

KADMIYUM TOKSİTESİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA TANNİK ASİTİN, AĞIR METAL GİDERİMİ VE BAZI BİYOKİMYASAL DEĞERLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

THE INVESTIGATION OF TANNIC ACID EFFECTS ON REMOVAL OF HEAVY METALS AND SOME
BIOCHEMICAL VALUES IN THE RAT TOXICITY INDUCED BY CADMIUM

Didem Turgut COŞAN¹, Aylin DAL¹, Ahu SOYOCAK², Ertuğrul ÇOLAK³, Arzu ÇİÇEK⁴, Hülyam KURT¹

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

²İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

³Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı

⁴Anadolu Üniversitesi, Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi

ÖZ

AMAÇ: Endüstriyel alanda yoğun bir şekilde kullanılan, önemli çevre kirleticilerden biri olan kadmiyum (Cd), günlük hayattaki maruziyetimiz nedeniyle yaşamsal bir takım tehditlere sebep olabilmektedir. Uzun bir yarılanma ömrüne sahip olan Cd, solunum, üriner, kardiyovasküler, gastrointestinal, sinir sistemi ve kemiklerde direkt veya dolaylı olarak toksisiteye neden olmaktadır. Vücutta biriken Cd'nin osteoporoz, anemi, eozinofili, anozmi ve kronik rinit gibi birçok hastalığa neden olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, flavonoid içeriği oldukça yüksek, ağır metal şelatlayıcı özelliğe sahip ve antioksidan tannik asidin (TA) Cd toksikasyonundan korunmadaki rolünü araştırmak amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Bu amaçla, 28 adet 200-300 gram ağırlığında sağlıklı 3-4 aylık Sprague-Dawley soyu erkek siçanlar kullanıldı. Deney hayvanlarına ön tedavi amaçlı intraperitoneal (i.p) enjeksiyon ile 5 gün boyunca TA 50mg/kg/gün olarak uygulandıktan sonra, intragastrik (i.g) enjeksiyon tek doz 35mg/kg CdCl₂ uygulandı.

BULGULAR: CdCl₂ uygulaması ile azalan hemolizat, karaciğer ve böbrek süperoksit dismutaz (SOD) değerlerini TA'nın artırdığı gözlemlendi. Benzer şekilde artan hemolizat ve karaciğer malondialdehit (MDA) değerlerini TA'nın azalttığı belirlendi. Karaciğer, böbrek, akciğer, testis ve dalakta CdCl₂ uygulaması ile artan birikimi azaltma yönünde, TA etkili olmazken, kalpteki birikimi azaltma yönünde TA'nın etkili olduğu analiz edildi. CdCl₂ uygulaması ile artan demir birikimini azaltma yönünde böbrek, dalak ve kalpte TA etkili olmazken, karaciğer, akciğer ve testiste etkili olduğu tespit edildi.

SONUÇ: Günlük diyetle kullanılan yiyecek ve içeceklerin, toksik ajanlara maruz kalma sonucunu geliştirebilecek bazı hastalıkları erken dönemde önlenmesiyle, bireylerin yaşam kalitesi yükseltilmektedir. Çalışmamızda günlük yaşamımızda tüketilen TA içeren yiyeceklerin, çeşitli şekillerde maruz kaldığımız ağır metallerden korunma üzerine olan etkileri gözlemlendi. Elde edilen sonuçlara göre farklı dokularda farklı sonuçlara ulaşılabileceği belirlenirken, genel olarak değerlendirildiğinde, Cd'nin zararlı etkilerine ya da en azından bazı dokulardaki birikimini azaltma yönünde TA'nın etkili olabileceği sonucuna ulaşıldı.

ANAHTAR KELİMELER: Kadmiyum, Tannik asit, Toksikite, Siçan

ABSTRACT

OBJECTIVE: Cadmium (Cd), one of the major environmental pollutants used intensively in the industrial field and could cause a variety of vital threats due to our exposure in our daily lives. Having a long half-life, Cd causes direct or indirect toxicity to respiratory, urinary, cardiovascular, gastrointestinal, nervous system and bones. It is known that Cd that accumulates in the body causes many diseases such as osteoporosis, anemia, eosinophilia, anosmia and chronic rhinitis. In our study, we aimed to investigate the role of tannic acid (TA), an antioxidant substance with a high content of flavonoids and heavy metal chelating agents, in order to investigate its role in protecting from Cd toxicity.

MATERIALS AND METHODS: In this study, it was used 28 Sprague-Dawley, 200-300 gr, 3-4 monthly male rats. For pre-treatment, TA (50 mg/kg/day) was administered by intraperitoneal (i.p) injection to the experimental groups for 5 days. And then a single dose CdCl₂ (35 mg/kg) was administered by intragastric (i.g).

RESULTS: It was observed that superoxide dismutase (SOD) values decreased in hemolysate, liver and kidney by CdCl₂ administration; but increased with TA. Malondialdehyde (MDA) values increased with CdCl₂ administration whereas decreased with TA the hemolysate and liver. TA was found to be effective in decreasing heart accumulation, while TA was not effective in reducing accumulation with CdCl₂ administration in liver, kidney, lung, testis and spleen. TA is not effective in reducing increased iron accumulation with CdCl₂ administration in the kidney, spleen and heart, but in liver, lung and testis it could be effective.

CONCLUSIONS: Food and drinks used in the daily diet may increase the quality of life of individuals by early prevention of certain diseases that may result in exposure to toxic agents. In our study, it has been shown that TA, which is consumed in our daily lives, may be effective in protecting substances from heavy metal toxicity. According to the results obtained, different results could be reached in different tissues; but when assessed in general, the harmful effects of Cd, or at least the result that TA have been achieved to reduce the accumulation of some tissues.

KEYWORDS: Cadmium, Tannic Acid, Toxicity, Rat

Geliş Tarihi / Received: 10.05.2017

Kabul Tarihi / Accepted: 24.07.2017

Yazışma Adresi / Correspondence: Doç. Dr. Didem Turgut Coşan
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 26480 Eskişehir
dcosan@gmail.com

GİRİŞ

Toksik ya da ağır metallerin, kimyasal ve endüstriyel işlemler sırasında ortaya çıkışı ve tarımsal alanlarda yoğun olarak kullanımları canlı organizmaların sağlığını tehdit edebilmektedir. Canlı organizmalar doğrudan solunum yolu ile veya besin zinciri aracılığıyla sindirim kanalından çevre kirleticilerine maruz kalarak, önemli sağlık problemleri ile karşılaşabilirler. Ağır metallerden kadmiyum (Cd), çinko üretimine eşlik eden metal olarak üretilmiştir. Çinko üretiminde kullanımı ortaya çıkıncaya kadar havaya, yiyeceklere ve suya doğal süreçlerle önemli miktarlarda karışmamıştır (1). Ancak günümüzde Cd çevre kirliliğine sebep olan ağır metaller arasında yerini almıştır (2). Endüstriyel olarak nikel/Cd pillerde, korozyona karşı özellikle deniz koşullarındaki dayanıklılığı nedeniyle gemi sanayisinde çeliklerin kaplanması, boya sanayisinde, PVC stabilizatörü olarak, alaşımlarda ve elektronik sanayide yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Cd empürüte olarak fosfatlı gübrelerde, deterjanlarda ve rafine petrol türevlerinde bulunur ve yaygın kullanım nedeniyle önemli miktarda Cd kirliliği ortaya çıkar (3). Dünya çapında her yıl 13.000 ton Cd üretimi gerçekleştirilerek çeşitli bileşimler halinde günlük hayatımızın içerisine girmektedir. Özellikle az gelişmiş olan ülkelerde Cd'un endüstride çok fazla kullanımına bağlı olarak yoğun çevresel kirliliğe neden olduğu belirlenmiştir (2).

Endüstride Cd'un verdiği zarar inhalasyon veya beslenme yoluyla gerçekleşerek akut/kronik intoksikasyona neden olmaktadır. Kısa süreli Cd inhalasyonunun akciğerde pulmoner tahrişlere neden olduğu belirlenmiştir. Uzun dönem inhalasyon veya oral maruziyetinin ise böbrek ve karaciğer hastalıklarına neden olabileceği gösterilmiştir (4). Tarım alanlarındaki Cd kontaminasyonu, sebze ve meyveler ile bireylerin Cd'a maruz kalmasına sebebiyet vermektedir (5). Aynı zamanda sigara kullanımı da Cd maruziyetine neden olmaktadır (6). Uzun yarılanma ömrüne sahip olan Cd (yaklaşık 30 yıl) absorbe edildiğinde, karaciğer ve böbreklerde birikir. Cd'un neden olduğu toksisite mekanizması çok yönlüdür. Solunum, üriner, kardiyovaskular, gastrointestinal, sinir sistemi ve kemikler direkt

veya dolaylı olarak Cd toksisitesinden etkilenmektedir (5). Yapılan çalışmalarda, Cd'un neden olduğu toksik etkilerin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Çözülebilir Cd tuzlarının (CdCl₂ gibi) böbrek, karaciğer, akciğer, beyin, testis, kalp ve merkezi sinir sisteminde birikerek toksisiteye neden olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda Cd'un osteoporoz, anemi, eozinofili, anozmi ve kronik rinite neden olduğu gösterilmiştir (7).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, Cd maruziyetinin genotoksisiteye de neden olduğunu göstermektedir (5). Meydana gelen toksik etkiler sonucunda hücrelerde, dejenerasyon veya transmutasyon meydana gelir (8). Apoptotik ve nekrotik olaylara neden olmasından dolayı Cd'un direkt sitotoksik etkisinin ortaya çıktığı, aynı zamanda kanser gelişiminde rol oynadığı raporlanmıştır. Daha sonra International Agency of Cancer Research tarafından tip 1 karsinogen olarak sınıflandırılmıştır (9, 10). Cd hücre seviyede hasarı indüklerken aynı zamanda hücre redoks tepkimelerinde önemli olan onarım sürecine de hasar verir. Literatür çalışmaları sonucunda Cd'un DNA'da indirekt oksidatif strese neden olarak apoptotik mekanizma indüklenmesi ve DNA onarım mekanizmasının bloklanması, lipid peroksidasyon artışı, protein oksidasyonu gibi çeşitli süreçleri tetiklediği belirlenmiştir (11-14). Geçiş metallerinin toksisiteyi genellikle dokuda oksidatif strese neden olarak gerçekleştirir. Redoks-aktif metaller (demir, bakır ve krom gibi) redoks döngüsünü hedeflerken, redoks-inaktif metaller (kurşun, kadmiyum, civa gibi) hücredeki önemli antioksidanların (özellikle tiyol içeren antioksidanlar ve enzimler) azalmasına neden olur. Hem redoks aktif metaller hem de redoks inaktif metaller hidroksil radikalleri (OH⁻) süperoksit radikalleri (O₂⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türevlerinin (ROS) artmasına neden olur. Artan ROS seviyesi, intrinsik antioksidan korumasını alt ederek hücrede ağır metallerin toksik etkisine bağlı olarak oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olur (15).

Cd diğer ağır metallerin aksine, indirekt olarak süperoksit radikallerinin, hidroksil radikallerinin ve nitrik oksit radikallerinin oluşmasına neden

olur. Hücre membranı ve sitoplazmasında bulunan ferritin gibi yapılarda demir veya bakırın yerini alarak, serbest demir veya bakırın seviyesinin artmasına neden olur. Serbest iyonlar ise Fenton reaksiyonu aracılığıyla oksidatif strese neden olur (16).

Flavonoidler antioksidan özelliklerini, serbest radikalleri ve oldukça agresif ROS oluşmasına neden olan şelat metallerini (Fe+2 ve Cu+) nötralize ederek, ROS oluşmasına neden olan enzimleri inhibe ederek ve antioksidan sistemi up-regüle ederek ve/veya koruyarak gerçekleştirir. Epikateşin ve kateşin Fe şelatlanmasında oldukça etkilidir. Peroksil, peroksinitrit, peroksit gibi çeşitli serbest radikallerin nötralize edilmesinde önemli rol oynar (17-19).

Polifenolce zengin meyveler, sebzeler, çay ve kırmızı şarap gibi içeceklerin tüketimi insan sağlığı üzerinde önemli bir yere sahiptir. Bu besinlerde bulunan taninler, hidrolize ve kondanse taninler olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (20, 21). Tanin içeren polifenoller antitümöral, antiviral, antiHIV, lipid peroksidasyon inhibisyonu ve plazmin aktivitesi gibi biyolojik aktivitelere sahiptirler (22). Hidrolize taninlerden olan Tannik asit (TA), çay, yeşil çay, kahve, kırmızı şarap, fındık ve ceviz gibi kabuklu yemiş, meyve ve çoğu bitkide bulunur (21, 23, 24). TA'in antikarsinogenik, antioksidan, antimutajenik, antimikrobiyal, antitallerjik, anti-inflamatuar ve kanamayı durdurma gibi başlıca biyolojik aktivitelere sahip olabilecekleri ile ilgili araştırmalar bulunmaktadır (20, 21, 24). TA, ayrıca kullanılan hücre tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak, antioksidan veya prooksidan olarak hizmet verebilir (22). Ancak bu etkileri henüz tam olarak ispatlanmamış olup araştırmalar sürmektedir. Günlük diyetimizde bulunmaları ve sağlığımız açısından zararsız olmaları nedeniyle doğal bileşenlerin tedavide kullanımına yönelik araştırmalar önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda, flavonoid içeriği oldukça yüksek ve ağır metal şelatlayarak antioksidan etki gösteren TA'in çevresel olarak maruz kalınan Cd toksikasyonundan korunmadaki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Etik Kurul

Çalışmada, 28 adet 200-300 gram ağırlıkta sağlıklı 3-4 aylık Spraque-Dawley soyu erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları deney süresince 12;12 aydınlık/karanlık ışıklandırma, ortalama 22±2°C ısı ve %45-50 nem koşullarına uygun şekilde yaşatıldı. Deney sürecinde tüm sıçanlar kafeslerde, standart sıçan pellet yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi. Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 grup oluşturuldu. Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (88/482) alınmıştır.

Deney yöntemi

CdCl₂ distile su içerisinde çözdürülerek i.g olarak sıçan ağırlıklarına göre uygulandı. Distile su içerisinde çözdürüldükten sonra uygun dozlar da TA i.p enjeksiyon ile verildi. Çalışmada gruplara uygulanan işlemler **Tablo 1**'de verildi.

Tablo 1: Deney hayvanlarına uygulanan işlemler

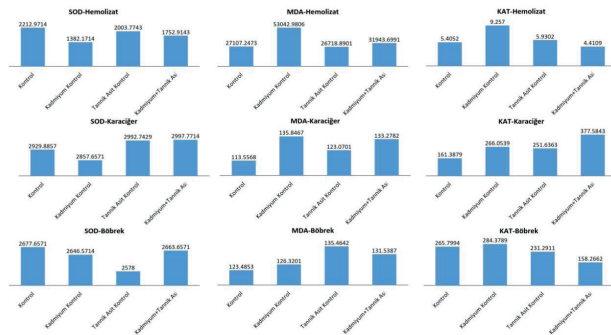
GRUPLAR	UYGULANAN İŞLEMLER
1. Grup:	Kontrol, (sım grup); Bu grup deney hayvanlarına i.g olarak serum fizyolojik (3 ml) uygulandı.
2. Grup:	(Ön tedavi grubu) Bu grup deney hayvanlarına i.p enjeksiyon ile TA 50mg/kg/gün olarak, 5 gün boyunca uygulandı.
3. Grup:	Bu grup deney hayvanlarına 35mg/kg CdCl ₂ i.g 1 gün tek doz uygulandı.
4. Grup:	Bu grup deney hayvanlarına TA 50mg/kg/gün olarak 5 gün boyunca i.p enjeksiyon ile uygulandıktan sonraki gün 35mg/kg CdCl ₂ i.g 1 gün tek doz uygulandı.

Uygulamaların bitiminden sonraki gün sıçanlardan anestezi altında diseksiyon yapılarak kan ve doku örneklerinin alımı gerçekleştirildi. Alınan kan, doku (akciğer, karaciğer, böbrek, testis, dalak, kalp), serum ve plazma örnekleri ölçümlere kadar -80 °C' de bekletildi. Serbest radikal analizleri için; SOD enzim aktivite düzeyi Yi Sun ve ark. (1988) metodu ile; MDA lipid peroksidasyon düzeyi Uchiama ve Mihara (1978) metodu ile, katalaz (KAT) enzim aktivite düzeyi Goth L., (1991) metodu ile, hemolizat (kan) ve doku homojenat (karaciğer, böbrek, akciğer, testis, dalak ve kalp) örneklerinde belirlendi. Doku örneklerinde Cd ve Fe miktarı belirlemeleri için örnekler konsantre nitrik asit ilave edilerek mikrodalga yakma ünitesinde (CEM Mars Xpress) sindirme işlemine tabi tutulmuştur. Organik yıkımları

biten örnekler soğutulduktan sonra filtre kağıdından süzülerek, hacimleri element seviyeleri Analytic Jena ContrAA 700 marka atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile belirlenmiştir (EPA 3051-A 1998). Ölçüm sonuçları Statistical Package of the Social Science (SPSS) programında istatistiksel analizlerle değerlendirildi. Bütün bilgiler ortalama \pm standart sapma olarak belirtilerek istatistiksel farklılıklar $p < 0,05$ 'e göre yorumlandı.

BULGULAR

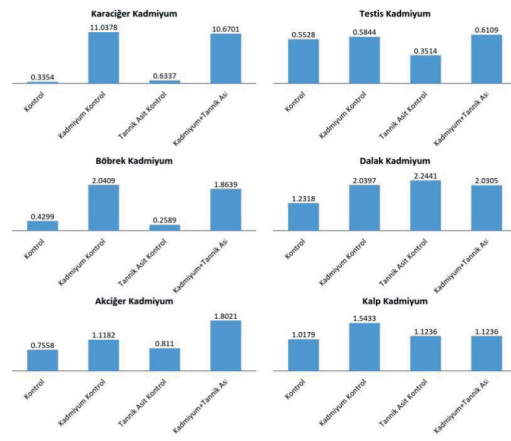
CdCl₂ uygulaması ile azalan hemolizat, karaciğer ve böbrek (sırasıyla $p=0,014$, $p=1,000$, $p=0,989$) SOD değerlerini tannik asidin artırdığı (sırasıyla $p=0,624$, $p=0,030$, $p=0,999$) gözlemlendi. CdCl₂ uygulaması ile artan hemolizat ve karaciğer MDA değerlerini (sırasıyla $p=0,238$, $p=0,348$) tannik asidin azalttığı (sırasıyla $p=0,224$, $p=0,013$) belirlendi. Cd uygulamasının arttırdığı böbrek MDA değerlerini ($p=1,000$) tannik asidin ($p=0,999$) etkilemediği hatta tek başına arttırdığı tespit edildi. CdCl₂ uygulaması ile azalması beklenen KAT değerlerinin hemolizat, karaciğer ve böbrekte arttığı (sırasıyla $p=0,764$, $p=0,929$, $p=1,000$) gözlemlendi (**Şekil 1**).



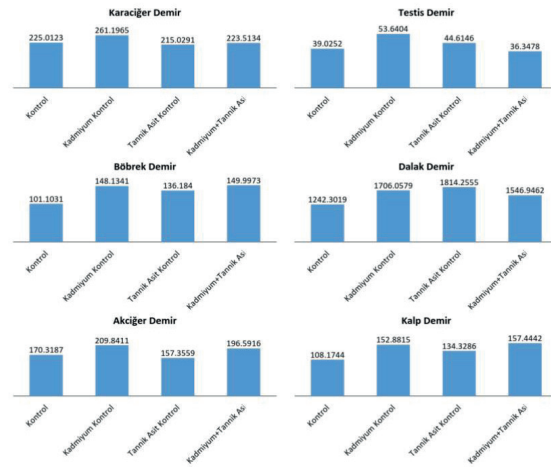
ŞEKİL 1: Karaciğer, böbrek ve hemolizatta SOD, MDA ve KAT değerleri

Akciğer, testis, dalak ve kalpte CdCl₂ uygulaması ile artan birikimi (sırasıyla $p=0,910$, $p=1,000$, $p=0,217$, $p=0,271$) azaltma yönünde TA etkili olmazken (sırasıyla $p=0,410$, $p=1,000$, $p=0,217$, $p=514$) Karaciğer ve böbrek birikimi (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,000$) azaltma yönünde TA etkili olmuştur (sırasıyla $p=1,000$, $p=1,000$) (**Şekil 2**).

CdCl₂ uygulaması ile artan demir birikimini azaltma yönünde böbrek, dalak ve kalpte (sırasıyla $p=1,000$, $p=0,728$, $p=0,225$) TA etkili



ŞEKİL 2: Akciğer, karaciğer, böbrek, testis, dalak, kalp dokularında Cd birikimi



ŞEKİL 3: Akciğer, karaciğer, böbrek, testis, dalak, kalp dokularında demir birikimi

olmazken (sırasıyla $p=0,989$, $p=997$, $p=0,225$), karaciğer, akciğer ve testiste etkili olmuştur (sırasıyla $p=0,308$, $p=986$, $p=0,368$) (**Şekil 3**).

Sunulan bu çalışmada bazı gruplar arasında rakamsal olarak azalış ve artışlar tespit edilmiş olup, istatistiksel olarak değerlendirmeler sonucu bu gruplardan bazıları anlamlı bulunmuştur, değerlendirme ve yorumlamalar tüm sonuçlar göz önüne alınarak yapılmıştır.

TARTIŞMA

Geçiş metallerinin toksisiteleri genellikle dokuda oksidatif strese neden olarak gerçekleşir. Redoks-aktif metaller (demir, bakır ve kromyum gibi) redoks döngüsünü hedeflerken, redoks-inaktif metaller (kurşun, kadmiyum, civa gibi) hücredeki önemli antioksidanların azalmasına neden olur. Her iki grup da, hidroksil radikalleri (OH⁻), süperoksit radikalleri (O₂⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi ROS artmasına neden

olur. Artan ROS seviyesi, intrinsik antioksidan korumasını alt ederek hücrede ağır metallerin toksik etkisine bağlı olarak oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olur (15).

Cd diğer ağır metallerin aksine, indirekt olarak süperoksit radikallerinin, hidroksil radikallerinin ve nitrik oksit radikallerinin oluşmasına neden olur. Hücre membranı ve sitoplazmasında bulunan ferritin gibi yapılarda demir veya bakırın yerini alarak serbest demir veya bakırın seviyesinin artmasına sebep olur. Serbest iyonlar ise Fenton reaksiyonu aracılığıyla oksidatif strese neden olur (16). Aşırı demir ve serbest ROS, eritrosit zarının lipid ve proteinleri yanında hücrenin organellerine hasar verir. Oksijen taşınımında önemli rol oynayan eritrositin hemoglobin yapısındaki değişiklikler, oksijen bağlama kapasitesini etkileyecektir. Dolayısı ile eritrositler oksidatif hasara karşı korunmada enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalar geliştirmişlerdir (25).

DeneySEL çalışmalarda, kanda meydana gelen oksidatif stresin Cd'a maruz kalma şekline bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan akut etkilerin gözlemlendiği bir çalışmada, bir grup sıçana tek doz oral yolla 30 mg/kg Cd uygulanırken diğer grup sıçana intraperitoneal olarak tek doz 1.5 mg/kg Cd uygulanmıştır ve her iki grup karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, her iki grupta da kontrol grubuna oranla SOD aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. O₂⁻, total oksidan ve MDA seviyesinin arttığı belirlenmiştir. İntraperitoneal uygulamanın ardından kanda daha yüksek seviyede Cd olduğu belirlenmiştir (26). Bu çalışmaya benzer olarak, çalışmamızda 35mg/kg Cd 1 gün tek doz uygulandı. Hemolizat, karaciğer ve böbrek dokularında SOD aktivitesinin azaldığı, MDA seviyesinin arttığı gözlemlendi. Böbrekte Cd uygulaması ile SOD değerlerinin düştüğü tespit edilirken hemolizat ve karaciğerde TA uygulaması ile beklendiği üzere SOD aktivitesinin arttığı ancak böbrek dokusunda azaldığı belirlendi. Bu sonuç hücre tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak, TA'nın antioksidan veya prooksidan olarak hizmet verebildiği hakkında bilgi içeren literatür bilgisini destekler nitelikteydi (22). Bu nedenle TA'nın böbrek dokusunda prooksidan etki göstermiş

olabileceği düşünüldü. Bir başka çalışmada Cd 21 gün boyunca intraperitoneal olarak 1mg/kg olarak uygulanmıştır. Çalışma sonucunda SOD aktivitesi ve GSH seviyesinin azaldığı, aynı zamanda serumda MDA seviyesinin arttığı gösterilmiştir (27). Oral Cd uygulamasında ise sıçanların içme sularına 40 mg/L Cd eklenmiştir ve 30 günün sonunda serumlarında SOD, KAT ve GPx aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir (28). Çalışmamızda tek doz Cd uygulaması ile KAT aktivitesinin bildirilen literatürdeki bilgilerin aksine arttığı belirlendi. Tek başına TA uygulamasının belirgin bir şekilde değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi. Cd uygulaması öncesi TA uygulamasının sonucunda KAT aktivitesinin hemolizat ve böbrekte birbirine benzer şekilde düştüğü gözlemlenirken, karaciğerde artış tespit edildi. Cd uygulamasının neden olduğu KAT aktivitesindeki artışın sebebi, KAT'ın toksik maddenin hücrede artan oksidatif stres sonucu oluşan hidrojen peroksit gibi ROS türevlerini su ve moleküler oksijene dönüştürerek parçalaması için miktar olarak artışına bağlı olabilir. TA uygulaması sonucunda KAT aktivitesinin karaciğerde fazla olması KAT gibi antioksidantların aktivitesinin karaciğer dokusunda daha fazla olması ile açıklanabilir (29). Süperoksit (O₂⁻) anyonu üretimindeki artış hemolizat ve böbrek KAT aktivitesini azaltmış olabilir. H₂O₂'nin detoksifikasyonunda görev alan enzimatik bir antioksidan olan KAT'ın bağ dokuya göre eritrosit ve böbreklerde de fazla olmasına rağmen karaciğer KAT düzeyine göre daha düşük aktivite göstermesi ve belki KAT'ın çoğunlukla söz konusu dokularda hidrojen peroksit dışındaki peroksitleri detoksifiye edememesi ayrıca hemolizat hazırlanırken eritrositlerin patlatılması ve hemoliz olması sağlanır. Bunun sonucunda eritrositlerin zarara uğramasından kaynaklanıyor olabilir (30, 31).

Bir başka çalışmada 12 haftalık deney sonrasında Cd ve Pb'ye maruz kalmanın bir sonucu olarak antioksidan mekanizmalarının çöktüğü, SOD ve KAT aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Araştırmanın sonucu TA içeren çay ve benzeri içeceklerin, uzun süreli alındığında Cd ve Pb'nin etkilerine karşı yetişkin beyni koruyabileceği yönünde olmuştur (32). Çalışmamızda Cd uygulaması ile artan hemolizat ve karaciğer dokularındaki MDA seviyelerini

tannik asidin azalttığı gözlemlenirken, Cd ile artan böbrek MDA seviyelerini azaltmada tannik asidin etkili olmadığı hatta arttırdığı tespit edildi. Bu sonuç böbrek dokusundaki SOD aktivitesine benzer şekilde beklenenin aksine bir durum ile karşılaşıldı ve bu nedenle TA böbrek dokusunda prooksidan etki göstermiş olabileceği düşüncesini destekler nitelikteydi.

ROS aşırı üretimi doku hasarına yol açan en önemli mekanizmalardan biridir. Aşırı ROS üretimi, biyomolekülleri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz hasara uğratabildikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Artan ROS iyonize radyasyona maruz kalma, iskemi-reperfüzyon hasarı ve kanser gibi fizyolojik ve patolojik birçok durumda görülebilir.

Cd absorbe edilmesinin ardından kana girip yapar ve eritrosit membranına, kan albumin veya metallothionein (MT)'ne bağlanarak vücuda dağılır. Glutasyon ve sistein gibi -SH içeren proteinlere kolaylıkla bağlanır (33). Akut intoksikasyonun ardından, kısa süreli Cd maruziyetinden en sık etkilenen organ olan karaciğere geçiş yapar. Uzun dönem maruziyetlerde ise birçok dokuda MT sentezi indüklenir. MT'ler ve aminoasitler gibi proteinler biyolojik matrikslerde toksik metalleri bağlayabilen biyomoleküllerin örnekleridir. MT'ler ağır metallerle maruz kalındığında indüklenir (34). Bu tür küçük proteinlere bağlanan Cd, daha sonra böbreklere geçiş yaparak glomerular membran aracılığıyla filtre edilir, proksimal tübül hücrelerinde tekrar absorbe edilir ve böbreklerde birikir. Bu yüzden uzun süreli Cd maruziyetlerinde en çok etkilenen organlardan bir diğeri de böbrektir (35). Ayrıca Cd hücresel seviyede hasarı indüklerken, aynı zamanda hücresel redoks tepkimelerinde önemli olan onarım sürecine de hasar verir. Çalışmamızda TA'nın bazı dokularda yeterince etkili olamamasının sebebi olarak, onarım sürecinde Cd toksikasyonunun çok yönlü bozukluklara yol açtığı ve bu nedenle onarım sürecinin işlememesinden kaynaklanıyor olabileceği kanaatine varıldı.

Ağır metallerin kalp, karaciğer, böbrekler gibi çeşitli hayati organlarda biriktiği ve hayvan vücudundaki radikallerin serbest bırakılmasına

neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle de bu karaciğer, kalp ve böbrek gibi dokularda oksidatif hasara neden olurlar. Çalışmamızda CdCl₂ kaynaklı oksidatif stres ve birikimi üzerine bitki polifenolü olan tannik asidin rolünün araştırılması amaçlandı. Erkek sıçanlarda CdCl₂ kaynaklı nefropatideki rolünün araştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada, bizim çalışmamızdakine benzer şekilde hayvanların TA ile ön muamelesi sonrası çeşitli parametreler incelenmiştir. CdCl₂ sıçanlarda önemli derecede renal doku bozulmaları olmuş ve sıçanlara önceden tannik asit muamele edildiğinde doza bağımlı bir şekilde dokunun korunduğu bulunmuştur. Böylece gelecekte Cd kaynaklı hasarlara karşı güçlü bir reno-koruyucu madde olarak sahip olduğu anti oksidan kapasitesinden dolayı TA'nın kullanılabilmesi yönünde sonuç elde edildiği bildirilmektedir (36). Bir diğer çalışmada da ceviz, fındık ve badem tohumlarından elde edilen tanen fraksiyonlarının Cu(II), Fe(II) ve Zn(II) şelatlama yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (37).

Cd hücre membranı ve sitoplazmasında bulunan ferritin gibi yapılarda demir veya bakırın yerini alarak serbest demir veya bakırın seviyesinin artmasına neden olmaktadır (16). Bu nedenle çalışmamız demir birikimi açısından da yorumlandı. İncelenen dokular arasında karaciğer, akciğer, testis ve dalakta Cd uygulaması ile artan demir birikiminin TA ile azaldığı gözlemlendi. Yapılan bir çalışma 10 gr/kg TA diyetinin Fe absorpsiyonunu azaltarak anemiye indüklediğini göstermektedir. Çalışmanın sonucunda, polifenollerin normal alımının nispeten güvenli olduğu takviyeyle veya diyetle yüksek bir alım söz konusu olduğunda sadece Fe seviyesinin etkileneceğini ancak sıradan yiyeceklerde yüksek seviyede alınan fenoliklerin anemi oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonuçları deney hayvanları üzerinde sağlandığından insanlardaki etkilerinin ayrıca incelenmesinin gerekliliği vurgulanmıştır (38). Yüksek dozlarda Pb ve Cd toksik aktivite gösterir. Vücudun bu metallerle uzun süre maruz kalması tehlikelidir. Cd'a ve Pb'ye maruz kalma durumlarında yetişkin sıçanların beyni üzerinde tannik asidin koruyucu özelliğinin olup olmadığının incelendiği bir araştırmada, yetişkin sıçanlar Pb ve Cd'ye maruz kalan

birakılmıştır. İçme solüsyonu ile verilen %2 TA, Cd birikimini azaltma yönünde etkili olduğu ancak Pb için etkisinin istatistiksel yöntemlerle doğrulanmadığı bildirilmektedir (32). Çalışmamızda incelenen dokular arasında belirgin olmasa da karaciğer ve böbrekteki Cd birikimini azalttığı, kalp dokusunda ise belirgin bir şekilde azalmanın olduğu gözlemlendi. Oral TA uygulamasının, Pb ve Cd birikimini azaltıp azaltamayacağını teyit etmeyi amaçlayan bir başka çalışmada, çok sayıda gıda ürünlerinde ve başta içeceklerde (şarap, çay, kahve ve meyvede bulunan tanik asitin) insan diyetinde kullanılırsa, dokudaki Pb ve Cd birikimini azaltabileceği bildirilmektedir. Yapılan çalışmada sıçanların kalp ve akciğerlerinde Pb ve Cd içeriğini azalttığı yönünde sonuçlar elde edilmiştir. Polifenol bileşiği TA, in vitroda Pb ve Cd için etkili metalik şelatlama özelliğine sahiptir. Sıçanların kalp ve akciğerlerinde Pb ve Cd içeriğini azaltmada %2'lik bir tannik asit solüsyonunun etkili olduğu belirlenmiştir (32).

Cd'un oral yoldan yüksek konsantrasyonlarda uygulanan sıçanların akciğerlerde kalpten daha yüksek miktarda Cd birikmesine yol açtığını gösterdi. Farkın, daha yüksek bir Cd arzıyla birlikte arttığını belirtmek gerekir. Ayrıca genç sıçanların kalp ve akciğerlerinde yetişkinlere göre daha yüksek miktarlarda Cd birikimi olduğu gözlemlenmiştir. Pb ve Cd, glutatyonun tükenmesi ve proteinlerin sülfidril gruplarına yapışması yoluyla zehirli etkilerini gösterir (34). Türkiye gibi geniş bir bitki florasına sahip ancak ekonomik imkânları kısıtlı ve sentez ederek ilaç yapım olanakları üst düzeylere gelememiş ülkelerde, doğal ürünlerden elde edilen ilaçların geliştirilmesi ve kullanımlarının teşvik edilmesi, yeterli ve ucuz ilaç sağlanması bakımından akılcı bir yaklaşım olacaktır. Bu tür toksik ajanlara maruz kalma sonucu gelişebilecek bazı hastalıkların hastalık oluşmadan önlenmesi yoluyla yaşam kalitesi artırılması yönünde katkı sağlayacaktır. Bu bağlamda çalışmamızda günlük yaşantımızda birçok alanda tüketilen TA içeren yiyeceklerin, çeşitli şekillerde maruz kaldığımız ağır metallere korunma üzerine etkili olabileceği belirlendi. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar tüm dokularda aynı değildi. Farklı dokularda farklı sonuçlar elde edilmesi tannik asidin tüm dokularda aynı etkiye sahip olmadığı yönünde fikir edinmemizi

ve ileride yapılacak yeni çalışmalarla etkinliğinin araştırılmasında farklı bakış açıları kazanmamızı sağladı.

KAYNAKLAR

1. Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: A review. *Int J Environ Heal R* 2014;24(4):378-399.
2. Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF. Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *Int J Occup Environ Heal* 2007;13(2):202-212.
3. Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S. Metallerin çevresel etkileri-I. *Metalurji Dergisi* 2003;136:47-53.
4. Haouem S, El Hani A. Effect of cadmium on lipid peroxidation and on some antioxidants in the liver, kidneys and testes of rats given diet containing cadmium-polluted radish bulbs. *J Toxicol Pathol* 2013;26(4):359-364.
5. Anetor JI. Rising environmental cadmium levels in developing countries: threat to genome stability and health. *Niger J Physiol Sci* 2012;27(2):103-115.
6. Lee YK, Park EY, Kim S. Evaluation of cadmium-induced nephrotoxicity using urinary metabolomic profiles in Sprague-Dawley male rats. *J Toxicol Environ Heal A* 2014;77(22-24):1384-1398.
7. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12(10):1161-1208.
8. Zarros A, Skandali N, Al-Humadi H, Liapi C. Cadmium (Cd) as a carcinogenic factor and its participation in the induction of lung cancer. *Pneumon* 2008;21:172-177.
9. International Agency for Research on Cancer (IARC). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. 1993;58:444.
10. Arroyo VS, Flores KM, Ortiz LB, Gómez-Quiroz LE, Gutiérrez-Ruiz MC. Liver and cadmium toxicity. *J Drug Metab Toxicol* 2012;5:1-7.
11. Zhou Z, Wang C, Liu H, Huang Q, Wang M, Lei Y. Cadmium induced cell apoptosis, DNA damage, decreased DNA repair capacity, and genomic instability during malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Int J Med Sci* 2013;10(11):1485-1496.
12. Mladenovic J, Branka Ognjanovic B, Dordevic N, et al. Protective effects of oestradiol against cadmium-induced changes in blood parameters and oxidative damage in rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014;65(1):37-46.
13. Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;213(3):282-290.
14. Brama M, Politi L, Santini P, Migliaccio S, Scandurra R. Cadmium-induced apoptosis and necrosis in human osteoblasts: role of caspases and mitogen-activated protein kinases pathways. *J Endocrinol Invest* 2012;35(2):198-208.
15. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 2001;1(6):529-539.

16. Waisberga M, Josephb P, Halea B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003;192(2):95-117.
17. Hatano T, Miyatake H, Natsume M, et al. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry* 2002;59(7):749-758.
18. Yilmaz Y, Toledo RT. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agr Food Chem* 2004;52(2):255-260.
19. Pollard SE, Kuhnle GG, Vauzour D, et al. The reaction of flavonoid metabolites with peroxyxynitrite. *Biochem Bioph Res Co* 2006;350(4):960-968.
20. Labieniec M, Gabryelak T. Oxidatively modified proteins and DNA in digestive gland cells of the fresh-water mussel *Unio tumidus* in the presence of tannic acid and its derivatives. *Mutat Res-Gen Tox En* 2006;603(1):48-55.
21. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(4):564-582.
22. Labieniec M, Gabryelak T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. *Mutat Res-Gen Tox En* 2003;539(1):127-135.
23. Taffetani S, Ueno Y, Meng F, et al. Tannic acid inhibits cholangiocyte proliferation after bile duct ligation via a cyclic adenosine 5', 3'-monophosphate-dependent pathway. *Am J Pathol* 2005;166(6):1671-1679.
24. Marienfeld C, Tadlock L, Yamagiwa Y, Patel T. Inhibition of cholangiocarcinoma growth by tannic acid. *Hepatology* 2003;37(5):1097-1104.
25. Scott MD, Van Den Berg JJ, Repka T, et al. Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. *J Clin Invest* 1993;91(4):1706.
26. Buha A, Bulat Z, Dukic-Cosic D, Matovic V. Effects of oral and intraperitoneal magnesium treatment against cadmium-induced oxidative stress in plasma of rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63(3):247-254.
27. Ashour TH, El-Shemi AG. Caffeic acid phenyl ester prevents cadmium intoxication induced disturbances in erythrocyte indices and blood coagulability, hepatorenal dysfunction and oxidative stress in rats. *Acta Haematologica Polon* 2014;45(3):272-278.
28. El-Boshya ME, Rishab FE, Abdelhamidb FM, Mubarak MS, Haddad TB. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J Trace Elem Med Bio* 2015;29:104-110.
29. Pandey S, Parvez S, Sayeed I, Haque R, Bin-Hafeez B, Raisuddin S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ* 2003;309(1):105-115.
30. Kelner MJ, Bagnell RD, Ugluk SF, Montoya MA, Mullenbach GT. Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase affords cellular resistance to paraquat. *Arch Biochem Biophys* 1995;323(1):40-46.
31. Bay Karabulut A, Özerol E, Temel İ, Gözükar EM, Akyol Ö. Yaş ve sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler üzerine etkisi. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 2002;9(2):85-88.
32. Winiarska-Mieczan A. Protective effect of tannic acid on the brain of adult rats exposed to cadmium and lead. *Environ Toxicol Phar* 2013;36(1):9-18.
33. Zalups RK, Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharm* 2003;186(3):163-188.
34. Winiarska-Mieczan A, Krusiński R, Kwiecień M. Tannic acid influence on lead and cadmium accumulation in the hearts and lungs of rats. *Adv Clin Exp Med* 2012;22(5):615-620.
35. Nordberg M, Nordberg GF. Toxicological aspects of metallothionein. *Cell Mol Biol Res* 2000;46(2):451-463.
36. Mishra S, Ghosh D, Dutta M, Chattopadhyay A, Bandyopadhyay D. Tannic acid protects against cadmium-induced renal damages of male albino rats. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2015;32(2):273-281.
37. Karamac, M. Chelation of Cu (II), Zn (II), and Fe (II) by tannin constituents of selected edible nuts. *Int J Mol Sci* 2009;10(12):5485-5497.
38. Afsana K, Shiga K, Ishizuka S, Hara H. Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats. *Biosci Biotech Bioch* 2004;68(3):584-592.