



## Sıçan (Wistar albino) merkezi sinir sisteminde kadmiyum sülfatla (CdSO<sub>4</sub>) birlikte verilen nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörlerinin toplam lipid ve protein miktarlarına etkisi

Effect of NOS inhibitors applied with cadmium sulphate on total lipid and protein quantities in central nervous system of rat (Wistar albino)

Mehmet Emin Önger<sup>a\*</sup>, Hayri Genç<sup>b</sup>, Faruk Tan<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Samsun

<sup>b</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun

<sup>c</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Meslek Yüksekokulu, Samsun

### MAKALE BİLGİLERİ

#### Makale geçmişi

Geliş 06 / 06 / 2011

Kabul 06 / 07 / 2011

#### \* Yazışma Adresi:

Mehmet Emin Önger  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A. D.  
55139 Atakum, Samsun.  
E-posta: mehmetemin.onger@omu.edu.tr

#### Anahtar Kelimeler:

Kadmiyum sülfat  
Beyin  
Beyincik  
Toplam lipid  
Toplam protein  
Aminoguanidin  
L-arginin  
Sıçan

#### Keywords:

Cadmium sulphate  
Cerebrum  
Cerebellum  
Total lipid  
Total protein  
Aminoguanidine  
L-arginine  
Rat

### ÖZET

Sıçanlarda (Wistar albino) somatomotor kortekse kadmiyum sülfat (CdSO<sub>4</sub>) verildikten sonra spesifik Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) enzim inhibitörü olan Aminoguanidin (AG) ve NO öncüsü olan L-Arjinin (L-Arg)'in beyin ve beyincikteki toplam lipid ve protein miktarlarına etkisini tespit etmek üzere, sunulan çalışma planlandı. Bu amaçla, saf, kontrol, kadmiyum, kadmiyum+L-Arg ve kadmiyum+AG olmak üzere 7'şer sıçandan oluşan 5 grup oluşturuldu. Kadmiyum grubu sıçanlara 0,0021 mg/kg CdSO<sub>4</sub> sol hemisfere (Bregmanın lateraline) intrakortikal yoldan enjekte edildi. Kontrol grubuna aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Kadmiyum+AG grubuna günde iki kez olmak üzere 100 mg/kg AG 15 gün süreyle intraperitoneal yoldan verildi. Kadmiyum+L-Arjinin grubuna da günde iki kez olmak üzere 1000 mg/kg L-Arjinin 15 gün süreyle intraperitoneal yoldan verildi. Saf grup ise hiçbir işleme tabi tutulmadı ve hiçbir madde verilmedi.

Elde edilen sonuçlar, çalışılan diğer gruplara göre kadmiyumun toplam lipid ve protein miktarlarını düşürdüğünü ve toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, sunulan çalışma ile sıçanda kadmiyumun bu nörotoksik etkisinin, spesifik NOS inhibitörü olan AG tarafından azaltıldığına dair sonuçlar yeni bulgulardır. L-Arjininin kadmiyumdan kaynaklanan toplam lipid ve protein miktarlarındaki azalmayı arttırdığını ve bu nörotoksik etkide NO'nun da rol aldığını, elde ettiğimiz bulgular göstermektedir.

*J. Exp. Clin. Med., 2011; 28:175-181*

### ABSTRACT

The present study was designed to assess the effects of a specific NOS inhibitor aminoguanidine (AG) and a NO precursor L-Arginine (L-Arg) on the total lipid and protein quantities in brain and cerebellum of Wistar albino rats after CdSO<sub>4</sub> injection into the somatomotor cortices. For this purpose 5 groups of rats, each containing 7 animals were formed as non-operated, control, cadmium, Cd+L-Arg and Cd+AG respectively. Rats in cadmium groups received 0.0021 mg/kg intracortical Cd injection in the left hemisphere, lateral to Bregma. Control group received the same volume of saline. Cd+AG group received i.p AG injections for 15 days after the intracortical Cd injections twice a day in 100 mg/kg doses, respectively. Cd+L-Arg group received i.p L-Arg injections for 15 days after the intracortical Cd injections twice a day in 1000 mg/kg doses, respectively, too. Non-operated group received neither any treatment nor any operation.

In conclusion, it was determined that CdSO<sub>4</sub> lowers the total lipid and protein quantities, and affects the rats toxically when compared to other groups. In addition, our results are new findings suggesting that the toxic effect of CdSO<sub>4</sub> was decreased by specific NOS inhibitor AG in rat. L-Arg also appeared to augment this toxic effect of CdSO<sub>4</sub>.

*J. Exp. Clin. Med., 2011; 28:175-181*

## 1. Giriş

Çevre kirliliğine neden olan kimyasal kirleticiler, hücre gelişim üzerine uzun süreli bir etkiye sahiptir (Köse, 2005). Nörotoksik maddeler arasında metallerin yeri ayrı bir önem taşımaktadır. Çünkü, beyin korteksine verildiklerinde uzun süre parçalanmadıklarından, lokal olarak enjeksiyon alanında kalmakta ve etki süreleri daha da uzun olmaktadır (Tan, 2003).

Kadmiyum, hiçbir biyolojik yararı olmayan fakat insanlar ve hayvanlar için yüksek derecede toksik etkiye sahip ve git-tikçe artış gösteren endüstriyel çevre kirleticilerinin başında gelmektedir. Çeşitli endüstriyel faaliyetler sonucu yiyeceklerine kurşun ve kadmiyum bulaşan büyükbaş hayvanların kanlarındaki kurşun ve kadmiyum seviyelerinde artışlar olduğu ifade edilmiştir (Swarup ve ark., 2007).

Kadmiyum insanlarda güçlü bir kanserojen etkiye sahip olup, kanser patogenezi için neden olan birçok faktöre bağlı olarak böbrek, pankreas, prostat ve akciğer kanserlerine neden olabilir (Waisberg, 2003). Kadmiyum karakteristik akciğer kanserojeni olmasından dolayı Amerika'da ulusal toksikoloji programı çerçevesinde uluslararası kanser araştırmaları kurumu tarafından birinci derecede insan kanserojeni olarak sınıflandırılmıştır (Waisberg, 2003).

Kadmiyum oksidatif strese neden olmaktadır, fakat bunun neden olduğu oksidatif stres mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Kadmiyum her ne kadar serbest radikallerin ortaya çıkışına doğrudan sebep olmasa da bazı enzimlerin antioksidan aktivitelerindeki değişiklikler ile dokularda lipid peroksidasyonuna neden olur (Patrick, 2003; El-Demerdash ve ark., 2004; Antonio ve ark., 2003; Carageorgiou ve ark., 2004). Ayrıca insanlar ve hayvanlarda çeşitli patolojik durumların başlaması ve DNA, protein ve lipidlerin oksidatif bozulmasıyla sonuçlanan serbest radikal üretimini uyardığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Manca ve ark., 1991; Sarkar ve ark., 1997; Zhang ve ark., 2009). Serbest radikal üretiminde rol oynayan kadmiyum, çeşitli stoplazmik ve membran proteinlerinin yapısında (ferritin, apoferritin gibi) bulunan demir ve bakır ile yer değiştirebilir, bu nedenle Fenton reaksiyonları ile oksidatif reaksiyon zincirine katılabilir (Casalino, 1997).

Mendez-Armenta ve ark., (2003) beş gün boyunca intraperitoneal olarak kadmiyum verilen (1 mg/kg/gün) sıçanlarda, beyin pariyetal korteks, striatum ve serebellum bölgelerindeki lipid peroksidasyonunda önemli derecede artış olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca erkek sıçanların hipotalamus, striatum ve prefrontal korteks gibi farklı beyin bölgelerinde kadmiyumun amino asit metabolizması üzerine farklı etkiler oluşturduğunu gösteren bulgular mevcuttur (Lafuente ve ark., 2001).

Son yıllarda artan atmosferik kirlilikle birlikte dikkati çeken bir diğer bileşik de Nitrik Oksit (NO)'tir. Bir serbest radikal olan NO (azot monoksit), azotun birçok oksitinden biridir. Özellikle 1987 yılından sonra NO ile ilgili 40,000 den fazla yayın yapılmış, 1992 yılında Science dergisi NO'yu yılın molekülü seçmiştir. İlerleyen yıllarda NO'nun hem hücre hem de bütün vücuda ait fizyolojik olaylarda, ayrıca inflamasyon ve uzun süreli dejeneratif hastalıklar gibi çoğu hastalığın patolojisinde önemli roller üstlendiği anlaşılmıştır (Bruckdorfer, 2005). Kadmiyum toksik etkisini mitokondrial membran potansiyelini azaltarak ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak gösterir. NO sentezinin engellenmesi durumunda kadmiyumun mitokondrial membran potansiyelini

azaltıcı etkisinde artış gözlenmiştir. NO'nun düzenleyici rol oynadığı sistemlerde, Kadmiyum Sülfat'ın meydana getirdiği toksik etki, mitokondriyi oksidatif stresten koruyarak NO tarafından azaltılır (Poliandri ve ark., 2004).

NO ile yapılan bir diğer çalışmada, serebellumda Kadmiyum Sülfat nörotoksitesinin oldukça etkili olduğu, spesifik Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzim inhibitörü olan Aminoguanidin (AG)'in sıçan serebellumunda Kadmiyum Sülfat nörotoksitesinden kaynaklanan hücre ölümlerinde tedavi edici bir rol oynadığı, non-spesifik ya da Kompetitif NOS enzim inhibitörü olan L-Arginin'in ise Kadmiyum Sülfat nörotoksitesinden kaynaklanan hücre ölümlerini daha da artırdığı stereolojik yöntemle tesbit edilmiştir (Tan, 2003).

Yapılan literatür taramaları sonucunda, Kadmiyum Sülfat toksisitesi ile NO arasındaki ilişkinin biyokimyasal sonuçları ve bu değişikliklerin mekanizmalarının nasıl olduğu hakkında yeterli çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, beyin ve beyincikte hücre kayıplarına neden olan Kadmiyum Sülfat toksisitesi ile NO arasındaki ilişkinin biyokimyasal olarak, hücrelerdeki toplam lipid ve protein miktarları üzerine olan etkilerini araştırmak, NO ve NO inhibitörlerinin etki mekanizmalarıyla toplam lipid-protein miktarları arasında bir ilişki olup olmadığı konusuna açıklık getirmektir.

## 2. Gereç ve yöntem

### Deney hayvanları

Deneyler, ağırlıkları 150-250 gram arasında değişen 2-3 aylık Wistar tipi erkek albino sıçanlarda yapıldı. Sıçanlar Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Grupların hepsi aynı laboratuvar şartlarında beslendi. Operasyon öncesi hayvanların ağırlıkları tesbit edilerek kaydedildi. Her hayvana ayrı numara verilerek etiketlendi. Deneyler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deneylere başlamadan önce laboratuvarda kullanılacak olan tüm malzemeler steril edildi. Deneyler ise semisteril şartlar altında gerçekleştirildi. Deney hayvanları, her biri 7'şer hayvandan oluşan 5 gruba ayrıldı. Bu gruplarda deneye alınan toplam 35 hayvanın 7'si saf grup dediğimiz hiçbir işleme tabi tutulmayan grup, 7'si kontrol grubu ( Serum Fizyolojik verilen grup), 7'si kadmiyum grubu (0.0021 mg/kg CdSO<sub>4</sub>), 7'si kadmiyum + Aminoguanidin-100 mg/kg grubu ve son olarak 7'si de kadmiyum + L-Arjinin-1000 mg/kg grubuna aittir.

Hayvanlar, operasyondan 12 saat önce aç bırakıldı. Ketamin hidroklorür (100 mg/kg, i.p.) ile anesteziye alındı. Bu çalışmada kullanılan CdSO<sub>4</sub> ve Aminoguanidin, Sigma Chem Co (St Louis)'dan, L-Arjinin ise Merck Darmstadt (Almanya)'den sağlanmıştır.

### Operasyon

Operasyon masasına yüzüstü yatırılan hayvan, üst çenesinden operasyon masasına (David Kopf) tesbit edildi. Baş bölgesi tıraş edildikten sonra, batikon ile silindi ve kafa derisi orta hat boyunca önden arkaya doğru bisturi ile 3-3.5 cm. kesildi. Kafa kemiği üzerindeki yumuşak doku hassas bir şekilde sıyrılarak kaldırıldı. Böylece kraniotomi yapılacak bölgenin ve Bregma hattının rahatça görülmesi sağlandı. Daha sonra hayvan anestezi altındayken sol serebral korteks üzerindeki kemik, bregmanın 1.5 mm sol lateralinde diş hekimliğinde kullanılan tur motoruyla (BM 9 Tipi) inceltirilerek 1.5-2 mm çapında delik açıldı. Hayvanlarda herhangi bir kanama

olmamasına dikkat edildi. Kafatası kemiğini delme işlemine dura belirgin hale gelinceye kadar devam edildi. Duranın zarar görmemesine azami derecede dikkat edildi.

Kemiği kaldırma işlemi sırasında bölgedeki sıcaklık artışını önlemek için sahaya sık sık 36-37°C sıcaklıkta serum fizyolojik damlatıldı. Daha sonra ince bir pensle dura kaldırıldı. Korteks görünür hale getirildi. Deney gruplarından kadmiyum grubuna açılan bu delikten, 1.2 mm derinliğe Hamilton mikroenjektör ile 0.0021 mg/kg (1µl hacim içinde) (Tan, 2003) kadmiyum sülfat (CdSO<sub>4</sub>) uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Kadmiyum + Aminoguanidin-100 mg/kg grubuna, aynı yöntemle aynı miktarda kadmiyum enjekte edildikten sonra operasyonu takiben 5. dakikada 100 mg/kg aminoguanidin (Tan, 2003) intraperitoneal (i.p) ilk doz olarak verildi. Kadmiyum + L-Arjinin- 1000 mg/kg grubuna ait hayvanlara 0.0021 mg/kg kadmiyum enjekte edildikten sonra operasyonu takiben 5. dakikada 1000 mg/kg L-Arjinin (Tan, 2003) (i.p) ilk doz olarak verildi. Saf grup adını verdiğimiz gruba ise işlem yapılmadı ve hiçbir madde verilmedi. Bu işlemler esnasında Harward Homeothermic Blanket Sistemi yardımıyla hayvanın vücut sıcaklığı 36.5-37.5°C arasında sabit tutuldu. Daha sonra kesilmiş olan kafa derisi usulüne uygun olarak silikonize cerrahi ipek 4/0 iplik ile dikilerek kapatıldı. İntrakraniyal herhangi bir enfeksiyona sebebiyet verilmemesi için oldukça steril şartlarda çalışıldı ve operasyon sonrası dikiş mahali ve yara bölgesi anti-septik solusyon ile temizlendi. Her enjeksiyon işlemi için ayrı ve steril bir enjektör kullanıldı.

Kadmiyum + Aminoguanidin grubundaki tüm hayvanlara 15 gün boyunca günde iki kez (sabah 09:00-akşam 17:00) 100 mg/kg spesifik İNOS enzim inhibitörü olan AG, (i.p) verildi. Kadmiyum + L-Arjinin grubu hayvanlara da yine aynı şekilde 15 gün boyunca günde iki kez (sabah 09:00- akşam 17:00) 1000 mg/kg L-Arjinin (i.p) verildi. Her enjeksiyon işlemi için ayrı ve steril bir enjektör kullanıldı. Enjeksiyon yapılacak peritoneal alan her seferinde batikon ile silindi. Deney gruplarının hepsinde hayvanlar aynı tür besinle beslendiler. Ratlar 15 gün sonra az miktarda eter ile sedasyona alındı ve servikal dislokasyon ile dekapite edilerek öldürüldü. Daha sonra beyin çıkarma işlemine geçildi. Kafatasının beyin ve kas kısmı uzaklaştırıldı. Beyin ve beyincığın çıkartılması için kafatası kemikleri kemik makasıyla (Guj) kırıldı. Beyin ve beyincığın hasar görmemesine azami derecede dikkat edildi. Çıkarılan beyin ve beyincik sağ ve sol olmak üzere ayrılarak, toplam yaş ağırlıkları hassas elektronik terazi ile tartılıp kaydedildi. Daha sonra 100 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 5 mM, pH 7,5 potasyum fosfat tamponu (Potasyum fosfat tamponu: 174,2 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 136,1 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 ml saf suda çözülür) içeren etiketli tüpler içerisine ayrı ayrı konulan parçalar analiz edilinceye kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

### Biyokimyasal analizler

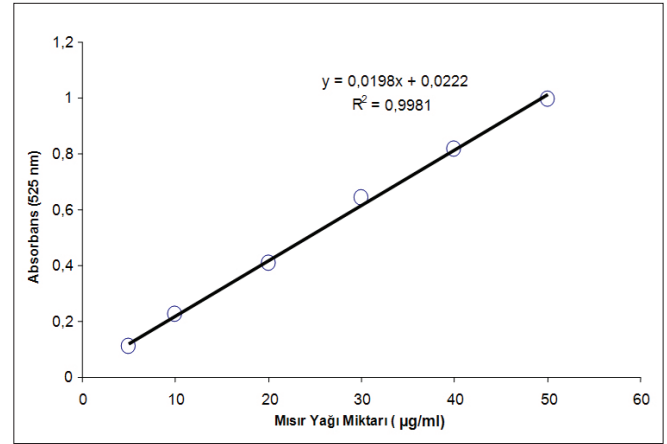
#### Homojenizasyon

Biyokimyasal analizleri yapmak için dondurucudan çıkartılan beyin ve beyincik kısımlarının bulunduğu tüpler, Ultra-Turrax T-25 marka bir homojenizatör kullanılarak, C<sup>0</sup>'de ve 4000 devir/dakikada 3 dakika homojenize edildi.

#### Total lipit analizi

Lipit miktarının belirlenmesi için önce lipit standart gra-

fiği çizildi. Standart grafik çizimi için %0,1'lik mısır yağı kullanıldı. Stok standart çözelti konsantrasyonunun 1 mg/ml olması sağlandı. Elde edilen bu stok çözeltiden lipit konsantrasyonu 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/ml olan çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin 200 µl'si boş bir tüpe aktarıldı. Bu tüpler, içlerindeki çözeltilerin tamamen buharlaşması için, 90 °C'deki su banyosunda ısıtıldı. Tüplerde kalan lipit çökeleğinin içine 40µl konsantre sülfirik asit çözeltisi ilave edilerek tüpler karıştırıldı. Bu işlemin ardından tüpler tekrar 90 °C'deki su banyosunda iki dakika ısıtıldı. Daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğuyan her bir tüp içerisine Van Handel (1985)'in yöntemiyle hazırlanmış 960 µl vanilin-fosforik asit reaktifi ilave edildi. Tüpler renk oluşumunun sağlanması için 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak tüpler karıştırılıp 525 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede



Şek. 1. Total lipit standart grafiği

okunarak absorbans değerleri tespit edildi. Bu işlemler her bir standart çözelti konsantrasyonu için üçer kez tekrarlandı. Tespit edilen absorbans değerleri kullanılarak standart lipit grafiği çizildi (Şek. 1).

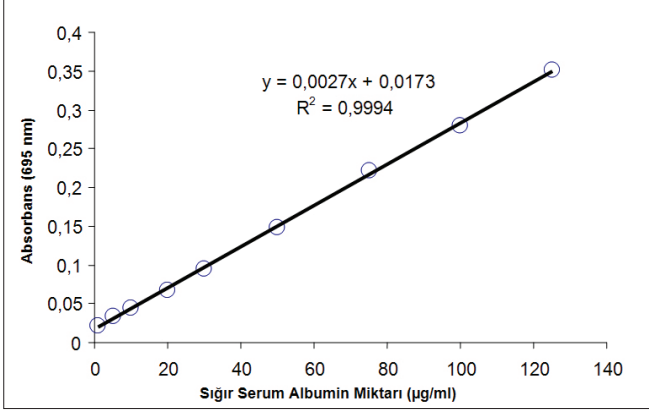
Toplam lipit miktarının belirlenmesinde Olson ve ark., (2000) Van Handel (1985; 1988) den modifiye ettikleri yöntem kullanıldı. Analiz aşamasına kadar -80 °C'de saklanan homojenat, buz içerisine alınarak sıcaklığın yükselmesi için bir süre beklendi. Daha sonra homojenattan 20 µl alınıp üzerine 100 µl fosfat tamponu eklendi. Elde edilen 120 µl seyreltik homojenattan bir ependorf içerisine 50 µl alınıp üzerine 50 µl %2'lik sodyum sülfat çözeltisi ilave edildi. Ardından ependorfa 450 µl kloroform-metanol (1:2) karışımı ilave edildi. Ependorflar karıştırıldıktan sonra, 14000 devir/dakikada iki dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatanttan 200 µl alınarak bir tüpe aktarıldı. Bu tüpler, içlerindeki çözeltilerin tamamı buharlaşmaya kadar 90 °C'deki su banyosunda ısıtıldı. Tüplerde kalan lipit kalıntısının üzerine 40 µl konsantre sülfirik asit çözeltisi ilave edilerek tüpler karıştırıldı ve iki dakika 90 °C'deki su banyosunda ısıtıldı. Daha sonra buzda soğutulan her bir tüp içerisine 960 µl vanilin-fosforik asit reaktifi ilave edilerek, tüpler 30 dakika oda sıcaklığında bırakıldı ve renk oluşumu sağlandı. Son olarak tüpler karıştırılıp absorbans değerleri spektrofotometrede 525 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Total lipit standart grafiği kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

#### Total protein analizi

Öncelikle, protein miktarının belirlenmesinde kullanıla-



cak protein standart grafiği çizildi. Protein standart grafiğinin hazırlanmasında %0,1'lik Sığır Serum Albumin çözeltisi kullanıldı. Stok standart çözelti konsantrasyonunun 1 mg/ml olması sağlandı. Bu çözeltiden seri sulanma ile protein konsantrasyonu 1, 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 ve 125 µg/ml olan standart çözeltiler elde edildi. Elde edilen çözeltiler Lowry



Şek. 2. Total protein standart grafiği

metoduna tabi tutuldu. Daha sonra spektrofotometrede 695 nm dalga boyunda köre karşı okutularak absorbans değerleri elde edildi. Bu işlemler her bir standart çözelti konsantrasyonu için üçer kez tekrarlandı. Elde edilen verilerle standart protein grafiği çizildi (Şek. 2).

Protein analizinde Lowry ve ark., (1951)'nin geliştirdiği yöntem esas alındı. Analiz için -80 °C'de bekletilen homojenat, buz içerisine alınarak sıcaklığın yükselmesi için bir süre beklendi. Daha sonra bir endorfor içerisine 5 µl homojenat alınarak üzerine 125 µl fosfat tamponu ilave edildi. Ardından endorforlar +4 °C'de 3500 devir/dakikada 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpte oluşan süpernatanttan 100 µl alınarak Lowry metodu uygulandı. Spektrofotometrede 695 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Okunan absorbans değerleri total protein standart grafiğinden yararlanılarak değerlendirildi.

### Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS for Windows (ver. 11.5) software paket programı kullanılarak yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanıldı. Bu testten elde edilen sonuçların önemli olması durumunda ortalamalar "Tamhane Testi" kullanılarak değerlendirildi. Sonuçların değerlendirilmesinde  $\alpha=0,05$  güven sınırı esas alındı.

### 3. Bulgular

#### Genel gözlemler

Kontrol grubuna ait deney hayvanlarında operasyon sonrası herhangi bir davranış değişikliği gözlenmedi. Operasyona alınan hayvanlardan ölen olmadı.

Kadmiyum verilen hayvanların hepsinin beyinlerinde enjeksiyon bölgelerinde lezyon gözlemlendi. Deney grubundaki hayvanlarda ilk 7. ve 10. günler arasında besini tanımada ve bulmada zorluk, hareketlerinde yavaşlama, zaman zaman şiddetli saldırganlık gözlemlendi. 10. günden sonra davranışlarında gözle görülür düzelmeler olsa da belirli zaman aralıklarında şiddetli bir şekilde aşırı bilinçsiz hareketler ve epileptik nöbe-

te benzer davranışlar gözlemlendi.

Kadmiyum verilen bütün gruplarda enjeksiyon bölgelerinden başlayıp boyunlarına kadar uzanan bir alanda oldukça fazla tüy dökülmesi gözlemlendi. Bu dökülmeye saf ve kontrol gruplarında rastlanmadı.

Kadmiyum + L-Arjinin grubuna ait 7 hayvanın, (i.p) enjeksiyona başlanan ilk günden itibaren 3. gün 4 adet, 4. gün

Tablo 1. Tüm gruplara ait beyin ve beyincikteki toplam lipid ve protein miktarları

Deneysel Grupları*	Toplam Lipid Miktarı (mg/100mg)	Toplam Protein Miktarı (mg/100mg)	
Saf Grup	Sağ Beyin	9,31 ± 0,30	6,59 ± 0,35
	Sol Beyin	9,40 ± 0,33	6,84 ± 0,50
	Sağ Beyincik	8,93 ± 0,23	5,80 ± 0,61
	Sol Beyincik	9,09 ± 0,28	6,70 ± 0,52
Kontrol Grubu	Sağ Beyin	9,00 ± 0,38	6,65 ± 0,42
	Sol Beyin	9,50 ± 0,27	6,50 ± 0,61
	Sağ Beyincik	9,16 ± 0,52	5,55 ± 0,56
Kadmiyum Grubu	Sol Beyincik	9,29 ± 0,25	6,31 ± 0,42
	Sağ Beyin	5,64 ± 0,33	4,56 ± 0,52
	Sol Beyin	5,88 ± 0,20	4,45 ± 0,23
Cd <sup>2+</sup> +L-Arjinin Grubu	Sağ Beyincik	5,63 ± 0,17	4,09 ± 0,23
	Sol Beyincik	5,48 ± 0,42	4,19 ± 0,16
	Sağ Beyin	4,93 ± 0,48	4,20 ± 0,27
Cd <sup>2+</sup> +AG Grubu	Sol Beyin	5,21 ± 0,53	4,21 ± 0,48
	Sağ Beyincik	5,11 ± 0,38	3,80 ± 0,35
	Sol Beyincik	5,04 ± 0,37	3,32 ± 0,68
Cd <sup>2+</sup> +AG Grubu	Sağ Beyin	7,87 ± 0,48	5,83 ± 0,24
	Sol Beyin	7,63 ± 0,47	5,12 ± 0,16
	Sağ Beyincik	8,02 ± 0,43	4,81 ± 0,23
Sol Beyincik	7,79 ± 0,43	5,26 ± 0,45	

\* Grupların oluşturulma şekli için Materyal ve Metot bölümüne bakınız.

2 adet ve 5. gün 1 adet olmak üzere öldüğü gözlemlendi. Ölen hayvanların çoğunda (i.p) enjeksiyon bölgesinde nekroza rastlandı. Bu grup için yeniden 7 adet hayvanla işlemler aynı şekilde tekrarlandı. İkinci tekrarda her bir hayvan 15 gün boyunca ayrı kafeslerde muhafaza edildi. 15 gün sonunda herhangi bir ölüm olayı gözlenmedi. Deneysel sonucu yapılan lipid ve protein analiz sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

### 4. Tartışma

Merkezi sinir sistemi elemanlarından beyin ve beyincikte kadmiyumun hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Tan ve ark., 1999; Bağırıcı ve ark., 2001; Genç ve ark., 2001; Tan, 2003). Demir ve arkadaşları (1996)'nın çinko için ileri sürdükleri gibi kadmiyum da tıpkı çinko gibi aşırı nöron aktivitesine sebep olarak, muhtemelen güçlü bir eksitator transmittir olan glutamat reseptörlerinden NMDA'yı aktiveleme yoluyla etkisini gösterebilir. Chvapil ve arkadaşları (1972) proteinlerin tiyol ve imidazol kısımlarıyla reaksiyona giren bazı metallerin proteinin yapı ve fonksiyonunu değiştirdiğini, neticede hücre ölümünü başlattığını ileri sürmüşlerdir. Çalışmalarımızdaki lipid ve protein miktarı ile ilgili sonuçlar da, muhtemelen kadmiyumun neden olduğu hücre ölümü sonucu beyin ve beyincikteki söz konusu maddelerin azalmasından kaynaklanmış olabilir.

Kadmiyumla yapılan bir başka çalışmada, beyinlerine kadmiyum verilen (0,0021 mg/kg) sıçanlarda beyin ve beyincikte kadmiyum nörotoksitesinin oldukça etkili olduğu ve hem beyin hem de beyincikte toplam lipid ve protein miktarlarını azalttığı belirtilmiştir (Köse, 2005). Gebelik sırasında kadmiyum ve kurşuna maruz bırakılan ratların yavrularının beyinlerindeki toplam lipid miktarlarında yeni doğan yavrularda % 11, beş günlük yavrularda ise % 23 oranında bir azalma olduğu, toplam protein miktarlarında yeni doğan yav-

ruklarda % 17, beş günlük yavrularda ise % 31 oranında azalma olduğu bildirilmiştir (Antonio ve ark., 1999). Bu sonuçlar bizim kadmiyum ile ilgili sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Yine kadmiyum ve kurşun gibi maddelere uzun süre maruz kalanlarda, serbest radikallerle ilişkili oksidatif stresin ortaya çıkacağı ileri sürülmüştür (Abdollahi ve ark., 2003; Abdollahi ve ark., 2004). Serbest radikaller hücrelerde normal metabolizma ürünü olarak üretilirler. Ancak fazla üretildiğinde, kolesterolün ve yağ asitlerinin doymamış bağlarına bağlanır ve membran lipid peroksidasyonuna (MLP) neden olarak plazma membranının bütünlüğünü bozar (Boje, 1996). Plazma membran bütünlüğünün bozulması, ekstrasellüler ortamda bulunan ve membrandan geçebilen iyonların hücre içine girmesine sonuçta iyon gradientlerinin bozulmasına neden olur (Robb ve ark., 1999). Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir (Cochrane, 1991). Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu singlet oksijen molekülü, yapısındaki iki adet çiftlenmemiş elektron sayesinde hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluşumuna yol açar. Lipid peroksitlerden de kimyasal reaksiyonlar sonucunda serbest lipid grupları oluşur. Serbest lipid grupları da, ayrıca doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksitler hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarak sekonder bozuklukların da göstergesi olabilirler. Beyin, oksidatif hasara en duyarlı bölgedir. Serbest radikaller, santral sinir sisteminin patolojik durumlarının pek çoğunda, direkt olarak doku hasarı meydana getirirler. Serbest oksijen türleri, ekzitotoksisite, metabolik fonksiyon bozukluğu ve kalsiyumun hücre içi dengesinde bozulma gibi mekanizmalarla doku hasarı meydana getirirler. (Facchinetti ve ark., 1998; Güven ve ark., 2003; Kaya ve ark., 1998; Mates, 2000; Halliwell, 1991).

NO ve nörotoksisite ile ilgili pek çok çalışma olmasına rağmen (Chao ve ark., 1992; Dawson ve ark., 1993; Dawson, 1994; Marangoz ve ark., 1994; Dawson ve ark., 1991; Satarug ve ark., 2000) NO'nun nöroprotektif mi yoksa nörotoksik mi olduğu kesin bir şekilde ifade edilmemiştir. Çelişkili sonuçlar muhtemelen nörotoksik ve epileptik modelin, çalışılan beyin bölgesinin, NO sistemi ile ilgili maddelerin verilmiş yollarının, uygulanan dozların ve deney metodunun farklı olmasına, ayrıca diğer maddelerin NO sistemini etkilemesine ve sonuçta mikro çevreye ait olan farklı redoks durumuna bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir (Marangoz, 1996).

Sentezlenen ya da ortamda bulunan NO miktarı bunun etkisinin fizyolojik ya da patolojik olmasını belirleyebilir. Normal fizyolojik ortamda sürekli olarak, küçük miktarlarda üretilen NO, guanilat siklazın uyarılması, hücre içindeki cGMP düzeyinin artımı, kan damarlarının gevşemesi, trombositlerin yapışmasının engellenmesi, iyon kanallarının açılması ve kapanması gibi etkilere sahiptir. Buna karşılık sürekli olarak, çok miktarda NO üretimi, hücre solunumu, enerji üretimi ve hücre çoğalmasıyla ilişkili demire bağımlı enzimlerin aktivasyonuna yol açmaktadır (Çakmakçı, 1999).

İndüklenebilen NOS, NO'yu toksik etki ortaya çıkarabilecek düzeylere kadar üretebilen bir enzimdir (Gross ve Volin, 1995). Beyindeki mikroglial hücreler, indüklenebilen tip NOS sentez edebilmektedirler.

Glutamat ve aspartat gibi uyarıcı aminoasitlerin normalden fazla salınımı nörotoksisiteye neden olmaktadır (Lynch ve Dawson, 1994). Bu aminoasitlerin reseptörleri uyarması NOS'un aktif hale geçmesine neden olur. NOS'un aktif hale geçmesinin aşırı miktarda NO sentezlenmesine neden olacağı ileri sürülmektedir (Dawson, 1995).

Nöronal ölüm aktif bir süreçtir ve nörotrofik faktörler bu süreci baskılamak için uğraşılır (Jhonson ve ark., 1989). İn vivo ve in vitro olarak yapılan deneysel çalışmalar öldürücü proteinler olarak adlandırılan bazı maddelerin bu süreci başlattıkları ve nöronal hasarı takiben hücre ölümünden sorumlu olduklarını ortaya koymuştur (Wu ve Li, 1993). Lezyona bağlı motor nöron dejenerasyonu ve ölümü üzerinde yapılan başka bir çalışmada 6. hafta sonunda bazı hasarlı motor nöronların NOS enzimi içermelerine rağmen büyük çoğunluğunun morfolojik olarak canlılıklarını yitirmedikleri saptanmıştır. Bu çalışmanın en önemli sonucu travmatik lezyon sonucu ortaya çıkan NOS'un nörotoksik düzeyde NO üreten bir öldürücü protein gibi etki edebileceğidir. NOS enzimi normal şartlar altında spinal motor nöronlarda mevcut değildir. Hasara uğramış nöronlarda NOS enziminin bulunması hasarlı nöronların ölümü ile uyumlu olup, NOS inhibisyonu ile ölüm oranı azalmakta ya da kısıtlanmaktadır (Jhonson ve ark., 1989).

Bu çalışmada kadmiyuma bağlı hücre ölümlerinin NO ile ilişkisi konusuna biyokimyasal açıdan açıklık getirmek için spesifik NOS inhibitörlerinden aminoguanidin ile non-spesifik NOS inhibitörlerinden L-Arjinin kullanıldı.

Cd+AG grubundaki hayvanlarda, kadmiyumun meydana getirdiği toplam lipid ve protein miktarındaki azalmanın, kadmiyum grubuna göre %20 oranında daha az olduğu bulundu. Burada guanidin türevi bir NOS inhibitörü olan aminoguanidinin nöroprotektif etki gösterdiği ancak bu koruyucu etkinin lipid ve protein miktarındaki azalmayı tamamen durdurmadığı görülmektedir.

Cd+L-Arjinin grubunda ise toplam lipid ve protein miktarlarındaki azalmada kadmiyum grubuna göre az da olsa bir artış gözlenmiştir. Bu sonuca göre; NO sentezinden sorumlu olan L-Arjinin, aminoguanidinin tam tersine NO sentezini arttırmış ve sonuçta fazla sentezlenen NO, beyin ve beyincikte toplam lipid ve protein miktarını azaltıcı etki göstermiştir. Yani bu grupta fazla sayıda gerçekleşen toplam lipid ve protein miktarı kaybindan NO sorumludur diyebiliriz.

AG ile yapılan bir çalışmada, ratlarda iNOS tarafından üretilen aşırı NO'nun neden olduğu nöronal ölümler ve beyin hasarı, günlük olarak (i.p) AG (100 mg/kg) uygulamasından sonra ortadan kalkmış ve AG, histopatolojik ve davranışsal bozuklukları belirgin derecede iyileştirmiştir (Lu ve ark., 2002). AG'nin düşük dozlarda verildiğinde sinir akson çapındaki daralmanın kısmi olarak iyileştiği, genelde tercih edilen iyileştirme dozunda (100 mg/kg) ise sinir liflerindeki atrofının tam olarak düzeldiği gözlenmiştir (Ino-ue ve ark., 1998). Bizim çalışmamızda elde etmiş olduğumuz verilere baktığımızda, tedavi gruplarından olan Cd+AG-100 mg/kg grubunda toplam lipid ve protein miktarındaki azalmanın en az olduğu dikkat çekicidir. Dolayısıyla, literatürdeki tercih edilen 100 mg/kg lık miktar, bizim çalışmamız tarafından da desteklenmektedir.

Bu değerlendirmelerden sonra, kadmiyuma bağlı hücre ölümünde ve toplam lipid ve protein miktarında meydana gelen azalmada aminoguanidinin muhtemel koruyucu mekanizması şu şekilde açıklanabilir: Akut enflamatuar değişikliklere

bağlı olarak ortaya çıkan sitokinler ve uyarıcı maddeler de tıpkı immünolojik ya da inflamatuvar uyarılarda olduğu gibi iNOS enzim aktivasyonuna katkıda bulunarak patolojik uyarıyı takip eden birkaç gün boyunca nanomol ile ifade edilebilen toksik düzeylerde NO üretilebilmekte ve sonuçta hücre ölümüne kadar gidebilecek hasarı arttırmaktadır (Brüne ve ark., 1995). Bu şekilde aşırı olarak üretilen NO'nun redükte formu artmaktadır. Artmış redükte NO, süperoksit ( $O_2^-$ ) ile reaksiyona girip peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) ve serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır. Artan serbest radikaller hücre zarındaki lipidlerden elektron çalarak lipid peroksidasyonuna neden olmakta ve bu da nöron ölümünü hızlandırmaktadır (Marangoz, 1996). AG spesifik olarak iNOS enzimini inhibe etmek suretiyle histopatolojik ve davranışsal bozukluklarda iyileştirici yönde etkili olmaktadır (Lu ve ark., 2002). Literatürdeki bu veriler ile bizim çalışmamızın verileri arasında benzerlik olduğu görülmektedir.

Elde ettiğimiz bu verilere göre, L-Arjinin'in toplam lipid ve protein miktarını azaltıcı etkisi şu şekilde ortaya çıkmış olabilir: iNOS ve cNOS enzimatik sistem N-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ya da N-nitro-L-arjinin (L-NNA) gibi L-arjinin analogları tarafından inhibe edilebilir. Bu enzim izoformları aynı hücrede birlikte de bulunabilir. Örneğin; endotel hücreleri nitrik oksit üretimi açısından TNF- $\alpha$  ile uzun süreli uyarılırken bir kalsiyum agonisti olan bradikinin ile de kısa sürede uyarabilir. Ya da, sinir hücreleri ve makrofajlar TNF- $\alpha$  ya da LPS ile uyarılırsa, indüklenebilen NOS aktif hale gelirken yapısal NOS'un mesajcı RNA'sı baskılanır (Çakmakçı, 1999). Bu baskılama protein miktarını düşürür. Cd+L-Arjinin grubunda da toplam lipid ve protein miktarlarındaki azalmanın yukarıda anlatılan şekilde olduğu sanılmaktadır.

Çalışmamızdaki L-Arjinin grubunda meydana gelen top-

## KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., Zafarlet, K., 2003. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 135, 331-336.
- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress : a review. *Med. Sci. Monit.* 10, 141-147.
- Antonio, M.T., Corpas, I., Leret, M.L., 1999. Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicology Letters*. 104, 1-9.
- Antonio, M.T., Corredor, L., Leret, M.L., 2003. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicology Letters*. 143, 331-340.
- Bağırıcı, F., Genç, H., Tan, F., Demir, Ş., 2001. Neuroprotective Effect of Nicardipine on Cadmium-Induced Purkinje Cell Death in Rat Cerebellum. *Neuroscience Research Communications*. 29, 2.
- Bruckdorfer, R., 2005. Nitric oxide in physiology and pathology. *Molecular Aspects of Medicine*. 26, 1-2.
- Brüne, B., Mebmer, U.K., Sandau, K., 1995. The role of nitric oxide in cell injury. *Toxicology Letters*. 82, 233-237.
- Boje, K.M.K., 1996. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis. *Brain Research*. 720, 75-83.
- Carageorgiou, H., Tzotzes, V., Patnos, C., Mourouzis, C., Zarros, A., Tsakiris, S., 2004. In vivo and in vitro Effects of Cadmium on Adult Rat Brain Total Antioxidant Status, Acetylcholinesterase, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase Activities: Protection by L-Cysteine. *Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology*. 94, 112-118.
- Casalino, E., Sblano, S., Landriscina, C., 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 346, 171-179.
- Chao, C.C., Hu, S., Molitor, T.W., Shaskan, E.G., Peterson, P.K., 1992. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.* 149, 2736-2741.
- Chvapil, M., Elias, S.L., Ryan, J.N., Zukoski, C.F., 1972. Pathophysiology of zinc. In: Pfeiffer CC ed. *Neurobiology of Trace Metals Zinc and Copper* 2nd ed. Vol 1. New York, Academic Press. 105-124.
- Cochran, C.G., 1991. Cellular injury by oxidants. *Ann. J. Med.* 92, 235-305.
- Çakmakçı, M., 1999. Zehirli molekülden haberci maddelerin kraliçeliğine; Nitrik Oksit. *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi*. 374, 58-62.
- Dawson, D.A., 1994. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab. Rev.* 6, 299-324.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1991. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 6368.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R., Snyder, S.H., 1993. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain

lam lipid ve protein miktarlarındaki azalma literatürdeki verilerle uygunluk göstermektedir (Brüne ve ark., 1995; Marangoz, 1996; Tan, 2003). Dolayısıyla bu çalışma ile elde edilen sonuçlar ışığında, L-Arjininden fazla miktarda sentezlenen NO'nun toksik etki yaptığı ve literatürdeki sonuçlarla örtüştüğü tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz tüm bu sonuçlar kadmiyumdan kaynaklanan; serebellumdaki purkinje hücrelerinin ölümünde ve ayrıca beyin ve beyincikteki toplam lipid ve protein miktarındaki azalmada NO'nun rolü olduğunu göstermektedir. Diğer spesifik ve non-spesifik NOS inhibitörleri ile ileri düzeyde daha gelişmiş teknik ve metodlarla yapılacak çalışmalar fizyopatolojik ve biyokimyasal olayların aydınlığa kavuşmasını ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada sıçan merkezi sinir sistemi elemanlarından beyin ve beyincikte kadmiyum nörotoksitesinin oldukça etkili olduğu, hem beyin hem de beyincikte toplam lipid ve protein miktarlarını önemli ölçüde azalttığı, ayrıca AG'in bu toksisitede tedavi edici bir rol oynayarak, kadmiyumdan kaynaklanan toplam lipid ve protein miktarlarındaki kaybı azalttığı, L-Arjininin ise kadmiyum nörotoksitesini ve dolayısıyla toplam lipid ve protein miktarlarındaki kaybı daha da arttırdığı biyokimyasal yöntemlerle tesbit edilmiştir.

Elde ettiğimiz verilen daha iyi anlaşılabilmesi için; nöronlarda moleküler düzeyde meydana gelen değişimlerin elektron mikroskopuyla, kadmiyum odağında ve ayrıca daha uzak bölgelerde meydana gelebilecek biyokimyasal ve moleküler düzeydeki değişimlerin ise immünohistokimyasal ve biyokimyasal metotlarla araştırılması gerekmektedir. Böylece çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların hücresel ve biyokimyasal mekanizmaları daha iyi anlaşılabilir.



- cultures. *J. Neuroscience*. 13, 2650-2661.
- Dawson, V.L., 1995. Nitric oxide: role neurotoxicity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Australia*. 224, 305-308.
- Demir, Ş., Genç, O., Bağırıcı, F., Ayyıldız, M., Korkmaz, A., Marangoz, C., 1996. Beyinde çinkonun sebep olduğu hücre ölümüne verapamilin etkisi. *O.M.Ü. Tıp Dergisi*. 131, 19-25.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I, Kedwany, F.S., Baghdadi, H.H. 2004. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and  $\beta$ -carotene. *Food and Chemical Tox.* 42, 1563-1571.
- Facchinetti, F., Dawson, V.L., Dawson, T.M. 1998. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 18, 667-682.
- Genç, H., Bağırıcı, F., Çakır, A., Demir, Ş., Tan, F. 2001. Effect of Flunarize On Cadmium-Induced Purkinje Cell Loss in Rats. *Neuroscience Research Communications*. 28, 2
- Gross, S.S., Volin, M.S. 1995. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Ann. Rev. Physiol.* 57, 737-769.
- Güven, A., Erginsoy, S., Kaya, N. 2003. Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Ü. Vet. Fak. Derg.* 9, 131-136.
- Halliwell, B., 1991. Drug antioxidant effects. *Drug.* 424, 569-605.
- Inoue, M., Ohgiya, N., Yamamoto, M. 1998. Effect of aminoguanidine on optic nerve involvement in experimental diabetic rats. *Brain Res.* 800, 319-322.
- Jhonson, E.M., Chang, J.Y., Kioko, T. Martin, D.P., 1989. Why do neurons die when deprived of trophic factor? *Neurobiol. Aging*. 10, 549-552.
- Kaya, S., Piriñçi, İ., Bilgili, A. 1998. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. *Medisan Yayın Serisi. Ankara*. 35, 222, 232, 273, 276, 355.
- Köse, L. 2005. Sıçan Wistar albino Merkezi Sinir Sisteminde Total Lipid ve Protein Miktarı Üzerine Kadmiyum Sülfatın CdSO<sub>4</sub> Etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*.
- Lafuente, A., Fena'ndez-Rey, E., Seara, R., Pe'rez-Lorenzo, M., Esquifino, A.I. 2001. Alternate cadmium exposure differentially affects amino acid metabolism within the hypothalamus, median eminence, striatum and prefrontal cortex of male rats. *Neurochemistry International*. 39, 187-192.
- Lowry, O.H., Rose Brough, N.J., Farr, A.L., Randall, V.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lu, J., Mochhala, S., Shirhan, M., Chye, K., Teo, A.L., Tan, M.H., Moore, X.L., Wong, M.C., Ling, E.A. 2002. Neuroprotection by aminoguanidine after lateral fluid-percussive brain injury in rats: a combined magnetic resonance imaging, histopathologic and functional study. *Neuropharmacology*. 44, 253-263.
- Lynch, D.R., Dawson, T.M. 1994. Secondary mechanism in neuronal trauma. *Curr. Opin. Neurol. U.S.A.* 76, 510-516.
- Manca, D., Ricard, A.C., Trottier, B., Chevalier, G. 1991. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*. 67, 303-323.
- Marangoz, C., Genç, H. 1990. Tavşanda intrakortikal çinko sülfattan uygulamasından sonra purkinje hücreleri sayısında azalma. *T.K.L. Tıp Bil. Araş. Dergisi*. 8, 67-74.
- Marangoz, C., Ayyıldız, M., Açar, E. 1994. Evidence that sodium nitroprusside possesses anticonvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuro.Report*. 5, 2454-2456.
- Marangoz, C. 1996. Nitrik Oksit ve Epilepsi. *O.M.Ü. Tıp Dergisi*. 133, 165-183.
- Me'ndez-Armenta, M., Villeda-Herna'ndez, J., Barroso-Moguel, R., Nava-Ru'z, C., Jime'nez-Capdeville, M.E., Ri'os, C. 2003. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicology Letters*. 144, 151-157.
- Olson, D.M., Fadamiro, H., Lundgren, J.G., and Heimpel, G.E. 2000. Effects of Sugar Feding on Carbonhydrate and Lipid Metabolism in a Parasitoid Wasp. *Physiol. Entomol.* 25, 17-26.
- Patrick, L. 2003. Toxic metals and antioxidants. Part II. The rol of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Altern. Med. Rew.* 8, 106-128.
- Poliandri, A.H.B., Velardez, M.O., Cabilla, J.P., Bodo, C.C.A., Machiavelli, L.I., Quinteros, A.F., Duvilanski, B.H. 2004. Nitric Oxide Protects Anterior Pituitary Cells From Cadmium-Induced Apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 379, 1463-1471.
- Robb, S.J., Robb-Gaspers, L.D., Scaduto, R.C., Thomas, Jr. A.p., Connor, J.R. 1999. Influence of calcium and iron on cell death and mitochondrial function in oxidatively stressed astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 556, 674-686.
- Sarkar, S., Yadav, P., Bhatnagar, D. 1997. Cadmium-induced lipid peroxidation and the antioxidant system in rat erythrocytes: the role of antioxidants. *Journal of Trace Elements in Medicine and Bio.* 11, 8-13.
- Satarug, S., Baker, J.R., Reilly, P.E.B., Esumi, H., Moore, M.R. 2000. Evidence for a Synergistic Interaction between Cadmium and Endotoxin Toxicity and for Nitric Oxide and Cadmium Displacement of Metals in the Kidney. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*. 44, 431-440.
- Swarup, D., Naresh, R., Varshney, V.P., Balagangatharathilagar, M., Kumar, P., Nandi, D., Patra, R.C. 2007. Changes in plasma hormones profile and liver function in cows naturally exposed to lead and cadmium around different industrial areas. *Research in Veterinary Science*. 82, 16-21.
- Tan, F., Bağırıcı, F., Demir, Ş., Gökçe, F., Genç, H., Marangoz, C. 1999. Kadmiyumun Sıçan Serebellumu Purkinje Hücre Yoğunluğuna Etkisi. *O.M.Ü. Tıp Dergisi*. 162, 128-132.
- Tan, F. 2003. Sıçan Wistar albino serebellumunda kadmiyumun neden olduğu hücre ölümüne nitrik oksit sentaz NOS inhibitörlerinin etkisi. *Doktora Tezi*.
- Van Handel, E. 1985. Rapid determination of Total Lipids in Mosquitoes. *J. Amer. Mosq. Cont. Assoc.* 1, 302-304.
- Van Handel, E. And Day, J.F. 1988. Assay of Lipids, Glycogen and Sugars in Individual Mosquitoes: Correlations with Wing Length in Field-collected Aedes vexans. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 4, 549-550.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 192, 95-117.
- Wu, W., Li, L. 1993. Inhibition of nitric oxide synhase reduces motoneuron death due to spinal root avulsion. *Neurscience Letters* 153, 121-124.
- Zhang, Y. M., Liu, X. Z., Lu, H., Mei, L., Liu, Z. P. 2009. Lipit Peroxidation and Ultrastructural Modifications in Brain after Perinatal Exposure to Lead and/or Cadmium in Rat Pups *Original Research Article Biomedical and Environmental Sciences*. 22, 423-429.