sentezlenirken, son enzim safra kanalı epitelyum hucelerinde sentezlenmektedirler. Bu enzimler karaciğer ve safra yollarına özgü olmayıp ALT ve AST, iskelet kası ile kalp kasında, GGT ise böbreklerde sentezlenmektedir (Pratt ve Kaplan 2000). GGT'nin diabetes mellitusta ve alkol kullanımında yükseldiği bilinmektedir (Goldberg ve Martin 1975). Farelerde oluşturulan deneysel toksikasyon sonucunda ise AST ve ALT aktivitesindeki yükselmeyi resveratrol uygulanmasının duřrdđđ bildirilmiştir (Sener ve ark. 2006). Elde ettiğimiz bulgularda da literatürde sunulan bilgiler ile paralel olarak plazma AST, ALT ve GGT enzim aktivitelerinin kadmiyum verilen grupta kontrol grubuna nazaran,

istatistiksel olarak arttığını göstermekle birlikte kadmiyum+resveratrol uygulamasının AST ve ALT enzim aktivitelerini fizyolojik sınırlara çektiği görülmüştür. Ayrıca kadmiyum+resveratrol grubunda AST ve ALT enzim aktiviteleri için kontrole karşı yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Fakat GGT enzim aktivitesinde resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görülse de kontrole kıyasla istatistiksel bir farkın varlığı tespit edilmiştir.

Böbrekler ise kadmiyum toksikasyonunda sekonder hedef organ olarak değerlendirilmektedir. Çünkü kadmiyum boşaltım sistemi yoluyla vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Kan ve karaciğerden süzülen kadmiyumun % 70'i böbrek proksimal tübülleri tarafından alınır. Yoğun kadmiyum maruziyetinde böbreklerin hasar görmesiyle kandan asitleri uzaklaştırma fonksiyonları yok edilmektedir. Böbreklerdeki fonksiyon bozukluğu kanda yüksek asit seviyesiyle seyreden birçok hastalığa sebep olmaktadır (Tsuruoka ve ark. 2000). Renugadevi ve Prabu (2009) yaptıkları çalışmada 4 hafta boyunca 5 mg/kg CdCl₂'ün oral gavaj yoluyla uygulamasının böbrek dokusunda hasar meydana getirdiğini ortaya koymuşlardır. Yapılan farklı bir çalışmada da, tek başına kadmiyum uygulamasının böbrek metallothionein miktarlarında önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (Shiraishi ve ark. 1994, Gawel ve ark. 2004). Bu bilgilere ek olarak resveratrolün iskemik böbrek modelinde lipid peroksidasyon seviyesini düşürdüğü bilinmektedir (Sener ve ark. 2006). Elde ettiğimiz veriler göre böbrek dokularında, kadmiyum verilen grupta kontrole grubuna kıyasla, MDA, NO ve TSA düzeylerinin istatistiksel olarak arttığını, GSH düzeylerinin ise azaldığını göstermekte olup, kadmiyum+resveratrol verilen grupta kadmiyumun MDA ve GSH konsantrasyonlarına yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Çünkü aynı grubun MDA ve GSH konsantrasyonları için kontrole karşı yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Fakat NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görünse de kontrole karşı istatistiksel farkın şekillendiği görülmektedir.

Kadmiyumun, kalpte metabolik ve yapısal bozuklukların yanı sıra hipertansiyon oluşumunda da etkili olduğu belirtilmektedir (Tomera ve ark. 1991). Kardiyomiyositlerde mitokondri hasarı oluşturarak hücre solunum ve enerji

metabolizmasında bozulmaya neden olduğu bilinmektedir (Skowerski ve ark. 2000). Ayrıca kadmiyumun kalpte birikme oranının, karaciğer ve böbrekle kıyaslandığında oldukça düşük olduğu kaydedilmiştir (Tomera ve ark. 1991). Kadmiyum okside maruz kalan işçilerde, kardiyovasküler sistem hastalıklarının görülme sıklığının 4 kat arttığı rapor edilmiştir (Vorobieva ve Eremeeva 1980). Yapılan çalışmalar resveratrolün kalp dokusu için koruyucu etkilere sahip olduğunu işaret etmektedir (Giovannini 2001). Ek olarak rat aorta düz kas hücre kültürlerinde yapılan farklı bir çalışmada, resveratrol uygulamasının hücresel GSH düzeyini kontrol gruba göre anlamlı derecede yükselttiği bildirilmiştir (Li ve ark. 2006). Verilerimiz literatürdeki bilgilere paralel olarak kadmiyumun kontrol grubuna nazaran kalp dokularında MDA, NO ve TSA düzeylerini istatistiksel olarak arttırdığını fakat GSH düzeylerini ise azalttığını göstermektedir. Kadmiyum+Resveratrol verilen grupta ise kadmiyumun MDA konsantrasyonuna yapmış olduğu olumsuz etkiyi resveratrolün önlediği görülmüştür. Çünkü aynı grubun MDA konsantrasyonu için kontrole karşı yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Fakat GSH, NO ve TSA konsantrasyonlarında resveratrol sayısal değer olarak kadmiyumun etkisini önlemiş gibi görülmekte. Lindberg ve ark. (1991) yaptıkları bir çalışmada, serum TSA konsantrasyonları ile kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle ölümler arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Bu yönüyle çalışmamızda, resveratrol aracılı olarak düşen TSA seviyelerinin, pozitif kardiyovasküler etkilerinin de olduğu söylenebilir.

Çalışma sonuçları kadmiyum uygulanan farelerin karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda oksidatif stresin indüklendiğini ve antioksidan sistemin kadmiyumun toksik etkisini elimine etmede yetersiz kaldığını göstermektedir. Resveratrol ve kadmiyum+resveratrol uygulanan farelerde ise karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda ise oksidatif stresin azaldığı ve antioksidan sistemin kadmiyumun toksik etkisini azaltarak doku hasarını önlediği kanısına varıldı.

6.KAYNAKLAR

Akesson A, Barregard L, Bergdahl IA, Nordberg GF, Nordberg M, Skerfving S: Non-renal effects and the risk assessment of environmental cadmium exposure. *Environ Health Perspect*, 122: 431-438, 2014.

Altıntaş A, Kurtdele A, Fidancı UR, Brk MK: Köpek gençlik hastalığında (distemper) serum sialik asit ve protein düzeylerinin klinik nemi. *Ankara niv Vet Fak Derg*, 36(1): 154-164, 1989.

Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S: Effects of stilbene components of the roots of polygonum cuspidatum SIEB. et ZUCC. on lipid metabolism. *Chem. Pharm. Bull.*, 30(5): 1766-1770, 1982.

Atakisi E, Merhan O: Nitric oxide synthase and nitric oxide involvement in different toxicities, nitric oxide synthase - simple enzyme-complex roles, seyed soheil saeedi saravi, *IntechOpen*, 2017.

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for cadmium, 2012.

Aumont V, Krisa S, Battaglia E, Netter P, Richard T, Merillon JM, Magdalou J, Sabolovic N: Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human. *Arch. Biochem. Biophys*, 393: 281–289, 2001.

Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ: Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague–Dawley rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 52(2): 143–154, 1996.

Baur JA, Pearson KJ, Price NI, Jamieson Ha, Lerin C, Kalra A Et Al: Resveratrol improves health and survival of mice on a highcalorie diet. *Nature*, 444(7117): 337-342, 2006.

Bayir H: Reactive oxygen species. *Crit Care Med.*, 33(12 Suppl): 498-501, 2005.

Beijers R, Gosker HR, Schols A: Resveratrol for patients with chronic obstructive pulmonary disease: hype or hope?. *Cur Opin Clin Nutr Metab Care*, 21: 138-144, 2018.

Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L: Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res.*, 24(3): 133-138, 1998.

Bertelli AA, Giovannini L, Bernini W, Migliori M, Fregoni M, Bavaresco L, Bertelli A: Antiplatelet activity of cis-resveratrol. *Drugs Exp Clin Res.*, 22(2): 61-63, 1996.

Bertin G, Averbeck D: Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(11): 1549-1559, 2006.

Beutler E, Duron O, Kelly BM: Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, 882-888, 1963.

Blond JP, Denis MP, Bezard J: Antioxidant action of resveratrol in lipid peroxidation. *Sci. Aliment.*, 15: 347-358, 1995.

Bridges CC, Zalups RK: Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 204(3): 274- 308, 2005.

Burkitt MJ, Duncan J: Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys.*, 381(2): 253-263, 2000.

Büyükoğlu T, Aslan N: Oksidatif Stres ve Geçiş Dönemi Süt Sığırlarında Oksidatif Stresin Etkileri. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 9(2): 33-41, 2018.

Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK: Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol.*, 3:141, 2012.

Chachay VS, Kirkpatrick CM, Hickman IJ, Ferguson M, Prins JB, Martin JH: Resveratrol--pills to replace a healthy diet? *Br J Clin Pharmacol.*, 72(1): 27-38. 2011.

Chan HM, Cherian MG: Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium. *Toxicol.*, 72(3): 281-290, 1992.

Chanvitayapongs S, Draczynska-Lusiak B, Sun AY: Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuroreport.*, 8(6): 1499-1502, 1997.

Conti EM, Cecchetti G: A biomonitoring study: Trace metals in algae and mollusks from Tyrrhenian coastal areas. *Environmental Research*, 93(1): 99-112, 2003.

Coyle P, Niezing G, Shelton TL, Philcox JC, Rofe AM: Tolerance to cadmium hepatotoxicity by metallothionein and zinc: in vivo and in vitro studies with MT-null mice. *Toxicol.*,150 (1-3): 53-67, 2000.

Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gözükara EM: Nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'in fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin Pediatri.*, 10: 226-236, 2001.

Das DK, Maulik N: Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv.*, 6(1): 36-47, 2006.

Das S, Das DK: Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy - Drug Targets.*, 6(3): 168-173, 2007.

De Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM: Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica.*, 30(11): 1047-1054, 2000.

Draczynska-Lusiak B, Doung A, Sun AY: Oxidized lipoproteins may play a role in neuronal cell death in Alzheimer disease. *Mol. Chem. Neuropath.*, 33(2): 139-148, 1998.

Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, 82: 47-95, 2002

El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH: Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food Chem Toxicol.*, 42(10): 1563-1571, 2004.

El-Ebiary AA, El-Ghaiesh S, Hantash E, Alomar S: Mitigation of cadmium-induced lung injury by *Nigella sativa* oil. *Environ Sci Poll Res*, 23(24): 25356-25363, 2016.

Ergin K, Yaylalı A: Resveratrol ve etkileri üzerine bir gözden geçirme. *SDÜ Tıp Fak Derg*, 20: 115-120, 2013.

Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM: Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. *Life Sci.*, 61(21): 2103-2110, 1997.

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE: Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.*, 341(8852):1103-1104, 1993.

Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P: Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek.*, 57(9-10): 453-455, 2004.

Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL: Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 94(25): 14138–14143, 1997.

Gerogiannaki-Christopoulou M, Athanasopoulos P, Kyriakidis N, Gerogiannaki IA, Spanos M: Trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*, 17(9): 700-706, 2006.

Gescher AJ, Steward WP: Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 12(10): 953-957, 2003.

Giovannini L, Migliori M, Longoni BM, Das DK, Bertelli AA, Panichi V, Filippi C, Bertelli A. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. *Journal of Cardiovascular Pharmacol.*, 37(3): 262–270, 2001.

Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA: The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol*, 1: 22, 2006.

Goldberg DM, Martin JV: Role of gamma-glutamyl transpeptidase activity in the diagnosis of hepatobiliary disease. *Digestion* .,12:232–246,1975.

Goldberg DM, Tsang E, Karumanchiri A, Diamandis EP, Soleas G, NG E: Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal Chem.*, 68 (10): 1688-1694, 1996.

Gross SS, Wolin MS: Nitric Oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol.*, 57:737-769, 1995.

Gunnarsson D, Nordberg G, Lundgren P, Selstam G: Cadmium-induced decrement of LH receptor expression and CAMP levels in the testis of rats. *Toxicol.*, 183(1-3): 57–63, 2003.

Halliwell B: Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidants intake in humans. *Free Radic. Res.*, 25(1): 57-74, 1996.

Ignatowicz E, Baer-Dubowska W: Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol J Pharmacol.*, 53(6): 557-569, 2001.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.*, 275(5297): 218-220, 1997.

Jensen SJK: Oxidative stress and free radicals. *J Mol Struct-Theochem.*, 666–667: 387-392, 2003.

Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodriguez-Gil JE, Planas JM: Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J. Nutr.*, 135(4): 757-760, 2005.

Kahvecioglu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S: *Metallerin Çevresel Etkileri. İstanbul Teknik Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, İstanbul, 2003.*

Kalay M, Karataş S: Kadmiyumun *Tilapia nilotica* (L.)’da kas, beyin ve kemik (omurga kemiği) dokularındaki birikimi. *Tr. J. of Zoology.*, 23(3): 985-991, 1999.

Kaldas MI, Walle UK, Walle T: Resveratrol trans- port and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, 55(3): 307–312, 2003.

Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE: Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int.*, 54(2): 111-118, 2009.

Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T: Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology.*, 27(5): 1265-1274, 1998.

Keleş İ, Ertekin A, Karaca M, Ekin S, Akkan HA: Sığırların leptospirozisinde serum sialik asit ve lipid-bağlı sialik asit düzeyleri üzerine araştırma. *Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 11(1):121-122, 2000.

Kim BM, Lee SY, Jeong IH: Influence of squid liver powder on accumulation of cadmium in serum, kidney and liver of mice. *Prev Nutr Food Sci.*, 18(1): 1-10, 2013.

Kimura Y, Ohminami H, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S: Effects of stilbene components of roots of *Polygonum ssp.* on liver injury in peroxidized oil-fed rats. *Planta Med.*, 49(9): 51-54, 1983.

Kishimoto T, Oguri T, Ohno M, Matsubara K, Yamamoto K, Tada M: Effect of cadmium(CdCl₂) on cell proliferation and production EDRF (endothelium-derived relaxing factor) by cultured human umbilical arterial endothelial cells. *Arch. Toxicol.*, 68(9): 555-559, 1994.

Koyu A, Gökçimen A, Özgüner F, Bayram DS, Kocak A: Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Mol Cell Biochem.*, 284(1-2): 81–85, 2006.

Leonard SS, Haris GK, Shi X: Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Bio Med.*, 37(12): 1921-1942, 2004.

Li Y, Cao Z, Zhu H: Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res.* 53: 6–15, 2006.

Lindberg G, Eklund GA, Gullberg B, Rastam L: Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality. *BMJ.*, 302(6769): 143-146, 1991.

Liu J, Kadiiska MB, Corton JC, Qu W, Waalkes M, Mason RP, Liu Y, Klaassen CD: Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice. *Free Radical Bio Med.*, 32(6): 525-535, 2002.

Liu Y, Zhang SP, Cai YQ: Cytoprotective effects of selenium on cadmium-induced LLC-PK1 cells apoptosis by activating JNK pathway. *Toxicol In Vitro.*, 21(4): 677-684, 2007.

Manca D, Ricard AC, Trottier B, Chevalier G: Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*, 67(3): 303–323, 1991.

Mannino DM, Holguin F, Greves HM, Svage-Brown A, Stock AL, Jones RL: Urinary cadmium levels predict lower lung function in current and former smokers: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Thorax*, 59(3): 194-198, 2004.

Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP, Ducharme MP: Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther.*, 302(1): 369-373, 2002.

Masella R, Benedetto RD, Vari R, Filesi C, Giovannini C: Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 16(10): 577-586, 2005.

- Maxwell SRJ: Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49(3): 345-361, 1995.
- Meija J, Coplen TB, Berglund M, Brand WA, Bièvre PD, Gröning M, Holden NE, Irrgeher J, Loss RD, Walczyk T, Prohaska T: Atomic weights of the elements (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 88(3): 265–291, 2016.
- Mendez-Armenta M, Rios C: Cadmium neurotoxicity. *Environ Toxicol. Pharmacol.*, 23(3): 350-358, 2007.
- Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS: Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agric Food Chem.*, 52(4): 935-942, 2004.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5, 62-71, 2001.
- Mudgal V, Madaan N, Mudgal A, Singh RB, Mishra S: Effect of toxic metals on human health. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3: 94-99, 2010.
- Muhtaroglu S, Doğan P, Tayyar M: Gebelerde serum sialik asit ve β -HCG seviyeleri, *Erciyes Üniv. Tıp Fak. Derg.*, 15(2):117-120, 1993.
- Murugavel P, Pari L, Sitasawad SL, Kumar S, Kumar S: Cadmium induced mitochondrial injury and apoptosis in vero cells: protective effect of diallyl tetrasulfide from garlic. *Inter J Biochem&Cell Biol.*, 39(1): 161-170, 2007.
- Nakazawa H, Genka C, Fujishima M: Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.*, 46(1): 15-32, 1996.
- Nandi D, Patra RC, Swarup D: Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. *Food Chem Toxicol.*, 44(9), 1579–1584, 2006.
- Park JD, Liu Y, Klaassen CD: Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicol.*, 163(2-3): 93-100, 2001.
- Pedras MS, Ahiahonu PW: Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry*, 66(4): 391–411, 2005.

- Pervaiz S: Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist Update.*, 7(6): 333-344, 2004.
- Planas JM, Colom H, Juan ME: Resveratrol: a polyphenol with multiple effects. *Recent Advan Pharma Sci*, 101-120, 2011.
- Porasuphatana S, Tsai P, Rosen GM: The generation of free radicals by nitric oxide synthase. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 134(3): 281–289, 2003.
- Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med.*, 342(17): 1266–1271, 2000.
- Prozialeck WC, Edwards JR, Woods JM: The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci.*, 79(16), 1493-1506, 2006.
- Rafati A, Hoseini L, Babai A, Noorafshan A, Haghbin H, Karbalay-Doust S: Mitigating effect of resveratrol on the structural changes of mice liver and kidney induced by cadmium; a stereological study. *Prev Nutr Food Sci.*, 20(4), 266-275, 2015.
- Rangan U, Bulkley GB: Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull.*, 49(3): 700-718, 1993.
- Renaud S, De Lorgeril M: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.*, 339(8808): 1523-1536, 1992.
- Renugadevi J, Prabu SM: Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology*, 256(1-2): 128-134, 2009.
- Reuter G, Gabius HJ: Sialic acids structure-analysis-metabolism-occurrence-recognition, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*, 377: 325-342, 1996.
- Reuter G., Schauer, S: Determination of sialic acid. *Met. Enzim.*, 230: 168-199, 1994.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G: Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, 2(4): 152-159, 1997.
- Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotillo D, De Gaetano D, Evangelista V, Cerletti C: Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br. J. Pharmacol.*, 123(8): 1691-1699, 1998.

Rougon G: Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eu. J. Cell Biol.*, (61):197-207, 1993.

Sarkar S, Yadav P, Trivedi R, Bansal AK, Bhatnagar D: Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 9(3): 144–149, 1995.

Schauer R: Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acid, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40: 131-234, 1982.

Schauer R, Freese A, Gollub M, Iwersen M, Kelm S, Reuter G, Schlenzka W, Vandamme- Feldhaus V, Shaw L: Functional and biosynthetic aspects of sialic acid diversity. *Indian J. Biochem.*, 34(1-2): 131-141, 1997.

Sen S, Chakraborty R: The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*. American Chemical Society, Chapter, 1: 1-37, 2011.

Sener G, Toklu HZ, Sehirli AÖ, Velioglu-Ögünç A, Çetinel S, Gedik N: Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepato Res.*, 35(1): 62-68, 2006.

Shiraishi N, Rehm S, Waalkes MP: Effect of chlorpromazine pretreatment on cadmium toxicity in the male wistar (WF/NCr) rat. *J Toxicol Environ Health*, 42(2): 193-208, 1994.

Sies H: Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91 (suppl 3C): 31-38, 1991.

Signorelli P, Ghidoni R: Resveratrol as an anticancer nutrient. molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem.*, 16(8): 449-466, 2005.

Silver HK, Karim KA, Salinas FA: Relationship of total serum sialic acid to sialoglycoprotein acute phase reactants in malignant melanoma. *Br. J. Cancer.*, (41):745-750, 1980.

Siskos PA, Spyridaki MHE: Determination of sialic acids in biological fluids using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography B.*, 724(2): 205-212, 1999.

Skoczynska A, Martynowicz H: The impact of subchronic cadmium poisoning on the vascular effect of nitric oxide in rats. *Hum Exp Toxicol.*, 24(7): 353-361, 2005.

Skowerski M, Jasik K, Konecki J: Effects of interaction between cadmium and selenium on heart metabolism in mice: the study of m RNA, protein, ANP synthesis activities and ultrastructure in mouse heart. *Med Sci Monit.*, 6:258-265, 2000.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal.*, 11(5): 287-313, 1997.

Sun AY, Chen YM, James-Kracke M, Wixom P, Cheng, Y: Ethanol induced cell death by lipid peroxidation in PC₁₂ cells. *Neurochem. Res.*, 22(10): 1187-1192, 1997.

Sydow G: A simplifield quick method for determination of sialic acid in serum. *Biomed Biochim Acta*, 44(11-12), 1721-1723, 1985.

Şimşek, B., Hacısalihoğlu, A: Sialik asit ve fizyolojik fonksiyonları. *Biyokimya Derg.*, 11(3): 77-88, 1986.

Tomera JF, Kukulka SP, Lilford K, Harakal C: Cadmium accumulation in experimental hypertension. *Corn Art Dis.*, 2: 769-774, 1991.

Traving C, Schauer R: Structure, function and metabolism of sialic acids. *CMLS. Cell. Mol. Life. Sci.*, 54(12): 1330-1349, 1998.

Tsuruoka S, Sugimoto KI, Muto S, Nomiyama K, Fujimura A, Imai M: Acute effect of cadmium-metallothionein on glucose and amino acid transport across the apical membrane of the rabbit proximal tubule perfused in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.*, 292 (2); 769-777, 2000.

Uenobe F, Nakamura S, Miyazawa M: Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutat Res.*, 373(2): 197-200, 1997.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Inter J Biochem&Cell Biol*, 39(1): 44-84, 2007.

Vorobieva RS, Eremeeva EP: Cardiovascular function in workers exposed to cadmium. *Gig. Sanit.*, 10:22-25, 1980.

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D: Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol*, 192(2-3): 95-117, 2003.

Wang B, Du Y: Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid Med Cell Longev.*, 2013:898034, 2013.

Waters PJ, Lewry E, Pennock CA: Measurement of sialic acid in serum and urine: clinical applications and limitations. *Ann. Clin. Biochem.*, 29:625-637, 1992.

Wight RD, Tull CA, Deel MW, Stroope BL, Eubanks AG, Chavis JA, Drew PD, Hensley LL: Resveratrol effects on astrocyte function: Relevance to neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun.*, 426(1): 112-115, 2012.

Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS, Engen RL: Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci.* 59(1): 15-21, 1996.

Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol.*, 135(3), 372-376, 1979.

Yousef M, Vlachogiannis IA, Tsiani E: Effects of resveratrol against lung cancer: in vitro an in vivo studies. *Nutrients*, 9(11): 1231, 2017.

Zalups RK, Ahmad S: Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharm.*, 186(3): 163-188, 2003.

Zhang F, Wang H, Wu Q, Lu Y, Nie J, Xie X, Shi J: Resveratrol protects cortical neurons against Microglia-Mediated neuroinflammation. *Phytother Res.*, 27(3): 344-349, 2013.

7.ÖZGEÇMİŞ

Canan IŞIK BİRCAN 1979 yılında Kars'ta doğdu. 1998'de Kars Sağlık Meslek Lisesinden ebe olarak mezun oldu. 2001 yılında ebe olarak işe başladı. 2004 yılında Kafkas üniversitesi laboratuvar bölümünü kazandı. 2006'da dikey geçiş ile Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi biyoloji bölümünü kazandı. 2008'de mezun oldu. 2009 yılında unvan değişikliği sınavını kazanarak laboratuvar teknikeri olarak çalışmaya devam etti. 2014 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında lisansüstü eğitimine başladı. Evli ve Mert İbrahim adında bir erkek çocuk annesidir.