

Kadmiyuma bağlı karaciğer hasarında taurin, melatonin ve asetilsisteinin nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidanlar üzerindeki etkileri

The effects of taurine, melatonin and acetylcysteine on nitric oxide, lipid peroxidation and some antioxidants in cadmium induced liver injury

Nurettin Aydoğdu,

Assist. Prof. Dr., PhD.
Department of Physiology,
Trakya University Medical Faculty,
naydogdu@hotmail.com

Mehmet Kanter,

Prof. Dr., PhD.
Department of Histology and Embryology,
Trakya University Medical Faculty,
mkanter65@yahoo.com

Hakan Erbaş,

Assist. Prof. Dr., PhD.
Department of Biochemistry,
Trakya University Medical Faculty,
herbas@trakya.edu.tr

Kadir Kaymak,

Prof. Dr., PhD.
Department of Physiology,
Trakya University Medical Faculty,
kaymakadir@hotmail.com

This study was presented in the XXXI. National Physiology Congress, September, 2005, Gaziantep, Turkey.

This manuscript can be downloaded from the webpage:
[http://tipdergisi.erciyes.edu.tr/download/2007;29\(2\)089-096.pdf](http://tipdergisi.erciyes.edu.tr/download/2007;29(2)089-096.pdf)

Submitted : July 11, 2006
Revised : September 26, 2006
Accepted : February 15, 2007

Corresponding Author:

Nurettin Aydoğdu
Department of Physiology,
Trakya University Medical Faculty,
Edirne, Turkey

Telephone : +90 284 2357641
E-mail : naydogdu@hotmail.com

Özet

Amaç: Kadmiyumun oluşturduğu karaciğer hasarını karşı taurin, melatonin ve asetilsisteinin hem koruyucu hem de tedavi etkilerini karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 90 adet erkek Sprague Dawley sıçan 9 gruba ayrıldı. 3 ay süreyle grup 1'e içme suyu, grup 2'ye 200 ppm CdCl₂, grup 3'e 200 ppm CdCl₂ ve % 1 taurin, grup 4'e 200 ppm CdCl₂ ve % 0,02 melatonin, grup 5'e 200 ppm CdCl₂ ve % 0,5 asetilsistein içme sularına katıldı. Grup 6, 7, 8 ve 9'un içme sularına 3 ay süreyle 200 ppm CdCl₂ katıldıktan sonra 7 gün, 7. gruba % 4 taurin, 8. gruba % 0,08 melatonin ve 9. gruba % 2 asetilsistein içme sularına katıldı.

Bulgular: Sadece kadmiyum verilen grupların karaciğer dokusunda glutatyon (GSH) düzeyinin, süperoksit dismutaz (SOD), ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitelerinin azaldığı; Tiyoarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS), nitrik oksit (NO), immünohistokimyasal olarak indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) pozitif hücrelerin arttığı görüldü. Taurin, melatonin ve asetilsistein verilen gruplarda GSH düzeyinin, SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı; TBARS, NO düzeylerinin ve iNOS aktivitelerinin azaldığı saptandı.

Sonuç: Taurin, melatonin ve asetilsisteinin kadmiyuma bağlı olarak gelişen karaciğer hasarına karşı hem koruyucu hem de tedavi edici rol oynadığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: **Antioksidan; Asetilsistein; Kadmiyum; Melatonin; Taurin.**

Abstract

Purpose: Our aim was to investigate both the potential protective and therapeutic effects of taurine, melatonin and acetylcysteine in cadmium induced liver injury.

Material and Methods: Ninety male Sprague Dawley rats were divided into nine groups. For the three months treatment period, drinking water was administered to Group 1 whereas 200 ppm CdCl₂ to Group 2, 200 ppm CdCl₂ and 1% taurine to Group 3, 200 ppm CdCl₂ and 0.02% melatonin to Group 4 and 200 ppm CdCl₂ and 0.5% acetylcysteine to Group 5. Groups 6, 7, 8 and 9 received 200 ppm CdCl₂ in their drinking water for 3 months. After this period, for 7 days, 4% taurine to group 7, 0.08% melatonin to Group 8 and 2% acetylcysteine to group 9 were applied.

Results: In liver tissues of cadmium received rats, the levels of glutathione (GSH) and the enzyme activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) were decreased. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activities were increased. While, taurine, melatonin and acetylcysteine increased GSH levels, SOD and GPx activities, it decreased TBARS, NO and iNOS activities.

Conclusion: Taurine, melatonin and acetylcysteine may have both protective and therapeutic effects in cadmium induced liver injuries.

Key Words: **Acetylcysteine; Antioxidants; Cadmium; Melatonin; Taurine.**

Giriş

En önemli endüstriyel ve çevresel kirlenmelerden biri olan ve canlılar üzerindeki çeşitli toksik etkileri bilinen kadmiyum esansiyel olmayan, ağır metallerden biridir (1). Kadmiyum endüstriyel olarak nikel/kadmiyum pillerde, korozyona karşı özellikle deniz koşullarına dayanımı nedeniyle gemi sanayinde çeliklerin kaplanması, boya sanayinde, polivinyl chloride (PVC) stabilizatörü olarak, alaşımlarda ve elektronik sanayinde kullanılır (2). Yine kadmiyum fosfatlı gübrelerde, deterjanlarda ve rafine petrol türevlerinde bulunur ve bunların çok yaygın kullanımı sonucunda da önemli miktarda kadmiyum kirliliği ortaya çıkar. Ayrıca kadmiyum diyet ve sigaradaki majör bileşiklerden de biridir (2).

Kadmiyumun oluşturduğu hücrel toksisitenin oksidatif stres ile ilişkili olduğu; başlıca süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve nitrik oksit üretimine yol açtığı ve lipid peroksidasyonunu arttırdığı, antioksidan enzimlere zarar verdiği, tiol proteinlerde değişikliklere sebep olduğu, enerji metabolizmasının inhibisyonu, DNA yapısında ve membran fonksiyonunda değişikliklere sebep olduğu bildirilmiştir (3-7).

Dokularda, oksidatif hasara karşı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan mekanizmalar vardır. Antioksidan enzim sistemleri; iki süperoksit dismutaz (CuZnSOD ve MnSOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir (8). Non-enzimatik endojen antioksidanların en önemlilerinden biri glutatyon (GSH)'dur. GSH, hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil (·OH), süperoksit (O₂⁻) ve alkoksil (RO·) radikalleri ile direkt olarak etkileşime girer ve hücreyi radikallere karşı korur (9).

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-argininden sentez edilir. Nitrik oksit sentaz enzimleri, endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Normal fizyolojik süreçler için eNOS ve nNOS ile üretilen NO miktarlarına gereksinim vardır. Doku hasarı ve zedelenmesi gibi durumlarda ise iNOS ile aşırı miktarlarda NO üretilir. iNOS ile üretilen miktarlar zarar verici olabilir (10,11). Bazı oksidatif stres ürünlerinin iNOS immunoreaktivitesini artırarak fazla miktarda NO oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir (12). iNOS immunoreaktivitesinin artışına bağlı olarak oluşan NO'nun süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek peroksinitrit anyonlarını (OONO⁻) oluşturduğu ve lipid peroksidasyon oluşumunu arttırdığı rapor edilmiştir (10-13). Kadmiyumun eNOS aktivitesini azalttığı ve buna bağlı olarak endotelial kaynaklı NO üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (13).

Pineal bezden salınan başlıca madde olan melatoninin farklı organ ve dokularda direkt serbest radikal yakalayıcı, indirek antioksidan etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (14-16). Melatonin doğrudan radikal yakalayıcı etkisini, en çok yüksek toksik etkili hidroksil radikali üzerinde gösterir. Ayrıca hidrojen peroksit, singlet oksijen, peroksinitrit anyon, nitrik oksit, peroksil radikali ve hipoklorik asidi de nötralize eder. Melatonin SOD, GPx, glutatyon reduktaz ve glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimlerini uyararak antioksidan etki gösterir. Ayrıca melatoninin iNOS salınımını inhibe ettiği rapor edilmiştir (14-16). Araştırmalarda antioksidan özelliği vurgulanan ve tüm memeli dokularında serbest olarak bulunan taurin, organizmada sisteinden sentez edilen, protein yapısına katılmayan bir amino asittir (5, 17, 18). Biyolojik sistemlerde gösterdiği antioksidan etkinin, biyomembranların stabilizasyonunda görev alması gibi özelliklerine bağlı olduğu ileri sürülmektedir (5, 17, 18). Asetilsistein (NAC) serbest radikaller tarafından oluşturulan doku hasarına karşı koruyucu etkiye sahiptir (19, 20). Bu koruyucu etkinin NAC ile GSH düzeyinin artması, direkt süpürücü etkinin veya stabil nitrozotil türevlerinin oluşması sonucu gerçekleştirdiği bildirilmektedir (19, 20). Taurin, Melatonin ve NAC'ın kadmiyumun oluşturduğu hasarın da içinde olduğu birçok deneysel çalışmada koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir (5, 14-22).

Çalışmamızda bazı antioksidanların (taurin, melatonin ve asetilsistein) kadmiyum ile oluşturulan karaciğer doku hasarını önleme ve bu hasarı tedavi etmedeki etkinliğini karşılaştırdık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra 340-370 g ağırlığında 90 adet erkek Sprague-Dawley sıçan eşit sayıda 9 gruba ayrıldı. 3 ay süreyle 1. gruba içme suyu, 2. grubun içme suyuna 200 ppm CdCl₂ (Fluka, USA), 3. grubun içme suyuna 200 ppm CdCl₂ ve % 1 oranında taurin (Sigma, USA), 4. grubun içme suyuna 200 ppm CdCl₂ ve % 0,02 oranında melatonin (Sigma, USA), 5. grubun içme suyuna 200 ppm CdCl₂ ve % 0,5 oranında NAC (Sigma, USA) katıldı. Tedavi amacıyla 6., 7., 8. ve 9. grupların içme suyuna 3 ay süreyle 200 ppm CdCl₂ katıldı ve bu sürenin sonunda 7 gün boyunca 6. gruba içme suyu, 7. grubun içme suyuna % 4 oranında taurin, 8. grubun içme suyuna % 0,08 oranında melatonin ve 9. grubun içme suyuna % 2 oranında NAC katıldı. Tedavi sürelerinin sonunda intramüsküler (im) 10 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 50 mg/kg ketamin

(Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) anestezi altında deneklerin karaciğer dokusu alındı. Karaciđerin bir parçası histopatolojik inceleme için % 10'luk formalin solüsyonuna konuldu ve diğer parçalar biyokimyasal analizler yapılmaya kadar -80 °C'de saklandı.

Karaciğer dokusu TBARS ve GSH için 0,15 M KCl solüsyonu; SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri için 50 mM fosfat tamponu (pH 7,4) ile % 10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlandı. Karaciğer dokusunda SOD (23), CAT (24), GPx (25) enzim aktiviteleri ve protein miktarı belirtimi Lowry (26) metoduna göre yapıldı. Karaciğer homojenatlarında lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) düzeyi Ohkawa ve ark. (27) tarif ettiği yöntemle ve glutatyon (28) düzeyleri Ellman ayırıcı [5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoik acid)] kullanılarak ölçüldü. Nitrik oksit düzeyi (total nitrit) Griess metodu ile spektrofotometrik olarak Cortas ve Wakid'in (29) tarif ettiği yöntemle ölçüldü.

Histopatolojik incelemeler için doku örnekleri % 10'luk formalin ile tespit edilerek parafine gömüldü ve hazırlanan kesitler, Hematoksilin-Eozin (HE) boyası ile boyandı. İmmünohistokimyasal boyama için kesitler rutin deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerine tabi tutuldular. Rehidratasyon aşamasından sonra kesitler antijenik maskelenmenin giderilmesi için 200 ml sitrat tamponu (pH:6, 1 lt distile suda 2,1 gr sitrik asit ve 15 ml NaOH) içinde mikrodalga fırınına verildi. Fırın dışına alınan kesitler distile su ve PBS'den geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin inhibe edilmesi için kesitlere, PBS içerisinde hazırlanan %3'lük H₂O₂ solüsyonu 10 dakika uygulandı. Distile su ve fosfat tamponu (PBS)'nda yıkanan kesitler, 1/100 dilüsyonda hazırlanmış iNOS primer antikolarıyla 60 dakika inkübe edildi (Cat. # RB-1605-P, Neomarkers, USA). Distile su ve PBS'den geçirilen kesitlere sıra ile 30'ar dakika biyotinli sekonder antikor (Super sensitive detection kit for rat; anti-rabbit Ig; Biogenex GP 900-9R, kullanıma hazır) ve streptavidin-peroksidaz kompleksi (Super sensitive label for animal detection; Biogenex GP 900-9R) uygulandı. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitler, aminoetilkarbizol (AEC; Biogenex HK 129-5K) ile boyandı ve akar musluk suyunda yıkandı. Daha sonra zıt boyama için Mayer'in hematoksileninde 30 saniye bırakıldı, suda yıkandı ve kapatma solüsyonu ile kapatıldı. İmmünohistokimya uygulanan doku kesitleri, ışık mikroskopunda oryantasyon amaçlı kesitlerle karşılaştırmalı olarak ve iNOS pozitif hücreler semikantitatif olarak; ±: çok az, +: az, ++: orta, +++: fazla, ++++: çok fazla şeklinde değerlendirildi.

Verilerin istatistiksel analizleri, gruplar arası fark olup olmadığı Kruskal-Wallis testi; iki grup arasındaki farkın anlamlılık derecesi Mann Whitney U testi ile değerlendirildi; p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar medyan (minumun-maksimum) olarak verildi.

Bulgular

Çalışmamız süresince 7. grupta 1, 8. grupta 2 adet sıçan öldü. Çalışma gruplarına ait karaciğer dokusunda saptanan parametreler Tablo I'de gösterildi. Çalışmamızda kontrol (1. grup) grubuna göre; 2. grupta TBARS ve NO düzeyinin arttığı (her ikisinde: p<0,001), GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin azaldığı (üçünde de: p<0,001), CAT aktivitesinde ise anlamlı farklılık olmadığı görüldü. Kadmiyum ile birlikte taurin verilen grupta (3. grup) sadece kadmiyum verilen 2. gruba göre; TBARS ve NO düzeyinin azaldığı (sırasıyla; p<0,01; p<0,05), GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı (sırasıyla; p<0,05; p<0,001; p<0,05) görüldü. CAT enzim aktivitesinde ise p<0,05 düzeyinde azalma görüldü. Kadmiyum ile birlikte Melatonin verilen grupta (4. grup) sadece kadmiyum verilen 2. gruba göre; TBARS ve NO düzeyinin azaldığı (sırasıyla; p<0,01; p<0,001), GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı (sırasıyla; p<0,05; p<0,001) görüldü. CAT enzim aktivitesinde ise anlamlı farklılık görülmedi. Kadmiyum ile birlikte NAC verilen grupta (5. grup) sadece kadmiyum verilen 2. gruba göre; TBARS ve NO düzeyinin azaldığı (her ikisinde; p<0,001), GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı (üçünde de; p<0,001) görüldü. CAT enzim aktivitesinde ise anlamlı farklılık görülmedi.

3 ay boyunca Cd verilen ve 7 gün sadece su verilen 6. grup ile 1. grup parametrelerine göre; TBARS ve NO düzeyinin arttığı (her ikisinde; p<0,001), GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin azaldığı (sırasıyla; p<0,001; p<0,01; p<0,05) görüldü. CAT enzim aktivitesinde ise anlamlı farklılık görülmedi. 6. grup ile 3 Ay boyunca Cd verildikten sonra ve 7 gün içme sularına % 4 oranında taurin verilen 7. grup arasında; TBARS düzeyinin azaldığı (p<0,001), GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı (sırasıyla; p<0,001; p<0,01; p<0,05) görüldü. Ayrıca CAT enzim aktivitesinde azalma (p<0,05) ve NO düzeyinde ise anlamlı farklılık olmadığı görüldü. 6. grup ile 3 ay boyunca Cd verildikten sonra ve 7 gün içme sularına % 0,08 oranında melatonin verilen 8. grup arasında; TBARS ve NO düzeylerinin azaldığı (her ikisinde; p<0,01), GSH düzeyi ile SOD aktivitesinin arttığı (sırasıyla; p<0,001; p<0,01) görüldü. Ayrıca CAT enzim aktivitesinde azalma (p<0,05) ve GPx aktivitesinde ise

anlamli farklılık olmadığı görüldü. 6. grup ile 3 ay boyunca Cd verildikten sonra ve 7 gün içme sularına % 2 oranında NAC verilen 9. grup arasında; TBARS ve NO düzeyinin azaldığı (her ikisinde: $p<0,001$), GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı (sırasıyla; $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,05$) görüldü. CAT enzim aktivitesinde ise anlamlı farklılık olmadığı görüldü.

Çalışmamızda sadece içme sularında kadmiyum verilen 2. gruba göre 6. grupta GSH düzeyi ile SOD aktivitesinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu (sırasıyla; $p<0,01$; $p<0,05$) NO düzeyinin ise anlamlı düzeyde azaldığı görüldü ($p<0,01$).

Kadmiyum ile taurin, melatonin ve NAC verilen 3., 4. ve 5. gruplar arasında; 3. gruba göre 4. grupta GSH düzeyi ile GPx aktivitesinin anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görüldü (sırasıyla; $p<0,01$; $p<0,05$). Diğer parametreler arasında anlamlı farklılık görülmedi. Üçüncü gruba göre 5. grupta; TBARS düzeyinin daha da azaldığı ($p<0,05$), GSH düzeyi ile SOD aktivitesinin anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görüldü (sırasıyla; $p<0,001$; $p<0,01$). 4. gruba göre 5. grupta GSH düzeyinin daha yüksek olduğu ($p<0,01$), TBARS düzeyinin daha da azaldığı ($p<0,05$). GPx enzim aktivitesinin 4. grupta, 5. gruba göre daha yüksek olduğu saptandı.

Üç ay boyunca Cd verildikten sonra 7 gün sadece su verilen 6. grup ile yüksek dozda taurin, melatonin, NAC verilen 7., 8. ve 9. gruplardaki parametreler arasında; 7. gruba göre 8. grupta; NO düzeyinin $p<0,001$ düzeyinde azaldığı görüldü. Yedinci gruba göre 9. grupta; GSH düzeyinin $p<0,001$ düzeyinde arttığı, NO düzeyinin ise $p<0,001$ düzeyinde azaldığı görüldü. 8. ve 9. grupların parametreleri arasında ise anlamlı farklılık görülmedi.

Çalışmamızda kontrol grubu, sadece kadmiyum verilen ve kadmiyum ile hem koruyucu hem de tedavi amaçlı taurin, melatonin ve NAC verilen gruplar arasında histopatolojik olarak herhangi bir farklılık görülmedi. Ancak Şekil 1'de görüldüğü gibi yapılan immünohistokimyasal boyamada; kontrol grubunda iNOS pozitif reaksiyon veren hücreler çok az görülürken, 3 ay kadmiyum verilen 2. grupta oldukça fazla miktarda görüldü. Kadmiyum ile taurin, melatonin ve NAC verilen gruplarda iNOS pozitif reaksiyon veren hücrelerin azaldığı görüldü. 3 ay kadmiyum verildikten sonra 7 gün içme suyu verilen 6. grupta iNOS pozitif hücrelerin 2. gruba göre azalma olduğu görüldü. 3 ay kadmiyum verildikten sonra 7 gün süresince yüksek dozda taurin, melatonin ve

NAC verilen gruplarda iNOS immunoreaktivitelerinde azalma olduğu görüldü. iNOS pozitif hücrelerde melatonin ve NAC gruplarında taurin verilen gruplara göre belirgin azalma saptandı. iNOS pozitif hücrelerin değerlendirilmesi Resim 1'de gösterilmiştir.

Tartışma

Endüstride yaygın olarak kullanılan kadmiyum bileşiklerinin insan ve hayvanlarda değişik toksik etkilere neden olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (2, 7, 12, 30). Daha önce kadmiyum verilerek oluşturulan hasara karşı koruyucu amaçla taurin, melatonin ve NAC'ın etkileri gösterilmiştir (5, 16, 21, 22, 31, 32). Ancak çalışmamızda kadmiyum ve antioksidanların verilme süreleri, dozları, uygulama yolu önceki çalışmalardan farklılık göstermektedir. Ayrıca yapılan literatür araştırmalarımıza göre kadmiyum toksisitesine karşı taurin, melatonin ve NAC verilen çalışmalarda hem NO düzeyi hem de iNOS immunoreaktivitesi üzerindeki etkileriyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadı.

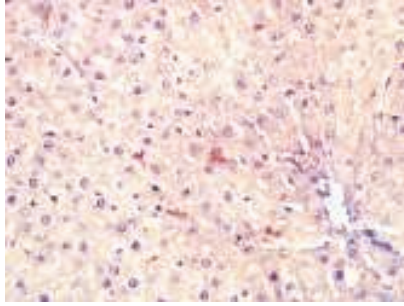
Çalışmamızda sadece kadmiyuma maruz bırakılan gruplarda GSH düzeyinin, SOD ve GPx aktivitelerinin azaldığı; TBARS, NO düzeylerinin ve iNOS immunoreaktivitesinin arttığı; CAT aktivitesi ve histopatolojik değişikliklerin ise anlamlı olmadığı görüldü. Çalışmamızda 3 ay boyunca kadmiyum verilen 2. grup ile 3 ay kadmiyum verildikten sonra 7 gün sadece içme suyu verilen 6. grup arasında GSH düzeyi ve SOD aktivitesinde artma, NO düzeyi ile iNOS immunoreaktivitesinde azalma gözlemlendi. Bu bulgularımız, kadmiyum maruziyetinin ortadan kalkması ile antioksidan savunma sisteminde düzelme olduğu, iNOS immunoreaktivitesinde ve buna bağılı olarak NO düzeyindeki artışta ise azalma meydana geldiğini gösterdi. Farklı deney hayvanlarında, farklı dozlarda, farklı sürelerde, farklı yollarla kadmiyum toksisitesine maruz kalmada lipid peroksidasyonun arttığı ve antioksidan savunma sisteminde bozukluğa sebep olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir (3, 5-7, 16, 21, 22). Kadmiyum maruziyetinin CAT aktivitesinde anlamlı farklılık oluşturmadığı, önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (7, 12). Çalışmamızda CAT aktivitesi bulguları bu çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Chwelatiuk ve ark. 50 ppm dozunda kadmiyum verdikleri farelerde; böbreklerde histopatolojik değişiklikler görülmesine rağmen karaciğerde histopatolojik değişiklikler olmadığını bildirmişlerdir (31). Bu bulgular çalışmamızda görülen histopatolojik bulgularla benzerlik göstermektedir.

Tablo I. Çalışma gruplarına kadmiyum, taurin, melatonin ve asetilsistein uygulamasının karaciğer parametrelerine etkileri.

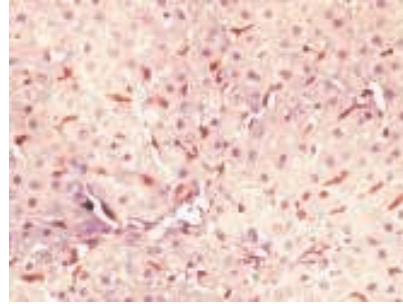
	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Cd	Grup 3 Cd + %1 Taurin	Grup 4 Cd + % 0,02 Mel	Grup 5 Cd + % 0,5 NAC	Grup 6 Cd	Grup 7 Cd + % 4 Taurin	Grup 8 Cd + % 0,08 Mel	Grup 9 Cd + % 2 NAC
GSH (nmol/mg doku)	436,1 (272,2-520,4) a***	121,3 (91,6-179,0) b*	186,1 (115,1-356,5) c*, i**	349,6 (280,3-405,8) d***, k***, l**	427,7 (335,7-527,9) e***, m**	197,1 (123,9-389,6) f***, p***	407,6 (354,7-473,1) g***, r**	435,6 (339,9-653,7) h***, o**	510,6 (381,4-877,9)
TBARS (nmol/mg doku)	53,5 (26,8-74,8)	95,7 (63,8-124,1) a***	66,8 (45,3-92,7) b**	68,8 (29,8-87,9) c**	53,2 (26,3-61,4) d***, k*, l*	94,1 (68,0-160,8) e***	62,0 (38,2-86,9) f**	67,9 (41,4-93,8) g**	52,3 (30,3-116,2) h**
NO (µmol/mg prot)	11,9 (2,8-18,8)	44,9 (19,4-55,3) a***	24,2 (12,4-37,8) b*	15,7 (2,7-38,0) c***	22,6 (5,2-34,4) d***	32,5 (8,9-38,6) e***, m**	31,6 (16,4-40,1)	6,4 (2,6-26,9) g**, n***	11,4 (2,6-29,4) h**, o**
SOD (U/mg prot)	6,3 (5,0-7,0)	4,7 (4,3-5,1) a***	5,8 (5,0-6,5) b***	5,6 (5,1-6,5) c***	5,9 (5,2-6,9) d***, k**	5,2 (4,3-6,8) e*, m*	6,6 (5,5-9,7) f**, p*	6,1 (5,4-7,1) g**, r*	6,8 (5,8-8,6) h***, s*
GPx (U/mg prot)	5,1 (4,3-5,5)	3,8 (3,4-4,8) a***	4,5 (3,1-5,8) b*	5,2 (4,4-6,2) c***, i*	4,5 (3,4-5,7) d***, l*	4,2 (2,9-5,2) e**	5,2 (3,4-8,7) f*	4,7 (3,6-5,3)	4,8 (4,3-7,3) h*
CAT (k/mg prot)	2,1 (1,3-2,8)	2,1 (1,7-2,6)	1,7 (1,5-2,4) b*	2,0 (1,1-2,6)	2,1 (1,8-2,9)	2,4 (1,7-2,9)	1,8 (1,1-2,6) f*	1,9 (1,5-2,4) g*	1,9 (1,7-2,9)
iNOS pozitif hücreler	±	++++	+++	++	+	+++	++	+	+

Sonuçlar medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. 3 ay grup 1'e içme suyu, grup 2'ye CdCl₂, grup 3'e CdCl₂ ve % 1 taurin, grup 4'e CdCl₂ ve % 0.02 melatonin, grup 5'e CdCl₂ ve % 0.5 NAC içme sularına katıldı. Grup 6, 7, 8 ve 9'a 3 ay CdCl₂ verildikten sonra; 7 gün 6. gruba içme suyu, 7. gruba % 4 taurin, 8. gruba % 0.08 melatonin ve 9. gruba % 2 NAC içme sularına katıldı. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

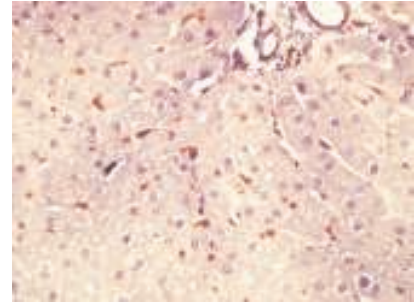
Karşılaştırmalar: a: Grup 1 ile 2, b: Grup 2 ile 3, c: Grup 2 ile 4, d: Grup 2 ile 5, e: Grup 1 ile 6, f: Grup 6 ile 7, g: Grup 6 ile 8, h: Grup 6 ile 9, i: Grup 3 ile 4, k: Grup 3 ile 5, l: Grup 2 ile 6, m: Grup 2 ile 6, n: Grup 7 ile 8, o: Grup 7 ile 9, p: Grup 3 ile 7, r: Grup 4 ile 8, s: Grup 5 ile 9. iNOS pozitif hücreler; ±: çok az, +: az, ++: orta, +++: fazla, ++++: çok fazla



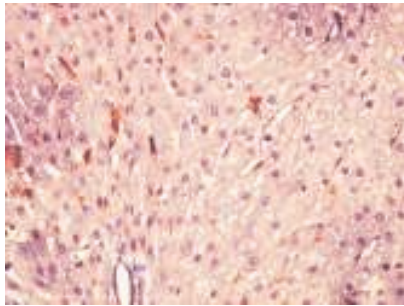
Grup 1



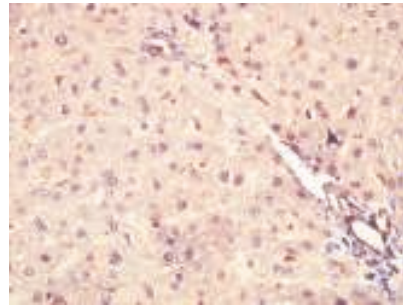
Grup 2



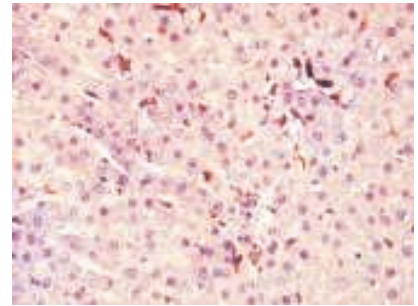
Grup 3



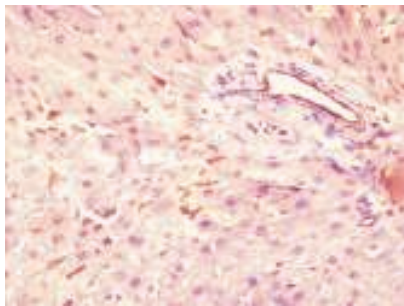
Grup 4



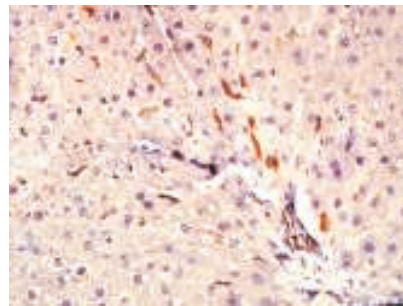
Grup 5



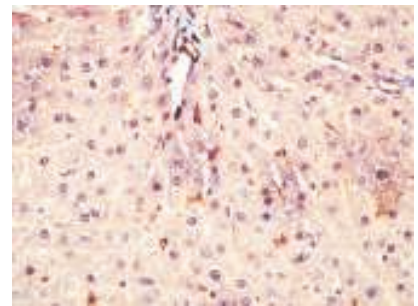
Grup 6



Grup 7



Grup 8



Grup 9

Resim 1. Deney gruplarında iNOS pozitif reaksiyon veren hücrelerin (kahverengi) gruplara göre dağılımı (immunperoksidaz, x200).

Bazı oksidatif stres ürünlerinin iNOS immunoreaktivitesini arttırarak fazla miktarda NO oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir. iNOS immunoreaktivitesinin artışına bağlı olarak oluşan NO'nun peroksinitrit anyonuna dönüşerek serbest radikal aracılı hasarı arttırdığı rapor edilmektedir. Kadmiyum toksisitesine maruz bırakılan farklı deney hayvanlarında iNOS immunoreaktivitesinin arttığı bildirilmiştir (12, 13, 30-32). Bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen bulgular ile uyumludur.

Kadmiyumun oluşturduğu toksik etkinin de içinde olduğu bir çok çalışmada taurinin antioksidan etkisi gösterilmiştir (5, 17, 18). Çalışmamızda kadmiyum ile birlikte koruyucu amaçla taurin verilen 3. grupta GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitesinin arttığı, TBARS ve NO düzeyinin anlamlı, iNOS immunoreaktivitesinin ise hafif düzeyde azaldığı saptandı. Kadmiyum 3 ay verildikten sonra yüksek dozda tedavi amacıyla 7 gün taurin verilen 7.grupta GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitesinin arttığı, TBARS düzeyinin azaldığı görüldü. NO düzeyinde ise anlamlı farklılık saptanmadı. CAT aktivitesinin ise hem koruyucu hem de tedavi amaçlı taurin verilen gruplarda azaldığı saptandı. Hwang ve Wang sıçanlara diyetle kadmiyum verilmesinin karaciğerde GSH düzeylerinde azalma, hem karaciğerde hem de plazmada TBARS düzeyinde artma; taurin uygulaması ile GSH düzeyinde artma, plazma ve karaciğerde TBARS düzeyinde azalma bildirmişlerdir. Taurinin farklı deneysel modellerde de lipit peroksidasyonunu azaltarak ve antioksidan savunma sistemi üzerinde koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir (5, 17, 18). Bu çalışma sonuçları da çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Melatoninin güçlü bir antioksidan olduğu ve dokularda lipit peroksidasyon sonucu oluşan oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir (14-16). Çalışmamızda koruyucu amaçla melatonin verilen 4. grupta GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı TBARS ve NO düzeyi ile iNOS immunoreaktivitesinin ise azaldığı görüldü. CAT enzim aktivitesinde ise farklılık görülmedi. Tedavi amacıyla yüksek dozda melatonin verilen 8. grupta ise GSH düzeyi ile SOD aktivitesinin arttığı TBARS ve NO düzeyi ile iNOS immunoreaktivitesinde azalma meydana geldiği, GPx aktivitesinde anlamlı farklılık olmadığı saptandı. CAT aktivitesinde ise azalma olduğu görüldü. Kadmiyum toksisitesine karşı farklı deney hayvanı türlerinde, farklı dozlarda, farklı yollarla melatonin verilmesinin farklı organlarda koruyucu rol oynadığı rapor edilmiştir (16, 31, 32). Melatonin uygulaması ile elde ettiğimiz

bulgularımız, bu çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Asetilsistein etkin bir antioksidan ve glutatyonun öncü maddesi olarak rol oynamaktadır (19-22). Kadmiyum ile birlikte koruyucu amaçla NAC verilen 5. grupta TBARS ve NO düzeyinin azaldığı, GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı görüldü. CAT enzim aktivitesinde ise anlamlı farklılık görülmedi. 3 ay boyunca Cd verildikten sonra 7 gün içme sularına % 2 oranında tedavi amacıyla NAC verilen 9. grupta TBARS ve NO düzeyinin azaldığı GSH düzeyi ile SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı görüldü. CAT enzim aktivitesinde ise anlamlı farklılık olmadığı görüldü. Hem koruyucu hem de tedavi amacıyla NAC verilen gruplarda iNOS immunoreaktivitesinin anlamlı olarak düştüğu saptandı. Shaikh ve ark. haftada 5 kez 22 hafta derialtı kadmiyum enjeksiyonunun sıçanlarda karaciğer GSH ve TBARS düzeyini arttırdığı, 9.haftadan sonra NAC verilmesinin GSH düzeyinde değişikliğe sebep olmadığı, TBARS düzeyini 2,3 kat daha azalttığı rapor edilmiştir. NAC'ın daha önce yapılan çalışmalarda iNOS immunoreaktivitesini inhibe ettiği ve buna bağlı olarak NO düzeyinde azalma olduğu bildirilmiştir (20). Çalışmamızda NAC uygulanan gruplarda elde ettiğimiz bulgular bu çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular göz önüne alındığında NAC uygulamasının hem koruyucu hem de tedavi edici olarak bazı antioksidanlar üzerinde olumlu etkilerinin diğerlerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak kadmiyum klorür uygulanmasının sıçan karaciğer dokusunda lipit peroksidasyonunu arttırdığı, bazı antioksidanların düzeylerini azalttığı, iNOS immunoreaktivitesinde ve buna bağlı olarak oluşan NO düzeyinde artışa neden olduğu saptandı. Kadmiyum klorür uygulanmasının kesilmesi, bazı antioksidanların artışına neden oldu. Sıçanlarda hem koruyucu amaçla kadmiyum klorür ile birlikte hem de tedavi amacıyla kadmiyum klorür uygulanmasından sonra, taurin, melatonin ve NAC uygulamasının bazı antioksidan parametreleri arttırdığı ve lipit peroksidasyonunu azalttığı tespit edildi. Taurin, melatonin ve NAC'ın kadmiyuma bağlı olarak gelişen karaciğer hasarına karşı hem koruyucu hem de tedavi edici amaçla uygulamasının bazı antioksidanları güçlendirmeye yönelik, olumlu etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Karabulut Bulan Ö, Koyutürk M, Bolkent Ş, Yanardağ R, Tabakoğlu Oğuz A. Sıçan Tiroid Bezinde Kadmium Hasarına Karşı C Vitamini, E Vitamini Ve Selenyumun Kombine Kullanımının Etkileri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004;35:174-180.
2. Public Health Statement for Cadmium (July, 1999) <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs5.html>.
3. Jurczuk M, Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Galazyn-Sidorczuk M, Kulikowska-Karpinska E. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem Toxicol* 2004;42:429-438.
4. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004; 15:91-96.
5. Hwang DF, Wang LC. Effect of taurine on toxicity of cadmium in rats. *Toxicology* 2001; 167:173-180.
6. Casalino E, Calzaretto G, Sblano C, Landriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 2002; 179: 37-50.
7. Lopez E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Canadas S, Gonzalez MP. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med* 2006; 40:940-951.
8. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem* 2000; 205: 1-11.
9. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-760.
10. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995; 82:1598-1610.
11. Kuyumcu A, Duzgun AP, Ozmen MM, Besler HT. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Ulusal Travma Dergisi* 2004;10:149-159.
12. Ramirez DC, Gimenez MS. Induction of redox changes, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages. *Toxicol Lett* 2003;145:121-132.
13. Martynowicz H, Skoczynska A, Wojakowska A, Turczyn B. Serum vasoactive agents in rats poisoned with cadmium. *Int J Occup Med Environ Health*. 2004;17:479-485.
14. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Euro J Pharm* 2001; 426:1-10.
15. Forsling ML. Melatonin. *Current Opinion in Endocrinology&Diabetes* 2001; 8:147-153.
16. Karbownik M, Gitto E, Lewinski A, Reiter RJ. Induction of lipid peroxidation in hamster organs by the carcinogen cadmium: melioration by melatonin. *Cell Biol Toxicol* 2001; 17:33-40.
17. Nakamura T, Ogasawara M, Koyama I, Nemoto M, Yoshida T. The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by oxygen radicals. *Biol Pharm Bull*, 1993;16:970-972.
18. Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, et al. Immunonutrition: The role of taurine. *Nutrition* 1998; 14:599-604.
19. Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoglu-Dulger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol* 2003;16:75-80.
20. Abbasoğlu SD, Balkan J, Kanbağlı Ö, Çevikbaş U, Tokar GA, Uysal M. Aminoguanidin ve asetilsisteinin endotoksemik sirozlu sıçanlarda karaciğer hasarı, oksidatif ve nitrozatif stres üzerine etkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004;5:27-32.
21. Tandon SK, Singh S, Prasad S, et al. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol Lett* 2003;145:211-217.
22. Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 154:256-263.
23. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
24. Aebi H. Catalase in vitro assay methods. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-126.
25. Lawrance RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Com* 1976; 71:952-958.
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
27. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-358.
28. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82:70-77.
29. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36:1440-1443.
30. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interact* 2005;151:159-165.
31. Effect of melatonin on cadmium-induced hepatotoxicity in male Sprague-Dawley rats. *Tohoku J Exp Med* 1998;186:205-213.
32. The effect of orally administered melatonin on tissue accumulation and toxicity of cadmium in mice. *J Trace Elem Med Biol* 2006;19:259-265.
33. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 210:128-135.
34. iNOS-null mice are not resistant to cadmium chloride-induced hepatotoxicity. *Toxicology* 2002; 175:83-90.