



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL KÖKENLİ BAZI AROMATİK BİLEŞİKLERİN
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Dilek YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2009



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL KÖKENLİ BAZI AROMATİK BİLEŞİKLERİN
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Dilek YILMAZ

Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2009

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL KÖKENLİ BAZI AROMATİK BİLEŞİKLERİN
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Dilek YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 01/09/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Rahmi BİLALOĞLU
(Danışman)

Doç. Dr. Berrin TUNCA
(Asil Üye)

Doç. Dr. Nilüfer ÇINKILINÇ
(Asil Üye)

ÖZET

Bu çalışmada ağır metal olan kadmiyumun genotoksik etkisi ve bu genotoksik hasar üzerine naringinin antigenotoksik etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla insan periferel kan lenfositlerinde in vitro kromozom hasarı (CA) ve kardeş kromatit değişimi (SCE) testleri uygulanmıştır.

Kadmiyumun 10 μ M, 20 μ M ve 40 μ M'lık dozları kültür başlatıldıktan 48 saat sonra kültüre eklenmiştir. 20 μ M ve 40 μ M'lık doz gruplarında CA testinden elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuna kıyasla hücre başına düşen total anomali oranında ve gap ve pulverizasyonlar hariç tutulduğunda hücre başına düşen total anomali oranında anlamlı bir artış olurken kadmiyumun 10 μ M dozunda anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. SCE testinden elde edilen sonuçlar CA testi sonuçlarına benzerdir. Kadmiyumun 20 μ M ve 40 μ M'lık doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla hücre başına düşen SCE oranında anlamlı bir artış saptanırken kadmiyumun 10 μ M'lık doz grubu kontrole kıyasla hücre başına düşen SCE oranında anlamlı bir farklılık yaratmamıştır.

Bulgular kadmiyumun 20 μ M'lık ve 40 μ M'lık dozlarının genotoksik olduğunu 10 μ M'lık dozunun ise genotoksik olmadığını göstermiştir.

Kadmiyumun 40 μ M'lık dozu ile naringinin 1 μ g/ml ve 2 μ g/ml'lik dozları ayrı ayrı kombine edilerek naringinin kadmiyumun neden olduğu genotoksik etki üzerine antigenotoksik aktivitesi ölçülmüştür.

Kromozom hasarı testi sonuçlarına göre 40 μ M Cd + 1 μ g/ml naringin ve 40 μ M Cd + 2 μ g/ml naringin kombine doz gruplarında kadmiyumun 40 μ M'lık doz grubuna kıyasla hücre başına düşen anomalilerde anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır. Fakat SCE testi sonuçları değerlendirildiğinde 40 μ M'lık doz grubuna kıyasla kombine doz gruplarında hücre başına düşen SCE oranında anlamlı bir azalma olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak denediğimiz 20 μ M'lık ve 40 μ M'lık kadmiyum dozları hem CA hem de SCE testi sonuçlarına göre genotoksik etki göstermiştir. Naringin dozları ise 40 μ M'lık kadmiyumun neden olduğu kromozom hasarlarını azaltmış fakat aynı doz kadmiyumun neden olduğu SCE'yi azaltmada etkisiz kalmıştır. Naringinin CA testi sonuçlarına göre antigenotoksik etkisinin olabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Naringin, Kadmiyum, Antioksidan, Ağır metal, Kromozom Hasarı Testi, Kardeş Kromatit Değişimi Testi, Genotoksisite.

ABSTRACT

In this study, we aimed to evaluate the genotoxic effects of cadmium, which is a heavy metal, and the antigenotoxic effect of naringin on genotoxic damage caused by cadmium. For this reason, in vitro chromosomal aberration (CA) and in vitro sister chromatid exchange (SCE) tests were carried out in human peripheral blood lymphocytes.

10 μ M, 20 μ M and 40 μ M doses of cadmium were administered to human lymphocytes after 48 h of culture initiation. 20 μ M ve 40 μ M doses of cadmium induced a significant increase of CAs, when both gaps and pulverized metaphase proportions were included and excluded. CA frequencies at 10 μ M concentrations did not show any significant differences when compared with control.

According to SCE results, there appeared to be a statistically significant increase in the SCE/Cell frequency at 20 μ M and 40 μ M cadmium concentrations when compared with control. However there is no significant increase in the SCE frequency was obtained at 10 μ M/ml concentration when compared to control.

According to our results, 20 μ M and 40 μ M doses of cadmium show genotoxic effect, 10 μ M dose of cadmium shows non-genotoxic effect in the CA and SCE tests in vitro human peripheral blood lymphocytes.

CA test results showed that; when 1 μ g/ml ve 2 μ g/ml naringin doses were combined with 40 μ M Cd, the enhanced chromosomal abnormalities by 40 μ M Cd was significantly reduced as compared with the extent of chromosome abnormalities. However co-treatment of 40 μ M Cd with 1 μ g/ml naringin and 2 μ g/ml naringin did not decrease the frequencies of SCE.

The present study demonstrates that cadmium concentrations at 20 μ M and 40 μ M showed genotoxic effect in human peripheral blood lymphocytes using the sister chromatid exchange (SCE) and chromosome aberration (CA) tests.

In the present study the ability of naringin to protect against cadmium- induced structural chromosome aberrations by CA assay was investigated. Co-treatments of cadmium and naringin did not significantly decreased the frequency of SCE induced by cadmium.

Keywords: Naringin, Cadmium, Antioxidant, Heavy Metal, Chromosomal Aberration (CA) Test, Sister Chromatid Exchange (SCE) Test, Genotoxicity.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Ağır Metaller	4
2.2 KADMİYUM	6
2.2.1 Kadmiyumun fiziksel özellikleri	6
2.2.2 Kadmiyum kaynakları	6
2.2.3 Kadmiyuma maruz kalma	7
2.2.4 Kadmiyum metabolizması	11
2.2.5. Kadmiyumun bitkiler üzerine etkisi	13
2.2.6. Kadmiyumun insan sağlığına etkisi	14
2.2.7. Kadmiyumun Oksidatif Strese etkisi	18
2.2.8. Kadmiyumun DNA Metilasyonuna etkisi	20
2.2.9. Kadmiyumun gen ekspresyonuna etkisi	21
2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	26
2.4. Antioksidanlar	28
2.4.1. Flavonoidler	33
2.4.1.1. Naringin	34
2.5. Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) Ve Kromozom Hasarı (CA) Test Yöntemleri	39
2.5.1. Kardeş kromatit değişimi (SCE)	39
2.5.2. Kromozom Hasarı (CA)	41
3. MATERYAL VE METOT	44
3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanı	44
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
3.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	46
3.4. Yöntem	47
4. BULGULAR	51
4.1. Kromozom Hasarı Testinden Elde Edilen Sonuçlar	51
4.1.1. Kadmiyum dozlarının kromozom hasarı (CA) sonuçları	51
4.1.2. Naringin dozlarının kromozom hasarı (CA) sonuçları	53
4.1.3. Kombine dozların kromozom hasarı (CA) sonuçları	54
4.2. Doz uygulamalarının Mitotik İndekse (Mİ) Etkileri	55
4.3. Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) Testinden Elde Edilen Sonuçlar	56

4.3.1. Kadmiyum dozlarının Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) Sonuçları	56
4.3.2. Naringin dozlarının Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) Sonuçları	57
4.3.3. Kombine dozların Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) sonuçları	58
4.4. Doz Uygulamalarının Replikatif İndekse (Rİ) Etkileri	58
5. FOTOĞRAFLAR	64
6. TARTIŞMA	67
7. KAYNAKLAR	73

KISALTMALAR DİZİNİ

Ag: Gümüş
As: Arsenik
Au: Altın
BER: Baz Kesip Çıkarma Onarımı
Bi: Bizmut
BrdUrd: 5- bromodeoksiüridin
CA: Chromosome Aberration (Kromozom Hasarı)
CAT: Katalaz
Cd: Kadmyum
Co: Kobalt
Cr: Krom
Cu: Bakır
Fe: Demir
Hg: Civa
Mİ: Mitotik İndeks
MMC: Mitomisin C
MMR: Yanlış Eşleşme Onarımı
Mn: Manganez
Mo: Molibden
MT: Metallothionin
NER: Nükleotit Kesip Çıkarma Onarımı
Ni: Nikel
Pb: Kurşun
Pt: Platin
Rİ: replikatif İndeks
ROS: Reactive oxygen species (Reaktif Oksikjen Türleri)
Sb: Antimon
SCE: Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)
Se: Selenyum
Sn: Kalay
SOD: Süperoksit dizmutaz
Te: Tellür
Ti: Titanyum
Tl: Talyum
Zn: Çinko
Zr: Zirkonyum

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

Çizelge 4.1.: Kontrol, 10µM, 20µM, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının farklı tipteki kromozom hasarları üzerine etkisi.	60
Çizelge 4.2.: Kontrol, 10µM, 20µM, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının mitotik indekse etkisi ve oluşturduğu kromozom hasarı ortalamalarının karşılaştırılması.	62
Çizelge 4.3.: Kontrol, 10µM, 20µM, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının hücre başına düşen SCE ve Replikatif İndeks üzerine etkileri.	63

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa**

Şekil 2.1.: Kadmiyuma mesleki maruz kalma	7
Şekil 2.2.: Kadmiyuma çevresel maruz kalma	8
Şekil 2.3.: Kadmiyumun insan vücudunda taşınması, metabolizması, depolanması ve salgılanması.	11
Şekil 2.4.: Kadmiyum metabolizması ve kadmiyumun vücutta taşınması.	12
Şekil 2.5.: Kadmiyumun çeşitli organ sistemlerine etkisi.	16
Şekil 2.6.: GO Tamir Mekanizması.	23
Şekil 2.7.: Hücredeki kadmiyum toksisitesinin biyolojik sonuçlarının genel şeması	25
Şekil 2.8.: Vitamin alınmasının ve eksikliğinin etkileri.	32
Şekil 2.9.: Naringinin kimyasal yapısı.	34
Şekil 2.10: Naringinin parçalanması.	35
Şekil 2.11.: Homolog rekombinasyon mekanizması.	41
Şekil 2.12.: Kromozom hasarı oluşum mekanizması.	43
Şekil 4.1.: Kadmiyum dozlarının neden olduğu metafaz başına düşen total anomali miktarlarının ve gap ve pulverizasyonlar hariç metafaz başına düşen anomali miktarlarının karşılaştırılması.	52
Şekil 4.2.: Naringin dozlarının total anomaliye ve gap ve pulverizasyonlar hariç tutulduğunda total anomaliye etkisinin grafiksel olarak gösterimi.	53
Şekil 4.3.: Kontrol, 10µM Cd, 20µM Cd, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin gruplarında hücre başına düşen total anomali ve gap ve pulverizasyonlar hariç hücre başına düşen anomali miktarı grafiksel olarak gösterilmiştir.	55
Şekil 4.4.: Kontrol, 10µM Cd, 20µM Cd, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının mitotik indekse etkisinin grafiksel gösterimi.	56
Şekil 4.5.: Kontrol, 10µM Cd, 20µM Cd, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının SCE/Hücre oranına etkisinin grafiksel gösterimi.	58
Şekil 4.6.: Kontrol, 10µM Cd, 20µM Cd, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının replikatif indekse etkisinin grafiksel gösterimi.	59
Şekil 4.7.: Total kromozom hasarının dozlara ve anomali türüne göre dağılımı.	62
Şekil 5.1.: 40µM kadmiyum uygulamasından hazırlanan bir kardeş kromatit değişimi testi preparatından SCE görüntüleri.	64
Şekil 5.2.: 40 µM kadmiyum uygulamasından hazırlanan kromozom hasarı testi preparatından kromatit tipte kırık görüntüsü.	64
Şekil 5.3.: 40 µM Cd + 1µg/ml naringin muamelesinden hazırlanan kromozom hasarı testinden preparatından disentrik görüntüsü.	65
Şekil 5.4.: 40 µM Cd muamelesinden hazırlanan kromozom hasarı testi preparatında exchange görüntüsü.	65
Şekil 5.5.: 40µM Cd muamelesi sonucu hazırlanan kromozom hasarı testi preparatında pulverize metafaz görüntüsü.	66
Şekil 5.6.: 2µg/ml naringin muamelesi sonucu hazırlanan kromozom hasarı testi preparatında poliploidi görüntüsü.	66

SİMGELER DİZİNİ

cm- Santimetre
dk- Dakika
gr- Gram
mg- Miligram
ml- Mililitre
M- Molar
 μ M- Mikromolar
 μ g- Mikrogram.

1. GİRİŞ

Günümüzde Kalp ve Damar Hastalıklarından sonra kanser en çok ölümlerle sonuçlanan hastalıktır. Prostat ve kolon kanserlerinin %80'inin beslenme, besinlerle ve yaşam seklinden etkilendiği düşünülmektedir. Önlenebilen kanserlerin üçte birinde DNA hasarının diyetle alınan mikro besinlerin eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mikro besinler doğrudan genoma etki ederek veya dolaylı olarak antioksidan enzim aktivitesini artırarak mutasyonları önleyebilirler (Ames 2001).

Metaller periyodik cetvelin dörtte üçünü oluşturmalarına rağmen sadece çok küçük bir kısmı yaşam için esansiyeldir. Örneğin selenyum, bakır, çinko ve demir gibi esansiyel metaller genom stabilitesini korumakta, DNA hasarına yanıtta ve tamirinde rol oynamaktadır (Cheng 2009).

Bilinen metallerin çoğu canlı organizmalar için oldukça toksiktir. Bazen esansiyel metaller bile toksik olabilirler (Ballatori 2002).

Bazı metal bileşiklerine maruz kalan işçilerde bu bileşiklerin kansere neden olduğu uzun süredir bilinmektedir. Bilinen ilk vakalar 19. yüzyılda ortaya çıkmıştır. Büyük endüstri ülkelerinde üretimin ve diğer ekonomik faaliyetlerin hızla artması demir içermeyen ve insan kanserojeni olarak bilinen metallerin yaygın kullanımını da beraberinde getirmiştir. Bu metallerin yüksek oranda kullanımı ve metal içeren atıkların iyi şekilde depolanmaması çevresel ağır metal kontaminasyonu için sayısız kaynak oluşturmaktadır. Metallerin toksisitesinin yüksek olmasının nedeni ise ağır metallerin kimyasal veya biyolojik olarak yıkılamamalarıdır (Salnikow ve Zhitkovich 2008).

Kanserojen metaller genellikle zayıf mutajeniktirler, krom dışındakiler DNA addukları oluşturmazlar. Metallerin neden olduğu kanserlerde asıl yol reaktif oksijen türlerinin oluşturulmasıdır.

Çalışmamızda dünyada yaygın kullanılan geçiş metallerinden biri olan kadmiyum kullanılmıştır. Kadmiyum endüstride sık kullanılması nedeniyle çevresel olarak birikmektedir. İnsanların kadmiyuma çevresel maruz kalması kontamine olmuş besinlerin tüketilmesiyle, topraktan kadmiyum almış tütünün dumanından ve kontamine olmuş havanın solunmasıyla gerçekleşmektedir (Filipic ve Hei 2004). Kadmiyumun biyolojik yarı ömrü çok uzundur ve biriken bir toksin olmasına neden olmaktadır. Mesleki maruz kalma insanda akciğer kanserleri ile ilişkilidir (IARC 1993).

Günümüzde çevresel kanserojenlere çok sık maruz kalınmaktadır. Bu kanserojenlerin etkilerinden korunmak için antioksidan tablet kullanımı da oldukça yaygınlaşmıştır. Fakat tablet halinde olan mı yoksa besinlerle alınan antioksidanların mı daha yararlı olduğu tam olarak bilinmemektedir. Antioksidanlar hücrede reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği hasara karşı koruyucu mekanizmalardır (Halliwell ve Whiteman 2004).

Antioksidan maddelerin kullanım miktarları son derece önemlidir. Fazla alındıkları takdirde bazı antioksidanların kendisinin de oksidan özellik gösterebileceği bilinmektedir (Childs ve ark. 2001). Kemoterapi ilaçları ile alınan antioksidanlar kanser tedavisinin etkisini azaltabilmektedir (Agus ve ark. 1999). Bu nedenle hangi maddelerin antioksidan etkisi olduğunun bilinmesi oldukça önemlidir.

Çalışmamızda greyfurt suyunda bulunan bir flavonoid olan naringinin kadmiyum ağır metalinin oluşturduğu genotoksik hasar üzerine antijenotoksik etkisi araştırılmıştır. Naringinin antimitojenik, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, kolesterol düşürücü, serbest radikalleri toplayıcı ve antioksidan etkiler gösterdiği bilinmektedir (Jeon ve ark. 2004).

Çalışmada insan periferik kan lenfositlerinde genotoksik hasar yaratmak için seçilen kadmiyum bir fenton metali olmamasına rağmen dolaylı mekanizmalarla serbest radikalleri üretmektedir. Kadmiyum hücrede ki glutatyon, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz veya katalaz gibi antioksidan enzimlerin sentezini azaltmaktadır. (Waisberg ve ark. 2003, Stohs ve Bagchi 1995). Antioksidanların aktivitelerinin veya hücre içindeki seviyelerinin kadmiyum tarafından azaltılması hücrede oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır. Oksidatif stres neticesinde ise DNA zincir kırıkları oluşmaktadır (Hengstler ve ark. 2003).

Kadmiyum genotoksik etkisini hücrede reaktif oksijen türlerinin miktarını artırarak gösterdiği için antioksidan bir madde olan naringinin serbest radikalleri azaltarak veya antioksidan enzim sentezini artırarak antijenotoksik etki gösterebileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda in vitro kromozom hasarı (CA) ve kardeş kromatit değişimi (SCE) test yöntemleri kullanılmıştır. İnsan lenfositlerinde in vitro kromozom hasarı (CA) ve kardeş kromatit değişimi (SCE) testleri genotoksik kanserojenlere mesleki ve çevresel maruz kalmanın erken etkilerinin biyomarkırı olarak kullanılmaktadır (Joseph ve ark. 2006, Wilson ve Thompson 2007).

Birçok çevresel kirleticilerin insan sağlığını ciddi şekilde tehdit ettiği bilinmektedir. Besinlerle alınan antioksidan maddelerin ise bu zararlı etkilere karşı koruyucu özelliklerinin olduğu göz ardı edilmemelidir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların kadmiyumun genotoksik etkileri ve buna karşı naringinin antigenotoksik etkileri hakkında fikir vereceği düşünölmüştür.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ağır Metaller

Son 200 yılda iz elementlerin doğadaki döngüleri insan aktiviteleri ile de değişikliğe uğramıştır. Neticede bu elementlerden çoğu havada, toprakta, canlılarda ve suda doğal miktarından fazla birikmiş ve ekosistemde toksik etkiler göstermiştir. Bu iz elementler ekosistemin temel elemanlarına ve fonksiyonlarına zarar vermekte bu da insan yaşamını tehdit etmektedir. İnsan sağlığını tehlikeye sokan maddeler besin zincirinde birikirler. Ağır metaller sürekli birikme eğilimlerinden ve mikroorganizmalar, hayvanlar, bitkiler ve insanlar için toksik olmalarından dolayı tehlikelidirler (Serrano 1995, Sandrin ve Maier 2003).

Yoğunluğu 4,5 den veya 5,0 den büyük olan elementler ağır metaller olarak adlandırılmaktadır. Ag, As, Bi, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Ti, Tl, Zn ve Zr ağır metallerdir. Bu metallerden büyük bir kısmı kayalarda ve sedimentlerde mineral formunda sülfid, oksit, fosfat, sülfat ve karbonat şeklinde bulunmaktadır. Küçük bir kısmı ise (örneğin Au, Hg, Cu, Pt) element formundadır (Ölmez ve Yılmaz 2004).

Cu, Fe, Mn, Mo, Ni ve Zn gibi ağır metaller organizma için esansiyel elementler olarak gerekliyken, Cd, Hg, Pb ve Tl gibi ağır metallerin biyolojik bir fonksiyonu bulunmamaktadır. Bir metal elementinin organizma için gerekli değerinin üstündeki konsantrasyonu canlı için zararlı ya da toksiktir. Metallerin ağır metal olarak adlandırılmasının nedeni molekül ağırlıklarından çok, canlı için zararlı maddeler olmasındandır. Bir ağır metalin organizma için esansiyel bir iz element mi yoksa zararlı mı olduğu bu metalin iyon formunun ya da özel ligandlarla veya organik moleküllerle oluşturduğu bileşiklerinin reaksiyonlarına bağlıdır (Guderian 2001).

Farklı ligandlarla oluşturdukları bileşiklere göre ağır metaller 3 grupta incelenmektedir.

- 1) A grubu elementler oksijen içeren ligandlarla bağlanırlar,
- 2) B grubu elementler azot ve kükürt içeren ligandlarla bağlanırlar,

3) Ara elementler: Bunların bağlanma tercihleri A grubu ve B grubu arasındadır. B grubu elementleri sırasıyla Zn, Ni, Co, Cd, Cu, Pb, oksijen içeren ligandlarla kompleks bileşik oluşturmak için daha az ilgi göstermektedir yani Zn, Cu'a kıyasla daha az ilgi gösterir. 2 değerlikli Hg iyonu kükürt ve azot içeren ligandlara olan büyük afinitesinden dolayı B grubu elementi olarak sınıflandırılmıştır. Çoğu metaller A ve B elementleri arasındaki geçiş bölgesinde bulunmaktadırlar. Örneğin Pb ve Cd B grubuna daha yakındır. Ağır metallerin moleküler ve biyokimyasal olayları üzerine toksisitesini anlamak için sınıflandırmasını açıklamak gerekmektedir (John, 2002).

Yüksek bitkiler ağır metallerin kara ekosistemindeki biyokimyası ile etkileşimde olduğundan ve bununla bağlantılı olarak biyosferdeki farklı etkilerinden dolayı önemlidir. Bitkiler diğer canlıların besin maddelerini oluşturmakta ve böylece ağır metallerin birikmesine neden olmaktadır. Bu yolla metaller biyolojik döngülere katılarak diğer yaşam türlerini etkilemektedir (Lambers ve ark. 1998). Bitkiler filtre etkileri nedeniyle biyosfer ve atmosfer arasında köprü görevi üstlenmekte ve ağır metallerin atmosfere girişini azaltmada önemli rol oynamaktadırlar. Bu da ekosistemde ağır metallerin birikmesi için önemlidir. Bitkiler ağır metallerin besin zincirine giriş kapısı olarak görev yapmaktadırlar. Ağır metallerin çeşitli bulaşma yollarında bitkisel besinler insanlar ve hayvanlar için asıl kaynaktır. Bitkiler belli şartlar altında bir alana ağır metal bulaştığının indikatörüdür (Lambers ve ark. 1998).

Esansiyel metallerin hücre içindeki konsantrasyonları sınırlıdır, fakat esansiyel olmayan metallerin genellikle homeostatik kontrolü bulunmamaktadır. Metal homeostasisine etki eden bazı moleküler faktörler bulunmaktadır, bunlardan biri de esansiyel metallerin hücre dışından içine alınmasını ve hücreden atılmasını sağlayan proteinlerdir (Sacher ve ark. 2001). Bu proteinlerden bazıları belli bir esansiyel metal için çok seçici iken diğerleri daha az spesifiktir ve çeşitli metallerle etkileşime girmektedir, buna toksik metaller de dahildir. Örneğin DCT1 (divalent cation transporter-1), Fe^{+2} ve diğer esansiyel iki değerlikli metallerin hücre içine alınma mekanizmasındaki bir proteindir fakat bu protein Cd^{+2} , Pb^{+2} ve diğer toksik iki değerlikli metallerin alınmasına da aracılık etmektedir. Metallerin hücre zarından geçişini sağlayan ve hücreye zarar veren diğer büyük bir mekanizmada ise metaller endojen moleküllerin yapısına benzer kompleksler oluşturmaktadır. Örneğin arsenat ve vanadat taşınma ve metabolizma için

fosfatla rekabete girmekte, böylece normal hücrel fonksiyonlara zarar vermektedirler (Ballatori 2002).

Deiyonize suda çözülmüş ve atık sulara ulaşmış kadmiyum, bakır, krom, civa, nikel ve çinkonun akut toksisitesi ve genotoksitesine farklı mikrobiyal testler kullanılarak elde edilen EC50 ve EC20 (effective concentration=etkili konsantrasyon) değerleri kıyaslanarak ulaşılmıştır. Akut toksisite testinde, solunum inhibisyonu için spektrofotometrik testlerde *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pseudomonas fluorescens* kullanılmış ve Microtox testi uygulanmıştır. Metal genotoksitesini belirlemek için *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* mutajenite testi, SOS-β-galaktosidaz genotoksite testi ve MutatoxTM testi uygulanmıştır. Toksikite sıralaması Hg>Cr>Cu~Cd~ Ni>Zn şeklindedir ve genotoksik etki sıralaması Hg>Cr>Cu~Cd~Ni>Zn şeklindedir (Codina ve ark. 2000).

2.2. KADMİYUM

2.2.1 Kadmiyumun fiziksel özellikleri

Kadmiyum 1817' de eş zamanlı olarak Herrmann ve Stromeyer tarafından bulunmuştur. Kadmiyum'un atom numarası 48 ve atom ağırlığı 112.40 dır. Kadmiyum çinko ile birlikte bulunan metallere dendir. Kadmiyum oksit (Cd₂O), kadmiyum sülfat (CdS₂), kadmiyum klorür (CdCl) ve brom kadmiyum (BrCd) bazı kadmiyum bileşikleridir (Ölmez ve Yılmaz 2004).

2.2.2 Kadmiyum kaynakları

Kadmiyum doğada saf olarak değil, kurşun ve çinko maden filizleri halinde bulunmaktadır. İlk defa çinkonun saflaştırılması sırasında elde edilmiştir. Günümüzde kadmiyum çevre kirliliğine sebep olan ağır metallere dendir. Kadmiyum endüstriyel olarak nikel/kadmiyum pillerde, korozyona karşı özellikle denizsel koşullara dayanıklı olması nedeniyle gemi sanayinde, çeliklerin kaplanmasında, boya sanayinde, PVC stabilizatörü olarak, alaşımlarda ve elektronik sanayide kullanılmaktadır. Kadmiyum

fosfatlı gübrelerde, deterjanlarda ve rafine petrol türevlerinde bulunmakta ve bunların çok yaygın kullanımı sonucunda da önemli miktarlarda kadmiyum kirliliği ortaya çıkmaktadır (Socolow 1996).

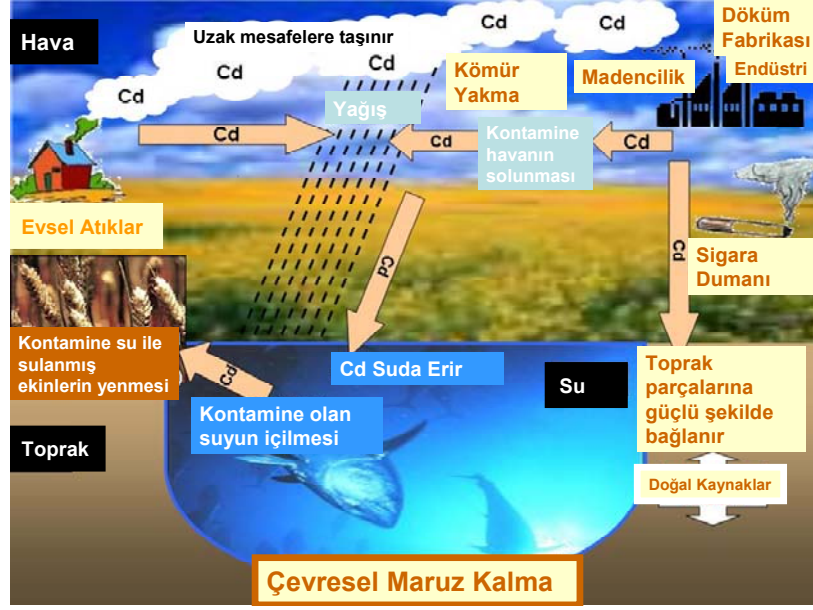
Kadmiyumun yıllık doğaya yayılım miktarı 25,000 – 30,000 tondur ve bunun 4,000-13,000 tonu insan faaliyetine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Kadmiyumun çevreye yayılmasının nedeni uçuculuğudur. Metal üretimi esnasında buharlaşmakta ve oksijenle reaksiyona girerek CdO' i oluşturmaktadır. Kömür, petrol, çöp gibi kadmiyum içeren maddelerin yakılmasıyla da yayılmaktadır (Fuhrmann 2006).

2.2.3 Kadmiyuma maruz kalma

Kadmiyuma maruz kalma çevresel ya da mesleki olarak gerçekleşebilmektedir. Kadmiyuma maruz kalma yolları şekil 2.1. ve 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.1.: Kadmiyuma mesleki maruz kalma: Kadmiyuma elektrikli kaplama endüstrisinde, kadmiyum içeren pigmentlerin üretilmesinde, kaynak yapma esnasında, kadmiyum alaşımlarının üretimi esnasında, nikel kadmiyum pillerin üretimi esnasında, mücevher üretimi esnasında çalışan işçiler maruz kalabilirler (<http://com-med.ikalogic.com>, 2009).



Şekil 2.2.: Kadmiyuma çevresel maruz kalma: Evsel atıkların, kömürün yakılması, madencilik, endüstriyel faaliyetler neticesinde açığa çıkan kadmiyum, havanın kontamine olmasına neden olur. Kontamine olan havanın direk solunması ile insanlar kadmiyuma maruz kalabilir. Yine sigara dumanı da önemli bir kadmiyum kaynağıdır. Yağışlar ile havadaki kadmiyum suya geçer ve suda erir. Kontamine suyun içilmesi ya da kontamine su ile sulanmış ekinlerin insanlar tarafından tüketilmesi ile kadmiyuma maruz kalınabilir (<http://com-med.ikalogic.com>, 2009).

Memeliler dünyaya geldiklerinde vücutlarında kadmiyum bulunmamaktadır, fakat zamanla özellikle de karaciğer ve böbreklerde birikmeye başlamaktadır. Hızlı renal konsantrasyon hayatın ilk yıllarında oluşmakta ve vücuttaki toplam kadmiyumun % 50-70 i bu iki organda toplanmaktadır. Her bireyin vücudunda 5-20 mg kadmiyum bulunduğu kabul edilmektedir. Bu miktar ülkeden ülkeye değişmektedir (Henke ve ark. 1970).

Kadmiyum emilimini etkileyen faktörler canlının türü, kadmiyum bileşiklerinin tipi, dozu, uygulanma frekansı, yaş veya gelişme durumu, ilaç alıp almama durumu, beslenme şeklidir. Deney hayvanlarındaki çalışmalar tek bir uygulamada kadmiyum nitrat veya kadmiyum kloridin %0,5-8 inin absorbe edildiğini göstermiştir. İnsanlarda radyoaktif kadmiyum %5 oranında absorbe edilmektedir (Flanagan ve ark. 1978).

Demir, bakır ve kalsiyum eksikliği olan insanlarda kadmiyum emiliminin arttığı tespit edilmiştir (Chaney ve ark. 1996). Yüksek alkol tüketimi kadmiyumun idrarla daha az atılmasına neden olmaktadır. Sigara içmeyen menopoz öncesi kadınlarda kadmiyum miktarı aynı yaştaki erkeklerden daha fazladır. Kadınlarda menopozdan sonra idrarla atılan kadmiyum miktarı artmaktadır. Ağır kadmiyum bulaşması olan bölgelerde

yaşayan insanlarda idrarla kadmiyum atılımı %30 dan fazladır (Lauwerys ve ark. 1991, Sartor ve ark. 1992).

Amerika birleşik devletlerindeki bir sağlık araştırmasında 22162 katılımcının idrarındaki kadmiyum konsantrasyonu ölçülmüştür. Kadmiyum konsantrasyonunun yaş ve sigara kullanımıyla orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. İdrardaki ortalama kadmiyum konsantrasyonu 0.57 µg/L dır. Başka bir araştırmada kadınların idrarla erkeklerden iki kat fazla kadmiyum attıkları gösterilmiştir (Paschal ve ark. 2000).

Kadmiyumun sindirim sistemi ile alınımı

Gatointestinal sistemle alınan kadmiyum miktarının yaklaşık %5'ini ağızla alınan kısmı oluşturmaktadır (Jin ve ark. 2002). Alman vatandaşları günde 30–35 µg kadmiyum almaktadır bunun %95'i yiyeceklerle ve içeceklerle alınmaktadır. Ortalama sigara kullanan bir kişi ilave olarak her gün 30 µg daha fazla kadmiyum almaktadır (Godt ve ark. 2006). Vitamin D'nin, kalsiyumun, çinko, bakır gibi iz elementlerin az alınması gibi çeşitli faktörler alınan kadmiyum miktarını artırabilmektedir. Kadmiyum ve çinkonun moleküler benzerliği yüksek kadmiyum emiliminin telafisinin nedeni olabilmektedir. Hayvan modellerinde Cd'un emiliminde bir rekabet bulunmaktadır (Taylor 1988). Kadmiyumun sıçan jejunumunda alınımı diğer polivalent katyonların (Pb, Ni, Cr³⁺, Sr ve Mg) çok yüksek konsantrasyonlarda olması nedeniyle azalmaktadır (Foulkes 1985).

Yüksek oranda lifli besinler içeren diyet günlük Cd alınımını artırmaktadır (Jarup ve ark. 1998). Günlük Cd alınımını etkileyen en önemli faktör kişideki demir eksikliğidir. Demir eksikliği olan kişilerde demir stokları dengede olan kişilerdekinden %6 daha fazla kadmiyum emilimi olmaktadır (Flanagan ve ark.1978). Anemisi olan ve sürekli demir eksikliği olan, çocuklar veya mensturasyon döngüsünde olan kadınlar gibi insanlarda yüksek kadmiyum emiliminin nedeni budur. Kandaki düşük demir seviyesi DCT-1 ekspresyonunu uyarmaktadır. DCT-1 (divalent cation transporter-1) sindirim sistemindeki metal iyonu taşıyıcısıdır, kadmiyum emiliminde giriş kapısı gibi görev yapmaktadır (Gunshin ve ark. 1997).

Kadmiyumun solunum sistemi ile alınımı

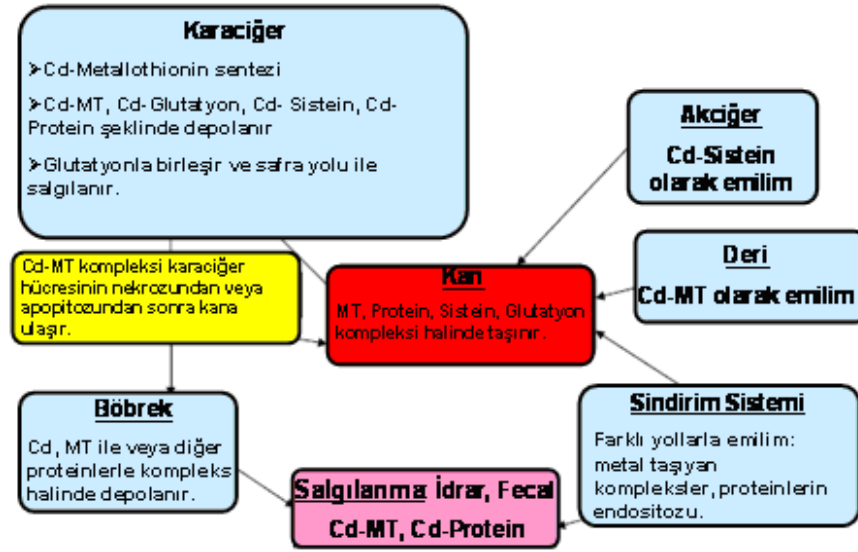
Solunumla kadmiyum zehirlenmesinin asıl kaynağı sigara dumanıdır. Sigara dumanındaki kadmiyumun %40-60'ı akciğerler tarafından emilmektedir (Elinder ve ark. 1976). Hayatı boyunca sigara içen kişilerde kadmiyum miktarı 30 mg iken, 50 yaş ortalamasındaki sigara içmeyen kişilerde kadmiyum miktarı 15mg dır. Sigara içen kişilerde kandaki kadmiyum seviyesi sigara içmeyenlerdekisinin 4-5 katıdır (Jarup ve ark. 1998).

Kadmiyum içeren dumana maruz kalan işçilerde akut solunum zorluğu sendromu gelişmektedir (Barbee ve Prince 1999). Solunumla alınan kadmiyum kan dolaşımına kadmiyum-sistein kompleksi formunda katılmaktadır (Zalups ve Ahmad 2003).

Kadmiyumun deri yolu ile alınımı

1991'de Wester ve arkadaşları kadmiyumun bulaştığı toprak ve suyun insan kadavrasındaki deri hücrelerinden difüzyonla emilimi modeli üzerinde deneyler yapmıştır. Uygulanan kadmiyum dozunun topraktan gelenin %8,8'inin ve sudan gelenin %12,7'sinin deriden girdiği halde plazmaya topraktan %0,01'inin ve sudan %0,07'sinin emildiği gösterilmiştir (Wester ve ark.1992).

Kadmiyumun deriden emilimini kolaylaştıran iki mekanizma vardır: Serbest kadmiyum iyonlarının epidermal keratindeki sisteinin sülfidril radikallerine bağlanması veya metallothioninlerin indüklenmesi ve bunlarla kompleks oluşturmasıdır (Fasanya-Odewumi ve ark. 1998).



Şekil 2.3.: Kadmiyumun insan vücudunda taşınması, metabolizması, depolanması ve salgılanması (Godt ve ark. 2006).

2.2.4 Kadmiyum metabolizması

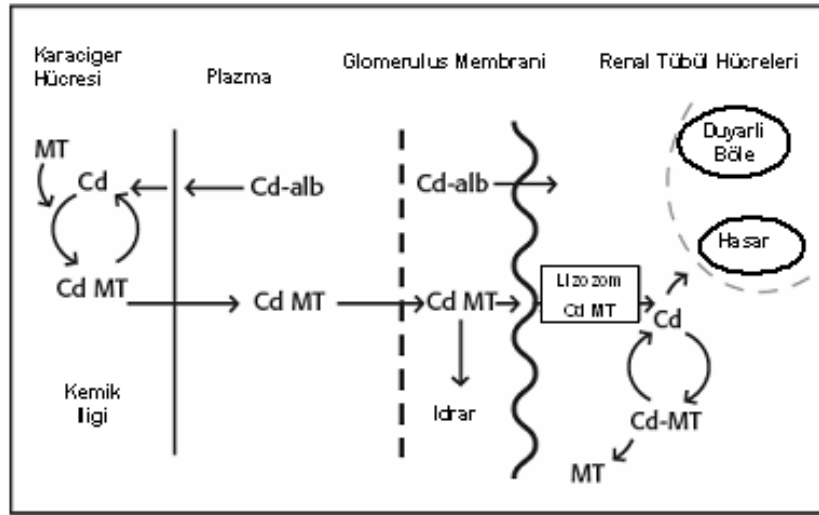
Absorbe edilen kadmiyum kanla özellikle de eritrositlerle taşınmakta ve hücre içinde yüksek ve düşük molekül ağırlıktaki proteinlere bağlanmaktadır (Nordberg 1972). Düşük moleküler ağırlıktaki bu proteinler metallothioninlerdir. Plazma metallothioninlerinin kadmiyumun taşınmasında önemli bir görevi bulunmaktadır. Bunlar %11 den fazla kadmiyumu sülfidril gruplarına bağlayarak taşıyabilmektedirler (Elinder ve Nordberg, 1985).

Metallothioninler metal bağlayan proteinlerdir. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları küçüktür, kadmiyuma afinite gösteren sistein uzantıları bulunmaktadır ve bunlar kadmiyumun toksisitesine etki etmektedirler (Nordberg 1998, Miles ve ark. 2000).

Metallothioninlerin sentezi esansiyel metaller olan bakır ve çinko tarafından indüklenmektedir. Çinkonun varlığı ve metallothioninlerin indüksiyonları karbon tetraklorid, etanol ve iyonize radyasyon gibi ajanların toksisitesini azaltmaktadır. Metallothionein kadmiyum tarafından indirgenmekte ve kadmiyumun hücre içinde metallothioninlere bağlanması kadmiyum toksisitesine karşı koruyucu etki yapmaktadır (Lu ve ark. 2001).

Metallothionin insanda en az 4 genetik isomer formuyla ortaya çıkmaktadır, bunlar 1, 2, 3 ve 4 dür. İki büyük formu 1 ve 2 dir ve özellikle karaciğer, böbrek ve beyin

olmak üzere birçok organda bulunmaktadır. Bu iki formun isoelektrik noktaları farklıdır fakat sistein kalıntılarının sırası benzerdir. Yetişkinlerden ve fetus karaciğerinden elde edilen metallothioninler çoğunlukla çinko ve bakır içermektedir. Metaller peptid mercaptid zincirleriyle bağlanmakta ve iki farklı gruba yerleşmektedirler: Proteinin C terminalindeki dört- metal kümesi alfa domain olarak ve 3- metal kümesi beta domain olarak adlandırılmaktadır. Alfa bölgesi zorunlu bir çinko grubudur, beta kümesindeki çinko esansiyel bir metal olan bakır veya toksik metal olan kadmiyum ile yer değiştirebilmektedir. Metallothioninlerle etkileşim metaller arasındaki etkileşimin temelini teşkil etmektedir (Davis ve Robert 2000).



Şekil 2.4.: Kadmiyum metabolizması ve kadmiyumun vücutta taşınması (Nordberg ve 2009).

Kadmiyum sindirim sistemi ya da akciğerler yoluyla alınmasından sonra kana geçmektedir ve ilk evrede albumin gibi yüksek moleküler ağırlıktaki proteinlere bağlanmaktadır. Kanda kadmiyumun %90'ı alyuvarlara girmekte ve diğer kısmı plazmada albümine bağlanmaktadır. Kadmiyum metallothioninlerin ekspresyonuna neden olmaktadır (Lu ve ark. 2001). Karaciğerden ayrılan kadmiyum-metallothionin kompleksleri glomerulustan süzülme ve düşük moleküler ağırlıklarından dolayı proksimal tüplerden geri emilmektedir. Kadmiyum-metallothionin kompleksi lizozomlarda ayrılmaktadır (şekil 2.4.). Bu gün geçerli modeller, Cd^{+2} -metallothioninlerin proksimal tüp hücrelerinin üst membranındaki reseptörler aracılığı ile endositozla alındığını ve lizozomda ayrıldığını ileri sürmektedir (Nordberg ve ark.

1994). Hücresel toksisitenin gerçekleşmesindeki en önemli basamaklardan biri Cd^{+2} tarafından indüklenmektedir, bu adım serbest Cd^{+2} 'nin lizozomdan çıkıp sitoplazmaya geçmesi ve sitoplazmada reaktif oksijen türlerini oluşturmasıdır, bunlar endojen radikal temizleyicileri azaltmaktadırlar. Kadmiyum, basolateral kalsiyum pompalarıyla etkileşime girmekte ve kalsiyum dengesini bozarak hücresel toksisiteye neden olmaktadır (Nordberg ve ark. 1994).

2.2.5. Kadmiyumun bitkiler üzerine etkisi

Ağır metallerin bitkiler üzerindeki toksisitesinde 3 farklı moleküler mekanizma öne çıkmaktadır.

- 1) Oksidasyon ve Fenton reaksiyonları ile reaktif oksijen türlerinin oluşması.
- 2) Biyomoleküllerde ki esansiel fonksiyonel grupların bloke edilmesi, bu reaksiyon genellikle kadmiyum ve civa gibi non-redox-reaktif ağır metaller için rapor edilmiştir.
- 3) Biyomoleküllerden esansiel metal iyonlarının yerinden çıkarılması.

Kadmiyum bitkilerdeki en toksik ağır metallerden biridir (Clemens 2006). Kadmiyum toksisitesi stoma sayısını, açıklığını ve CO_2 geçirgenliğini azaltmakta, bunlarda yaprak fotosentezini azaltmaktadır (Baryl ve ark. 2001). Yaprak ölümünden önce ağır metal toksisitesi süperoksitler, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bunlar antioksidatif enzim aktivitesini bozmaktadır (Gratão ve ark. 2005). Aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) lipidlerle, pigmentlerle ve proteinlerle reaksiyona girmekte ve bu reaksiyonlar membran hasarı, fotosentezin inhibisyonu ve enzim inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Scandalios 2005). Kadmiyum indirekt mekanizmalarla oksidatif strese neden olmaktadır. Örneğin fonksiyonel enzimlerin SH-gruplarıyla reaksiyona girip enzimlerin yapısını bozmakta, elektron transfer zincirini kesmekte ve nükleik asitlerle etkileşime girmektedir (Smeets 2005). SH bileşikleri seviyesi yüksek olan bitkiler ağır metal toksisitesini tolere etmede SH içermeyen türlerden daha şanslıdır (Clemens 2006).

Bitkilerde ROS'u temizleyen en önemli enzimler superoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) ve peroksidazdır (POD; EC 1.11.1.7). SOD

hücreleri oksidatif strese karşı koruyan anahtar bir enzim olarak görev yapmaktadır (Alscher ve ark. 2002, Fatima ve Ahmad 2005).

Metal biriktiren ve metal biriktirmeyen bitkilerin antioksidan enzimlerinin Cd stresi altındaki tepkileri incelenmiştir. Bitki fideleri 4 günlük periyodlarla 200 veya 400 μM CdCl_2 içeren sıvı ortamda yetiştirildiğinde fotosentez değerleri, terleme değerleri ve stoma geçirgenliği metal biriktiren bitkilerde metal biriktirmeyenlere kıyasla daha yavaş azalmıştır. SOD ve CAT aktivitelerinin metal biriktiren bitkilerde biriktirmeyenlere oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Wang ve ark. 2008).

2.2.6. Kadmiyumun insan sağlığına etkisi

Kronik kadmiyuma maruz kalan hastalarda böbrek hasarı en önemli problemdir (Barbier ve ark. 2005). Kadmiyum böbreklere kadmiyum-metallothionin (Cd-MT) formunda ulaşmaktadır. Cd-MT glomeruluslardan süzülmemekte ve daha sonra proksimal tüplerden geri emilmektedir (Svartengren ve ark. 1986). Artıklar tubul hücrelerinde kalmakta ve kadmiyum kütlesinin büyük kısmını oluşturmaktadır. Böbrek hücrelerindeki kadmiyum miktarı her kişinin hayatı boyunca artmaktadır. Fosfor ve kalsiyum metabolizmasındaki düzensizlik bunun bir sonucudur. Artan kadmiyum böbreklerde birikmekte ve neticesinde yüksek kalsiyum salgılanması böbrek taşı oluşum riskini artırmaktadır (Svartengren ve ark. 1986).

İdrardaki kadmiyum atılımı kadmiyumun böbreklerde hasara neden olduğu düşüncesi ile paralellik göstermektedir; idrarda 1gr kreatin için 2,5 mikrogram kadmiyum %4 oranında renal tubular hasarın göstergesidir (Jarup ve ark. 1998). Böbrek hasarının ilk belirtisi idrarda β 2-microglobulin, N-acetyl- α -D-glukosaminidiaz (NAG), ve retinol-binding-protein (RBP) atılmasıdır (Bernard 2004). Kanında normal konsantrasyondan daha fazla kadmiyum bulunan insanlarda β 2-microglobulin ve RBP'nin idrarla atılım miktarının anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (Jin ve ark. 2002).

Kadmiyumun üreme biyolojisine etkileri

Kadmiyumdan en çok etkilenen progesteron ve testosteron üretimidir (Piasek ve Laskey 1999). Kadmiyumun düşük dozları ovaryumun progesteron biyosentezini

artırırken yüksek dozları inhibe etmektedir (Henson ve Chedrese 2004). Annenin kadmiyuma maruz kalması ani düşük riskini artırmaktadır. Kadmiyumun in vivo ve in vitroda steroidal olmayan östrojen gibi etkili olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Frery 1993, Shiverick ve Salafia 1999). Sıçanlardaki çalışmalarda kadmiyum erken meme gelişimini hızlandırmış ve uterus ağırlığını artırmıştır (Johnson ve ark. 2003).

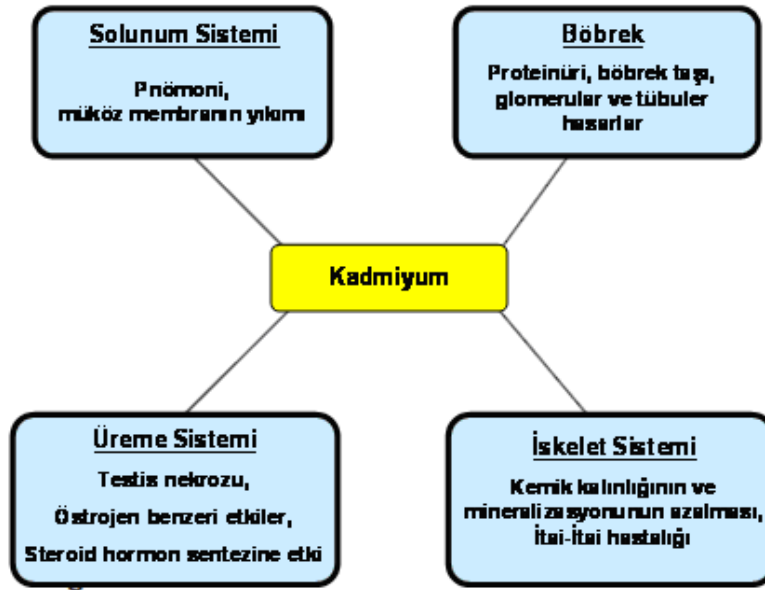
Kemik Hasarı Ve İtai-Itai-Hastalığı

20'üzyıldaki çeşitli çalışmalar kadmiyum buharına ve tozlarına maruz kalmış işçilerde kadmiyum zehirlenmesi ve kemik hasarı arasında ilişki olduğunu göstermiştir (Kazantzis 1979).

Kadmiyum Itai-Itai hastalığının oluşması ile bağlantıdır. Bu hastalık kemik mineralizasyonu derecesinin düşük olması, kırılma oranının fazla olması, osteoporoz oranının artması, şiddetli kemik ağrıları gibi geniş semptomlar göstermektedir. İtai-itai hastalığı salgını Japonya'da Jinzu nehri havzasında 1940'larda ortaya çıkmıştır. Yüksek oranda kadmiyumla kirlenmiş sularla sulanan tarlalarda yetişmiş pirinçle beslenen hastalarda karakteristik semptomlar gözlenmiştir (Inaba ve ark. 2005).

Güney İsveç'ten 1021 kişinin katıldığı araştırmada özellikle 60 yaş ve üzerindeki insanlarda idrardaki kadmiyum konsantrasyonu ve kemikteki düşük mineral konsantrasyonu arasında anlamlı negatif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Ek olarak kadmiyuma maruz kalan bireylerde ön kol kırıklarının artma riski olduğu bulunmuştur. Bu çalışmadaki bireyler ya pil fabrikası çalışanları ya da pil fabrikalarına yakın yerlerde oturan kişilerden seçilmiştir (Jarup ve ark. 1998).

Şekil 2.5.'de kadmiyumun çeşitli sistemler üzerine etkisi şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.5.: Kadmiyumun çeşitli organ sistemlerine etkisi (Godt ve ark. 2006).

Kadmiyumun karsinojenik etkisi

Kadmiyumun kansere neden olabileceğine dair bazı kanıtlar bulunmaktadır. Sıçanlara kadmiyum klorid deri altına enjekte edildiğinde prostat kanserine neden olabilmektedir (Waalkes ve ark. 1988). Bu gruplarda kadmiyumun yüksek dozlarının sıçanlarda ağır testis nekrozlarına neden olduğu ve bunu testis kanserinin izlediği kabul edilmektedir. Laboratuvar bilgilerinin tersine epidemik çalışmalar kadmiyumun prostat kanserine neden olduğunu kanıtlayamamaktadır (Sahmoun ve ark. 2005).

IARC (International Agency for Research on Cancer) kadmiyumu insan kanserojeni olarak birinci grupta sınıflandırmaktadır. Son çalışmalar, kadmiyumun solunum yoluyla alınmasının kanserojenik potansiyele sahip olduğunu ileri sürmektedir (Jin ve ark. 2002).

Kadmiyumun neden olduğu kanserin mekanizması henüz anlaşılammıştır, mitotik sinyallerin up-regulasyonu, kadmiyuma maruz kalma ile apoptoza direnç kazanılması gibi çeşitli faktörler buna neden olabilmektedir (Goyer ve ark. 2004). Transkripsiyonu düzenleyen proteinlerde çinkonun kadmiyumla yer değiştirdiği tartışılmaktadır. Yeni bilgiler kadmiyumun E-Cadherin'nin (E-cadherin bir adezyon molekülüdür ve doku bütünlüğünün korunması, tümör invazyonu ve tümör metastazı gibi birçok olayda rol almaktadır ve membranda Ca(II) bağlayan bir glikoproteindir) yapısını

değiştirebileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar E-cadherinin Cd^{+2} 'nin toksisitesinin direkt hedefi olabileceği hipoteziyle tutarlıdır (Prozialeck ve Lamar 1999).

Kadmiyumun toksik etkisi

Kadmiyumun toksisitesi ilk defa 1955'de Japonya'da İtai İtai hastalığıyla bulunmuştur. Kadmiyumun bu hastalıkta en önemli etkileri böbrek hasarları (tübülür ve glomerular fonksiyon bozuklukları), immun eksiklikler, kemik hasarları (osteomalazi ve osteoporos), uyluk kemiği ağrısı, bel ağrısı, iskelet deformasyonudur. Kadmiyum kontaminasyonu nehrin üst tarafında bulunan çinko madeninin atık sularından kaynaklanmıştır ve bu bölgede yaşayan insan popülasyonunun sağlığını derinden etkilemiştir (Nogawa ve ark. 2004).

İn vitro sistemde hücrelerin ağır metallere maruz bırakılması, ağır metallerin immun toksik etkisinin aydınlatılması için gereklidir. 0.1, 1 veya 10.0 ppm $CdCl_2$ fare splenositlerinde (dalak dokusunda meydana gelen monosit) toksik değilken 1000ppm konsantrasyonunda toksik etki göstermiştir (Lee 1992).

İn vitro olarak NK (natural killer) hücreleri aktivitesi ve insan periferik kan lenfositlerinde (PBL) antikora bağlı hücrel sitotoksikite, $CdCl_2$ eklendiğinde doza ve zamana göre baskılanabilmiştir. Sitotoksik etki yalnızca Cd kültürüne çok erken eklenirse gözlenmiştir. Cd'un etkisinin bu hücrede erken sinyal yolu üzerine olduğu ileri sürülmüştür (Cifone ve ark. 1990).

Cd'un humoral immun sistem üzerine in vitro etkisinin artırıcı olduğunu gösterilmiştir. Örneğin Balb/c farelerinin mononükleer dalak hücre kültürüne 5 gün 4-40 μM $CdCl_2$ eklenmesi PFC'nin (antibody plaque forming cell) SRBC'ye (sheep red blood cell) olan cevabının anlamlı şekilde artmasıyla sonuçlanmıştır (Fujimaki ve ark. 1981). CBA/J farelerinin kültürüne veya CBA/J veya Balb/c farelerinin karaciğer mononükleer hücre kültürlerine 0.1, 1.0, 10.0 veya 100 μM $CdCl_2$ eklendiğinde SRBC'de PFC sayısında artış gözlenmiştir (Lee 1992).

Kadmiyumun hücre üzerine çok çeşitli etkileri bulunmaktadır. Kadmiyumun hücre döngüsü sürecine, bölünmesine, farklılaşmasına, DNA replikasyonuna ve DNA tamirine ve apoptoz yoluna etkileri bulunmaktadır (Oh ve Lim 2006). Kadmiyum bazı hücrel sinyallerin aktivasyonu ile hücre döngüsünü düzenlemekte, DNA metilasyonunu inhibe ederek ve/veya E-cadherin'e müdahale ederek hücre yapışmasına neden olmaktadır.

DNA sentezine ve hücre bölünmesine etkisi doza bağlıdır. 1 μ M kadmiyuma maruz kalma DNA sentezini ve hücre bölünmesini engellemektedir (Misra ve ark. 2003). Fakat kadmiyumun daha düşük konsantrasyonları DNA sentezini ve hücre bölünmesini artırmaktadır (Zglininicki ve ark. 1992).

Hücre döngüsünün düzenlenmesiyle ilgili bazı genler kadmiyuma maruz kalındıktan sonra aşırı ifade edilmekte ve bazı proteinler daha az regule edilmektedir, örneğin GRB2 ve SHC, RAS sinyal yolunun iki önemli proteini hücre bölünmesinde ve farklılaşmasında etkilidir. Kadmiyum RAS yolunun kinaz seviyesini artırmaktadır, bunlar: RAF-1, MAPK, MEK1/2, ERK1/2, p38 MAPK ve JNK (Misra ve ark. 2003). Kadmiyum muamelesi NF-kappaB'nin sitoplazmadan membrana translokasyonunu artırmaktadır (Jeong ve ark. 2004).

Kadmiyum protoonkogenler olan C-FOS, C-MYC ve C-JUN'lerin ve bazı translyasyon faktörlerinin aşırı ekspresyonlarına neden olmaktadır. Bu genler hücre bölünmesine ve kadmiyuma maruz kalınmasından sonra tümör gelişmesine neden olmuşlardır. Memeli hücrelerinde Cd^{+2} Myb-tipi transkripsiyon faktörünü aktive ederek cyclin D ve cyclin E ekspresyonuna neden olmuştur. Oysa bitkilerde Cd^{+2} Cyclin B'nin inhibisyonuna neden olmaktadır (Deckert 2005).

Kadmiyumun hücredeki toksik etkileri şekil 2.7.'de şematik olarak özetlenmiştir.

2.2.7.Kadmiyumun Oksidatif Strese etkisi

Kadmiyum zehirlenmesinden sonra DNA tek zincir kırığının oluşması oksidatif stresle ilişkilidir (Waisberg ve ark. 2003). Çeşitli memeli hücreleri tiplerinde kadmiyumun yüksek sitotoksik (Cd^{+2}) konsantrasyonları DNA'daki tek zincir kırıklarıyla (SSB), kromozom hasarları, kardeş kromatit değişimi ve DNA- protein bağlanma başarısızlıkları ile ilişkilendirilmiştir (Misra ve ark. 1998, Fotakis ve ark. 1997). Kadmiyum sitotoksik olmayan konsantrasyonlarında DNA'ya hasar veren diğer ajanlarla kombine edildiğinde genotoksik bir maddedir. Gerçekte kadmiyum UV ışınları, gama-radyasyonu gibi diğer mutajenik ajanlarla kombine edildiğinde veya metil metan-sulfonat, N-methyl-N-nitrosourea, N-nitro-N-nitrosoguanidine gibi alkilleyici kimyasalların varlığında ko-genotoksik etki göstermektedir (Lynn ve ark. 1997, Murkherjee ve ark 2004).

Kadmiyum zehirlenmesi hücrel DNA'yı etkilemekte ve oksidatif stresi artırmaktadır. Fakat ROS'un üretimi dolaylıdır. Kadmiyum redox-aktif bir metal değildir. DNA'ya direkt bağlanmamakta ve DNA ile kararlı etkileşime girmemektedir. Bu kadmiyumun direkt genotoksik olmamasının nedeni olarak gösterilmiştir (Waalkes ve Poirier 1984).

4 farklı kemirgen hücresi 0.1, 5, 10, 50 veya 100 μM CdCl_2 maruz bırakılarak direkt DNA hasarının olup olmadığı gözlenmiştir. DNA zincir kırığının ölçülmesi için mikrofiltrasyon testi kullanılmıştır ve DNA-protein çapraz bağlarının ölçülmesi için filter-binding testi uygulanmıştır, bu lezyonlar kadmiyum muamelesiyle bağlantılıdır ve metallerin genotoksitesine aracılık etmektedir. Her ne kadar DNA hasarına olan duyarlılık farklı hücre hatlarında değişken ise de sadece tamamen tutulmuş hücrelerde artan bir DNA hasarı gözlenmiştir. Test edilen dört hücre hattından üçünde kadmiyumun neden olduğu sitotoksite ve genotoksiteye karşı metallothioninlerin neden olduğu önemli koruyucu etki gözlenmemiştir. Bu hücre hatlarında metallothioninler kadmiyumun neden olduğu DNA –protein çapraz bağlarına karşı koruyucu etki göstermemiştir. Deney sonuçları kadmiyumun direk genotoksik olmadığı hipotezini desteklemektedir (Misra ve ark. 1998).

5-35 μM kadmiyuma maruz kalan insan lenfosit hücrelerinde Cd^{+2} 'nin neden olduğu oksidatif stres 8-oxo-7, 8-dihidro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) adduktları gibi tipik oksidatif mutajenik lezyonlarını oluşturmaktadır (Mikhailova ve ark. 1997). Çin hemstırlarının yumurtalık hücrelerinde, 8-oxodG'nin en yüksek seviyesi S fazında gözlenmektedir. Kadmiyum DNA replikasyonunu azaltarak oksidatif DNA hasarına neden olmaktadır (Banfalvi 2000).

Kadmiyumun neden olduğu ROS HeLa ve sığır endotel hücrelerinde 1-20 μM kadmiyum konsantrasyonlarında superoksit iyonlarının ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve H_2O_2 seviyesinde artış ortaya çıkmaktadır. Kadmiyum ROS üretimindeki rolüne ek olarak DNA hasarı oluşmasına da dahil olmakta, ROS'un yok edilmesinde önemli rol oynayan antioksidatif proteinleri etkilemektedir. Normal sıçan karaciğer hücresi hatlarında kadmiyumun yüksek konsantrasyonları (100-300 μM) katalaz (CAT), glutatyonreduktaz (GR), glutatyonun metabolitleri ve okside olmuş glutatyon (GSSG) gibi bazı antioksidan proteinlerin aktivitelerini muameleden 4 veya 8 saat sonra azaltmıştır. Şaşırtıcı şekilde

superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi muameleden 4 saat sonra azalmış fakat 8 saat sonra tekrar artmıştır (Ikediobi ve ark. 2004).

Kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres sadece DNA hasarına (mutasyon) ve proteinlerin oksidasyonuna neden olmamakta aynı zamanda lipidlerin de peroksidasyonuna neden olmaktadır. Örneğin kadmiyum konsantrasyonu 7,5 µM den yüksek olduğunda iskelet kası hücrelerinde Cd₂Cl₂ lipid oksidasyonu gözlenmiştir (Yano ve Marcondes 2005).

2.2.8. Kadmiyumun DNA Metilasyonuna etkisi

DNA metilasyonu doğal olarak DNA modifikasyonunda meydana gelmektedir ve sitozin halkasının 5' pozisyonundaki karbona metil grubu (5-MeC) eklenmesiyle gerçekleşmektedir. Tümör dokularında karakteristik olarak global metilasyon durumunda bir azalma gözlenmekte ve buna DNA'nın belli bölgelerinde ki metilasyon artışı eşlik etmektedir (Robertson ve Jones 2000). Tümör supressorlerin promotor bölgesinde ki hipermetilasyon genlerin susturulmasıyla ilişkilidir, kanserde yaygın olarak meydana gelmektedir (Esteller ve ark. 2001, Lin ve ark. 2001, Patel ve ark. 2000).

Global DNA hipo metilasyonu kimyasalların neden olduğu kanser vakalarında önemli bir rol oynamaktadır (Baylin 2002, Razin ve Shemer 1999, Goodman ve Watson 2002). Bu durum ras ve metilasyonla susturulmuş diğer onkogenlerin hasarlı gen ekspresyonlarını kolaylaştırmaktadır (Ray ve ark. 1994). Ayrıca hipometilasyon metilasyonun neden olduğu yabancı genomik elementlerin susturulmasını azaltarak genomik bütünlüğün azalmasına sebep olmaktadır (Laird 1997). Sonradan ortaya çıkan kanser vakalarında Cd'un DNA metilasyonunu azalttığı görülmüştür (Takiguchi ve ark. 2003). Methionin DNA metilasyonunda metil grubunun donörü olarak S-adenosylmethionin (SAM) sentezi için gereklidir. Methionin'in bazı kanserojenlerin neden olduğu hipometilasyonu ve meme kanseri hücrelerinin poliferasyonunu engellediği rapor edilmiştir (Pereira ve ark. 2004, Tao ve ark. 2000).

Memeli hücrelerinde DNA'daki sitozin kalıntılarının DNA (5-cytosin) metiltransferaz (DNA MeTase) tarafından metilasyonu replikasyondan sonraki en sık görülen baz modifikasyonudur. Bu metillenen bölgelerin fonksiyonu tanıma ve gen

transkripsiyonunun düzenlenmesiyle ilişkilidir. Memeli DNA MeTase'ları, S-adenosylmethionin'den (SAM) DNA çift zincirinin CpG dinükleotid içindeki C-5 pozisyonundaki sitozin üstüne metil grubu transfer eden enzim grubudur (Bonfils ve ark. 2000).

2.2.9. Kadmiyumun gen ekspresyonuna etkisi

Memelilerin metallothioninleri (MT) sisteince zengin ağır metal bağlayan proteinlerdir. Bunlar kadmiyumun toksisitesine ve oksidatif strese karşı koruyucudurlar. %30 civarında cystein kalıntısı içerirler, bunların serbest kadmiyumu bağlama yeteneği olduğu bilinmektedir. Hücrelerin veya hayvanların kadmiyuma maruz bırakılması metallothioninlerin üretimini artırmasıyla sonuçlanmıştır, bu yol ağır metallerin detoksifikasyonundaki ilk yoldur. MT gen ekspresyonu kadmiyum ve oksidatif stres tarafından indüklenmektedir. Metallothionin kadmiyuma yüksek bir affinite ile bağlanmakta, bu da bu katyonların hücrede detoksifikasyonuna izin vermektedir. Metallothioninlerin önemi kadmiyuma maruz kalmış sıçanlara ekzojen metallothioninler verildiğinde oksidatif stresin azalması gerçeğiyle gösterilmiştir. MT seviyesi ile Cd^{+2} muamelesinden sonraki apoptoz arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır (Shimoda ve ark. 2001). Kadmiyum muamelesi insan periferik lenfositlerinde MT-1B hariç MT-1'in isoformu olan MT-1A, MT-1E, MT-1F, 1G, 1H ve 1X'in gen ekspresyonlarını artırmaktadır (Chang ve ark. 2006).

Kadmiyum zehirlenmesi, strese cevap veren diğer önemli proteinlerin, örneğin heat shock proteinler (HSP), ekspresyon seviyelerini değiştirmektedir. Proteinlerin kadmiyum tarafından denatürasyonu ve oksidasyonu HSP şaperonlarının aşırı ekspresyonlarına cevaptır (Parsel ve ark. 1994). Cd^{+2} ye maruz kalınmasından sonra HSP induksiyonu oksidatif stresin artmasına bağlıdır (Gaubin ve ark. 2004).

Kadmiyum zehirlenmesi HSP10, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP72, HSP89, HSP90, GRP78 gibi bazı şaperon proteinlerinin aşırı ekspresyonuna neden olmuştur. Bu durum yanlış katlanmış proteinlerin tamir edilmesini veya bütün proteinlerin ubiquitin-proteasom sistemi tarafından yok edilmesini kolaylaştırmaktadır.

Bazı durumlarda kadmiyumun neden olduğu hücre ölümlerinin p53 proteininin ve p53 mRNA seviyesinin kadmiyuma maruz kaldıktan sonra farklı hücre hatlarında artmasıyla

ilişkili olduğu gösterilmiştir (Achanzar ev ark. 2000). Ayrıca MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 10-20 μM kadmiyuma maruz kaldıktan sonra p53 serin 15'in fosforilasyonu ile aktive edilmiştir (Matsuoka ve Iqisu 2001). Cd^{+2} 'ye maruz kalan insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde p53 fonksiyonunda azalma, şekil değişiklikleri, DNA bağlanma aktivitesinin kaybolması, transkripsiyonel aktivitenin azalması ve gama- radyasyonuna bağlı DNA hasarı ile gözlenmiştir (Meplan ve ark. 1999).

2.2.10. Kadmiyumun DNA Tamir Mekanizmalarına etkisi

Kadmiyumun DNA tamir enzimlerini inhibe etmesi mümkündür. Kadmiyum düşük, sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda DNA tamir sistemlerini etkilemektedir. Bazı hücrel DNA tamir sistemleri kadmiyumun neden olduğu DNA tek zincir kırığı içeren hasarlarla ilgilidir: yanlış eşleşme tamiri (MMR), nükleotid kesip çıkarma tamiri (NER) ve baz kesip çıkarma tamiri (BER).

Yanlış Eşleşme Onarımı (MMR)

İnsan 293T hücrelerine kadmiyum verildiğinde veya alkilleyici ajanlarla muamele edildiğinde MMR'nin aracılık ettiği G2 fazında hücre döngüsünde alıkoyma baskılanır. MMR'nin bu şekildeki kadmiyum tarafından invitro inhibisyonu muameleden önce çinko eklenirse tersine döner (Lutzen ve ark. 2004). Kadmiyum 5 μM gibi düşük konsantrasyonlarda da MMR'yi tamamen inhibe edebilir.

Nükleotid Kesip Çıkarma Onarımı (NER)

Kadmiyuma maruz kalma NER'in farklı basamaklarını etkilemektedir: DNA hasarının tanınması, proteinlerinin DNA hasarının olduğu bölgeye bağlanması ile gerçekleşmektedir (Jin ve ark. 2003). Kadmiyuma maruz kalma xeroderma pigmentosum A'yı (XPA) inhibe etmiştir. Bu protein, 273 aminoasit içermektedir, birçok çevresel ajanın neden olduğu DNA lezyonunun tanınması ile ilgilidir ve diğer NER proteinlerini hasarlı bölgeye toplamaktadır. Kadmiyum muamelesinden sonra XPA'nın DNA'ya bağlanma kapasitesi çok azalmıştır (Cleaver ve States 1999). Bu

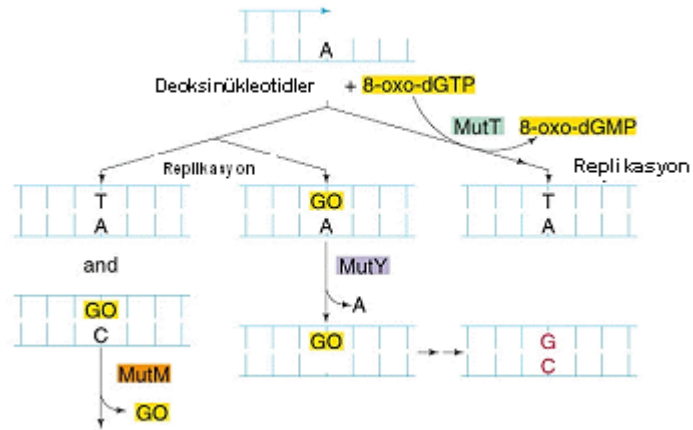
durum çinko parmak (zinc finger) yapısındaki Zn'nin kadmiyum ile yer değiştirmesinden kaynaklanmaktadır (Asmuss ve ark. 2000, Kopera ve ark. 2004).

Kadmiyum XPA diğer NER proteinleri ile etkileşebilmektedir [Excision repair cross-complementing protein 1 (ERCC1), transkripsiyon faktör 2H (TF2H) ve replikasyon proteini A (RPA) 99] ve bu proteinlerin normal fonksiyonunu bozmaktadır (Miyamoto ve ark. 1992, Ikegami ve ark. 1998).

Baz Kesip Çıkarma Onarımı (BER)

GO sistemi:

MutM ve MutY genlerinin ürünü olan 2 glikozilaz DNA'daki 8-oxoG (GO) lezyonlarından kaynaklanan mutasyonları önlemek için çalışmaktadırlar. MutT geninin ürünüyle birlikte GO sistemi olarak adlandırılmaktadırlar. DNA'da spontan oksidatif hasar neticesinde GO lezyonları oluştuğunda mutM geni tarafından kodlanan glikozilaz lezyonları uzaklaştırmaktadır. MutY geninin ürünü olan ikinci bir glikozilaz yanlış eşleşen adeninini uzaklaştırmaktadır ve böylece DNA polimeraz 1'in aracılık ettiği tamir mekanizmaları ile sitozinin doğru şekilde yerleştirilmesini sağlamaktadır (Kremer ve ark. 2004). GO tamir sistemi Şekil 2.6.'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.6.: GO Tamir Mekanizması (Kremer ve ark. 2004).

Kadmiyuma maruz kalma BER'in önemli proteinlerinden formamidopirimidin glikozilaz'ı inhibe ve modifiye etmektedir. Bu glikozilaz oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarının tamiri ile ilgilidir, *Escherichia coli*'de BER'i başlatmaktadır. Oksidatif

olarak oluşan baz modifikasyonları, örneğin 8-oxo-7,8-dihidroguanin (8-oxoGua) ROS'un neden olduğu büyük lezyonlardan biridir, glikozilaz bunu tanımakta ve tamir etmektedir. 8-oxoGua sabit adenin formuna dönüşebilmektedir. DNA replikasyonundan sonra tamir edilmemiş 8-oxoGua, G-C çiftinin T-A çiftine dönüşmesine neden olmaktadır. 8-oxoGua lezyonu yüksek mutajeniktir ve genomik stabiliteyi etkilemektedir (Moriya ve ark. 1991).

Kadmiyum Fpg proteininin çinko parmak yapısına yönelmektedir. Fpg proteininin C terminalinde bulunan çinko parmak yapısındaki bir sisteinin ayrılması Fpg proteininin DNA'ya bağlanmasını inhibe etmiştir (O'Connor ve ark.1993).

OGG1 (8-oxoguanin-DNA glycosylaz-1) proteini memelilerin Fpg proteininin homologudur. OGG1 yapısal olarak Fpg'den farklıdır fakat fonsiyonları aynıdır. OGG1 8-oxoG gibi oksidatif hasarlara karşı bir savunma sistemidir.

Kadmiyum zehirlenmesi transkripsiyon faktörü olan Specificity protein-1 (SP1)'in DNA bağlanma aktivitesinin azalması ile ilişkilidir. Alveolar epitel hücrelerinde kadmiyum muamelesinden sonra fosforilasyonla Sp1'in DNA'ya bağlanma aktivitesi azalmıştır. İnsan hücrelerinde transkripsiyon faktörü SP1'in hOGG1 promotörüne bağlanmasının azalması hOGG1 transkripsiyonunun azalmasıyla sonuçlanmıştır. OGG1 (8-oxoguanine-DNA glycosylase-1) 8-oxoG gibi oksidatif hasara karşı koruyucu bir sistemdir (Watkin ve ark. 2003).

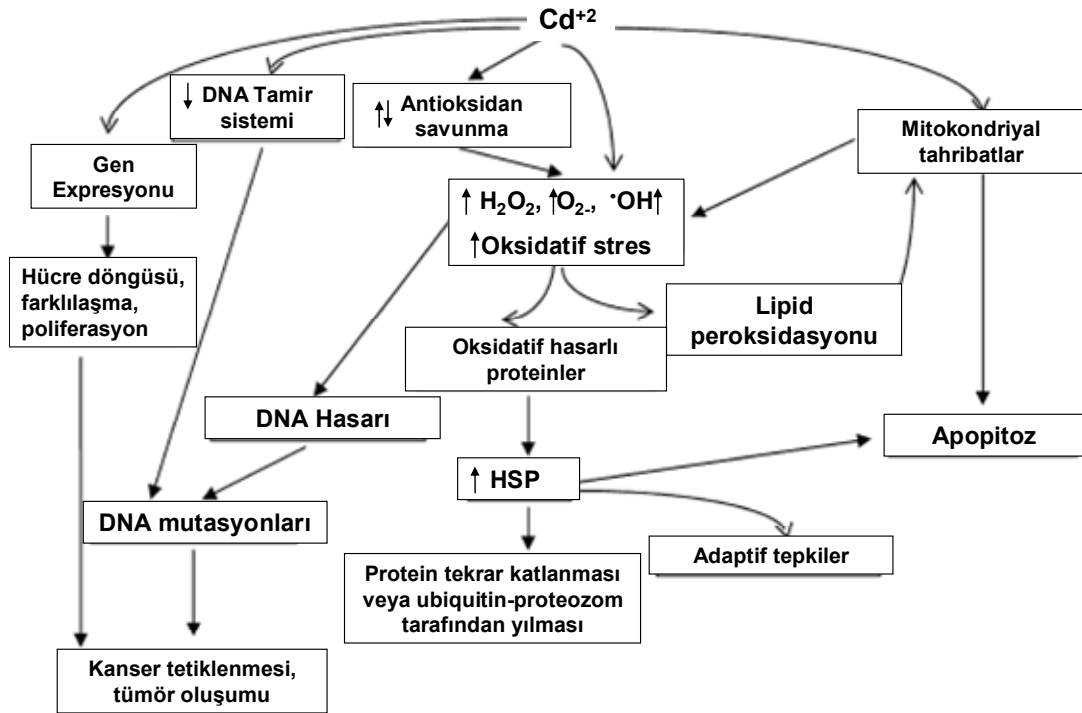
Kadmiyumun yüksek konsantrasyonu (>10 µM) Ape1 nükleaz aktivitesini inhibe etmektedir. NER proteini olan Apurinic/aprimidic (AP) endonükleaz1 (Ape1) DNA Mg⁺² bağımlı reaksiyonlar gibi DNA hasarına neden olan temel reaksiyonları onarımını başlatmaktadır. Ape1 endonükleaz aktivitesinin kadmiyum tarafından inhibe edilme mekanizması bilinmemektedir (McNeill ve ark. 2004).

Ek olarak poly(ADP-ribosyl)ation uzunluğunun kadmiyum tarafından azaltılması tek zincir kırığının (SSB) BER tarafından tamir edilmesiyle alakalıdır (Hartwig ve ark. 2002). PARP N-terminalindeki DNA bağlanma bölgesinde 3 sistein ve 1 histidin bulundurmaktadır (Schreiber ve ark. 1992).

Çeşitli proteinlerin NAD⁺a bağlı poly(ADP-ribosyl)asyonu DNA tek zincir kırığının oluşmasında ki ilk olaydır. Kromatin yapısını açmakta ve tamir proteinlerinin DNA'nın hasarlı bölgesine toplanmasına izin vermektedir (Gradwohl ve ark. 1990). Poly ADP Riboz Polimeraz (PARP) SSB'nin tamir edilmesini koordine etmekte ve

hücre döngüsünün düzenlenmesini ve ölüm yolunu (P53 ve AIF etkileşimi ile) düzenlemektedir (Koh ve ark. 2005).

Memeli hücrelerinde caspase'nin iç ve dış olmak üzere aktive ettiği iki büyük yol vardır. Dış yolda (extrinsic) ölü reseptörlerin bağlanması caspase-8'in (öncü caspase) aktivasyonuna neden olmaktadır. İç yolda çeşitli hücresel stresler mitokondrinin yaşlanmasına, mitokondri membranının depolarizasyonuna, sitokrom c'nin serbest kalmasına neden olmaktadır. Cd^{+2} 'nin apoptotik yolu harekete geçirdiği tartışılmaktadır. Bazı çalışmalarda caspase'nin Cd^{+2} 'nin neden olduğu hücre ölümünde anahtar rol oynadığı ileri sürülmektedir (Kondoh 2002). Bazı çalışmalar ise Cd^{+2} 'nin caspase'a bağlı yollar vasıtasıyla apoptozu uyardığını ileri sürmektedir (Harstad ve Klaassen 2002, Lemarie 2004). Cd^{+2} apoptozu hücre tipine ve maruz kalma şekline uygun olarak harekete geçirmektedir.



Şekil 2.7.: Hücredeki kadmiyum toksisitesinin biyolojik sonuçlarının genel şeması (Berlin ve Averbek 2006).

2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

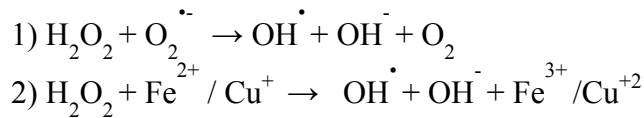
Damar sertliği, hipertansiyon, diyabetteki damar komplikasyonları ve kalp yetmezliği gibi kalp damar hastalıklarında reaktif oksijen türlerinin miktarı artmaktadır (Bagi 2009).

Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), hidroksiradikalleri (OH^{\cdot}), peroksiradikalleri (RO_2^{\cdot}), alkoly radikalleri (RO^{\cdot}) ve hidroksiperoksil radikalleri ($H O_2^{\cdot}$) reaktif oksijen radikalleridir. Fakat H_2O_2 reaktif oksijen radikali olmamasına rağmen Fenton reaksiyonları ile reaktif oksijen türlerini oluşturmaktadır.

Memeli hücrelerinde potansiyel reaktif oksijen (ROS) kaynakları mitokondrideki elektron transfer zinciri, araşidonik asiti metabolize eden lipoksigenaz enzimi ve cycloksigenaz, sitokrom P450, ksantin oksidaz, NAD(P)H oksidaz, ayrılmamış nitric oksit sentaz (NOS), peroksidaz ve diğer hem proteinleridir. Bu sistem moleküler oksijenin bir elektron alarak süperoksite dönüşmesini katalizlemektedir. Süperoksit NO'yu inaktif yaparak peroksinitrite dönüştürür. Çevresel koşullarda süperoksit kendiliğinden ya da süperoksitdismutaz (SOD) tarafından katalizlenerek hidrojenperoksite dönüşmektedir. NO'nun eksikliği H_2O_2 'nin oluşumunu artırabilir. Bazı enzimler örneğin ksanthin oksidaz ve glukoz oksidaz oksijene 2 elektron vererek direk H_2O_2 'yi oluşturabilir (Kowaltowski ve ark. 2009).

Ağır metallerin varlığında H_2O_2 Fenton reaksiyonlarına girerek çok reaktif olan hidroksi radikalleri oluşturmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 ve hidroksi radikali üretildiğinde bunlar proteinleri ve lipidleri oksitleme yeteneğindedir ve DNA zincir kırıklarına neden olabilmektedir (Stohs ve Bagchi 1995).

Fenton reaksiyonları:



1 Haber-Weiss reaksiyonu; 2 Fenton reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Fenton reaksiyonları oksidatif DNA hasarını açıklayan bir hipotezdir ve bu hipoteze göre OH· radikalleri DNA ya saldırarak hasar oluşturmaktadır. Hidroksi radikallerinin etkili olabilmesi için DNA'nın çok yakınında veya üzerinde oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek hidroksi radikallerinin hücreye difüzyonla girerek DNA'ya ulaşma ihtimali oldukça azdır. Dolayısıyla hücrede hidroksi radikalleri hidrojen peroksidin Fe ve Cu ile reaksiyona girmesiyle oluşmaktadır (Burçak ve Andican 2004).

2.4. Antioksidanlar

Halliwell ve Whiteman'ın tanımına göre “antioksidanlar oksitleyici bir maddenin dozuna kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda bu maddenin oksitleyici etkisinden koruyan veya oksidasyonu engelleyen maddelerdir” (Halliwell ve Whiteman 2004).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki etmektedirler.

- 1) **Toplayıcı Etki:** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküllere çevirmektedirler. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki göstermektedirler.
- 2) **Bastırıcı Etki:** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürmektedirler. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- 3) **Zincir Kırıcı Etki:** Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engellemektedirler. Hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki göstermektedirler.
- 4) **Onarıcı Etki:** Serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarmaktadırlar (Baskin ve Salem 1997).

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

A) Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

Enzim olan endojen antioksidanlar: 1) Süperoksit dismutaz (SOD). 2) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px). 3) Glutatyon S-Transferazlar (GST). 4) Katalaz (CAT). 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi. 6) Hidroperoksidaz (Harold 2006).

Enzim olmayan endojen antioksidanlar: 1) Melatonin. 2) Seruloplazmin. 3) Transferrin. 4) Miyoglobinin. 5) Hemoglobinin. 6) Ferritin. 7) Bilirubin. 8) Glutatyon. 9) Sistein. 10) Metiyonin. 11) Ürat. 12) Laktoferrin. 13) Albümin (Harold 2006).

B) Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler (Harold 2006).

Vitamin eksojen antioksidanlar: 1) α -tokoferol (vitamin E) 2) β -karoten 3) Askorbik asit (vitamin C) 4) Folik asit (folat) 5) Ürik asit 6) Glutasyon (Harold 2006).

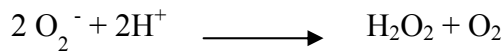
Endojen Antioksidanlar

Enzim olan endojen antioksidanlar

Organizmalar oksidatif stresle başa çıkmak için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler geliştirmiştir, bunlar arasında süperoksit radikallerini H_2O_2 'e indirgeyen süperoksit dismutaz (SOD) ve H_2O_2 'yi su ve oksijene indirgeyen katalaz (CAT) bulunmaktadır, bu enzimler çok reaktif olan hidroksi radikallerinin (OH) oluşmasını engellemektedirler. Bu hidroksi radikalleri lipid peroksidasyonuna, protein denaturasyonuna ve DNA da mutasyonlara neden olabilirler (Halliwell 1991).

Süperoksit Dismutaz (SOD):

Süperoksit radikallerinin H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşmesini sağlamaktadır (Kwee ve ark. 1991). SOD enziminin konsantrasyonu organa göre değişebilmektedir. Akciğer, kalp, karaciğer ve böbrek gibi metabolizması hızlı olan organlarda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Serbest radikal hasarına karşı son derece savunmasız olan beyinin glutasyon peroksit aktivitesi katalaz aktivitesinin 7 katı kadardır (Friedovich 1995).

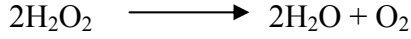


Bu enzimin iki formu vardır ve bunlar sitoplazmik (Cu, Zn-SOD) ve mitokondrial (Mn-SOD) süperoksit dismutazdır (McCord ve Fridovich 1969). Birçok çalışmada akciğer kanserinde antioksidan enzimlerin aktivitelerinin normal akciğer dokusundakinden daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Akciğer kanseri hastalarında SOD aktivitesindeki azalma süperoksit serbest radikallerinin artmasına neden

olmaktadır. SOD'un azalması ROS tarafından inaktivasyonu nedeniyle olmaktadır (Steaper 1997).

Katalaz (CAT):

Katalaz enzimi H₂O₂'i su ve oksijene parçalamaktadır.



Hayvanlarda hidrojen peroksit katalaz ve glutatyonperoksidaz tarafından detoksifiye edilmektedir. Hidrojenperoksitin hidroksi radikallerini oluşturmasını engellemektedir. Katalaz esas olarak peroksizomlarda bulunmakta fakat az miktarda sitoplâzma ve mikrozomlarda bulunmaktadır (Gaetani ve ark. 1996).

Eksojen antioksidanlar

Vitamin olan eksojen antioksidanlar

Vücutta serbest radikalleri temizleyen çeşitli enzimler vardır. Ek olarak hücre de küçük moleküler ağırlıkta ki antioksidanlar bulundurmaktadır. C ve E vitaminleri önemli antioksidanlardır. Yüksek dozlarda bazı vitaminler istenmeyen etkiler gösterebilmekte ve artan dozla beraber bu etkilerin şiddeti de artmaktadır. Vitaminlerden bazılarının besinlerle aşırı tüketilmesi olasılığı düşüktür fakat yüksek dozda vitamin yüklenmesi mümkündür. Bazı vitaminlerin yeterince yüksek dozlarının mide bulantısı, ishal ve kusma gibi yan etkileri olabilmektedir. Vitaminlerin yan etkileri ortaya çıktığında iyileşme dozun azalması ile gerçekleşmektedir. Bireyin tolere edebileceği vitamin konsantrasyonları yaşa ve sağlık durumuna göre değişmektedir (Canter ve ark. 2007).

Vitamin alınmasının ve eksikliğinin etkileri şekil 2.8.'de özetlenmiştir.

C Vitamini

Son çalışmalar vitamin C ve kronik rahatsızlıklar arasında ki ilişkiye dikkat çekmektedir. Örneğin vitamin C'nin alınmasının atar damarlarda ki kan basıncını azaltan yönde etki yaptığı rapor edilmiştir (Block 1991). Diğer taraftan vitamin C nin kanseri önleme etkisi birçok çalışmada tartışılmakta ve bu noktaya dikkat çekilmektedir. Nobel ödüllü Pauling ve arkadaşı Cameron soğuk algınlıklarının iyileştirilmesi ve

önlenmesi aynı şekilde kanserin de başlangıcının engellenmesi için askorbik asidin yüksek dozlarda kullanılmasını tavsiye etmektedirler. Yapılan çalışmalarda turunçgilleri haftada iki defa tüketen yaşlıların ölüm riskinin haftada bir defadan az turunçgil tüketen yaşlıların ölüm riskinin yarısı kadar olduğu dikkat çekmektedir. Önemli biyokimyasal ve fizyolojik deliller askorbik asit fonksiyonunun serbest radikalleri temizlediğini ve nitratlardan potansiyel kanserojen N-nitroso bileşiklerinin oluşmasını engellediğini ve bunun da mide kanserine karşı koruduğunu göstermektedir (Drake ve ark. 1996, Block 1991). Fakat bazı çalışmalar C vitamini eklenmesinin pozitif bir etkisi olmadığını göstermektedir (Moertel ve ark. 1985). Mayo Clinic’de kanser hastalarındaki klinik çalışmalar C vitamini verilen gruplar ve kontrol grupları arasında hayatta kalma süresi açısından önemli bir fark olmadığını göstermiştir (Moertel ve ark. 1985). Ek olarak lipid hidroperoksidleri askorbik asitle reaksiyona girerek DNA’ya hasar veren ürünleri oluşturmaktadır. Bu görüşe göre askorbik asit mutajeniteyi ve kanser riskini artırabilmektedir (Lee ve ark. 2001). Sonuç olarak tümör hücrelerinde yüksek miktarlarda askorbik asit bulunması kemoterapi veya radyasyon terapisini etkilemektedir. Bu terapiler süresince oksidatif mekanizmalar hücre ölümüne neden olmaktadır. Ancak askorbik asit takviyesi kanser tedavisinin etkisini azaltmaktadır (Agus ve ark. 1999).

Başka önemli bir nokta da vitamin C’nin pro-oksidan olarak davranmasının mümkün olmasıdır. Vitamin C’nin bu pro-oksidatif reaksiyonları in vitro ve in vivo ortaya çıkmaktadır (Childs ve ark. 2001). Demirin askorbik asitle beraber uzun süreli alınması LDL’nin lipid peroksidasyonunun artışına neden olmakta ve damar tıkanması riskini artırmaktadır (Berger ve ark. 1997). Diğer bir çalışmada fazla demir yüklenmiş plazmada askorbik asit antioksidant gibi davranmakta ve in vivo lipid oksidatif hasarını önlemektedir (Chen ve ark. 2000).

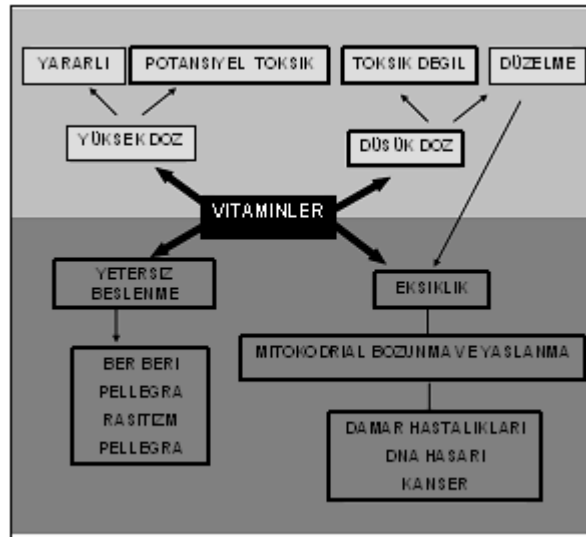
E Vitamini

Epidemik çalışmalar vitamin E’nin fazla miktarda alınmasının yaşla ilgili ve kronik hastalıkların riskini azalttığını göstermektedir. Deneysel çalışmalar hastalıkların önlenmesinde ve tedavi edilmesinde vitamin E’nin sağlık için önemli olduğunu göstermiştir. A-tocopherol vitamin E’nin vücuttaki en büyük formudur, tekrar eden hastalıklar için (Chappell ve ark. 1999), yaşa bağlı göz hastalıkları (Mares-Perlman ve

ark. 2000), metabolik düzensizlikler (Jain ve ark. 2000) ve nörolojik bozukluk düzensizlikleri için faydalı olmaktadır (Sano ve ark. 1997).

2003'de α -tocopherol ve β -karotenlerin kalp damar hastalıklarından ölüm ve bu hastalıklara yakalanma üzerine etkileri uzun süre test edilmiştir (Vivekananthan ve ark. 2003). Vitaminlerin farklı populasyonlarda pozitif bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Virtamo ve ark. 2003). Diğer bir çalışma da her gün 200 IU E vitamini alımının evde hasta bakıcı himayesindeki yaşlılarda solunum yolları enfeksiyonunun tekrarlanma oranının düşürmede etkili olmadığı (Meydani ve ark. 2004) ve aynı vitaminin 600 IU gün aşırı alınmasının sağlıklı kadınlarda kanser veya büyük kalp damar hastalıkları üzerine yararı olmadığı gösterilmiştir (Lee ve ark. 2005). Yeni araştırmalar β karoten, A vitamini ve E vitamini ilavesinin ölüm oranını atışıyla ilişkilendirmektedir (Bjelakovic ve ark. 2007).

Diyetin antioksidanlarla yüklenmesi veya antioksidanlarca zengin meyvelerin veya sebzelerin artan alınımı birçok çalışmada periferik kan lenfositlerinde oksidatif DNA hasarını azaltmıştır. DNA hasarı kanseri başlatırken bu sonuçlar meyvelerin ve sebzelerin DNA'ya atak yapan serbest radikalleri engelleyerek kansere karşı koruduğu görüşünü doğrulmuştur (Frnech ve Rinaldi 1994).



Şekil 2.8.: Vitamin alınmasının ve eksikliğinin etkileri (Vinã ve ark. 2007).

2.4.1.Flavonoidler

Flavonoidler polifenolik bileşiklerdir. 4000 kadar çeşidi bulunmaktadıdır. Bunlar flavonoidler, flavonlar, flavanonlar, katechinler, antokyosiyamidlerdir ve çok sayıdaki memelide farklı biyolojik etkiler göstermektedirler. Naringin greyfurttaki ve turunçgillerdeki en baskın flavanondur (Ng ve ark. 2000).

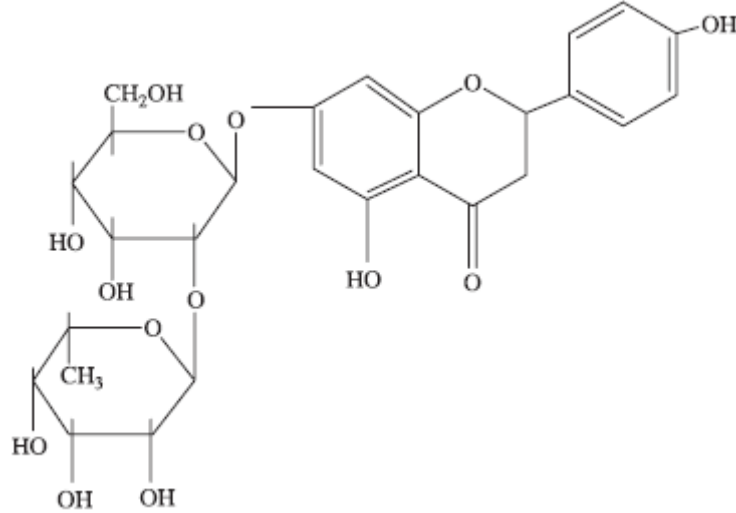
Flavonoidler birçok bitkide ve meyvede kendiliğinden oluşan polfenolik bileşiklerin büyük grubudur. İnsan diyetinde bol miktarda bulunur ve kanser ve kalp damar hastalıklarını önleyici etkisi vardır. Bu bileşikler kas gücünü, damarların iltihabi durumlara dayanıklılığını, antioksidan aktivitesini ve serbest radikalleri söndürebilme yeteneğini artırmaktır. Avrupa'da ilaç reçetesi ile kronik toplardamar yetmezliği gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar (Cesarone ve ark. 2006).

Flavonoidler bilinen doğal ilaçlardır, antioksidan, anti-inflammatory, antikanser, antimikrobial ve antiviral etkileri içeren biyolojik/farmakolojik özellikler göstermektedirler. Meyvelerin ve sebzelerin biyoaktif bileşenlerine olan ilgi, bu bileşenlerin çeşitli kalp damar hastalıklarına ve kanserin bazı tiplerine karşı olan koruyucu etkisi nedeniyle son yıllarda artmıştır (Gorinstein ve ark. 2003). Turunçgillerde asıl biyoaktif bileşenler askorbik asit, karotenoidler, flavonoidler, limonoidlerdir (Yu ve ark. 2003). Son zamanlarda özellikle turunçgillerden izole edilen anti-inflammatory etki gösteren flavonoidlere ilgi gösterilmiştir. Birçok flavonoid antioksidan aktivitesini B halkasındaki çok sayıda hidroksil grup vasıtasıyla gerçekleştirmektedir (Rotelli ve ark. 2003). Bu bölge biyomoleküllerin anti-inflammatory etkisinden sorumludur. Serbest radikalleri temizlemesi ve lipid peroksidasyonunu engellemek yanında flavonoidlerin anti-inflammatory aktivitesi arachidonate metabolizmasındaki siklooksijenaz ve 5-lipooksijenaz yolunun inhibisyonu ile alakalıdır (Morikawa ve ark.2003).

2.4.1.1. Naringin

Naringinin Kimyasal Yapısı

Naringinin kimyasal yapısı şekil 2.9.'da gösterilmiştir.



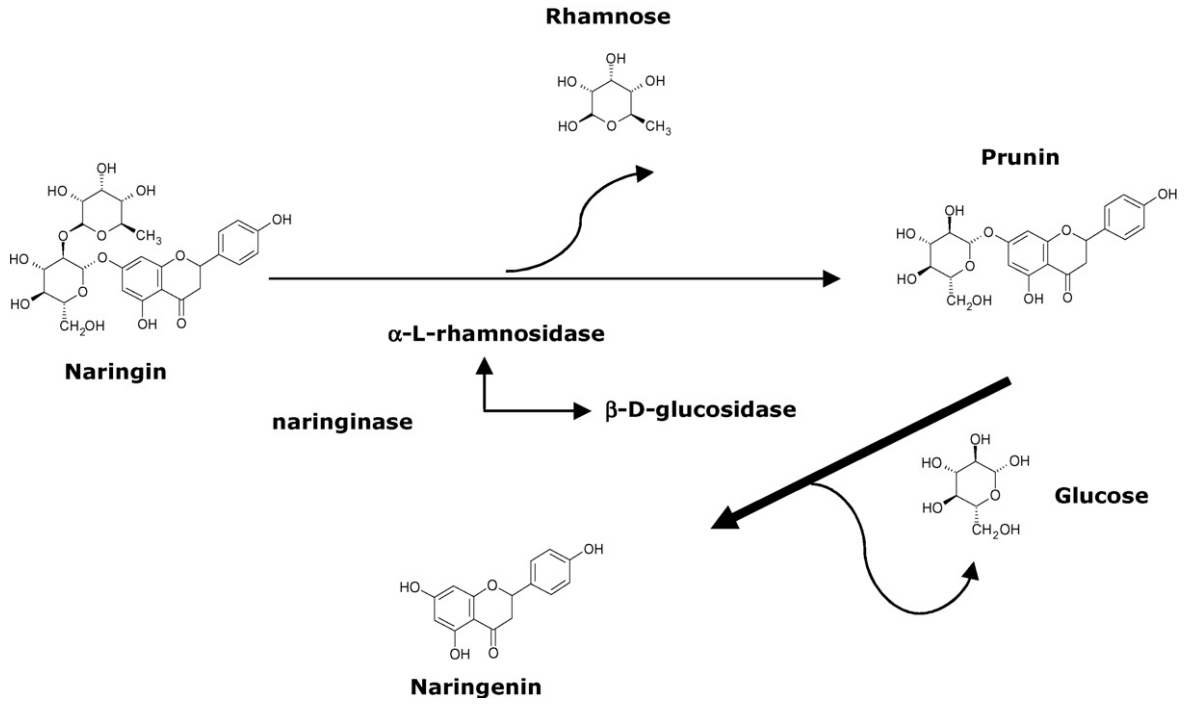
Şekil 2.9.: Naringinin kimyasal yapısı, 7-(2-O-(6-deoxy-alpha-L-mannopyranosyl)-beta-D-lucopyranosyloxy)-2,3-dihydro-4',5,7-trihydroxyflavone (Jagetia ve ark. 2007).

Naringin (4',5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside) greyfurt suyundaki en çok bulunan flavonoiddir ve naringenin (4',5,7-trihydroxyflavanone) gibi antioksidant ve antiinflammatör aktivite göstermektedir.

Naringinin Bulunduğu Bitkiler

Naringin, *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus unshu*, *Citrus nobilis*, *Citrus tachibana*, *Citrus junos*, *Artemisia selengensis*, *Artemisia stolonifera*'nın meyvelerinde *Cudrania cochincinensis*'nin köklerinde, *Poncirus* türlerinin meyvelerinde *Mabea fistulifera*, *Swartzia polyphylla*'nın meyvelerinde bulunmaktadır (Jagetia ve Reddy 2002).

Naringin α -ramnosidaz ve β -glukosidaz gibi enzimlerin aktivasyonu ile naringenine dönüşebilmektedir (Shiratori ve ark. 2005). Naringinin naringenine parçalanması şekil 2.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10.: Naringin, α -rhamnosidaz ve β -glukosidaz aktivitesi ile prunin, rhamnoz, naringenin ve glikoza parçalanmaktadır (Jagetia ve ark. 2007).

Naringenin insan sağlığına etkileri

Naringin farmakolojik ve tedavi edici özellikler gösterir; bunlar antimutajenik, antimikrobiyal, anti-inflamatory, kolesterol düşürücü, serbest radikalleri topayıcı ve antioksidant etkilerdir (Jeon ve ark. 2004).

Naringin ve naringenininin antioksidant aktiviteleri in vivo önemli bir role sahip olabilirler. Bu bileşiklerin antioksidan, anti-inflamatory özellikleri iltihaplı hayvan deneyi modellerinde araştırılmıştır.

Naringenin etkisi in vivo ve in vitro farklı olabilmektedir. Naringin ağızdan alındığında emilmeden önce enterobacteria tarafından naringenin gibi aglikonlarına hidroliz edilmektedir (Ameer ve ark. 1996). Naringenin, naringenin aglycon'u ve metaboliti'dir. Naringin ve naringenininin metabolik farmokokinetiği kıyaslandığında naringenin sıçanlara damar ve ağız yoluyla naringin ise ağız yoluyla verilmektedir. Naringenininin serumdaki konsantrasyonu enzimatik parçalanmadan önce ve sonra ölçülmüştür. Ağızdan alınan naringenininin biyoyararlılığı %4 dür oysa konjugant naringenin alındığında %8'e arttığı gösterilmiştir (Hsiua ve ark. 2002).

Naringinin kemik gelişimine etkisi

Naringinle muamele edilmiş sıçanlarda kemik gelişimi açısından, uyluk kemiğinin uzunluğu, çapı, kalsiyum ve fosfor seviyesi açısından daha üstündür. Kontrol grubundakinden daha fazla naringin alan sıçanların kemiklerin mineral yoğunluğu daha fazladır. Bu da naringinin osteoporozun yönetimi üzerine olumlu etki ettiğini göstermektedir (Wei ve ark. 2007).

Naringin BMP-2 promotorunu aktive edebilmektedir ve kemik gelişimini aktive etmektedir. BMP-2 insanda ve hayvanda kemik gelişimi sağlayan bir büyüme faktörüdür (Wong ve Rabie 2005).

Naringinin kan kolesterolü seviyesine etkisi

Naringinin kolesterolü düşüren güçlü bir ajan olması HMG-CoA reduktazı inhibe etmesiyle ilişkilendirilmiştir (Shin ve ark. 1999). Kolesterol varlığı apo B lipoproteinlerinin karaciğerden salgılanmasının düzenlenmesinde anahtar bir rol oynamakta ve kolesterol sentezi ve apo B lipoproteininin üretimi arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır (Thompson ve ark. 1996, Watts ve ark. 1995). Homozigot kalıtsal hiperkolesterolde artan bir kolesterol biyosentezi gözlenmektedir, yani artan bir pro B lipoprotein üretimi vardır (Bilheimer ve ark. 1979). Hepatic HMG-CoA reduktaz kolesterol biyosentezi yolunda sınırlandırıcı bir enzimdir ve inhibitörleri birçok hayvan türünde ve insanlarda da plazmadaki kolesterol düştüğünde oldukça etkilidir (Amin ve ark. 1993).

LDLR-KO fareleri naringin'in HMG-CoA reduktaz'ın inhibisyonu ile olan ilişkisini farelerde araştırmak için seçilmiştir. LDL reseptörlerinin yokluğuna bağlı olarak hayvanlarda kolesterol biyosentezi ve plazmadaki kolesterol miktarı anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu fareler homozigot kalıtsal hiperkolesterol araştırmaları için LDL reseptör genlerinin bozulmasıyla oluşturulmuştur. Yabanıl tip farelere zıt olarak LDLR-KO farelerinde düşük miktardaki kolesterolle beslendiklerinde plazmadaki kolesterol seviyesi anlamlı yükseliş göstermektedir (Ishibashi ve ark. 1993).

Naringin LDL-reseptörlerinin eksikliğinde hepatic HMG-CoA reduktaz enzimini inhibe ederek plazmadaki kolesterol konsantrasyonunu azaltmaktadır. Naringin

eklenmesi kolesterolle beslenen LDLR-KO farelerinde plazmadaki kolesterolün düşmesine katkıda bulunmaktadır (Kima ve ark. 2004).

Naringinin kan plazmasındaki etanol seviyesine etkisi

Etanolla muamele edilmiş sıçanlara naringin verilmesi plazmanın, hepatic lipidlerin ve hepatic TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) seviyesinin ve plazmadaki etanol konsantrasyonunun azalmasıyla sonuçlanmıştır. Bu belirtiler hepatic SOD ve GSH-Px aktivitesinde ki artışla ilişkilidir. Naringin, etanol alınmasıyla oluşan kötü etkilere karşı etanol ve lipid metabolizması gibi karaciğer antioksidan savunma sistemlerinin aktivitesini artırarak mücadele etmektedir (Seo ve ark. 2003).

Alkol, ADH (alkoldehidrogenaz) tarafından asetaldehit'e ve ALDH (aldehiddehidrogenaz) tarafından asetata parçalanmaktadır. Asetaldehit etanolün çok toksik bir metabolitidir ve alkolik karaciğer rahatsızlıklarına neden olmaktadır. Kronik alkol alımından sonra karaciğerdeki asetaldehit birikimi ADH ve ALDH aktivitesi ile belirlenmektedir. Naringin ADH ve ALDH aktivitesini artırarak plazmadaki etanol konsantrasyonunu azaltmaktadır (Seo ve ark. 2003).

Naringinin Kalp Damar Hastalıklarına etkisi

Naringin kalp damar hastalıklarının gelişimini engellemektedir. Naringin muamelesi büyüme inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır ve p53'e bağlı p21WAF1 ekspresyonunun induksiyonu; VSMC 'de (damarların düz kas hücreleri) siklinlerin ve CDK'nın az regule edilmesi, hücre döngüsünün G1 fazında tutuklanmasına neden olmaktadır. ERK (extracellular signal regulated kinase = hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz) fonksiyonunun bloke edilmesi naringine bağlı p21WAF1 (p21) ekspresyonunu inhibe etmekte, naringin'in neden olduğu hücre poliferasyonu, inhibisyonunu geri döndürmekte ve hücre döngüsü proteinlerini azaltmaktadır. Naringin muamelesi Ras ve Raf aktivasyonunu artırmaktadır (Lee ve ark 2008).

P21 VSMC'de CDK'nın ilk negatif düzenleyicisidir. Cyclin/CDK komplekslerinin kinaz aktiviteleri p21WAF1 gibi CDK inhibitörleri tarafından negatif olarak düzenlenmektedir. Bu inhibitörler hücre döngüsünün devamlılığını G1 fazında cyclin/CDK kompleksinin inaktivasyonu ve bağlanması ile bloke ederler (Taner ve ark.1998).

Naringinin Cytochrome P450'ye etkisi

İn vitro çalışmalarda naringinin antimutajenik etkisi hakkında olumlu ve olumsuz sonuçlar bulunmaktadır. Diğer taraftan bazı ilaçlar greyfurtla beraber alındığında biyoaktiviteleri artmaktadır. Bu etkinin nedeni insandaki Cytochrome P450 (CYP) 3A4 enziminin naringin tarafından inhibe edilmesidir (Kupferschmidt ve ark. 1998). Cytochrome P450 karaciğerdeki ilaç metabolizmasında yer alan tipik bir enzimdir, birçok ilacın parçalanması için çok önemlidir. P450 ailesi üyeleri arasında yer alan CYP3A, P450 tarafından katalizlenen metabolizmaların büyük çoğunluğunda yer alan en önemli enzimdir

Çalışmalar greyfurt suyunun CYP3A'nın katalitik aktivitesini güçlü şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Meyve sularının CYP3A'nın inhibisyonuna etkileri greyfurt > karadut > yabani üzüm> nar >siyah ahududu şeklindedir. Her meyvenin kendine özgü bir içeriği vardır ve inhibe edici etki de bu farklı içeriğe bağlıdır (Hidaka ve ark. 2005). Greyfurt suyu bazı ilaçların plazmadaki miktarlarının artmasına neden olmaktadır, örneğin calcium channel antagonistleri (Bailey ve ark. 1993, 1998), cyclosporin (Yee ve ark. 1995), midazolam (Kupferschmidt ve ark. 1995), HIV proteaz inhibitörleri (Lilja ve ark. 1998) ve HMG-CoA redüktaz inhibitörleri (Hidaka ve ark. 2004).

Naringinin antioksidan etkisi

Flavonoidlerin serbest radikalleri temizlemesi gibi antioksidan etkileri radikallere hızlı şekilde hidrojen atomu aktarması ile gerçekleşmektedir. Naringin de bu antioksidan özellikleri taşıyan bileşikler içerir. Naringinin C halkasında C-4'de karbonil grup ve A halkasındaki C-5'deki ve B halkasının C-4'ündeki hidroksil grubu bulunmaktadır. Naringin gibi C-4 karbonil grup ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları içeren flavonoidler demir iyonları ile chelatlar oluşturmakta ve flavonoidlerin metal iyonlarını ayırma yetenekleri Fenton sisteminde serbest radikallerin oluşmasını engelleyerek anti-lipoperoksidatif özelliğe katkıda bulunmaktadır. Flavonoidler serbest radikalleri temizleme aktivitelerini demir iyonları ile kompleksler oluşturduktan sonra da korumaktadır ve bu metal iyon chelatlarının oluşumu flavonoidlerin antioksidan mekanizmalarından biridir (Cook ve Samman 1996).

2.5. Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) Ve Kromozom Hasarı (CA) Test Yöntemleri

2.5.1. Kardeş kromatit değişimi (SCE):

Hücre döngüsünün S-fazı boyunca DNA replikle olmakta ve her kromozom sentromerden sıkıca tutunan birbirinin aynı duplike olmuş iki kardeş kromatit içermektedir. Kardeş kromatitler mitozun geç profazında ve erken metafazında hücre bölünmesinden önce açıkça görülebilmektedirler. SCE kardeş kromatitlerin etkili olarak kırıldığı ve bir diğeriyle fiziksel değişim bölgesinden birleştiği bir süreçtir (Taylor 1958).

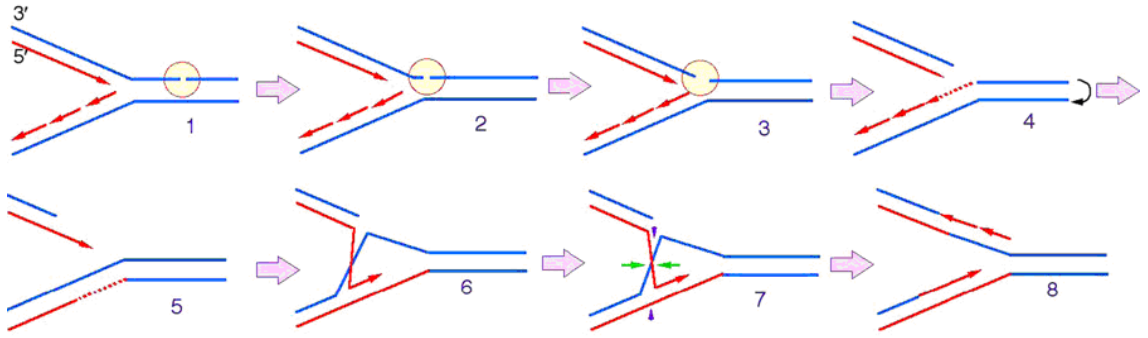
SCE ilk defa Taylor tarafından bitki hücrelerinde tritium ve otoradyografi kullanılarak gözlemlenmiştir. Daha sonra DNA baz analogu olan 5'-bromodeoxyuridin (BRDU)'in Hoechst 33258 boyası ile kombine edilmesiyle kardeş kromatitlerin ayırt edilebileceği ve SCE'ler gözlenebileceği keşfedilmiştir (Latt 1973). BRDU timine çok benzemekte ve replikasyon sırasında uzayan DNA iplikleri içine girmektedir. Standart FPG (florosans artı Gimsa) boyama metodu BRDU içeren kültürde büyüyen hücrelerde değişimleri gözlemek için güvenilirdir. DNA replikasyonu semikonservatif olduğundan BRDU'nun tamamı her bir çift heliksin yeni oluşan ipliğine dahil olmaktadır. BRDU'lu kültürdeki ikinci büyüme döngüsü boyunca iki kardeş kromatit BRDU içeriği açısından farklılık göstermektedir (Perry ve Wolff 1974). Orijinal DNA kalıbının bir ipliğini taşıyan kromatitin bir ipliği normal diğer ipliği BRDU içermektedir. Diğer kardeş kromatit her iki ipliğinde de BRDU taşımaktadır. BRDU renk açıcı özelliğe sahiptir dolayısıyla daha çok BRDU içeren kromatitler daha açık renkte görülmektedir.

UV radyasyonuna maruz bırakılmayı gerektiren FPG tekniğine alternatif uygun bir teknikte DNA denaturasyonu sırasında BRDU yerine bağlanan antikolar kullanılmaktadır. DNA propidium iodid ile veya flüoresan boya DAPI ile zıt boyanarak SCE olaylarını daha kolay hesaplamamızı sağlayacak görüntü oluşmasına izin vermektedir. Antikor kullanılan metodun bir avantajı da BRDU'nun yerini alan şeyin çok daha az kullanılması ve böylece BRDU'nun neden olduğu SCE' nin azaltılabilesidir (Pinkel ve ark. 1985).

SCE'nin moleküler mekanizması

SCE doğal olarak normal DNA replikasyonu sırasında ve çatallanma başarısızlığına bağlı olarak eğer ortamda BRDU çok azsa veya hiç yoksa her döngüde hücre başına 3-4 değişim olarak tahmin edilmektedir (Stoilov ve ark. 2002). Yukarıda bahsedildiği gibi BRDU kendisi de SCE'ye neden olduğu gibi (Zhao ve ark. 1992) tek zincir kırığı ve alkali değişim bölgelerinin seviyesini de artırmaktadır (Dillehay ve ark. 1982). *E. coli*'deki biyokimyasal ve genetik araştırmalar BRDU'nun urasil'e dönüştüğünü ve bunların urasil -DNA glykosylase tarafından uzaklaştırılmasını takiben abazik endonükleazlar tarafından tek zincir çentiği oluşturulduğunu göstermektedir (Krych ve ark. 1979).

Boyama için BRDU yerine biotin-dUTP'nin kullanıldığı deneylerde iyonize radyasyon ve UV-C ile BRDU varlığına atfedilenden daha fazla SCE üretildiği bulunmuştur (Wojcik ve ark. 2004). Mitomisin C'nin (MMC) neden olduğu SCE BRDU kullanımının bir sonucu değildir. Çapraz bağ ajanları genel olarak SCE indükleyicileridir, muhtemelen çapraz bağların tamir edilmesi sırasında oluşan kırık replikasyon çatallarının onarılması için homolog rekombinasyona ihtiyaç duyulmaktadır (Thompson 2005). Hücrede tek zincir kırığı (SSB) miktarını artıran olaylar SCE'yi etkili şekilde tetiklemektedir (Thompson ve ark. 1982): Bu olaylar XRCC1 eksikliği, poly (ADP-riboz) polymeraz 1 (PARP-1)'in inhibisyonu (Murcia ve ark. 1997), hidrojen peroksite maruz kalma (Speit ve ark. 1982), DNA sentezinin hidroksiüre, aphidicolin veya camptothecin tarafından inhibe edilmesi olarak sıralanabilir. Bunlar denatüre edilmemiş pules field jel elektroforezinde çift zincir kırığı gibi davranan kırık replikasyon çatalları üreten ilaçlardır (Saleh-Gohari ve ark. 2005). Böylece SCE gibi gerçekleşen bu en basit yol şekil 2.11'de gösterildiği gibi parental zincirde bir gap veya kırık ile karşılaşıldığında kırık DNA replikasyon çatalı homolog rekombinasyon (HR)-aracılığı ile yeniden başlatılmaktadır (Helleday 2003).



Şekil 2.11.: Homolog rekombinasyon mekanizması: Replikasyon çatalının temel ipliğinde tek zincir kırığı veya gap ile karşılaşıldığında SCE'nin oluşum mekanizması. 1 ve 2. basamak: Çatal bir tek zincir kırığına yaklaşır. 3. basamak: çatal kırılır. 4. basamak: Kırılmayan kromatitdeki gapde tamir sentezi gerçekleşir. Eğimli siyah ok sonraki olayların görüntülenmesini kolaylaştırmak için yapısal değişimleri gösterir. 5. basamak: Kırık duplex'in ilerlemesi 3' tek zincir dizisi oluşturur. 6. basamak: Rad51 zincir tutunmasına aracılık eder. 7. basamak: Yönlenme sırasında Holliday (junction) birleşme noktasının çözülmesi yeşil oklar tarafından gösterilmektedir ve SCE ile sonuçlanır, bunlar parental zincirlerde kırmızı/ mavi renkteki birleşme yerleriyle gösterilmektedir. Yönlenme sırasındaki çözülme mor ok başları ile gösterilmektedir ve SCE üretmeyecektir. 8. basamak: Replikasyon çatalı onarılmıştır (Wilson ve Thompson 2007).

XRCC1, baz kesip çıkarma tamiri (BER) ve tek zincir kırığı tamiri (SSBR) ile ilgili yollara katılan enzim olmayan bir faktördür. BER ve SSBR hidrolitik parçalanma ürünlerini (urasil bazları ve abazik bölgeler) ve oksidatif lezyonları içeren (baz modifikasyonu ve tek zincir kırığı) spontan DNA hasarlarının birçok formunu düzeltmektedir.

XRCC1 eksik olan hücreler ki bunlarda kırık oranı yüksektir önemli derecede yüksek HR (homolog rekombinasyon) bölgelerini gösteren Rad51 seviyesine sahiptirler (Saleh-Gohari ve ark. 2005). Kırık çatalların HR benzeri süreçleri genotoksinler gibi replikasyon inhibitörlerinin eklenmesiyle üretmesi mümkün olmaktadır (Arnaudeau ve ark. 2001).

2.5.2. Kromozom Hasarı (CA):

Kromozomal hasarlar (CA) normal kromozom yapısını veya sayısını değiştirmektedir. Bu kendiliğinden veya kimyasal/ radyasyon muamelesi sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Russell 2002). Yapısal kromozomal hasarları doğrudan DNA

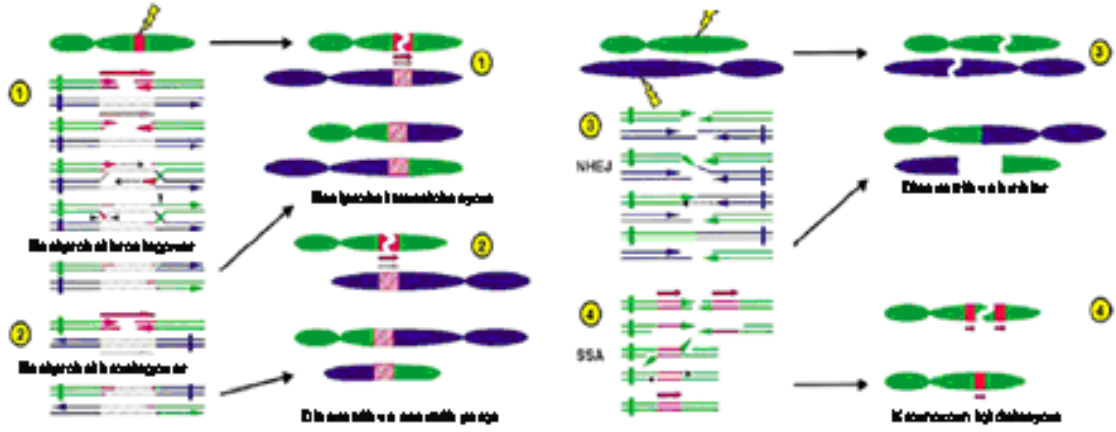
kırılmasıyla, zarar görmüş DNA kalıbı üzerindeki replikasyonla, DNA sentezinin inhibisyonu ve diğer mekanizmalarla meydana gelmektedir (Albertini ve ark. 2000). Morfolojik kriterlere göre yapısal kromozom hasarı iki ana sınıfa ayrılmaktadır: kromozom tipi hasar (CSA) , bir veya çok sayıda kromozomun her iki kromatitini içermektedir ve kromatit tipi hasar (CTA) bir veya birkaç kromozomun bir veya iki kromatitini farklı konumlarda içermektedir (Hagmar ve ark. 2004).

Yapısal kromozom hasarının oluşumunda DNA'da bir veya birkaç çift zincir kırılımı gerçekleşmektedir, fakat kromozom tipi hasar ve kromatit tipi hasar oluşumu mekanizmaları mutajen (iyonize radyasyon veya kimyasal) ve özel DNA tamir mekanizmaları açısından farklılık göstermektedir. Kromozom tipi hasar S fazından bağımsız klastojenlerle in vivo $G_0 - G_1$ lenfositlerinde tam onarılmamış çift zincir kırıkları ile ortaya çıkmaktadır (örneğin iyonize radyasyon). DNA sentezinden ve kromozom duplikasyonundan sonra $G_0 - G_1$ de oluşan hasarlar ikiye katlanmakta ve metafazda kromozom tipi kırıklar ve değişimler oluşmaktadır (bunlar disentrik ve halkasal kromozomlar, dengeli translokasyonlardır). CTA (kromatit tipi kırıklar ve değişimler) kültüre edilmiş lenfositlerin S- fazı boyunca in vitro ortaya çıkmakta, in vivo S- fazında klastojenlere bağlı olarak (örneğin kimyasallar) tek zincir kırılımı (SSB) ve baz değişimi görülmektedir (Hagmar ve ark. 2004). Şekil 2.12 de yapısal CA oluşumundaki mümkün olan mekanizmalara örnekler verilmiştir (Obe ve ark. 2002).

Yapısal kromozom hasarı DNA kırıklarıyla oluşmaktadır, bunların akibeti DNA kırıklarının akibetine bağlıdır. DNA kırıkları kromozomlar orijinal halinde onarılacak şekilde yeniden birleşmekte, yanlış şekilde birleşmekte ya da hiç birleşmemektedir. Bu son iki durum metafaz hücresinin mikroskopik incelenmesinde de görülebilmektedir. Kromozom hasarının bu tipi hücrenin ölümü için kesindir. Kararsız hasarlar (örneğin disentrik, halka ve kromozom fragmentleri) gösteren hücreler P53'e bağlı yolda apoptoz ile yok edilmektedirler (Schwartz ve Jordan 1997). Diğer taraftan dengeli translokasyonlar gibi kararlı hasarlar organizma için zararlı sonuçlara neden olabilmektedir çünkü delesyona uğramış yapılar apoptotik hücre ölümünü daha az etkilemektedirler.

Sayısal kromozom hasarı normal kromozom sayılarının değiştiğine işaret etmektedir (aneuploidi, poliploidi), ki bunlar anormal kromozom ayırımına uygun olarak

gerçekleşmekte ve kendiliğinden ya da aneugen uygulamaların sonucu olarak ortaya çıkmaktadırlar (Albertini ve ark. 2000).



Şekil 2.12.: Kromozom hasarı oluşum mekanizması: 1,2) Disentrikler ve translokasyonlar gibi CA lar farklı kromozomlarda lokalize olmuş homolog DNA dizileri arasında homolog rekombinasyon ile oluşmaktadır. 3) Dizi homologundan bağımsız iki çift zincir kırığına gerek duyulan non homolog endjoining (NHEJ) tarafından oluşturulan farklı CA'lar (örneğin disnetrikler), 4) tekrarlanan iki dizi arasındaki çift zincir kırığı, tek zincir birleşmesi (SSA=single-strand annealing) ile tamir edilebilmektedir (Obe ve ark. 2002).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanı

Hassas Terazı

Santrifüj

İnkübatör

Mikroskop

Buzdolabı

Mikropipet

pH metre

Vortex

Besiyeri tüpleri

Cam malzemeler

Flowkabin

Enjektör

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Firma	Katalog No
KCl	Merck	104936
KH ₂ PO ₄	Merck	104871
Na ₂ HPO ₄	Merck	106586
NaCl	Merck	106404
Nevparin	Mustafa Nevzat	
Gimsa	Merck	109204
İmmersiyon yağ	Merck	104699
Kolşisin	Sigma	D-7385
Fetal calf serum	Biochrom	S-0113
Penicilin, streptomycin	Sigma	P-4333
Phytohemagglutinin	Biochrom	M5030
RPMI medium	Sigma	R-8758
L-Glutamine	Sigma	G-7513
Hoechst (Bisbenzimidide)	Sigma	B-2883
Trisodyumsitrat	Merck	6432
BrdUrd	Sigma	B5002
Metanol	Merck	106008
Asetik Asit	Merck	100056
Naringin	Sigma	N1376
CdCl ₂ H ₂ O	Merck	B897411

3.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Kolşisin: 10mg lık Demecolcine 1ml steril distile su ile sulandırılır. Bu çözeltiden 0,1cc alınarak 10ml'lik steril distile su ile sulandırılır ve her kite bu solüsyondan 0,05cc katılır.

Hipotonik Çözelti: 0,075M KCl için 1,397gr KCl 250ml bidistile suda çözünür.

Fiksatif: 3:1 oranında metanol (3) ve asetikasit (1) karışımı.

KH₂PO₄ tamponu: 500 ml için 6,85gr KH₂PO₄ kullanılır.

Na₂HPO₄ tamponu: 1000ml için 18gr Na₂HPO₄ kullanılır.

Hoechst (Bisbenzimid) stok solüsyonu:

0,5 mg Bisbenzimid 10ml bidistile suda çözüldü. Aliminyum folyo ile sarılarak +4 de saklandı.

Giemsa (%5):

56ml Na₂HPO₄'den ve 44ml KH₂PO₄'den alınarak pH'ı 6,8 olan tampon çözelti hazırlanır. Bu tampon çözeltiden 95 ml alınarak 5ml Giemsa ile karıştırılır.

5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd):

0,0077 gr tartılarak 5ml steril saf suda çözünür ve koyu renkli şişede stoklanarak +4 de muhafaza edilir. Her bir kite 0,05 ml katılır.

PBS:

72 ml Na₂HPO₄ tamponu, 28 ml KH₂PO₄ içerisine 0,03 gr KCl ve 0,82 gr NaCl katılır bunun içinden 99,99 ml alınır ve 0,1 ml Hoechst solüsyonu ilave edilir.

2 x SSC:

8,82 gr trisodyumsitrat (2H₂O) ve 17,53 gr NaCl 100 ml distile suda çözünür bu 20 x SSC olur. 10 ml 20 x SSC'den alınır ve 90 ml distile su ilave edilerek 2 x SSC hazırlanır.

Kadmiyum Çözeltisi:

0.0015gr CdCl₂H₂O tartılarak 5ml steril distile suda çözülmüştür.

Naringin Çözeltisi:

0.0002gr Naringin tartılarak 1ml Fetalcalf içinde çözülmüştür.

Besiyerinin Hazırlanışı:

100cc RPMI 1640 medium.

15cc Fetal calf serum

2cc Glutamin

0,5cc Penicilin, streptomycin

2,5cc Phytohemagglutinin

Karışım steril Flow'da hazırlanır ve steril şişelere 5cc dağıtılır.

3.4. Yöntem:

SCE (kardeş kromatit değişimi) ve CA (kromozom hasarı) test yöntemleri uygulanmıştır.

Besiyeri Sayısının Belirlenmesi:

Her donör için 8 besiyeri çalışılmıştır. Ve her deneyin tekrarı yapılmıştır.

1.Tüp: 10 μ M Cd

2.Tüp: 20 μ M Cd

3.Tüp: 40 μ M Cd

4.Tüp: 1 μ g/ml Naringin

5.Tüp: 2 μ g/ml Naringin

6.Tüp: 40 μ M Cd ve 1 μ g/ml Naringin

7.Tüp: 40 μ M Cd ve 2 μ g/ml Naringin

8.Tüp: Kontrol

Bireylerin Seçimi

Araştırma grubu yaşları 23- 28 arasında değişen, hiç sigara kullanmamış, ilaç kullanmayan sağlıklı iki erkek iki bayan olmak üzere 4 kişiden oluşmaktadır. Deney grubunun yaş ortalaması $25.75 \pm 2,217$ dir.

Kan Örneklerinin Alınması

Enjektörlere bir miktar heparin çekilip boşaltılmış ve daha sonra bu enjektörlerle her kişiden 10 ml kan alınmıştır.

Lamların Temizlenmesi

Deneyden bir gün önce lamlar içi etanol dolu olan bir behere yerleştirilerek difrizde bekletilmiş ve preparatlar hazırlanmadan 5 saat önce kurularak üzerlerine hangi bireye ait olduğu ve dozlar yazılarak derin dondurucuda bekletilmiştir.

Preparatların Hazırlanması

1. Genetik Laboratuvarında daha önceden hazırlanan ve 37 °C'de inkübe edilmiş kitlelere 40 ar damla kan ekimi yapılmıştır. Kan ekimi steril Flow'da gerçekleştirilmiştir.
2. Tüpler 72 saat 37 °C'de inkübe edildi.
3. SCE yapılacak kültürlerle 24. saatte BRDU ilave edildi.
4. Tüplere 48. saatte belirlenmiş dozlarda kadmiyum ve naringin ilave edildi.
5. 70. saatte tüplere 0,5 ml kolşisin eklendi.
6. Tüpler 2 saat daha 37 °C'de inkübe edildi.
7. İnkübatörden çıkarılan tüpler santrifüj tüplerine boşaltılmış ve 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrasında tüplerdeki süpernatant kısım atıldı.
9. Tüplere 37 °C'de etüvde bekletilen hipotonik çözeltilerden 5 ml eklendi. Yavaşça karıştırıldı ve etüvde 10 dakika bekletildi.
10. Etüvden çıkarılan tüpler 3500 rpm'de 10dk santrifüj edildi.
11. Süpernatant atıldı ve vortex üzerinde damla damla dipfrizde bekletilen fiksatifden eklendi ve harvest işlemine başlandı.
12. 10 dakika süreyle damla damla fiksatif eklenerek harvest işlemine devam edildi.
13. İlk harvestten sonra tüplerin kapakları katıldı iyice karıştırıldıktan sonra dipfrizde 20 dakika bekletildi.
14. Dipfrizden çıkarılan tüpler tekrar 3500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra harvest işlemi 2 defa daha tekrarlandı.
15. Son harvestten sonra tüpler tekrar 3500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan kısım üzerine vortex'de 6-7 damla fiksatif eklendi.
16. Bu kısım pipetaj yapıldıktan sonra iki lam üzerine yayıldı.
17. CA preparatları havada kurutuldu.

18. SCE preparatları PBS'den geçirildikten sonra şaleye 99,99 ml PBS dolduruldu ve 0,1ml Hoechst eklenerek içine SCE preparatları yerleştirildi ve karanlıkta 10 dakika bekletildi. Çıkarılan preparatlar aynı pH daki PBS ile durulandıktan sonra ıslak şekilde 45 dakika UV ışığına maruz bırakıldı.
19. SCE preparatları 24 saat sonra 60 derecelik su banyosundaki 2 SSC içerisinde 15 dakika bekletildi.
20. Daha sonra çıkarılan lamalar bidistile su ile yavaş yavaş lamalar çatlatılmadan durulandı.

Preparatların Boyanması

CA preparatları cam şale içerisine dizildi ve %5'lik Giemsa ile 15 dakika boyandı. Preparatlar saf sudan geçirildi ve kurumaya bırakıldı. SCE preparatları kaynatma işleminden sonra %5'lik gimsa ile 25 dakika karanlıkta boyandı. Preparatlar saf sudan geçirilerek karanlıkta kurumaya bırakıldı.

Mikroskobik İncelemeler

CA Preparatlarının İncelenmesi:

Işık mikroskobunun immersiyon objektifinde (x100) her birey için iyi dağılmış ve eksik kromozomu olmayan 50 metafaz sayıldı. Kromozom anormallikleri kaydedilmiştir. Kromatit kırığı, kromozom kırığı, disentrik kromozom, poliploidi, halka kromozom, asentrik parçalar gibi anormallikler değerlendirildi. Ek olarak mitotik indeks hesaplandı.

SCE Preparatlarının İncelenmesi:

Işık mikroskobunun immersiyon objektifinde (x100) her birey için iyi dağılmış ve eksik kromozomu olmayan 50 M2 metafazı sayıldı. Toplam SCE miktarı hesaplandı ve hücre başına düşen SCE miktarı hesaplandı. Ek olarak M₁, M₂, M₃ metafazları sayılarak aşağıdaki formüle göre replikatif indeks hesaplandı.

$$RI = (1 \times M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3) / 100$$

İstatistiksel Hesaplamalar

Tüm donörlerden elde edilen verilerin her iki test yöntemindeki dozlara göre karşılaştırmaları tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile gerçekleştirildi. Fark grupları Tukey HSD testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm istatistiksel analizler SPSS 11.5 bilgisayar programı ile yapıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada ağır metal olan kadmiyumun insan kan lenfosit kültürlerindeki genotoksik etkisi ve naringinin, kadmiyumun yarattığı genotoksik hasara karşı göstermiş olduğu antigenotoksik etki in vitro kardeş kromatit değişimi (SCE) ve kromozom hasarı (CA) testleriyle ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.1., 4.2. ve 4.3.'de ve şekil 4.1., 4.2., 4.3., 4.5., 4.6. ve 4.7.'de verilmiştir.

4.1. Kromozom Hasarı Testinden Elde Edilen Sonuçlar

4.1.1. Kadmiyum dozlarının kromozom hasarı (CA) sonuçları:

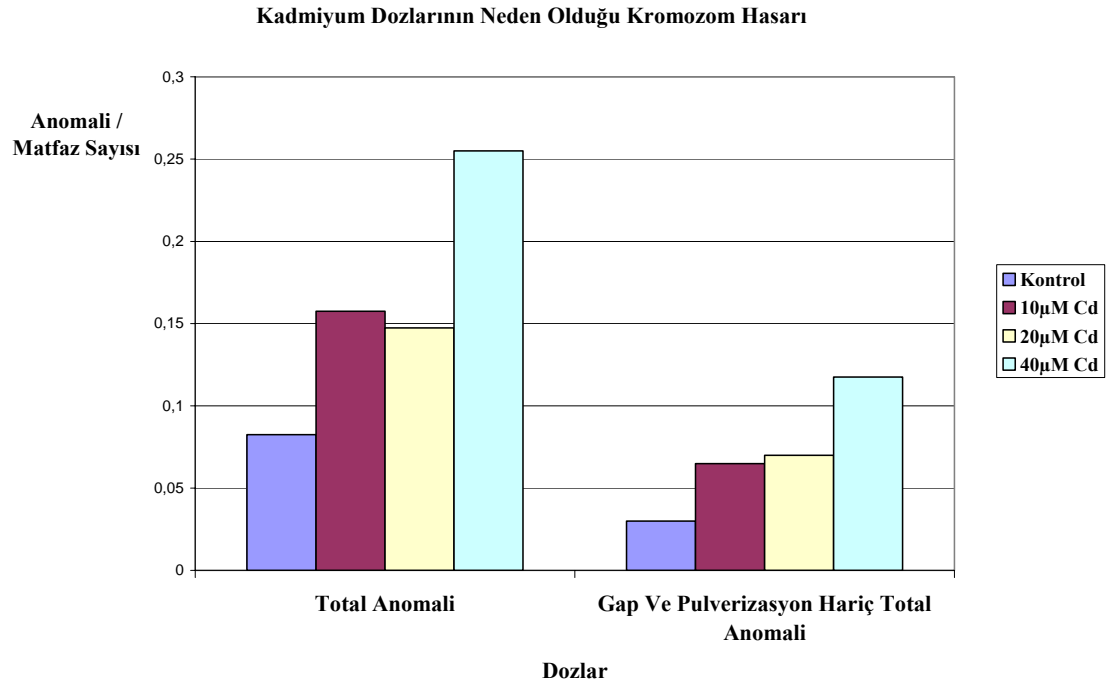
Kadmiyumun sırasıyla 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M dozları denenmiştir. Bu dozlardaki kadmiyum neden olduğu kromozom hasarı sonuçları çizelge 4.1.'de ve şekil 4.1.'de verilmiştir. Kadmiyum dozları kontrol grubuyla kıyaslanmıştır. Kontrol grubunda metafaz başına düşen total anomali miktarı 0.0825 iken kadmiyumun 10 μ M, 20 μ M ve 40 μ M doz gruplarında sırasıyla 0.1575, 0,1474 ve 0.255 olduğu saptanmıştır. Kontrol grubu ile kadmiyum dozları kıyaslandığında kadmiyum dozlarının hücre başına düşen total anomaliyi arttırdığı görülmektedir. Fakat kadmiyumun 10 μ M doz grubunda kontrol grubuna kıyasla metafaz başına düşen total anomali hasarında bir artış gözlenmiş olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). 20 μ M ve 40 μ M kadmiyum dozları kontrol grubuna kıyasla hücre başına düşen total anomaliyi anlamlı şekilde artırmıştır ($p<0.05$). İstatistik sonuçları çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Gap ve pulverizasyonlar hariç metafaz başına düşen total anomali miktarı kontrol grubunda 0.03 iken kadmiyumun 10 μ M, 20 μ M ve 40 μ M doz gruplarında sırasıyla 0.0649, 0.07 ve 0.1175 olduğu saptanmıştır. Beklendiği gibi uygulanan kadmiyum dozu arttıkça gap ve pulverizasyonlar hariç metafaz başına düşen total anomali miktarı da artış göstermiştir. Kontrol grubuna kıyasla kadmiyum 10 μ M'lık dozunun neden olduğu artış anlamlı değil iken kadmiyum 20 μ M ve 40 μ M dozlarının neden olduğu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$, Çizelge 4.2.).

Kadmiyumun dozları kendi içinde karşılaştırıldığında 10 μ M, 20 μ M ve 40 μ M doz gruplarında metafaz başına düşen total anomali oranı ise sırasıyla 0.1575, 0.1474 ve 0.255 şeklindedir. Beklenenin aksine 10 μ M kadmiyum doz grubundaki metafaz başına düşen total anomali miktarı 20 μ M doz grubundakinden daha yüksektir fakat bu fark

istatistiksel olarak anlamlı değildir. İstatistiksel olarak sadece 10 μ M ve 40 μ M kadmiyum doz grupları arasında bir farklılık gözlenmiştir ($p < 0.05$). Sonuçlar çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Gap ve pulverizasyonlar hariç total anomali bakımından kadmiyum doz grupları kendi içinde kıyaslandığında 10 μ M, 20 μ M ve 40 μ M kadmiyumun doz gruplarında ki anomali miktarında sırasıyla 0.0649, 0.07 ve 0.1175 şeklinde bir artış gözlenmiştir. 10 μ M ve 20 μ M'lık kadmiyum doz grupları arasındaki farkın istatistiki olarak anlamsız ($p > 0.05$) olduğu fakat 10 μ M ve 40 μ M'lık kadmiyum doz grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). İstatistik sonuçları çizelge 4.2.'de verilmiştir.

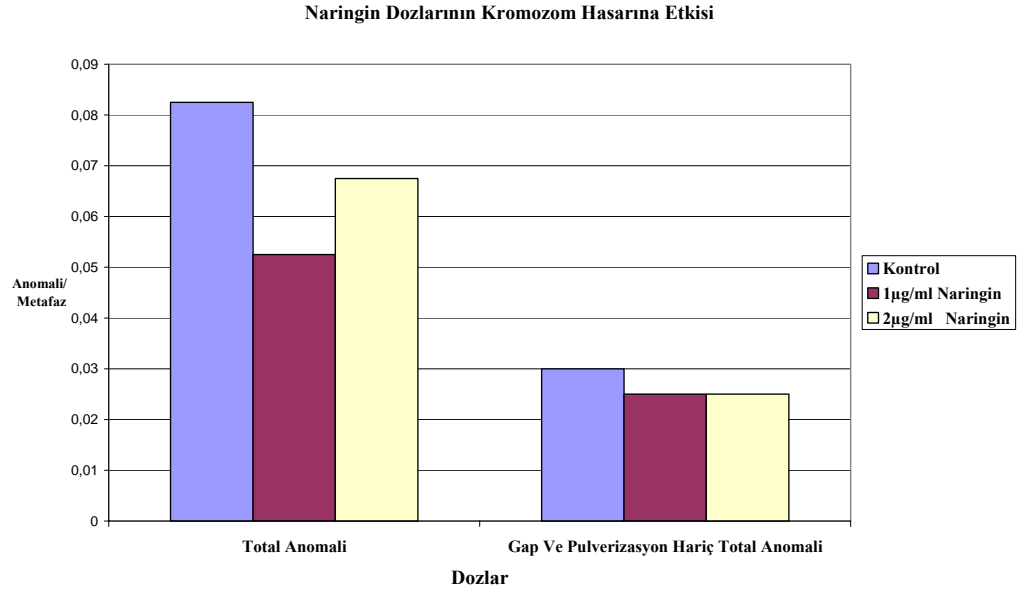


Şekil 4.1.: Kadmiyum dozlarının neden olduğu metafaz başına düşen total anomali miktarlarının ve gap ve pulverizasyonlar hariç metafaz başına düşen anomali miktarlarının karşılaştırılması.

4.1.2. Naringin dozlarının kromozom hasarı (CA) sonuçları:

Naringinin 1µg/ml ve 2µg/ml dozları denenmiştir. Bu dozlarda naringinin kromozom hasarına etkileri çizelge 4.1.'de ve şekil 4.2'de verilmiştir. Naringin dozları kontrol grubuyla kıyaslanmıştır. Metafaz başına düşen total anomali miktarının kontrol grubunda 0.0825 iken naringinin 1µg/ml dozunda 0.0525, naringinin 2µg/ml dozunda ise 0.0675 olduğu, gap ve pulverizasyonlar hariç metafaz başına düşen total anomali sayısının kontrol grubunda 0.03 iken naringin 1µg/ml doz grubunda 0.025, naringinin 2µg/ml doz grubunda ise 0.025 olduğu saptanmıştır. Naringin dozlarının kontrol grubuna kıyasla metafaz başına düşen total anomali miktarını ve gap ve pulverizasyonlar hariç metafaz başına düşen total anomali miktarını azalttığı görülmüştür fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). İstatistik sonuçları çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Naringin dozları kendi içinde kıyaslandığında beklenenin aksine 1µg/ml naringin doz grubunda metafaz başına düşen total anomalinin 2µg/ml naringin doz grubundakinden daha düşük olduğu görülmektedir, fakat istatistiki açıdan anlamlılık yoktur ($p>0.05$). Gap ve pulverizasyonlar hariç metafaz başına düşen total anomali miktarının ise naringinin her iki dozun da da aynı olduğu saptanmıştır. Naringin dozlarının kromozom hasarına etkisi şekil 4.2.'de görülmektedir.



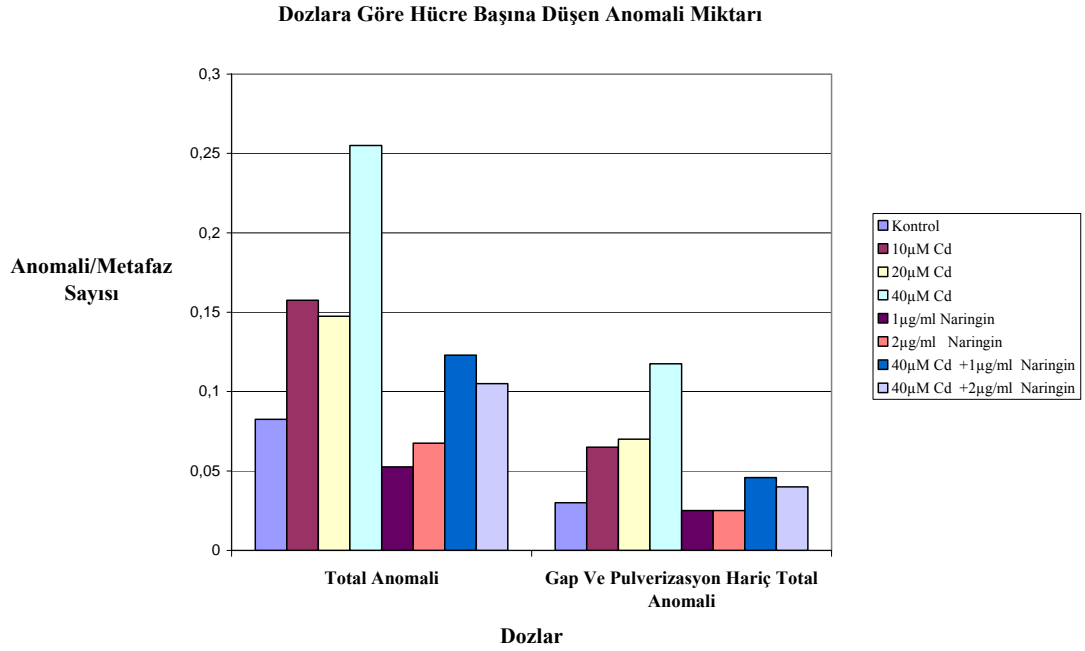
Şekil 4.2.: Naringin dozlarının total anomaliye ve gap ve pulverizasyonlar hariç tutulduğunda total anomaliye etkisinin grafiksel olarak gösterimi.

4.1.3. Kombine dozların kromozom hasarı (CA) sonuçları:

40 μ M kadmiyum dozu 1 μ g/ml ve 2 μ g/ml naringin dozlarıyla ayrı ayrı kombine edilmiştir. 40 μ M kadmiyum doz grubunda metafaz başına düşen total anomali miktarı 0.255 iken 40 μ M Cd + 1 μ g/ml naringin kombine doz grubunda 0.123'e, 40 μ M Cd + 2 μ g/ml naringin doz grubunda ise 0.105'e düştüğü saptanmıştır ve anomali miktarındaki bu azalma istatistiki açıdan da anlamlıdır ($p < 0.05$). Fakat kombine dozlar kendi içinde karşılaştırıldığında 40 μ M Cd + 2 μ g/ml naringin doz grubundaki metafaz başına düşen total anomali miktarı 40 μ M Cd + 1 μ g/ml naringin doz grubundakinden az olmasına rağmen bu iki grup arasında istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık yoktur ($p > 0.05$, Çizelge 4.2.).

Gap ve pulverizasyonlar hariç metafaz başına düşen total anomali miktarı 40 μ M kadmiyum doz grubunda 0.1175 iken 40 μ M Cd + 1 μ g/ml naringin doz grubunda 0.0459'e ve 40 μ M Cd + 2 μ g/ml naringin doz grubunda 0.04'e düşmüştür. Naringin, kombine dozlarında kadmiyumun neden olduğu gap ve pulverizasyonlar hariç metafaz başına düşen total anomali miktarını istatistiki açıdan anlamlı şekilde azaltmıştır ($p < 0.05$). 2 μ g/ml'lık naringin uygulaması 1 μ g/ml naringin uygulamasına kıyasla 40 μ M kadmiyumun neden olduğu anomaliyi daha çok azaltmasına rağmen istatistiki olarak kombine doz grupları arasında bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Sonuç olarak kromozom hasarı testinden elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde metafaz başına düşen total anomali ile gap ve pulverizasyonlar hariç hücre başına düşen total anomali miktarı 20 μ M, 40 μ M kadmiyum dozu uygulamalarında anlamlı bir artış göstermiştir. 40 μ M kadmiyumun neden olduğu anomali artışı naringin ilave edildiğinde anlamlı şekilde azalmıştır (şekil 4.3.). Fakat naringin dozlarının hasarı azaltıcı etkileri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

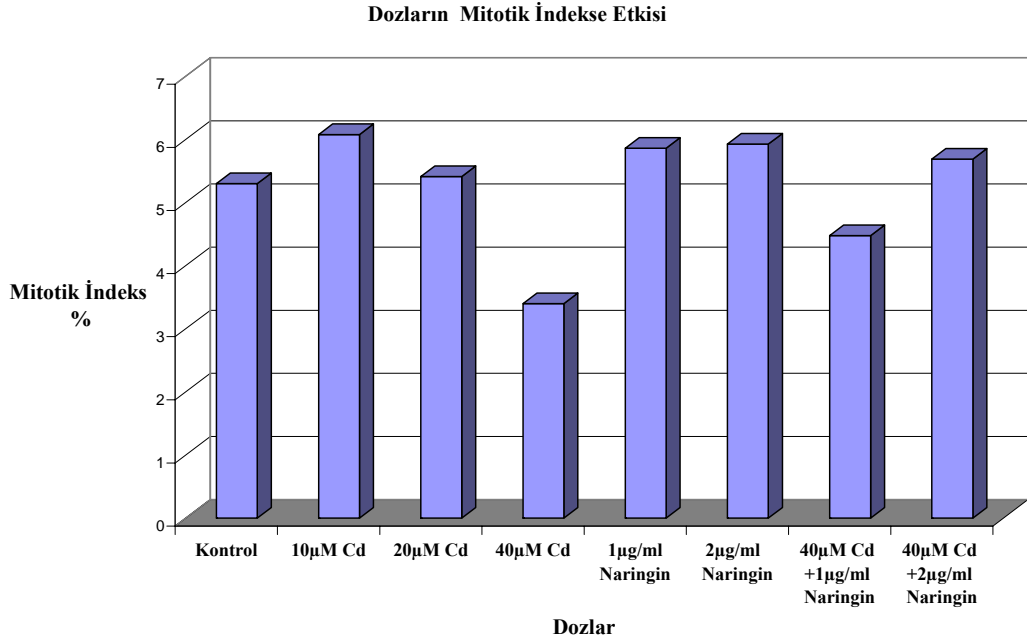


Şekil 4.3.: Kontrol, 10µM Cd, 20µM Cd, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin gruplarında hücre başına düşen total anomali ve gap ve pulverizasyonlar hariç hücre başına düşen anomali miktarı grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.2. Doz uygulamalarının Mitotik İndekse (Mİ) Etkileri:

Kontrol grubunda mitotik indeks % 5.3 olarak hesaplanmıştır. 10µM, 20µM, 40µM kadmiyum doz gruplarında ise sırasıyla %6.075, %5.412, %3.4 olduğu saptanmıştır. Kadmiyum uygulamasının Mİ'yi azaltması beklenmiştir fakat, 10µM, 20µM kadmiyum uygulamaları mitotiks indeksde istatistiki olarak anlamlı olmayan ($p>0.05$) artışa neden olmuştur. Sadece 40µM kadmiyum uygulaması Mİ'yi azaltmıştır fakat bu azalma anlamlı değildir ($p>0.05$). Kadmiyum dozlarının Mİ'e etkisi kendi içinde karşılaştırıldığında yine anlamlı bir azalma ya da artış söz konusu değildir ($p>0.05$). Naringin dozlarındaki mitotik indeks yüzdelерinin 1µg/ml ve 2µg/ml naringin doz gruplarında sırasıyla %5.86 ve 5.925 olduğu saptanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla naringin dozu arttıkça mitotik indeksde bir artış gözlene de bu artış anlamlı değildir ($p>0.05$). Kombine dozlar olan 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin doz grubundaki mitotik indeks yüzdesi sırasıyla %4.475 ve %5.6875 olarak bulunmuştur. 40µM kadmiyum doz grubuna kıyasla kombine doz gruplarında MI'de bir artış gözlene de bu artış anlamlı

değildir ($p>0.05$). İstatistik sonuçları çizelge 4.2.'de verilmiştir. Doz uygulamalarının MI'e etkileri şekil 4.4.'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.4.: Kontrol, 10µM Cd, 20µM Cd, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının mitotik indekse etkisinin grafiksel gösterimi.

4.3. Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) Testinden Elde Edilen Sonuçlar

4.3.1. Kadmiyum dozlarının Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) sonuçları:

Kadmiyumun 10µM, 20µM, 40µM dozları kullanılmıştır. Bu dozlarda ki kadmiyumun neden olduğu hücre başına düşen kardeş kromatit değişimi (SCE) sonuçları çizelge 4.3.'de ve şekil 4.5.'de verilmiştir. Kadmiyum dozları kontrol grubuyla kıyaslanmıştır. Kontrol grubunda metafaz başına düşen SCE miktarı 6.63 iken kadmiyumun 10µM, 20µM ve 40µM doz gruplarında sırasıyla 7.675, 8.34, 8.58 şeklindedir. Kadmiyum dozu arttıkça hücre başına düşen SCE miktarının arttığı gözlenmiştir. Fakat kontrol grubuna kıyasla sadece 20µM ve 40µM kadmiyum dozunun neden olduğu SCE/Hücre artışı anlamlıdır ($p<0.05$).

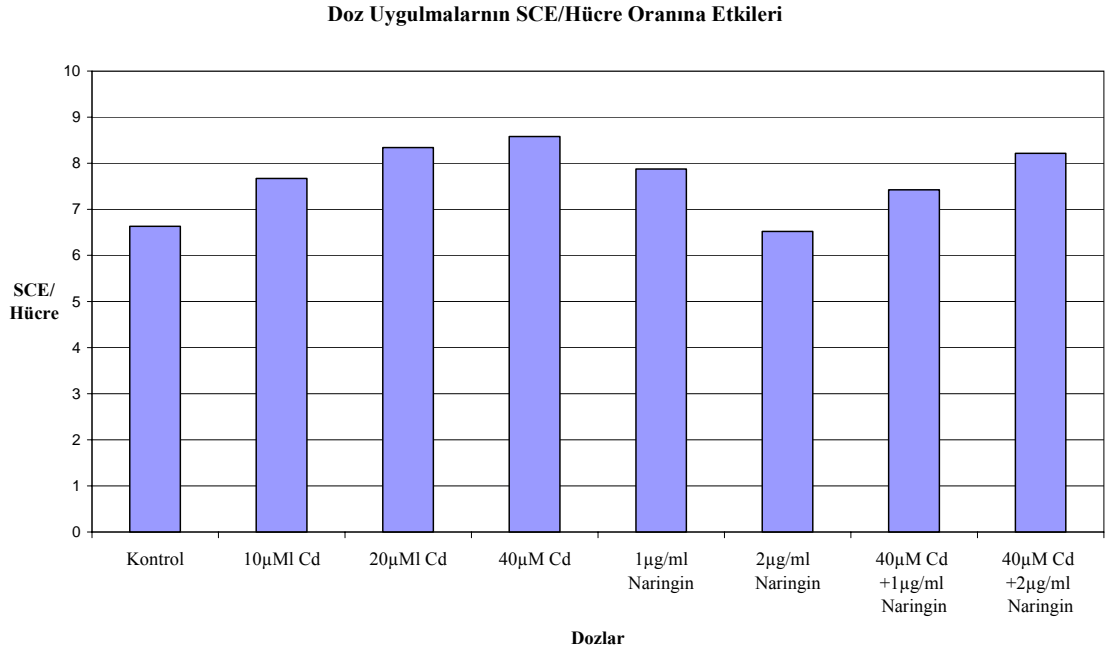
Kadmiyum dozları kendi arasında karşılaştırıldığında doz arttıkça SCE/hücre oranında artış gözlenirse de bu artış anlamlı değildir ($p>0.05$). İstatistik sonuçları çizelge 4.3.'de verilmiştir.

4.3.2. Naringin dozlarının Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) sonuçları:

Naringinin 1µg/ml ve 2µg/ml dozları denenmiştir. Bu dozlarda naringinin hücre başına düşen SCE'ye etkileri çizelge 4.3.'de ve şekil verilmiştir. Naringin dozları kontrol grubuyla kıyaslanmıştır. Hücre başına düşen SCE miktarı kontrol grubunda 6.63 iken naringinin 1µg/ml dozunda, 7.8775, 2µg/ml dozunda 6.5275'dir. Kontrol grubuna kıyasla 1µg/ml naringin uygulamasının SCE/hücre oranını arttırdığı, 2µg/ml naringin uygulamasının ise SCE/hücre oranını azalttığı gözlenirse de bu artış ve azalma anlamlı değildir ($p>0.05$). Naringin dozları kendi arasında karşılaştırıldığında 1µg/ml doz grubunda SCE/Hücre oranının 2µg/ml doz grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlenirse de bu farklılık anlamlı değildir ($p>0.05$). İstatistik sonuçları çizelge 4.3.'de verilmiştir.

4.3.3. Kombine dozların Kardeş Kromatit Değişimi (SCE) sonuçları:

40µM kadmiyum dozu 1µg/ml ve 2µg/ml naringin dozlarıyla ayrı ayrı kombine edilmiştir. 40µM kadmiyum doz grubunda hücre başına düşen SCE oranı 8.58 iken SCE/Hücre oranının 40µM Cd + 1µg/ml naringin kombine doz grubunda 7.4225'e, 40µM Cd + 2µg/ml naringin kombine doz grubunda ise 8.2162'ye düştüğü gözlenmiştir fakat SCE/Hücre oranındaki bu azalma istatistiki açıdan anlamlı değildir ($p>0.05$). Kombine dozlar kendi arasında karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). İstatistik sonuçları çizelge 4.3.'de verilmiştir.



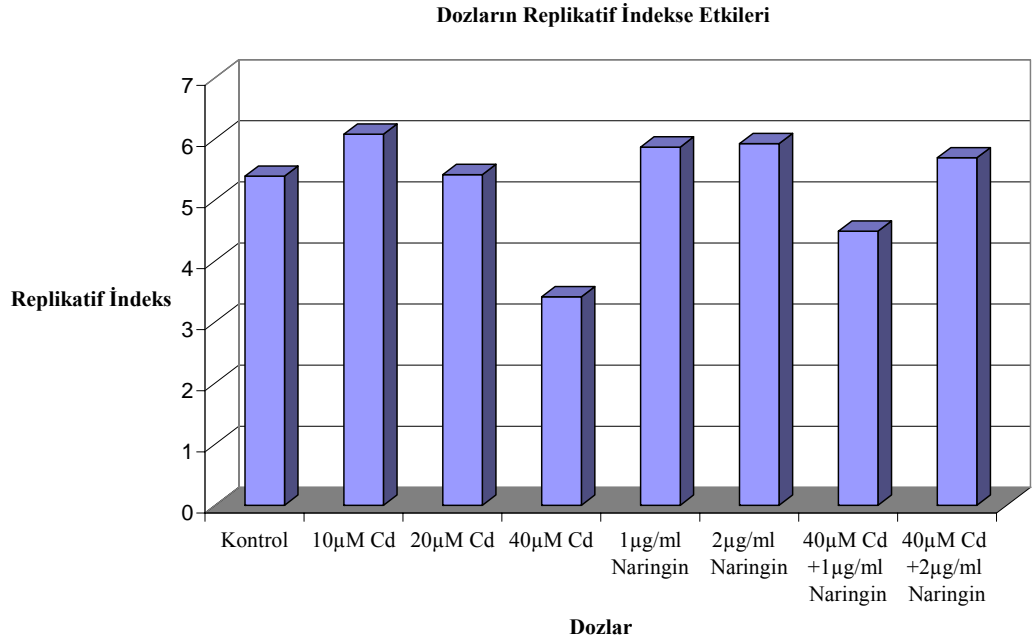
Şekil 4.5.: Kontrol, 10µM Cd, 20µM Cd, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının SCE/Hücre oranına etkisinin grafiksel gösterimi.

4.4. Doz Uygulamalarının Replikatif İndekse (Rİ) Etkileri

Rİ verilerinin tümü çizelge 4.3.'de ve şekil 4.6.'da verilmiştir. Kontrol grubunda replikatif indeks 5.3875 olarak hesaplanmıştır. 10µM, 20µM, 40µM kadmiyum doz gruplarında ise sırasıyla 6.075, 5.4125, 3.4125 olduğu saptanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla kadmiyumun 10µM, 20µM doz gruplarında replikatif indeksde anlamlı olmayan bir artış gözlenmiştir ($p > 0.05$). 40µM kadmiyum doz gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla replikatif indeksin azaldığı fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$). Kadmiyum doz grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında replikatif indeks açısından aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

Naringin dozlarındaki replikatif indeks oranları 1µg/ml ve 2µg/ml naringin doz gruplarında sırasıyla 5.8625, 5.92 şeklindedir. Kontrol grubuna kıyasla naringinin dozu arttıkça replikatif indeksde de bir artış söz konusudur fakat bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildir.

Kombine dozlardan 40 μ M Cd + 1 μ g/ml naringin grubunda replikatif indeks 4.4875 iken 40 μ M Cd + 2 μ g/ml naringin grubunda 5.6875'dir. Kombine dozlar 40 μ M kadmiyum doz grubu ile kıyaslandığında naringin muamelesinin replikatif indeksi artırdığı görülmektedir fakat bu artış anlamlı değildir ($p>0.05$). Kombine doz grupları kendi arasında kıyaslandığında aralarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). İstatistik sonuçları çizelge 4.3.'de verilmiştir.



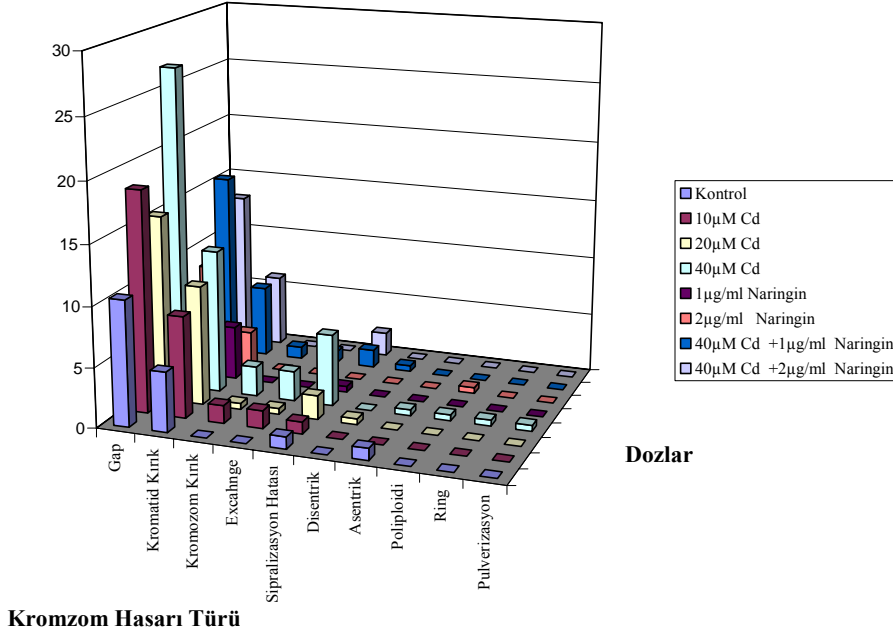
Şekil 4.6.: Kontrol, 10 μ M Cd, 20 μ M Cd, 40 μ M Cd, 40 μ M Cd + 1 μ g/ml naringin ve 40 μ M Cd + 2 μ g/ml naringin uygulamalarının replikatif indekse etkisinin grafiksel gösterimi.

Çizelge 4.1.'nin devamı: Kontrol, 10µM, 20µM, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının farklı tipteki kromozom hasarları üzerine etkisi.

Doz	N*	İncelenen Metafaz Sayısı	Mitotik İndeks	Gap	Kromatit Kırık	Kromozom Kırık	Exchange	Sipralizasyon Hatası	Disentrik	Asentrik	Ring	Pulverizasyon	Poliploidi
2µg/ml	1	50	3.95	5(0.10)	1.5(0.03)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.5(0.25)
Naringin	2	50	6.05	1(0.02)	1.5(0.03)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	3	50	8.65	2.5(0.05)	0.5(0.01)	0(0)	0(0)	0.5(0.01)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.5(0.01)
	4	50	5.05	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Ortalama			5.925	2.125 (0.0425)	0.875 (0.0175)	0 (0)	0 (0)	0.125 (0.0025)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.25 (0.005)
40µM Cd	1	50	3.95	6.5(0.13)	1.5(0.03)	0(0)	0(0)	0(0)	0.5(0.01)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
+ 1µg/ml	2	50	7.25	5.5(0.11)	2.5(0.05)	0.5(0.01)	1(0.02)	0.5(0.01)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Naringin	3	50	4.3	3.5(0.07)	1.5(0.03)	0.5(0.01)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	4	50	2.45	0(0)	0.5(0.01)	0(0)	0.5(0.01)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.5(0.01)
Ortalama			4.475	3.875 (0.0775)	1.5 (0.03)	0.025 (0.005)	0.375 (0.0075)	0.125 (0.0025)	0.125 (0.0025)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.125 (0.0025)
40µM Cd	1	50	3.3	4.5(0.09)	1.5(0.03)	0(0)	1.5(0.03)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
+ 2µg/ml	2	50	6.9	2.5(0.05)	1.5(0.03)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Naringin	3	50	7.35	0.5(0.01)	2.5(0.05)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	4	50	5.2	5.5(0.11)	0.5(0.01)	0(0)	0.5(0.01)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Ortalama			5.6875	3.25 (0.065)	1.5 (0.03)	0 (0)	0.5 (0.01)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*: Kan alınan donörleri ifade etmektedir.

Total Kromozom Hasarının Dozlara Ve Kromozom Hasarı Türüne Göre Dağılımı



Şekil 4.7.: Total kromozom hasarının dozlara ve anomali türüne göre dağılımı.

Çizelge 4.2.: Kontrol, 10µM, 20µM, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının mitotik indekse etkisi ve oluşturduğu kromozom hasarı ortalamalarının karşılaştırılması.

Dozlar	N*	İncelenen Metafaz Sayısı	Mitotik İndeks Ortalaması ± SS***	Toplam Anomali Ortalaması ± SS***	Gap ve Pulverizasyon Hariç Total Anomali Ortalaması ± SS***
Negatif Kontrol	4	50	5.3 ± 1,8714 ^c	0.0825 ± 0,0618 ^b	0.03 ± 0,0207 ^b
10µM Cd	4	50	6.075 ± 3,7016 ^c	0.1575 ± 0,0650 ^b	0.0649 ± 0,0310 ^b
20µM Cd	4	50	5.412 ± 2,4712 ^c	0.1474 ± 0,0427 ^a	0.07 ± 0,0177 ^a
40µM Cd	4	50	3.4 ± 1,7545 ^c	0.255 ± 0,0900 ^a	0.01175 ± 0,0440 ^a
1µg/ml Naringin	4	50	5.86 ± 1,5417 ^c	0.0525 ± 0,0369 ^c	0.025 ± 0,0177 ^c
2µg/ml Naringin	4	50	5.925 ± 1,9969 ^c	0.07 ± 0,0354 ^c	0.0275 ± 0,0225 ^c
40µM Cd + 1µg/ml Naringin	4	50	4.475 ± 2,0476 ^c	0.123 ± 0,0648 ^b	0.0459 ± 0,030 ^b
40µM Cd + 2µg/ml Naringin	4	50	5.6875 ± 1,9445 ^c	0.105 ± 0,0533 ^b	0.04 ± 0,029 ^b
0.25µg/ml MMC**	4	50	11.46 ± 3.24	0.39 ± 0.13	0.25 ± 0.1

*: Her grup için kan alınan toplam donör sayısıdır. **: Mitomisin C pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. ***: Ortalama ve standart sapma.

^a: Kontrol grubuna kıyasla istatistiki anlamlılık (p<0.05). ^b: 40µM/mlCd grubuna kıyasla istatistiki anlamlılık (p<0.05). ^c: İstatistiksel olarak farklılık göstermeyen gruplar (p>0.05).

Çizelge 4.3.: Kontrol, 10µM, 20µM, 40µM Cd, 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin uygulamalarının hücre başına düşen SCE ve Replikatif İndeks üzerine etkileri.

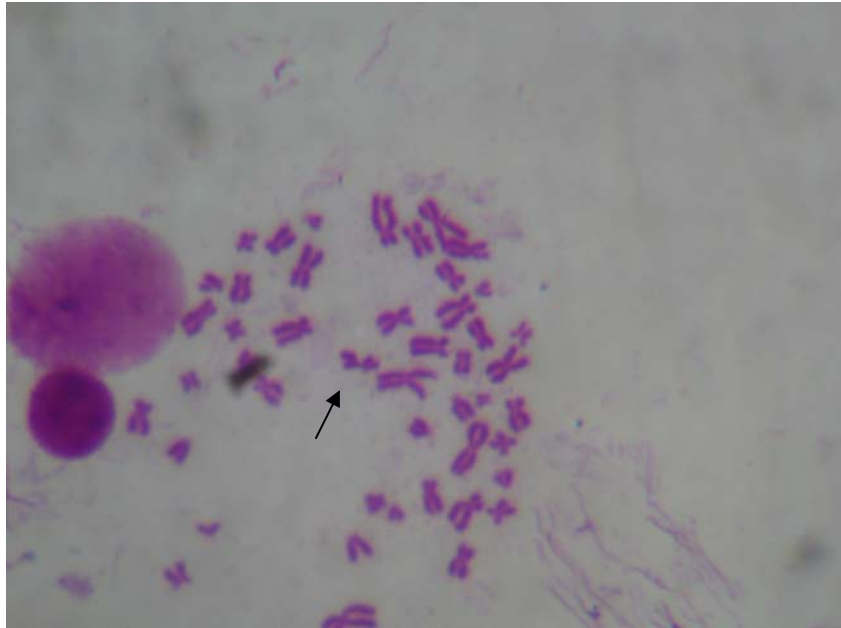
Doz	N*	İncelenen Metafaz Sayısı	Replikatif İndeks ± SS***	SCE / Hücre ± SS***
Negatif Kontrol	1	50	4.35	8.05
	2	50	3.6	6.16
	3	50	7.35	6.43
	4	50	6.25	5.88
Ortalama			5.3875^b ±0,1949	6.63 ±1,16162
10µM Cd	1	50	2.5	8.84
	2	50	4.7	7.82
	3	50	6.7	7.23
	4	50	10.4	6.81
Ortalama			6.075^b ±0,1658	7.675^b ±1,1504
20µM Cd	1	50	2.8	7.76
	2	50	4.1	9.53
	3	50	7.2	8.52
	4	50	7.55	7.55
Ortalama			5.4125^b ±0,2522	8.34^a ±1,6727
40µM Cd	1	50	2.8	9.71
	2	50	2.8	8.79
	3	50	5.1	8.01
	4	50	2.95	7.81
Ortalama			3.4125^b ±0,1993	8.58^a ±0,8872
1µg/ml Naringin	1	50	4.5	8.36
	2	50	7.1	9.64
	3	50	5.1	7.3
	4	50	6.75	6.21
Ortalama			5.8625^b ±0,1315	7.8775^b ± 1,4370
2µg/ml Naringin	1	50	3.95	7.78
	2	50	6.03	6.46
	3	50	8.65	5.97
	4	50	5.05	5.59
Ortalama			5.92^b ±0,1367	6.5275^b ± 1,3665
40µM Cd +1µg/ml Naringin	1	50	3.95	8.88
	2	50	7.25	8.57
	3	50	4.3	5.72
	4	50	2.45	6.52
Ortalama			4.4875^b ±0,1987	7.4225^b ±1,6602
40µM Cd +2µg/ml Naringin	1	50	3.3	8.91
	2	50	6.9	9.3
	3	50	7.35	7.755
	4	50	5.2	6.9
Ortalama			5.6875^b ±0,0894	8.2162^b ±0,4244
0.25 µg/ml MMC**			2.13 ±0.07	17.38 ±3.54

*: Kan alınan donörleri ifade etmektedir. **: Mitomisin C pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. ***: Ortalama ve standart sapma. ^a: Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık (p< 0.05). ^b: İstatistiksel olarak farklılık göstermeyen gruplar (p>0.05).

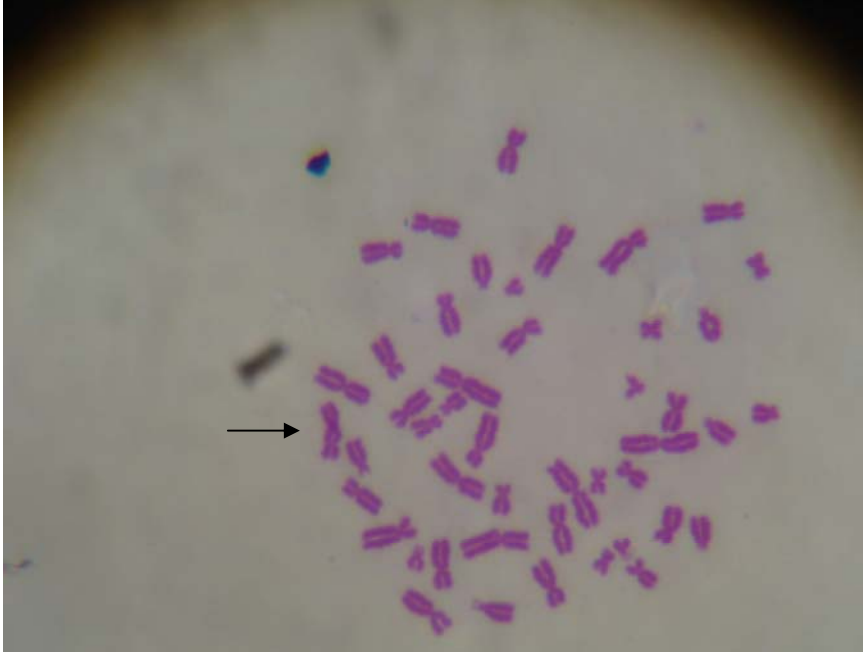
5. FOTOĞRAFLAR



Şekil 5.1.: 40 μ M kadmiyum uygulamasından hazırlanan bir kardeş kromatit değişimi testi preparatından SCE görüntüleri.



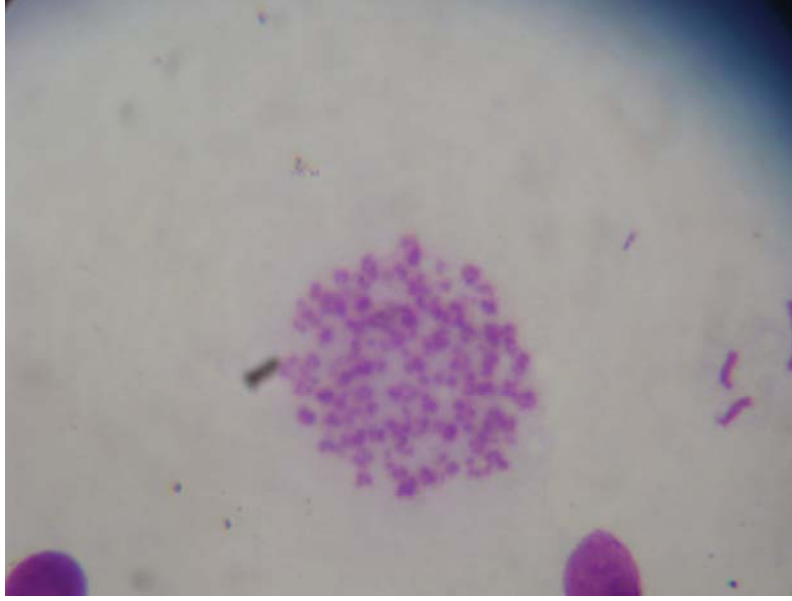
Şekil 5.2.: 40 μ M kadmiyum uygulamasından hazırlanan kromzom hasarı testi preparatından kromatit tipte kırık görüntüsü.



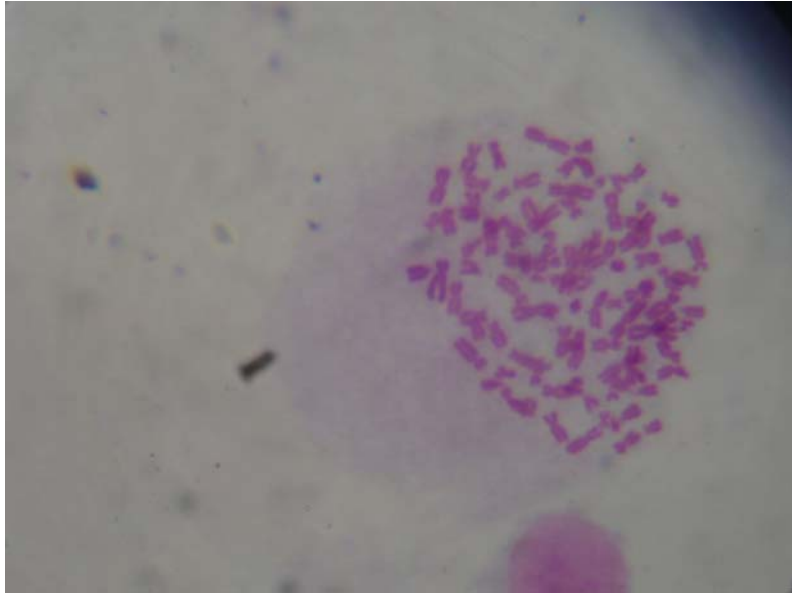
Şekil 5.3.: 40 μM Cd + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ naringin muamelesinden hazırlanan kromozom hasarı testinden preparatından disentrik görüntüsü.



Şekil 5.4.: 40 μM Cd muamelesinden hazırlanan kromozom hasarı testi preparatında exchange görüntüsü.



Şekil 5.5.: 40µM Cd muamelesi sonucu hazırlanan kromozom hasarı testi preparatında pulverize metafaz görüntüsü.



Şekil 5.6.: 2µg/ml naringin muamelesi sonucu hazırlanan kromozom hasarı testi preparatında poliploidi görüntüsü.

6. TARTIŞMA

Endüstrileşme ile birlikte ağır metallerin kullanımında da hızlı bir artış gerçekleşmiştir. Bu hızlı artış ise hava, su ve toprağın ağır metallerle kontaminasyonunu beraberinde getirmiştir. Ağır metaller toksik etkileri bilinmeden pek çok alanda kullanılmıştır (Sandrin ve Maier 2003).

Kadmiyum günümüzde sanayide sık kullanılan ağır metallere dendir. Kadmiyum içeren maddelerin üretimi aşamasında veya kadmiyum ile kontamine olmuş havanın solunması, kontamine suyun kullanımı veya kadmiyum içeren besinlerin tüketilmesiyle insanlar kadmiyum toksik, mutajenik ve kanserojenik etkilerine maruz kalmışlardır (Nogawa ve ark. 2004, Jin ve ark. 2003).

Kadmiyumun hücrede reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olarak oksidatif stresi artırdığı ve böylece DNA' da hasara yol açtığı düşünülmektedir (Banfalvi 2000). Buradan hareketle çalışmamızda kadmiyumun neden olduğu genotoksik hasarı önlemek için hücrede oluşan oksidatif stresin azaltılması gerektiği düşünülmüş ve bu amaçla antioksidan bir madde olan naringin tercih edilmiştir (Cook ve Samman 1996).

Naringin greyfurt suyunda bulunan en önemli flavonoiddir. Naringin antioksidan etkisini radikallere hızlı şekilde hidrojen atomu aktararak gerçekleştirmektedir. Bu reaksiyonlar C halkasında C-4'de karbonil grup ile A halkasındaki C-5'deki ve B halkasının C-4'ündeki hidroksil grubu vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Cook ve Samman 1996).

Bu çalışmada kadmiyumun 3 dozu denenmiştir ve bu dozlardan sitotoksik olmayan en yüksek doz ile naringinin iki dozu ayrı ayrı kombine edilerek naringinin kadmiyumun neden olduğu genotoksik hasarı azaltıp azaltmadığı saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla kardeş kromatit değişimi (SCE) ve kromozom hasarı (CA) testleri uygulanmıştır.

İnsan lenfositlerindeki yapısal kromozom hasarı ve kardeş kromatit değişimi testleri 30 yıldan beri genotoksik kanserojenlere mesleki ve çevresel maruz kalmanın erken etkilerinin biyomarkırı olarak kullanılmaktadır (Watanabe ve Endo 1984, Hagmar ve ark. 2004).

Kromozom hasarı testinden elde edilen sonuçlara göre kadmiyumun 20µM ve 40µM doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla hücre başına düşen total anomali miktarında

anlamli bir artiş saptanmıştır. Aynı şekilde gap ve pulverizasyonlar hariç tutulduğunda metafaz başına dūřen total anomali miktarı kontrol grubuna kıyasla kadmiyumun 20µM ve 40µM doz gruplarında beklendiği gibi uygulanan kadmiyum dozuna bağlı olarak artiş göstermiştir. Fakat kadmiyumun 10µM'lık doz grubunda anlamli bir artiş saptanamamıştır. Bu durum kadmiyumun 10µM'lık dozunun yeterince toksik olmadığına, 20µM'lık ve 40µM'lık dozlarının ise genotoksik olduğuna ve genomik stabiliteyi azalttığına işaret etmektedir.

Kromozom hasarı testinden elde edilen sonuçlar içerisinde dikkat çekici başka bir durum en sık rastlanan kromozom hasarı türünün kromatit tipi kırıklar olmasıdır. Bu tip kromozom hasarlarının, kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres neticesinde oluşan DNA tek zincir kırıklarının tamir edilemeyerek, DNA replikasyonundan sonra kromatit ve kromozom tipi kırıklarının oluşturması neticesinde meydana geldiği düşünölmektedir. Nitekim literatürde kadmiyumun baz kesip çıkarma, nükleotit kesip çıkarma, yanlış eşleşme tamiri gibi DNA tamir mekanizmalarını inhibe ettiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Dally ve Hartwig 1997, Asmuss ve ark. 2000, Jin ve ark. 2003).

Hengstler ve arkadaşlarının çalışma sonuçları bulgularımızı destekler niteliktedir. Bu çalışmada 10 fabrikadan kadmiyum, kobalt ve kurşuna maruz kalan 78 işçiden alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Tek çekirdekli kan hücrelerindeki tek zincir kırıkları ile havadaki kadmiyum konsantrasyonu arasında bir korelasyon olduğu saptanmıştır (Hengstler ve ark. 2003).

Yine Müller ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada in vitro 5:2 oranında Cd⁺² ve Zn⁺² içeren metallothioninlerin DNA zincir kırıklarına neden olduğu gösterilmiştir (Müller ve ark. 1994).

SCE testinden elde edilen sonuçlar da kadmiyumun toksik etkisini desteklemektedir. Kontrol grubuna kıyasla 20µM ve 40µM kadmiyum dozları hücre başına dūřen SCE oranını anlamli şekilde arttırmıştır. Fakat kromozom hasarı testinde olduğu gibi kadmiyumun 10µM'lık dozu kontrol grubuna kıyasla hücre başına dūřen SCE oranında anlamli bir farklılığa neden olmamıştır.

Kadmiyumun SCE oranında artışa neden olması DNA'da zincir kırıklarına yol açmasıyla ilişkilendirilebilir. SCE mekanizmasının replikasyon çatalındaki kırıkları onarmak için gerçekteşiği düşünölmektedir (Thompson 2005). DNA'da tek zincir kırığı

(SSB) miktarını artıran olayların SCE'yi etkili şekilde tetiklediği bilinmektedir (Thompson ve ark. 1982).

Şaplakoğlu ve İşcan G_0 ve S fazlarında 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M konsantrasyonlardaki $CdCl_2$ ile muamele ettikleri in vitro insan lenfositlerinde SCE frekansını değerlendirmişlerdir. G_0 fazında 10^{-5} M dozundaki kadmiyum ile muamele edildiğinde SCE oranında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Erken S fazında 10^{-5} M $CdCl_2$ ile yapılan muamele neticesinde ise kadmiyum konsantrasyonu arttıkça SCE frekansının da arttığını tespit etmişlerdir. Fakat bizim sonuçlarımıza göre kadmiyumun 10^{-5} M ($10\mu M$) dozu SCE oranını anlamlı şekilde arttırmamıştır. Şaplakoğlu ve İşcan'ın çalışmasında 10^{-5} M kadmiyum muamelesi kültür başlatıldıktan sonra 24., 54. ve 72. saatlerde yapıldığında SCE frekansının 24. saatte muamele edildiğinde en yüksek olduğu, 54. ve 72. saatte yapılan muamelelerde giderek azaldığı saptanmıştır (Şaplakoğlu ve İşcan 1998). Bizim çalışmamızda ise kadmiyum muamelesi 48. saatte yapılmıştır. Dolayısıyla sonuçlarımız arasındaki farklılığın kadmiyum muamelesinin yapıldığı saatlerden kaynaklandığı düşünülebilir.

Palus ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise $8\mu g/ml$ kadmiyum ile kültür başlangıcında muamele edildiğinde ve 72. saatte harvest işlemi yapıldığında SCE oranında artış saptanmıştır (Palus ve ark. 2003).

SCE ve CA testlerinden elde ettiğimiz sonuçları değerlendirdiğimizde kadmiyumun $20\mu M$ ve $40\mu M$ dozlarının in vitro insan kan lenfositleri üzerinde genotoksik etkilerinin olduğunu, $10\mu M$ 'lık dozunun ise genotoksik etki göstermediğini görmekteyiz.

Mitotik indeks ve replikatif indeks verilerini değerlendirdiğimizde ise kadmiyum dozlarının veya naringin dozlarının mitotiks indeks ve replikatif indeks üzerinde diğer doz gruplarına kıyasla anlamlı bir farklılık yaratmadığı görülmektedir. Bu durum kullandığımız naringin ve kadmiyum dozlarının sitotoksik olmadığını göstermektedir. Naringin dozları genotoksik etki göstermediği için hücre ölümünü indüklememesi olağandır. Fakat kadmiyumun $20\mu M$ ve $40\mu M$ genotoksik etki gösterdiği halde hücre ölümünü artırmaması düşündürücüdür. Kadmiyumun genotoksik hasar verdiği hücrelerin ölmemesi kadmiyumun apoptozu baskılamasıyla ilişkilendirilebilir (Gunawardana ve ark. 2005).

Çalışmamızda kadmiyumun neden olduğu genotoksik etkiyi azaltmak için antioksidan bir madde olan naringin kullanılmıştır. Naringinin genotoksik etkisi olup

olmadığını anlamak için 1µg/ml ve 2µg/ml naringin dozlarının CA ve SCE test sonuçları kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Naringinin her iki dozunun da CA sonuçlarına göre hücre başına düşen total anomali miktarı ve gap ve pulverizasyonlar hariç tutulduğunda hücre başına düşen total anomali miktarı açısından kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık yaratmadığı hatta istatistiki açıdan anlamlı olmasa da anomali miktarını azalttığı saptanmıştır.

Naringinin 1µg/ml ve 2µg/ml'lik doz gruplarının SCE sonuçlarını değerlendirdiğimizde kontrol grubuna kıyasla hücre başına düşen SCE oranında anlamlı bir farklılık yaratmadıkları gözlemlenmiştir.

Neticede hem SCE hem de CA testinden elde edilen sonuçlar kullandığımız naringin dozlarının genotoksik etkisi olmadığını göstermiştir. Sonraki adımda ise bu naringin dozlarının 40µM'lık kadmiyumun neden olduğu genotoksik hasar üzerine etkileri ölçülmüştür. Kadmiyumun 40µM'lık dozunun seçilmesinin nedeni bu dozun sitotoksik olmayan en yüksek doz olmasıdır. Ayrıca kullandığımız naringin dozları kadmiyumun 40µM'lık dozunun neden olduğu genotoksik hasarını azaltırsa kadmiyumun daha düşük dozlarının neden olduğu hasarı azaltma ihtimali yüksektir.

Bu amaçla 40µM Cd + 1µg/ml naringin ve 40µM Cd + 2µg/ml naringin kombine dozları kullanılmıştır. Elde ettiğimiz CA sonuçları naringinin her iki dozunun da 40µM Cd'un neden olduğu hücre başına düşen total anomali miktarını ve gap ve pulverizasyonlar hariç tutulduğunda hücre başına düşen total anomali miktarını azalttığını göstermiştir. Fakat kombine dozlar arasında anomali miktarı açısından anlamlı bir farklılık yoktur. Bu bulgular 1µg/ml naringin 2µg/ml naringin dozlarının 40µM kadmiyumun neden olduğu anomaliyi azaltmada gösterdikleri etkilerin farklı olmadığına işaret etmektedir. Normalde beklentimiz 40µM Cd + 2µg/ml naringin doz grubunda 40µM Cd + 1µg/ml naringin doz grubuna kıyasla anomali miktarında anlamlı bir azalma olması şeklinde idi.

Naringinin kadmiyumun neden olduğu kromozom hasarını azaltması onun antioksidan etkisiyle açıklanabilir. Kadmiyumun hücrede oksidatif stresi artırma nedenlerinden biri antioksidan enzimleri inhibe etmesidir (Ikediobi ve ark. 2004). Naringin ise katalaz, süperoksitdismutaz, glutatyon peroksidaz gibi önemli antioksidanların sentezini artırmaktadır (Jeon ve ark. 2001, 2002).

Kadmiyumun oksidatif strese neden olmasını sağlayan mekanizmalardan bir başkası ise proteinlerdeki demir ve bakır iyonlarının serbest kalmasına neden olması ve serbest kalan demir ve bakır iyonlarının fenton reaksiyonları ile reaktif oksijen türlerini oluşturmasıdır (Mikhailova ve ark. 1997, Banfalvi ve ark. 2000). Naringin ise bakır ve demir iyonları ile şelatlar oluşturarak fenton reaksiyonlarına girmelerini engellemektedir. Böylece kadmiyumun neden olduğu reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltmaktadır (Mira ve ark. 2002).

Neticede naringin kadmiyumun neden olduğu oksidatif stresi azalttığı için DNA hasarı azalmakta ve bu da naringin ilave edilen gruplardaki azalan kromozom hasarı miktarını açıklamaktadır.

Naringinin oksidatif stresi artıran ilaçların oluşturduğu genotoksik hasar üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda naringinin antioksidan etkisi üzerine olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

V79 hücrelerinde naringinin bleomycinin neden olduğu DNA hasarı ve değişimleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bleomycin sitotoksitesini ve DNA hasarı etkisini Fe^{+2} ile kompleksler oluşturarak göstermektedir. Bu kompleksler oksijen ile kombine olarak çok reaktif türler oluşturmaktadır. Bu reaktif türler ise Deoksiribozun 4.üncü C'undan H alarak DNA zincir kırığına neden olmaktadır. Naringin demir-bleomycin kompleksinin oluşmasına izin vermeyerek Fe^{+2} 'nin in vitro neden olduğu toksisiteyi azaltmaktadır (Jagetia ve ark. 2007).

Bu çalışma bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Bizim çalışmamızda da en sık rastlanan kromozom anomalileri oksidatif stresin neden olduğu DNA zincir kırıklarının tamir edilmemesi sonucu oluşan kromozom kırıklarıdır. Naringin bu kromozom kırıklarının azalmasını sağlamıştır.

Başka bir çalışmada ise fare kemik iliği hücrelerinde, naringinin lomefloxacin'nin vivo neden olduğu genomik kararsızlığa karşı etkisi kromozom hasarı ve mikronükleus testiyle tespit edilmiştir. Fareye naringin ile muamele edildiğinde lomefloxacin'nin neden olduğu kromozom hasarını ve mikronükleus oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Naringinin bu etkisi lomefloxacin tarafından üretilen serbest radikallerin DNA'ya ulaşmasını engellemesiyle açıklanmaktadır (Attia 2008).

Grant'ın yapmış olduğu başka bir çalışmada naringinin P388 hücrelerinde Ara-C'nin neden olduğu hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (Grant 1998). Ara-C'nin

sitoksisitesi hücrel oksidatif stresden dolayı apoptozu artırmaktadır. Naringin antioksidan aktivite göstererek, hücrel ROS üretimini durdurmakta, antioksidan enzim aktivitesini artırmakta ve neticede Ara-C'nin neden olduğu apoptoz ve sitotoksisiteyi bloke etmektedir (Iacobini ve ark. 2001).

SCE testinden elde ettiğimiz sonuçlara göre 40µM Cd + 1µg/ml naringin ile 40µM Cd + 2µg/ml naringin doz gruplarında 40µM/ml kadmiyum doz grubuna kıyasla hücre başına düşen SCE miktarında anlamlı bir azalma söz konusu değildir. Naringinin her iki dozu da 40µM kadmiyumun neden olduğu SCE'yi azaltmada etkisiz kalmıştır. Bu durum naringinin SCE de görev alan topoizomeraz 2 aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklanıyor olabilir (Snyder ve Gillies 2003).

Elde edilen bulgulara göre kadmiyumun 40µM ve 20µM dozları genotoksik olduğu, naringinin 1µg/ml'lik ve 2µg/ml'lik dozlarının 40µM'lık kadmiyumun neden olduğu kromozom anomalilerini azalttığı fakat 40µM'lık kadmiyumun neden olduğu hücre başına düşen SCE oranını azaltma da etkisiz kaldığı ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak günümüz dünyasında insanlar kanserojen olan pek çok genotoksik ajana maruz kalmaktadır ve bu etkilerden korunmak için naringin gibi doğal antioksidan flavonoidlerin alınması alternatif olabilir. Fakat bu antioksidan maddelerin yüksek dozlarda kullanıldığında veya farklı maddelerle kombine edildiğinde yaratabileceği farklı etkilerin daha detaylı araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

ACHANZAR, W.E., K.B. ACHANZAR, J.G. LEWIS, M.M. WEBBER, M.P. WAALKES. 2000. Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 164:291-300.

AGUS, D.B., J.C. VERA, D.W. GOLDE. 1999. Stromal cell oxidation: a mechanism by which tumors obtain vitamin C. *Cancer Res.*, 59: 4555–4558

ALBERTİNİ, R.J., D. ANDERSON, G.R. DOUGLAS, L. HAGMAR, K. HEMMINKİ, F. MERLO, A.T. NATARAJAN, H. NORPPA, D.E. SHUKER, R. TICE, M.D. WATERS, A. AITIO. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety, Mutat. Res.*, 463: 111–172.

ALSCHER, R.G., N. ERTURK, L.S. HEATH. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*, 53:1331–1341.

AMEER, B., R.A. WEINTRAUB, J.V. JOHNSON, R.A. YOST, R.L. ROUSEFF. 1996. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 60: 34–40.

AMES, B.N. 2001. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res.*, 475: 7–20.

AMIN, D., S.K. GUSTAFSON, J.M. WEINACHT, S.A. CORNEL, K. NEUENSCHWANDER, A.C. SCOTESE, J.R. REGAN, M.H. PERRONE. 1993. A novel synthetic inhibitor of HMG-CoA reductase and cholesterol lowering agent. *Pharmacology*, 46: 13–22.

ARNAUDEAU, C., C. LUNDIN, T. HELLEDAY. 2001. DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J. Mol. Biol.*, 307: 1235–1245.

ASMUSS, M., L.H. MULLENDERS, A. EKER, A. HARTWIG. 2000. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis*, 21:2097–2104.

ATTIA, S. M. 2008. Abatement by naringin of lomefloxacin-induced genomic instability in mice. *Mutagenesis*, 23 (6): 515–521.

BAGI, Z., A. FEHER, T. BELEZNAI. 2009. Preserved coronary arteriolar dilatation in patients with type 2 diabetes mellitus: Implications for reactive oxygen species. *Pharmacological Reports*, 61: 99–104

BAILEY, D.G., J.M. ARNOLD, C. MUNOZ, J.D. SPENCE. 1993. Grapefruit juice—felodipine interaction: mechanism, predictability and effect of naringin. *Clin Pharmacol Ther* 53:637–642.

BAILEY, D.G., J. MALCOLM, O. ARNOLD, J.D. SPENCE. 1998. Grapefruit juice-drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* 46:101–110.

BALLATORI, N. 2002. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environmental Health Perspect*, 110 (5): 689–694

BANFALVI, G., N. LITTLEFIELD, B. HASS, M. MIKHAILOVA, I. CSUKA., E. SZEPESY, M.W. CHOU. 2000. Effect of cadmium on the relationship between replicative end repair DNA synthesis in synchronized CHO cells. *Eur. J. Biochem*, 267: 6580–6585.

BARBEE, J.Y.J., T. S. PRINCE. 1999. Acute respiratory distress syndrome in a welder exposed to metal fumes. *South Med J*, 92(5):510-512.

BARBIER, O., G. JACQUILLET, M. TAUC, M. COUGNON, P. POUJEOL. 2005. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol*, 99(4):105-10.

BARYLA, A., P. CARRIER, F. FRANCK, C. COULOMB, C. SAHUT, M. HAVAUX. 2001. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta*, 212:696–709.

BASKIN, I. S. VE H. SALEM. 1997. Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals .

CRC Press, p:1-20.

BAYLİN, S.B., 2002. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 12, 331–337.

BERGER, T.M., M.C. POLİDORİ, A. DABBAGH, P.J. EVANS, B. HALLİWELL, J.D. MORROW, L.J. ROBERTS, B. FREİ. 1997. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J Biol Chem.*, 272: 15656–15660.

BERNARD, A. 2004 Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biometals*, 17(5):519-523.

BERTİN, G. VE D. AVERBECK. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88:1549–1559

BİLHEİMER, D.W., N.J. STONE, S.M. GRUNDY. 1979. Metabolic studies in familial hypercholesterolemia. Evidence for a gened dosage effect in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 64: 524–533.

BJELAKOVIĆ, G., D. NİKOLOVA, L.L. GLUUD, R.G. SİMONETTİ, C. GLUUD. 2007. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 297: 842–857.

BLOCK, G. 1991. Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. *Am J Clin Nutr.*, 54:1310S–1314S.

BONFİLS, C., N. BEAULİEU, E. CHAN, J. COTTON-MONTPETİT, A.R. MACLEOD. 2000. Characterization of the Human DNA Methyltransferase Splice Variant Dnmt1b. *THE Journal of Biological Chemistry*, 275 (15): 10754–10760

BURÇAK, G. ve G. ANDİCAN. 2004. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 35 (4): 159-169.

CANTER, P. H., B. WİDER, E. ERNST. 2007. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. *Rheumatology*. 46:1223–1233

CESARONE, M. R., G. BELCARO, L. PELLEGRİNİ, A. LEDDA, G. VİNCİGUERRA, A. RİCCİ, A. D. RENZO, I. RUFFİNİ, G. GİZZİ, E. IPPOLİTO, F. FANO, M. DUGALL, G. ACERBİ, U. CORNELLİ, M. HOSOİ, M. CACCHİO. 2006. Venoruton® vs Daflon®: Evaluation of Effects on Quality of Life in Chronic Venous Insufficiency. *Angiology*, 57 (2): 131-138

CHANEY, R.L., J.A. RYAN, Y.M. Lİ, R.M. WELCH, P.G. REEVES, S.L. BROWN, C.E. GREN. 1996. Sources of Cadmium in the Environment, Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

CHANG, X.L., T.Y. JİN, Y.F. ZHOU. 2006. Metallothionein I isoform gene expression induced by cadmium in human peripheral blood lymphocytes. *Biomed. Environ. Sci.*, 19: 104-109.

CHAPPELL, L.C., P.T. SEED, A.L. BRİLEY, F.J. KELLY, R. LEE, B.J. HUNT, K. PARMAR, S.J. BEWLEY, A.H. SHENNAN, P.J. STEER, L. POSTON. 1999. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet*, 354: 810–816.

CHEN, K., J. SUH, A.C. CARR, J.D. MORROW, J. ZEİND, B. FREİ. 2000. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 279: E1406–E1412.

CHENG, W.H. 2009. Impact of inorganic nutrients on maintenance of genomic stability. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50: 349-360

CHİLDS, A., C. JACOBS, T. KAMİNSKİ, B. HALLİWELL, C. LEEUWENBURGH. 2001. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med*, 31: 745–753.

- CÍFONE, M.G., A. PROCOPIÓ, T. NAPOLÍTANO, E. ALESSE, G. SANTONÍ, A. SANTONÍ. 1990. Cadmium inhibits spontaneous (NK), antibody-mediated (ADCC) and IL-2-stimulated cytotoxic functions of natural killer cells. *Immunopharmacology*, 20(2):73-80.
- CLEAVER, J.E., J.C. STATES. 1997. The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells: the XPA damage binding protein. *Biochem. J.* 328:1-12.
- CLEMENS, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88:1707–1719
- CODINA, J. C., F.M. CAZORLA, A. PE' REZ-GARCÍA, A. VICENTE. 2000. Heavy metal toxicity and genotoxicity in water and sewage determined by microbiological methods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (6): 1552–1558.
- COOK, N.C. VE S. SAMAN. 1996. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, 7: 66–76.
- DALLY, H. VE A. HARTWÍG. 1997. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 18: 1021–1026.
- DAVIS, S.R. VE ROBERT. J. 2000. Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function. *Journal of Nutrition*, 130: 1085–1088.
- DECKERT, J., 2005. Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mamalian cells. *Biometals*, 18: 475-481.
- DILLEHAY, L.E., L.H. THOMPSON, A.V. CARRANO. 1984. DNA-strand breaks associated with halogenated pyrimidine incorporation. *Mutat. Res.*, 131: 129–136.
- DRAKE, I.M., M.J. DAVIES, N.P. MAPSTONE, M.F. DIXON, C.J. SCHORAH, K.L. WHITE, D.M. CHALMERS, A.T. AXON.1996. Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. *Carcinogenesis*, 17: 559–562.
- DUFFUS J.H. 2002. Heavy metals—A meaningless term?. *IUPAC, Pure and Applied Chemistry.*, 74: 793–807.
- ELÍNDER, C.G., B. LÍND, T. KJELLSTROM, L. LÍNNMAN, L. FRÍBERG. 1976. Cadmium in kidney cortex, liver, and pancreas from Swedish autopsies. Estimation of biological half time in kidney cortex, considering calorie intake and smoking habits. *Arch Environ Health*, 31(6):292-302.
- ELÍNDER, C.-G. VE NORDBERG, M. 1985. In: Friberg, L., Elinder, C.-G., Kjellstrom, T. & Nordberg, G.F. eds, *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal*, Boca Raton, FL: CRC Press.
- ESTELLER, M., R.A. RÍSQUES, M. TOYOTA, G. CAPELLA, V. MORENO, M.A. PEÍNADO, S.B. BAYLÍN, J.G. HERMAN. 2001. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene *O(6)-methylguanine–DNA methyltransferase* is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 61: 4689–4692.
- FASANYA-ODEWUMÍ, C., L.M. LATÍNWO, C.O. IKEDÍOBÍ, L. GILLIARD, G. SPONHOLTZ, J. NWOGA, F. STÍNO, N. HAMILTON, G.W. ERDOS. 1998. The genotoxicity and cytotoxicity of dermally-administered cadmium: effects of dermal cadmium administration. *Int J Mol Med*, 1(6):1001-1006.
- FATÍMA, R.A. VE M. AHMAD. 2005. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Sci Total Environ*, 346:256–273.
- FÍLÍPÍC, M. VE K. T. HEÍ. 2004. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 546: 81–91.
- FLANAGAN, P.R., J.S. MCLELLAN, J. HAÍST, M.G. CHERIAN, M.J. CHAMBERLAIN, L.S. VALBERG. 1978. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology*, 74: 841–846.
- FOTAKÍS, G., E. CEMELÍ, D. ADERSON, J.A. TIMBRELL. 1997. Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in methyl methanesulfonate-treated CHO-KL cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 171-176.
- FOULKES., E.C. 1985. Interactions between metals in rat jejunum: implications on the nature of cadmium uptake. *Toxicology.*, 37(1-2):117-125. Frery, N., C. Nessmann, F. Girard, J.

Lafond, T. Moreau, P. Blot, J. Lellouch, G. Huel. 1993. Environmental exposure to cadmium and human birthweight. *Toxicology*, 79(2):109-118.

FRIEDOVÍCH, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.*, 64: 97-112.

FRNECH, M. VE J. RINALDÍ. 1994. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, Vitamin E, Vitamin B₁₂ and folic acid. *Carcinogenesis*, 15: 1405-1411.

FUHRMANN, G. F. 2006. *Toxikologie für Naturwissenschaftler: Einführung in die theoretische und spezielle Toxikologie*. Vieweg+Teubner Verlag. p. 212-213.

FUJIMAKI, H., M. MURAKAMI, K. KUBOTA. 1981. *In vitro* evaluation of cadmium-induced augmentation of the antibody response. *Toxicol Appl Pharmacol*, 62:288-295.

GAETANI, G., A. FERRARIS, M. ROLFO, R. MANGERINI, S. ARENA, H. KIRKMAN. 1996. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 87 (4): 1595-9.

GAUBIN, Y., F. VAÏSSADE, F. CROUTE, B. BEAU, J. SOLEÏLHAVOUP, J. MURAT. 2000. Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line. *Biochim. Biophys. Acta*, 1495: 4-13.

GODT, J., F. SCHEIDIG, C. GROSSE-SIESTRUP, V. ESCHE, P. BRANDENBURG, A. REICH, D.A. GRONEBERG. 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology.*, 1(22): 1-6.

GOODMAN, J.I., R.E. WATSON. 2002. Altered DNA methylation: a secondary mechanism involved in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 42: 501-525.

GOYER, R.A., J. LIU, M.P. WAALKES. 2004. Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals*, 17(5):555-558.

GRADWOHL, G., J.M. MENISSIER DE MURCIA, M. MOLINETE, F. SIMONIN, M.KOKEN, J.H. HOEIJMAKERS, G. DE MURCIA. 1990. The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for singlestranded breaks in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 2990-2994.

GRANT, S., 1998. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Advances in Cancer Research*, 72: 197-233.

GRATÃO, P.L., A. POLLE, P.J. LEA, R.A. AZEVEDO. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol*, 32:481-494.

GUNAWARDANA, C. G., R. E. MARTINEZ, W. XIAO, D. M. TEMPLETON. 2005. Cadmium inhibits both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*.

GUNSHIN, H., B. MACKENZIE, U.V. BERGER, Y. GUNSHIN, M.F. ROMERO, W.F. BORON, S. NUSSBERGER, J.L. GOLLAN, M.A. HEDIGER. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388(6641):482-488.

HAGMAR, L., U. STROMBERG, S. BONASSI, I.L. HANSTEEN, L.E. KNUDSEN, C. LINDHOLM, H. 2004. Norppa, Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res.*, 64: 2258-2263.

HALLIWELL, B. 1991. Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42(4):569 - 605.

HALLIWELL, B. VE M. WHITEMAN. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, 142: 231-255.

HAROLD, V. 2006. *Panglossi Antioxidants: New Research*. Nova Publishers, p: 9-13.

HARSTAD E.B. VE C.D. KLAASSEN. 2002. Tumor necrosis factor- α null mice are not resistant to cadmium chloride-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 179:155-162.

HARTWIG, A., M. ASMUSS, H. BLESSING, S. HOFFMANN, G. JAHNKE, S.KHANDELWAL, A. PELZER, A. BURKLE. 2002. Interference by toxic metal ions with

zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food Chem. Toxicol.*, 40: 1179–1184.

HELLEDAY, T. 2003. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat. Res.*, 532: 103–115.

HENGSTLER, J.G., U. BOLM-AUDORFF, A. FALDUM, K. JANSSEN, M. REIFENRATH, W. GÖTTE, D. JUNG, O. MAYER-POPKEN, J. FUCHS, S. GEBHARD, H.G. BIENFAIT, K. SCHLÖNK, C. DIETRICH, D. FAUST, B. EPE, F. OESCH. 2003. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*, 24: 63–73.

HENKE, G., H. SACHS, G. BOHN. 1970. Cadmium determination by neutron activation analysis of liver and kidneys from children and young people. *Arch. Toxikol.*, 26, 8–16.

HENSON, M.C. VE P.J. CHEDRESE. 2004. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229(5):383-392.

HIDAKA, M., K. FUJITA, T. OGIKUBO, K. YAMASAKI, T. IWAKIRI, M. OKUMURA, H. KODAMA, K. ARIMORI. 2004. Potent inhibition by star fruit of human cytochrome P450 3A (CYP3A) activity. *Drug Metab Dispos* 32:581–583.

HIDAKA, M., M. OKUMURA, T. OGIKUBO, H. KAI, K. FUJITA, T. IWAKIRI, K. YAMASAKI, N. SETOGUCHI, N. MATSUNAGA, K. ARIMORI. 2005. Transient inhibition of CYP3A in rats by star fruit juice. *Drug Metabolism and Disposition Fast Forward.*, 34:343-345.

HSIUA, S.L., T.Y. HUANGB, Y.C. HOUC, D.H. CHIND, P.D. LEE. 2002. Chaoa Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits. *Life Sciences*, 70:1481–1489.

IACOBINI, M., A. MENICHELLI, G. PALUMBO, G. MULTARI, B. WERNER, D. D. PRINCIPALE. 2001. Involvement of oxygen radicals in cytarabine-induced apoptosis in human polymorphonuclear cells. *Biochemical Pharmacology*, 61: 1033–1040.

IARC, 1993. Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 58. IARC, Lyon, France, p.119–238.

IKEDIÖBI, C.O., V.L. BADISA, L.T. AYUK-TAKEM, L.M. LATINWO, J. WEST. 2004. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *Int. J. Mol. Med*, 14: 87-92.

IKEGAMI, T., I. KURAOKA, M. SAÏJO, N. KODO, Y. KYOGOKU, K. MORIKAWA, K. TANAKA, M. SHIRAKAWA. 1998. Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA. *Nat. Struct. Biol.*, 5: 701–706.

INABA, T., E. KOBAYASHI, Y. SUWAZONO, M. UETANI, M. OISHI, H. NAKAGAWA, K. NOGAWA. 2005. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicol Lett.*, 159: 192–201.

ISHIBASHI, S., M.S. BROWN, J.L. GOLDSTEIN, R.D. GERARD, R.E. HAMMER, J. HERZ. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knock-out mice and its reversal by adeno-virus mediated gene delivery. *J Clin Invest.*, 92(2):883-93.

JAGETIA, A., G. C. JAGETIA, S. JHA. 2007. Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival 122. *J. Appl. Toxicol.*, 27 (2): 122–132.

JAGETIA, G.C. VE T.K. REDDY. 2002. The grapefruit flavonone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. *Mut. Res.* 519, 37–48.

JAÏN, S.K., R. MCVIE, T. SMITH. 2000. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care*, 23: 1389–1394.

JARUP, L., M. BERGLUND, C.G. ELİNDER, G. NORDBERG, M. VATHER. 1998. Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand- J-Work -Environ- Health.*, 24: 11-51.

JARUP, L., T. ALFVEN, B. PERSSON, G. TOSS, C.G. ELİNDER. 1998. Cadmium may be a risk factor for osteoporosis. *Ocap Environ Med*, 55(7):435-439.

JEON, S.M., S.H. BOK, M.K. JANG, M.K. LEE, K.T. NAM, Y.B. PARK, S.J. RHEE, M.S. CHOİ. 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci.* 69: 2855-2866.

JEON, S.M., S.H. BOK, M.K. JANG, Y.H. KİM, K.T. NAM, T.S. JEONG, Y.B. PARK, M.S. CHOİ. 2002. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clin. Chim. Acta.* 317: 181-190.

JEON, S.M., Y.B. PARK, M.S. CHOİ. 2004. Antihypercholesterolaemic property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterolregulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits. *Clin. Nutr.*, 23: 1025-1034.

JEONG, E.M., C.H. MOON, C.S. KİM, S.H. LEE, E.J. BAİK, C.K. MOON, Y.S. JUNG, 2004. Cadmium stimulates the expression of ICAM-1 via NF-kappaB activation in cerebrovascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 320: 887-892.

JİN, T., M. NORDBERG, W. FRECH, X. DUMONT, A. BERNARD, T.T. YE, Q. KONG, Z. WANG, P.Lİ, N.G. LUNDSTROM, Y. Lİ, G.F. NORDBERG. 2002. Cadmium biomonitoring and renal dysfunction among a population environmentally exposed to cadmium from smelting in China. *Biometals*, 15(4): 397-410.

JİN, Y.H., A.B. CLARK, R.J. SLEBOS, H. AL-REFAİ, J.A. TAYLOR, T.A. KUNKEL, M.A. RESNICK, D.A. 2003. Gordenin, Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Genet*, 34: 326-329.

JOHNSON, M.D., N. KENNEY, A. STOICA, L. HILAKIVI-CLARKE, B. SINGH, G. CHEPKO, R. CLARKE, P.F. SHOLLER, A.A. LİRİO, C. FOSS, R. REİTER, B. TROCK, S. PAİK, M.B. MARTİN. 2003. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med*, 9 (8):1081-1084.

KAZANTZIS, G. 1979. Renal tubular dysfunction and abnormalities of calcium metabolism in cadmium workers. *Environ Health Perspect*, 28:155-159.

KİM, H.-J. 2004. Lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *Life Sciences*, 74: 1621-1634

KİMA, H.J., G. T. OHB, Y. B. PARK, M.K. LEED, H.J. SEOA, M.S. CHOİA. 2004. Naringin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition. *Life Sciences*, 74: 1621-1634.

KOH, D.W., T.M. DAWSON, V.L. DAWSON. 2005. Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol. Res.*, 52: 5-14.

KONDOH, M., S. ARARAGİ, K. SATO, M. HİGASHIMOTO, M. TAKIGUCHİ, M. SATO. 2002. Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology*, 170:111-117.

KOWALTOWSKI, A. J., N. C. SOUZA-PİNTO, R. F. CASTİLHO, A. E. VERCESİ. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 11; 4C: 2.

KOPERA, E., T. SCHWERDTLE, A. HARTWİG, W. BAL. 2004. Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chem. Res. Toxicol*, 17: 1452-1458.

KREMER, T. M., M. L. RİNNE, Y. XU, X. M. CHEN, M. R. KELLEY. 2004. Protection of pulmonary epithelial cells from oxidative stress by hMYH adenine glycosylase. *Respiratory Research*, 5:16.

KRYCH, M., I. PIETRZYKOWSKA, J. SZYSZKO, D. SHUGAR. 1979. Genetic evidence for the nature, and excision repair, of DNA lesions resulting from incorporation of 5-bromouracil, *Mol. Gen. Genet.*, 171: 135-143.

- KUPFERSCHMIDT, H.H., H.R. HA, W.H. ZIEGLER, P.J. MEIER, S. KRAHENBUHL. 1995. Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clin Pharmacol Ther* 58:20–28.
- KUPFERSCHMIDT, H.H., K.E. FATTINGER, H.R. HA, S. KRAHENBULN. 1998. Grapefruit juice enhances the bioavailability of the HIV protease inhibitor saquinavir in man, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 45:355–359.
- KWEE, J.K., E. MITIDIEN, O.R. ALFONSO. 1991. Lowered superoxide dismutase in highly metastatic B 16 melanoma cells. *Cancer Lett*, 57: 199-202.
- LAIRD, P.W.1997. Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Mol. Med. Today*, 3: 223–229.
- LAMBERS, H., F. S. CHAPIN, T.L. PONS. 1998. *Plant physiological ecology*. Springer, New York, p. 289-290.
- LATT, S.A. 1973. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 3395–3399.
- LAUWERYS, R., A. BERNARD, J.P. BUCHET. 1991. Does environmental exposure to cadmium represent a health risk?. Conclusions from the Cadmibel Study. *Acta Clin. Belg.*, 46, 219–225.
- LEE, E.J., G.S. MOON, W.S. CHOI, W.J. KIM, S.K. MOON. 2008. Naringin-induced p21WAF1-mediated G(1)-phase cell cycle arrest via activation of the Ras/Raf/ERK signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Food Chem Toxicol.*, 46 (12): 3800-3807.
- LEE, I.M., N.R. COOK, J.M. GAZIANO, D. GORDON, P.M. RIDKER, J.E. MANSON, C.H. HENNEKENS, J.E. BURING. 2005 Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: The Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*, 294: 56–65.
- LEE, K.S. 1992. The stimulating effect of heavy metals on human peripheral blood lymphocytes in vitro. *J Cathol Med Coll*, 45(2):439-445.
- LEE, S.H., T. OE, I.A. BLAIR. 2001. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*, 292: 2083–2086.
- LEMARIE A., D. LAGADIC-GOSSMANN, C. MORZADDEC, N. ALLAIN, O. FARDEL, L. VERNHET. 2004. Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free Radic Biol. Med.*, 36:1517–1531.
- LILJA, J.J., K.T. KIVISTO, P.J. NEUVONEN. 1998. Grapefruit juice-simvastatin interaction: effect on serum concentrations of simvastatin, simvastatin acid and HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacol Ther*, 64:477–483.
- LIN, C.H., S.Y. HSIEH, I.S. SHEEN, W.C. LEE, T.C. CHEN, W.C. SHYU, Y.F. LIAW. 2001. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*, 61:4238–4243.
- LU, J., T. JIN, G. NORDBERG, M. NORDBERG. 2001. Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from cadmium-exposed workers. *Cell Stress & Chaperones*, 6 (2), 97–104.
- LUTZEN, A., S.E. LIBERTI, L.J. RASMUSSEN. 2004. Cadmium inhibits human DNA mismatch repair in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 321: 21-25.
- LYNN, S., H.T. LAI, S.M. KAO, J.LAI, K.Y. JAN. 1997. Cadmium inhibits DNA strand break rejoining in methyl methanesulfonate-treated CHO-K1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:171-176.
- MARES-PERLMAN J.A., B.J. LYLE, R. KLEIN, A.I. FISHER, W.E. BRADY, L.G.M. VANDEN, J.N. TRABULSI, M. PATLA. 2000. Vitamin supplement use and incident cataracts in a population-based study. *Arch Ophthalmol*, 118: 1556–1563.
- MATEUCA, R., N. LOMBAERT, P.V. AKA, I. DECORDIER, M. KIRSCH-VOLDERS. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88: 1515–1531.

- MATSUOKA, M. VE H. IGISU. 2001. Cadmium induces phosphorylation of p53 at serine 15 in MCF-7 cells. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 282: 1120-1125.
- MEPLAN, C., K. MANN, P. HAÏNAUT. 1999. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 274: 31663-31670.
- MEYDANI, S.N., L.S. LEKA, B.C. FINE, G.E. DALLAL, G.T. KEUSCH, M.F. SINGH, D.H. HAMER. 2004. Vitamin E and respiratory tract infections in elderly nursing home residents: a randomized controlled trial. *JAMA*, 292: 828–836.
- MCCORD, J.M., I. FRÍDOVÍCH. 1969. Superoxide dismutase. An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244: 6049-55.
- MCNEILL, D.R., A. NARAYANA, H.K. WONG, D.M. WILSON. 2004. 3rd, Inhibition of Ape1 nuclease activity by lead, iron, and cadmium. *Environ. Health Perspect*, 112: 799–804.
- MIKHAÏLOVA, M.V., N.A. LITTLEFIELD, B.S. HASS, L.A. POÏRIER, M.W. CHOU. 1997. Cadmium-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells. *Cancer Lett*, 115: 141-148.
- MILES, A.T., G.M. HAWKSWORTH, J.H. BEATTIE, V. RODILLA. 2000. Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 35, 35–75.
- MIRA, L., M.T. FERNANDEZ, M. SANTOS, R. ROCHA, M.H. FLORENCIO, K.R. JENNINGS. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.* 36: 1199–1208.
- MISRA, R.R., G.T. SMITH, M.P. WAALKES. 1998. Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines. *Toxicology*, 126:103-114.
- MISRA, U.K., G. GAWDI, S.V. PIZZO. 2003. Induction of mitogenic signaling in the ILN prostate cell line on exposure to submicromolar concentrations of cadmium. *Cell. Signal*, 15: 1059-1070.
- MİYAMOTO, I., N. MIURA, H. NIWA, J. MIYAZAKI, K. TANAKA. 1992. Mutational analysis of the structure and function of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein. Identification of essential domains for nuclear localization and DNA excision repair. *J. Biol. Chem.* 267: 12182–12187.
- MOERTEL, C.G., T.R. FLEMING, E.T. CREAGAN, J. RUBIN, M.J. O'CONNELL, M.M. AMES. 1985. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N Engl J Med.*, 312: 137–141.
- MORIKAWA, K., M. NONAKA, M. NARAHANA, I. TORII, K. KAWAGUCHI, T. YOSHIKAWA, Y. KUMAZAWA, S. MORIKAWA. 2003. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.*, 74 (6): 709–721.
- MORIYA, M., C. OU, V. BODEPUDI, F. JOHNSON, M. TAKESHITA, A.P. GROLLMAN. 1991. Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study of translation synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutat. Res.* 254: 281–288.
- MURCIA, J.M., C. NIEDERGANG, C. TRUCCO, M. RICOUL, B. DUTRILLAUX, M. MARK, F.J. OLIVER, M. MASSON, A. DIERICH, M. LEMEUR, C. WALZTINGER, P. CHAMBON, G. DE MURCIA. 1997. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 7303–7307.
- MURKHERJEE, J.J., S.K. GUTA, S. KUMAR, H.C. SIKKA. 2004. Effects of cadmium (II) on (+/-) anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage response in human fibroblasts and DNA repair: a possible mechanism of cadmium's cogenotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 287-293
- MÜLLER, T., R. SCHUCKELT, L. JAENICKE. 1994. Evidence for Radical Species as Intermediates in Cadmium/Zinc- Metallothionein-dependent DNA damage in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 102 (3) 27-29.
- NG, T.B., F. LIU, Z.T. WANG. 2000. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*, 66:709–723.

- NOGAWA, K., E. KOBAYASHI, Y. OKUBO, Y. SUWAZONO. 2004. Environmental cadmium exposure, adverse effects and preventive measures in Japan. *Biometals*, 17(5):581-587.
- NORDBERG, G. 1972. Cadmium metabolites and toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.*, 2, 7-36.
- NORDBERG, G.F. 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 238(3):192-200
- NORDBERG, G. F., T. JIN, M. NORDBERG. 1994. Subcellular targets of cadmium nephrotoxicity: cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis. *Environ. Health Perspect.* 102, 191-194.
- NORDBERG, M. 1998. Metallothioneins: Historical review and state of knowledge. *Talanta*, 46, 243-254.
- OBE, G., P. PFEIFFER, J.R. SAVAGE, C. JOHANNES, W. GOEDECKE, P. JEPPESEN, A.T. NATARAJAN, W. MARTÍNEZ-LOPEZ, G.A. FOLLE, M.E. DRETS. 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat. Res.*, 504: 17-36.
- O'CONNOR, T.R., R.J. GRAVES, G. DE MURCIA, B. CASTAING, J. LAVAL. 1993. Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. *J. Biol. Chem.*, 268: 9063-9070.
- OH, S.H. VE S.C. LIM. 2006. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 212: 212-223.
- ÖLMEZ, H. VE V.T. YILMAZ. 2004. Anorganik Kimya, Temel Kavramlar. *Otak Form-Ofset Basım San. Ve Tic. A.Ş. Samsun.* s. 214-215. Parsel, D.L.S., R.I. Morimoto, A. Tissiereres, C. Georgopoulos. 1994 *The biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. CSHL Press, New York, p. 457-494.
- PASCHAL, D., V. BURT, S. CAUFDILL, E. GUNTER, J. PIRKLE, E. SAMPSON, D. MILLER, R. JACKSON. 2000. Exposure of the US population aged 6 years and older to cadmium: 1988-1994. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 38, 377-383.
- PATEL, A.C., C.H. ANNA, J.F. FOLEY, P.S. STOCKTON, F.L. TYSON, J.C. BARRETT, T.R. DEVEREUX. 2000. Hypermethylation of the p16 (*Ink4a*) promoter in B6C3F1 mouse primary lung adenocarcinomas and mouse lung cell lines. *Carcinogenesis*, 21: 1691-1700.
- PEREIRA, M.A., W. WANG, P.M. KRAME, L. TAO. 2004. Prevention by methionine of dichloroacetic acid-induced liver cancer and DNA hypomethylation in mice. *Toxicol. Sci.*, 77: 243-248.
- PERRY, P. VE S.WOLFF. 1974. NewGiemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251: 156-158.
- PINKEL, D., L.H. THOMPSON, J.W. GRAY, M. VANDERLAAN. 1985. Measurement of sister chromatid exchanges at very low bromodeoxyuridine substitution levels using a monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.* 45: 5795-5798.
- PALUS, J., K. RYDZYNSKI, E. DZIUBALTOWSKA, K. WYSZYNSKA, A. T. NATARAJAN, R. NILSSON. 2003. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research*, 540: 19-28.
- PIASEK, M. VE J.W. LASKEY. 1999. Effects of in vitro cadmium exposure on ovarian steroidogenesis in rats. *J Appl Toxicol*, 19(3):211-217.
- PROZIALECK, W.C. VE P.C. LAMAR. 1999. Interaction of cadmium (Cd(2+)) with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin. *Biochim Biophys Acta*, 1451(1):93-100.
- RAY, J.S., M.L. HARBISON, R.M. MCCLAIN, J.I. GOODMAN. 1994. Alterations in the methylation status and expression of the raf oncogene in phenobarbital-induced and spontaneous B6C3F1 mouse liver tumors. *Mol. Carcinogen*, 9: 155-166.
- RAZIN, A., R. SHEMER. 1999. Epigenetic control of gene expression. *Results Probl. Cell Differ*, 25: 189-204.

- ROBERTSON, K.D. VE P.A. JONES. 2000. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21: 461–467.
- RICKY, W.K., A. WONG, M. BAKR. 2006. Effect of naringin collagen graft on bone formation. *Biomaterials*, 27: 1824–1831.
- ROTELLÌ, A.E., T. GUARDÌA, A.O. JU'AREZ, N.E. ROCHA, L.E. PELZER. 2003. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharm. Res.*, 48 (6): 601–606.
- RUSSELL, P.J. 2002. Chromosomal mutations, in: B. Cummings (Ed.), *Genetics*, Pearson Education Inc, San Francisco, p: 595–621.
- SACHER, A., A. COHEN, N. NELSON. 2001. Properties of the mammalian and yeast metal-ion transporters DCT1 and Smf1p expressed in *Xenopus Laevis* oocytes. *The Journal of Experimental Biology*, 204;1053–1061
- SALNÍKOW, K. VE A. ZHÍTKOVÍCH. 2008. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium. *Chem Res Toxicol.*, 21(1): 28–44.
- SAHMOUN, A.E., L.D. CASE, S.A. JACKSON, G.G. SCHWARTZ. 2005. Cadmium and prostate cancer: a critical epidemiologic analysis. *Cancer Invest*, 23(3):256–263.
- SANDRÌN, T.R. ve R.M. MAÏER. 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environ Health Perspect*, 111 (8): 1093–1101.
- SANO, M., C. ERNESTO, R.G. THOMAS, M.R. KLAUBER, K. SCHAFER, M. GRUNDMAN, P. WOODBURY, J. GROWDON, C.W. COTMAN, E. PFEIFFER, L.S. SCHNEIDER, L.J. THAL. 1997. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med.*, 336: 1216–1222.
- SCANDALÌOS, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 38:995–1014.
- SCHREÏBER, V., M. MOLINETE, H. BOEUF, G. DE MURCÌA, J. MENISSIER-DE MURCÌA. 1992. The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *EMBO J.*, 11: 3263–3269.
- SALEH-GOHARÌ, N., H.E. BRYANT, N. SCHULTZ, K.M. PARKER, T.N. CASSEL, T. HELLEDAY. 2005. Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol. Cell Biol.*, 25: 7158–7169.
- SCHWARTZ, J.L. VE R. JORDAN. 1997. Selective elimination of human lymphoid cells with unstable chromosome aberrations by p53-dependent apoptosis, *Carcinogenesis* 18: 201–205.
- SERRANO, O. ve R. FATE. 1995. Transport and interactions of heavy metals. *Environmenta Health Perspect*, 103 (1):7-8.
- SEO, H.J., K.S. JEONG, M.K. LEE, Y. B. PARK, U. J. JUNG, H.J. KÌM, M.S. 2003. Role of naringin supplement in regulation of lipid and ethanol metabolism in rats. *Choi. Life Sciences*, 73 (7): 933-946.
- SHÌMODA, R., T. NAGAMÌNE, H. TAKAGÌ, M. MORÌ, M.P. WAALKES. 2001. Induction of apoptosis in cells by cadmium: quantitative negative correlation between basa lor induced metallothionein concentration and apoptotic rate. *Toxicol. Sci*, 64: 208-215.
- SHÌN, Y.W., S.H. BOK, T.S. JEONG, K.H. BAE, N.H. JEOUNG, M.S. CHOI. 1999. Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. *Int J Vitam Nutr Res.*, 69(5):341– 7.
- SHÌRATORÌ, K., K. OHGAMÌ, I. ILÌEVA, X. JÌN, K. YOSHÌDA, K. SATORU, S. OHNO, J. OCUL. 2005. The Effects of Naringin and Naringenin on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. *Pharmacol. Ther.*, 21 (4): 298–304.
- SHÌVERÌCK, K.T. VE C. SALAFÌA. 1999. Cigarette smoking and pregnancy I: ovarian, uterine and placental effects. *Placenta*, 20:265-272.

- SMEETS, K., A. CUYPERS, A. LAMBRECHTS, B. SEMANE, P. HOET, L.A. VAN, J. VANGRONSVELD. 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol Biochem*, 43:437–444.
- SPEIT, G., W. VOGEL, M. WOLF. 1982. Characterization of sister chromatid exchange induction by hydrogen peroxide. *Environ. Mutagen.*, 4: 135–142.
- STEAPER, S.D., M. FABRIS, V. FERRARI, M.O. CARBONARE, A. LEON. 1997. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(4): 669–678.
- STOILOV, L., A. WOJCIK, A.K. GIRI, G. OBE. 2002. SCE formation after exposure of CHO cells prelabelled with BrdU or biotin dUTP to various DNA-damaging agents. *Mutagenesis*, 17:399–403.
- SNYDER, R. D. VE P. J. GILLIES. 2003. Reduction of genistein clastogenicity in Chinese hamster V79 cells by daidzein and other flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1291–1298.
- SOCOLOW, R.H. 1996. *Industrial Ecology and Global Change*. Cambridge University Press. New Jersey, p. 297–298.
- STOHS, S.J. VE BAGCHI, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Med.*, 18: 321–336.
- SVARTENGREN, M., C.G. ELINDER, L. FRIBERG, B. LIND. 1986. Distribution and concentration of cadmium in human kidney. *Environ Res*, 39(1)-7.
- ŞAPLAKOĞLU, U. VE M. İŞCAN. 1998. Sister Chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium in G₀ ve S phase of their cell cycles. *Mutation Research*, 412: 109–114.
- TAKIGUCHI, M., W.E. ACHANZAR, W. QU., G. LI, M.P. WAALKES. 2003. Effects of cadmium on DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell Res*, 286, 355–365
- TANNER, F.C., Z.Y. YANG, E. DUCKERS, D. GORDON, G.J. NABEL, E.G. NABEL. 1998. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease. *Circ. Res.*, 82 (3): 396–403.
- TAO, L., R. GE., M. XIE, P.M. KRAMER, M.A. PEREIRA. 2000. Effect of trichloroethylene and its metabolites, dichloroacetic acid and trichloroacetic acid, on the methylation and expression of c-jun and c-myc protooncogenes in female B6C3F1 mouse liver: prevention by methionine. *Toxicol. Sci*, 54:399–407.
- TAYLOR, J.H. 1958. Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics*, 43: 515–529.
- TAYLOR, W.R. 1988. Permeation of barium and cadmium through slowly inactivating calcium channels in cat sensory neurones. *J Physiol*, 407: 433–452.
- THOMPSON, G.R., R. NAOUMOVA, G.F. WATTS. 1996. Role of cholesterol in regulating apolipoprotein B secretion by the liver. *Journal of Lipid Research*, 37: 439–447.
- THOMPSON, L.H. 2005. Unraveling the Fanconi anemia-DNA repair connection. *Nat. Genet.*, 37: 921–922.
- THOMPSON, L.H., K.W. BROOKMAN, L.E. DILLEHAY, A.V. CARRANO, J.A. MAZRMAS, C.L. MOONEY, J.L. MINKLER. 1982. A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strandbreak repair, and an extraordinary baseline frequency of sister chromatid exchange. *Mutat. Res.*, 95: 427–440.
- VINA, J., M.C. GOMEZ-CABRERA, C. BORRAS. 2007. Fostering antioxidant defences: up-regulation of antioxidant genes or antioxidant supplementation? *British Journal of Nutrition*, 98(1): S36–S40.
- VIRTAMO, J., P. PIETINEN, J.K. HUTTUNEN, P. KORHONEN, N. MALILA, M.J. VIRTANEN, D. ALBANES, P.R. TAYLOR, P. ALBERT. 2003. Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up. *JAMA*, 290: 476–485.

VIVEKANANTHAN, D.P., M.S. PENN, S.K. SAPP, A. HSU, E.J. TOPOL. 2003. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 361: 2017–2023.

WAALKES, M.P. VE L.A. POIRIER. 1984. In vitro cadmium –DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium, and zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 75: 539-546.

WAALKES, M.P., S. REHM, C.W. RIGGS, R.M. BARE, D.E. DEVOR, L.A. POIRIER, L. WENK, J.R. HENNEMAN, M.S. BALASCHAK. 1988. Cadmium carcinogenesis in male Wistar [CrI:(WI)BR] rats: dose-response analysis of tumor induction in the prostate and testes and at the injection site. *Cancer Res*, 48(16):4656-4663.

WAISBERG, M., P. JOSEPH, B. HALE, D. BEYERSMANN. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192: 95-117.

WANG, Z., Y. ZHANG, Z. HUANG, L. HUANG. 2008. Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant Soil*, 310:137–149.

WATKIN, R.D., T. NAWROT, R.J. POTTS, B.A. HART. 2003. Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. *Toxicology*, 184: 157–178.

WATTS, G.F., R. NAUMOVA, M.H. CUMMINGS, A.M. UMPLEBY, B.M. SLAVIN, P.H. SONKEN, G.R. THOMPSON. 1995. Direct correlation between cholesterol synthesis and hepatic secretion of apolipoprotein B-100 in normolipidaemic subjects. *Metabolism*, 44: 1052–1057.

WEI, M., Z. YANG, P. LI, Y. ZHANG, W. C. SSE. 2007. Anti-Osteoporosis Activity of Naringin in the Retinoic Acid-Induced Osteoporosis Model. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35 (4): 663–667.

WESTER, R.C., H.I. MAIBACH, L. SEDIK, J. MELENDRES, S. DIZIO, M. WADE. 1992. In vitro percutaneous absorption of cadmium from water and soil into human skin. *Fundam Appl Toxicol*, 19(1):1-5.

WILSON, D. M. VE L. H. THOMPSON. 2007. Molecular mechanisms of sister- chromatid Exchange. *Mutation Research*, 616: 11–23.

WOJCIK, A., E. BRUCKMANN, G. OBE. 2004. Insights into the mechanisms of sister chromatid exchange formation. *Cytogenet. Genome Res.*, 104: 304–309.

YANO, C.L. VE M.C. MARCONDES. 2005. Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. *Free Radic. Biol. Med*, 39: 1378-1384.

YEE, G.C., D.L. STANLEY, L.J. PESSA, C. T. DALLA, S.E. BELTZ, J. RUIZ, D.T. LOWENTHAL. 1995. Effect of grapefruit juice on blood cyclosporin concentration. *Lancet*, 345: 955–956.

YU, J., L. WANG, R.L. WALZEM, E.G. MILLER, L.M. PIKE, B.S. PATIL, J. AGRIC. 2005. Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins. *Food Chem*, 53 (6): 2009–2014.

ZALUPS, R.K. VE S. AHMAD. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol*, 186(3): 163-188.

ZGLINICKI, T.V., C. EDWALL, E. OSTLUND, B. LIND, M. NORBERG, N.R. RINGERTZ, J. WROBLEWSKI. 1992. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. *Journal of Cell Science*, 103 (4) 1073-1081.

ZHAO, J.H., H. TOHDA, A. OIKAWA. 1992. Camptothecin-induced sister-chromatid exchange dependent on the presence of bromodeoxyuridine and the phase of the cell cycle. *Mutat. Res.*, 282: 49–54.

<http://com-med.ikalogic.com>, 2009

TEŐEKKÜR

Bana bu konuda çalışma olanağı veren ve tezimin her aşamasında yardımına baŐvurduđum danıŐmanım Prof.Dr. Rahmi BİLALOĞLU'na, deney ve yazım aşamasında tezle ilgili birçok konuda yardımına baŐvurduđum Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ'a, kan alma aşamasında ki yardımlarından ötürü Yrd. Doç. Dr. Serap ÇELİKLER'e, deneylerimde emeği geçen ve deneyiminden faydalandığım AraŐ. Gör. Özgrü VATAN'a ve beni destekleyen aileme teŐekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

DİLEK YILMAZ 1981 yılında Artvin’de doğdu. İlk ve lise öğrenimini Bursa ilinde tamamladı. 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliğinden mezun oldu. 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa ve 2009 yılında Araştırma Görevliliğine başladı.