

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KADMİYUMA MARUZ KALAN SIÇANLARDA DAVRANIŞSAL,
BİYOKİMYASAL ve METABOLOMİK PARAMETRELERDE
GÖZLENEN DEĞİŞİKLİKLERE KARVAKROLÜN ETKİSİ**

Nigar ABBAK

**Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2024**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KADMİYUMA MARUZ KALAN SIÇANLARDA DAVRANIŞSAL,
BİYOKİMYASAL ve METABOLOMİK PARAMETRELERDE
GÖZLENEN DEĞİŞİKLİKLERE KARVAKROLÜN ETKİSİ**

NİGAR ABBAK

Fizyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Okan ARIHAN

ANKARA

2024

KADMİYUMA MARUZ KALAN SIÇANLARDA DAVRANIŞSAL, BİYOKİMYASAL ve
METABOLOMİK PARAMETRELERDE GÖZLENEN DEĞİŞİKLİKLERE KARVAKROLÜN
ETKİSİ

Nigar ABBAK

Danışman: Doç.Dr. Okan ARIHAN

İkinci Danışman: Unvanı, Adı ve Soyadı

Bu tez çalışması 13.05.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Fizyoloji – Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Aysen ERDEM*
(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD)
- Üye:** *Prof. Dr. Gonca AKBULUT*
(Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi/Fizyoloji)
- Üye:** *Dr. Öğr. Üye. Gülbahar BÖYÜK ÖZCAN*
(Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi/Fizyoloji ABD)
- Üye:** *Doç.Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU*
(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD)
- Üye:** *Prof.Dr. Emirhan NEMUTLU*
(Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/ Analitik Kimya ABD)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

22 Mayıs 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tekyetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezimaşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü/Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... yıl ertelenmiştir.⁽¹⁾
- Enstitü/Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir.⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.⁽³⁾

22/05/2024

Nigar ABBAK

“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesidurumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6.2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7.1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb.konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum vekuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilentezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemineyüklenir.

* *Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Okan ARIHAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Nigar ABBAK

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim kısıtlı bir zamanında kendisinin öğrencisi olduğum halde bana tüm doktora eğitimim boyunca edinebileceğim deneyim, bilgi ve birikimi kazanmamı sağlayan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Okan ARIHAN'a, her araştırmamızda şevkle çalıştığı ve her konuda desteğini esirgemediği için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Fizyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve doktora eğitimim boyunca bana ve tüm öğrencilerine kendi evladıymış gibi davranan bilgi ve deneyimlerini bizden esirgemeyen başta bölüm başkanımız Sayın Aysen Erdem'e ve Öğr. Gör. Dr. Aslı Şan Dağlı Gül'e ve bölümümdeki değerli tüm öğretim üyelerine,

Doktora çalışmam süresince desteğini ve yardımını esirgemeyen titiz ve etik çalışma şeklini örnek aldığım Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya ve Öğr. Üyesi Dr. Tuba REÇBER'e,

Tüm öğrenim sürem ve tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen her zaman destek veren tüm değerli akademik ve idari personele,

Tez çalışmam süresince yolumun iyi ki kesiştiği dediğim sevgisini, arkadaşlığını uzakta da olsa hissettiren sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Hamiyet ECİROĞLU'na,

Tüm yaşamları boyunca birçok mücadele ve zorluklara rağmen ben ve diğer kardeşlerimi büyük bir emek ve özveriyle yetiştiren bizlere karşı daima destekleyici, ilgili ve sevgi dolu olan annem Safiye TAŞDEMİROĞLU ve babam Muzaffer TAŞDEMİROĞLU'na,

Canım kardeşlerim; her zaman sevgi ve desteklerini içtenlikle gösteren her daim yanlarında olacağım sevgili kardeşlerim Pınar TAŞDEMİROĞLU KILIÇ, Öykü ve Övünç TAŞDEMİROĞLU'na,

Tanıştığım ilk günden beri beni her anlamda destekleyen, cesaretlendiren ve kendimi fark etmemi sağlayan canım eşim, çok sevdiğim Ümit ABBAK'a, bu yoldaki en büyük şansım ve uğurum, canım oğlum Atlas ABBAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Nigar ABBAK, Kadmiyuma Maruz Kalan Sıçanlarda Davranışsal, Biyokimyasal ve Metabolomik Parametrelerde Gözlenen Değişikliklere Karvakrolün Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara 2024.

Kadmiyum (Cd) endüstri ve tarım gibi aktivitelerle çevrede bulunabilen toksik ve kanserojen ağır metallere biridir. Karvakrol (CAR), çeşitli aromatik bitkilerde bulunan bir fenoldür. CAR'ın çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir. Çalışmamızın amacı, Cd'nin sebep olduğu toksik etkilere karşı, CAR'ın koruyuculuğunu, davranış parametreleri, biyokimyasal analiz, histopatoloji ve metabolitlerle değerlendirmektir. Çalışmamızda Wistar-albino erkek sıçanlar kullanıldı. Kontrol, CAR20 mg/kg, CAR40 mg/kg, Cd50 mg/kg, Cd50 mg/kg+CAR 20 mg/kg ve Cd50 mg/kg+CAR 40 mg/kg gruplarına 12 gün oral uygulama yapıldı (her grupta n=8). CAR çözücüsü olarak %0,2'lik Tween 80 kullanıldı. Cd'nin sıçanlar üzerindeki etkilerini gözlemleyebilmek için deney sürecinin sonunda davranış testlerinden açık alan (OFT), yükseltilmiş artı labirent (EPM) ve Barnes Maze (labirenti) testi uygulandı. Lokomotor aktivite Rotarod testi ile değerlendirildi. Alınan böbrek ve karaciğer dokularında histopatolojik çalışmalar yapıldı. Buna ek olarak sıçanlardan alınan plazmada hedeflenmemiş metabolomik analizler GC-MS ve LC-QTOF teknikleri ile çalışıldı. Ayrıca plazmalarda ICP-OES'le arsenik, çinko, demir, kadmiyum ve kalsiyum ölçüldü. Bulgular Cd'nin rotarod testinde kontrole göre yürüme süresini azalttığını, EPM testinde kapalı kolda kalma süresini uzattığını, OFT testinde merkezde geçen süre ve sayısını azalttığını göstermektedir. Cd'nin kilo alımını azalttığı ve kan plazmasında elementlerin miktarlarını değiştirdiği tespit edildi. Metabolomik analiz sonuçlarında Cd'nin lipid, enerji ve amino asit metabolizmasına olumsuz etkide bulunduğu dair belirteçler gözlemlendi. Davranış sonuçları birlikte değerlendirildiğinde Cd'nin anksiyete benzeri davranışları artırdığı, lokomotor aktiviteyi azalttığı ve CAR ile beraber uygulandığında bu parametrelerin daha kötüye gittiği söylenebilir. Cd'nin böbrek ve karaciğerde olumsuz değişimlere neden olduğu biyokimya sonuçlarımızla da desteklenmektedir. Sonuçlarımız Cd'nin incelenen tüm parametrelerde tek veya CAR ile beraber uygulanmasında olumsuz etki gösterdiğini, CAR'ın tek başına uygulandığında olumsuz bir etkiye neden olmadığını ortaya koymaktadır. Çalışmamız Cd ve CAR'ın etkisini davranış, biyokimya, histopatoloji, element analizi ve metabolomiks yönünden ele almaktadır.

Anahtar Kelimeler: Anksiyete, öğrenme ve bellek, yükseltilmiş artı labirent testi, açık alan testi, rotarod testi, metabolomiks, karvakrol, kadmiyum.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir (Proje no:THD-2023-20628).

ABSTRACT

Nigar ABBAK, Effect of Carvacrol on Alterations Observed in Behavioral, Biochemical and Metabolomic Parameters in Rats Exposed to Cadmium, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Physiology Programme, PhD Thesis, Ankara, 2024.

Cadmium (Cd) is one of the toxic and carcinogenic heavy metals that can be found in the environment through activities such as industry and agriculture. Carvacrol (CAR) is a phenol found in various aromatic plants. CAR is known to have various biological activities. The aim of our study is to evaluate the protection of CAR against the toxic effects caused by Cd with behavioral parameters, biochemical analysis, histopathology and metabolites. Wistar-albino male rats were used in our study. Oral administration was given to the control, CAR20 mg/kg, CAR40 mg/kg, Cd50 mg/kg, Cd50 mg/kg+CAR 20 mg/kg and Cd50 mg/kg+CAR 40 mg/kg groups for 12 days (n=8 in each group). 0.2% Tween 80 was used as CAR solvent. In order to observe the effects of Cd on rats, behavioral tests such as open field (OFT), elevated plus maze (EPM) and Barnes Maze test were applied at the end of the experimental period. Locomotor activity was evaluated with the Rotarod test. Histopathological studies were performed on the kidney and liver tissues. In addition, untargeted metabolomic analyzes were performed in plasma from rats using GC-MS and LC-QTOF techniques. Additionally, arsenic, zinc, iron, cadmium and calcium were measured in plasma with ICP-OES. Findings show that Cd reduces walking time compared to the control in the rotarod test, prolongs the time spent in the closed arm in the EPM test, and reduces the time and number of hours spent in the center in the OFT test. It was found that Cd reduces weight gain and changes the amounts of elements in blood plasma. In the metabolomic analysis results, indicators for negative effects of Cd on lipid, energy and amino acid metabolism were observed. When the behavioral results are evaluated together, it can be said that Cd increases anxiety-like behaviors, reduces locomotor activity, and when applied together with CAR, these parameters worsen. It is also supported by our biochemical results that Cd causes negative changes in the kidney and liver. Our results show that Cd has a negative effect on all parameters examined when administered alone or together with CAR, and CAR does not cause a negative effect when administered alone. Our study addresses the effect of Cd and CAR in terms of behavior, biochemistry, histopathology, elemental analysis and metabolomics.

Key Words: Anxiety, learning and memory, elevated plus maze test, open field test, rotarod test, metabolomics, carvacrol, cadmium

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no:THD-2023-20628).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kadmiyum ve Fizyolojik Özellikleri	3
2.2. Karvakrol ve Fizyolojik Özellikleri	7
2.2.1. Karvakrol Biyosentezi	9
2.2.2. Karvakrolün Nöroprotektif Etkisi	9
2.2.3. Karvakrolün Antioksidan Etkisi	10
2.2.4. Karvakrolün Antiinflamatuvar Etkisi	10
2.2.5. Karvakrolün Hepatoprotektif Etkisi	11
2.3. Metabolomiks	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Deney Hayvanlarının Sağlanması ve Barınma Koşulları	15
3.1.1. Deney Grupları	15
3.2. Davranış Testleri	17

3.2.1. Yükseltilmiş Artı Labirent - <i>Elevated Plus Maze</i> (EPM)	17
3.2.2. Açık Alan Testi - <i>Open Field Test</i> (OFT)	18
3.2.3. Barnes Labirenti	18
3.2.4. Rotarod	20
3.3. Metabolomik Analizler	21
3.3.1. Plazma Örneklerinin LC-qTOF-MS ve GC-MS Hazırlığı	21
3.3.2. LC-qTOF-MS Metabolomik Analizi	22
3.3.3. GC-MS Metabolomik Analizi	23
3.3.4. Profillerin Yorumlanması	24
3.4. Histopatoloji için Örnek Hazırlığı	25
3.5. Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi ile (ICP-OES) İncelenmesi	25
3.6. Serum Biyokimya Parametrelerinin Analizi	26
3.7. İstatistik Analiz	26
3.8. Etik Kurul İzni	26
4. BULGULAR	27
4.1. Hayvanlarda Kilo değişimi	27
4.2. Davranış Test Sonuçları	29
4.2.1. Yükseltilmiş Artı Labirent	29
4.2.2. Açık Alan Testi	30
4.2.3. Barnes Labirenti	36
4.2.4. Rotarod Testi	37
4.3. Metabolomiks Sonuçları	38
4.3.1. Tek Değişkenli Analizler	38
4.3.3. Çok Değişkenli Veri Analizi	38
4.3.4. Metabolit Seti Zenginleştirme Analizi	43

4.4. Karaciğer ve Böbrek Dokularının Histopatolojik İncelenmesi	45
4.5. Plazmada Bulunan Bazı Elementlerin Değerlendirilmesi	47
4.6. Serum Biyokimya Parametrelerine ait Bulgular	49
5. TARTIŞMA	52
5.1. Hayvanlarda kilo değişimi	52
5.2. Davranış Testleri	52
5.2.1. Açık Alan Testi ve Yükseltilmiş Artı Labirent	52
5.2.2. Barnes Labirenti	54
5.3. Lokomotor Aktivite Testi	55
5.3.1. Rotarod Testi	55
5.4. Metabolomiks	56
5.5. Histopatoloji Sonuçları	61
5.6. Plazmada Bulunan Bazı Elementlerin Değerlendirilmesi	63
5.7. Serum Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	63
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
7. KAYNAKLAR	67
8. EKLER	80
EK1. ETİK Kurul İzni	
EK2. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK3. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	Alanin Amino Transferaz
AST	Aspartat Amino Transferaz
Ca	Kalsiyum
CAR	Karvakrol
CAR20	20 mg/kg Karvakrol Grubu
CAR40	40 mg/kg Karvakrol Grubu
Cd	Kadmiyum
CdCl₂	Kadmiyum Klorür
Cd50	50 mg/kg Kadmiyum Grubu
Cd50+ CAR20	50 mg/kg Kadmiyum+20 mg/kg Karvakrol Grubu
Cd50+ CAR40	50 mg/kg Kadmiyum+40 mg/kg Karvakrol Grubu
dk	Dakika
EPM	Yükseltilmiş Artı Labirent
FA	Formik Asit
Fe	Demir
g	Gram
GABA	Gamma Aminobutirik Asit
GC-MS	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi
GSH	Glutasyon
HE	Hematoksilen ve Eozin
ICP-OES	İndüktif Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi
KBB	Kan Beyin Bariyeri

Kg	Kilogram
LC-qTOF-MS	Sıvı Kromatografisi Kuadropol-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
MS	Kütle Spektrometrisi
MT	Metallothionin
MSEA	Metabolit Seti Zenginleştirme Analizi
ml	Mililitre
m/z	Kütle/yük
nmol/mmol	Nanomolar/milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
LC	Sıvı Kromatografisi
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamid
Na⁺/K⁺-ATPaz	Sodyum/potasyumATPaz
OES	Optik emisyon Spektroskopisi
OFT	Açık Alan Testi
OH	Hidroksil Grubu
PCA	Temel Bileşen Analizi
PLSDA	Kısmi En Küçük Kareler-Ayrım Analizi
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Dakikadaki Tur Sayısı
TMCS	Trimetil-Klorosilan
VIP	Projede önemli olan değişkenler
Zn	Çinko

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kadmiyumun endüstride kullanım yaygınlığı	3
2.2. Kadmiyumun karaciğer ve böbrekteki toksisitesinin şematik gösterimi	5
2.3. Aromatik bitkilerde karvakrol biyosentezi	9
2.4. Deneyde kullanılan GC-MS cihazı	12
2.5. Deneylerde kullanılan LC-qTOF/Ms cihazı	13
3.1. Deney boyunca gruplara uygulanan prosedür	16
3.2. Deneyde kullanılan yükseltilmiş artı labirent düzeneği	17
3.3. Deneyde kullanılan açık alan test düzeneği	18
3.4. Deneyde kullanılan Barnes labirenti düzeneği	20
3.5. Deneyde kullanılan rotarod test cihazı	21
3.6. Deneyde kullanılan ICP-OES cihazı	26
4.1. Deney ilk gün hayvanların vücut ağırlıklarının karşılaştırılması	28
4.2. Deney prosedürü sonunda hayvanların vücut ağırlıkları karşılaştırması	28
4.3. Kapalı kolda geçen sürenin karşılaştırılması	30
4.4. Merkezde geçen sürenin karşılaştırılması	32
4.5. Kenarda geçen sürenin karşılaştırılması	32
4.6. Merkezde geçen sürenin yüzde karşılaştırılması	33
4.7. Merkeze geçiş sayısının karşılaştırılması	33
4.8. Kenara geçiş sayısının karşılaştırılması	34
4.9. Merkeze geçiş sayısının yüzdesinin karşılaştırılması	34
4.10. Şahlanma sayısının karşılaştırılması	35
4.11. Tımarlanma süresinin karşılaştırılması	35
4.12. Rotarod deney düzeneğinde kalma süreleri karşılaştırılması	37
4.13. Kontrol, Cd50, CAR20, CAR40, Cd50+CAR20 ve Cd50+CAR40 grupları plazma örneklerindeki metabolit düzeylerine ait PCA skor grafiği	41
4.14. Kontrol, Cd50, CAR40, Cd50+CAR40 grupları plazma örneklerindeki PLSDA, VIP skor grafiği ve ilk 50 metabolit düzeylerine ait sıcak harita analizi	41
4.15. Kontrol, Cd50, CAR40, Cd50+CAR40 plazmalarının ikili karşılaştırma sonucu anlamlı değişen metabolitlere ait PLSDA, VIP ve sıcak harita grafikleri	42
4.16. Kontrol, Cd50, CAR40, Cd50+CAR40 plazmalarının ikili karşılaştırma sonucu anlamlı değişen metabolitlerle yapılan Metabolit Seti Zenginleştirme Analizi	44

4.17. Karaciğer dokularına ait histopatolojik analiz	46
4.18. Böbrek dokularına ait histopatolojik analiz	46
4.19. Plazmadaki kadmiyum miktarının karşılaştırılması	48
4.20. Plazmadaki çinko miktarının karşılaştırılması	48
4.21. Serum biyokimya kreatinin parametrelerine ait bugular	50
4.22. Serum biyokimya üre parametrelerine ait bugular	50
4.23. Serum biyokimya ALT parametrelerine ait bugular	51
4.24. Serum biyokimya kortizol parametrelerine ait bugular	51

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Karvakrolün fiziksel özellikleri	8
3.1. LC-qTOF-MS cihaz parametreleri için gradient elüsyon programı	22
3.2. LC-qTOF-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri	23
3.3. GC-MS analiz koşulları ve parametreleri	24
4.1. Deney prosedürü sonunda grupların vücut ağırlıkları (g)	27
4.2. Yükseltilmiş artı labirent test sonuçları	29
4.3. Açık alan test sonuçları	31
4.4. Barnes Labirenti test sonuçları	36
4.5. Rotarod testi sonuçları	37
4.6. Plazmada bulunan bazı elementlerin miktarları	47
4.7. Serum biyokimya parametreleri	49

1. GİRİŞ

Kadmiyum (Cd) besin zincirine girebilen ağır metallere biridir (1, 2). Cd, Cd-nikel pillerde, plastik ve cam boyamada, güneş panellerinde, polivinil klorür üretiminde, fosfatlı gübre ve diğer kimyasal madde üretimlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Cd, Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı tarafından en toksik ve kanserojen maddelerden biri olarak sınıflandırılmaktadır (3). Cd, ekosistemlerde birikerek; bitkiler, balıklar ve hayvanlar tarafından besin zincirine dahil olmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedir (4). Yapılan çalışmalarla Cd'nin beyin, karaciğer, böbrek, testis, dalak, akciğer, pankreas ve kalp gibi organlar üzerinde güçlü toksik etkileri olduğu gösterilmiştir (5-7). Cd'nin kan-beyin bariyerini (KBB) geçerek beyinde birikmesi sonucunda (8), serebral ödeme, hücre işlev bozukluklarına, nörotransmitter iletiminin ve antioksidan seviyelerinin kötüleşmesine (9, 10) neden olur. Cd'nin oksidatif stres artışına bağlı olarak dikkat, öğrenme ve hafıza bozukluklarına, agresif ve anksiyöjenik benzeri davranışlarda artışa neden olabileceği gösterilmiştir (11, 12). Bu nedenle, Cd toksisitesinin neden olduğu etkileri azaltabilen moleküller araştırılmaktadır (13). Cd sadece sanayi ya da kirleticilerin besin kaynaklarına bulaşması sonucunda olmamaktadır. Sigara içenlerde kan Cd düzeyleri, içmeyen bireylere göre daha yüksek bulunmuştur (14). Bu nedenle Cd'ye bağlı olumsuz etkiler tahmin edilenden daha yaygındır.

Anksiyete insanın tabiatında var olan ve ölümüne kadar bireyi takip eden bir duygudur. Anksiyete, anormal sınırlara ulaştığında ise anksiyete bozukluğu olarak tanımlanır ve sıklığı yüksek olan psikolojik bozukluklar arasında yer alır (15). Öğrenme, insanın hafızasında daha önce yer almayan bilgilerin edinilmesini ifade ederken; hafıza ise öğrenilen bilgilerin beyinde yer etmesi, saklanması ve geri çağırılması basamaklarını kapsamaktadır (16). Cd maruziyetinin sinir sistemi fonksiyonunu etkileyerek anksiyete benzeri davranışlarda artışa, konsantrasyonun azalmasına, öğrenme güçlüğünün ortaya çıkmasına sebep olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (11, 17, 18). Günümüzde, bu kapsamda yeni moleküller araştırılmaktadır (19). Bunlardan biri olan karvakrol (5-izopropil-2-metil fenol-CAR), çeşitli aromatik tıbbi bitkilerde bulunan ayrıca sentetik olarak da elde edilebilen monoterpene bir fenoldür (20, 21). *Origanum* ve *Thymus* gibi kekik türleri başta olmak üzere bazı bitkilerin uçucu yağlarında bulunmaktadır (22). CAR, güvenli kabul

edilen bileşikler arasında yer almaktadır ve ticari olarak gıda aroması olarak kullanılmaktadır (23). CAR antioksidan, antiinflamatuvar, antitümör, analjezik, antihepatotoksik ve anksiyolitik aktivitelere sahiptir (24). CAR'ın güçlü antioksidan aktivitesi nöroprotektif etkisiyle ilişkilendirilmektedir (25). CAR'ın, KBB'yi kolay ve hızlı bir şekilde geçmesinin beyin üzerinde anksiyolitik ve antidepresan etkilerinde rolü olduğu varsayılmaktadır (26). CAR'ın GABAerjik ve dopaminerjik sistemin modüle edebilmesi ile anksiyolitik benzeri etkide önemli olduğu da bildirilmiştir (22). Literatürde CAR ve Cd'nin beraber kullanımıyla ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Cd'nin davranış parametreleri ve metabolitler üzerindeki olumsuz etkilerine karşı CAR'ın koruyuculuğu daha önce yeterli düzeyde çalışılmamıştır.

H1 (0): Cd uygulanan sıçanlarda subakut dönemde anksiyete benzeri davranışlara sebep olmaz, motor davranışları ve uzamsal öğrenme belleği bozamaz.

H1: Cd uygulanan sıçanlarda subakut dönemde anksiyete benzeri davranışlara sebep olur, motor davranışları ve uzamsal öğrenme belleği bozar.

H2 (0): CAR, Cd maruziyetinde subakut dönemde sıçanlarda anksiyete benzeri davranışları azaltmaz, motor koordinasyonu ve uzamsal öğrenmeyi düzeltmez.

H2: CAR, Cd maruziyetinde subakut dönemde sıçanlarda anksiyete benzeri davranışları azaltır, motor koordinasyonu ve uzamsal öğrenmeyi düzeltir.

H3 (0): Cd ve/veya CAR, plazma metabolomiks parametrelerini değiştirmez.

H3: Cd ve/veya CAR, plazma metabolomiks parametrelerini değiştirir.

H4 (0): Cd ve/veya CAR, serum ve plazmada incelenen biyokimyasal parametreleri değiştirmez.

H4: Cd ve/veya CAR, serum ve plazmada incelenen biyokimyasal parametreleri değiştirir.

H5 (0): Cd ve/veya CAR, karaciğer ve böbrekte histopatolojik değişimlere yol açmaz.

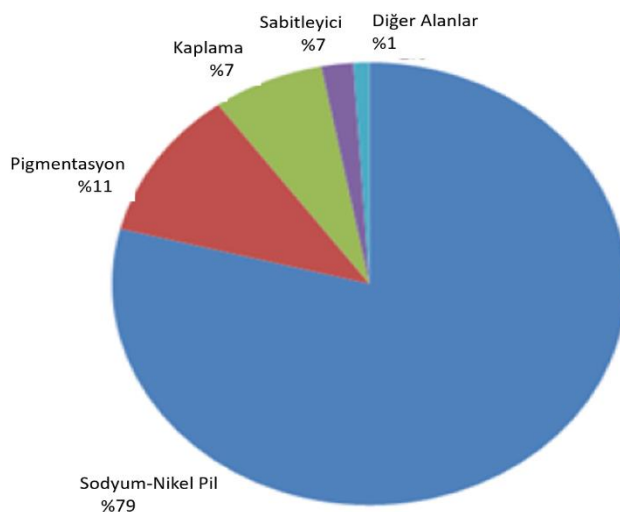
H5: Cd ve/veya CAR, karaciğer ve böbrekte histopatolojik değişimlere yol açar.

Bu çalışmanın amacı sıçanlarda Cd maruziyetinde oluşan davranışsal, biyokimyasal ve metabolomik parametreler üzerinde karvakrol'ün koruyucu etkisinin olup olmadığının incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kadmiyum ve Fizyolojik Özellikleri

Kadmiyum (Cd) besin zincirine girebilen ağır metallere biridir (6). Ağır metaller, inorganik çevre kirlenmelerinin ana gruplarından biridir. Ağır metaller toprak, su ve havaya karışarak besin zincirine girebilmektedir (27, 28). Cd, kompleks organik kirlenmelerin aksine mikroorganizmalar tarafından parçalanamayan ve doğada varlığını sürdüren ağır metallere biridir. Cd ekosistemlerde biriktiği için; bitkiler, balıklar ve hayvanlar tarafından alınarak besin zincirine dahil olmakta ve bunları tüketen insanların sağlığını tehdit etmektedir (29). İnsan nüfusunun hızla büyümesinden dolayı endüstri kirliliği ve çevre kirlenmelerinin kullanımını arttırmaktadır. Bu artış Cd maruziyetini de arttırmakta ve problemleri daha da kötüleştirmektedir. Cd, sanayi kirliliği ve çevre kirlenmelerin yanı sıra sigara gibi kaynaklardan da insan vücuduna girebilmektedir (30). Sigara içenlerde kan Cd düzeyleri içmeyen bireylere göre daha yüksek bulunmuştur (31, 32). Bu nedenle Cd'ye bağlı olumsuz etkiler tahmin edilenden daha yaygındır (32).



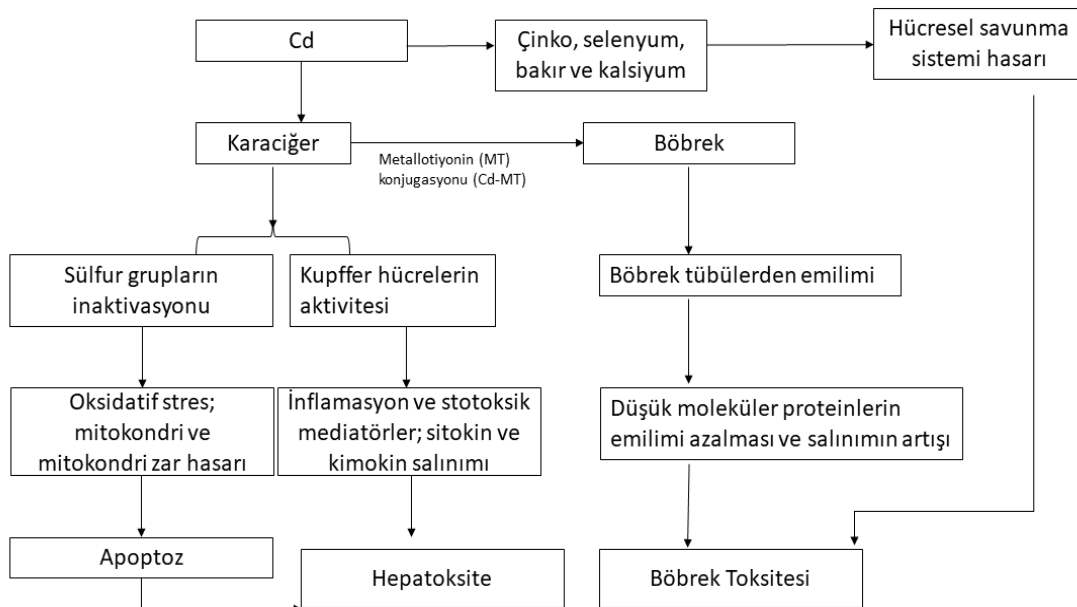
Şekil 2.1. Cd'nin endüstride kullanım yaygınlığı (32)'den değiştirildi.

Cd'nin, ucuz elde edilebilir ve dayanıklı bir kimyasal olması her alanda kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Cd; Cd-Ni pillerde, plastik ve cam boyamada, güneş panellerinde, polivinil klorür üretiminde, fosfatlı gübre, tütün ve çeşitli kimyasal madde üretim süreçlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 2.1). Bu kadar yaygın

kullanılan Cd aynı zamanda Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından en toksik ve kanserojen maddelerden biri olarak sınıflandırılmaktadır (29, 33). Yapılan çalışmalarla Cd'nin beyin, karaciğer, böbrek, testis, dalak, akciğer, pankreas ve kalp gibi farklı organlar üzerinde güçlü toksik etkileri olduğu gösterilmiştir (30). Cd, oksidatif stres moleküllerinin ve lipit peroksidasyonunun artışına, antioksidan moleküllerin azalmasına neden olmaktadır (34). Hücre zarının geçirgenliği değişerek kalsiyum (Ca) dengesi bozulmakta ve DNA hasarı gibi olumsuz sonuçlar oluşmaktadır (35). Cd'nin, hücrelerde ciddi bir inflamasyon artışına neden olduğu belirtilmektedir (36). Cd maruziyetine bağlı olarak pro-inflamatuar sitokinlerden interlökin-1 ve tümör nekroz faktörü- α gibi inflamatuvar mediatörlerin salınımının da aşırı arttığı gösterilmiştir (36). Bunun bir sonucu olarak beyin de dahil birçok organda doku hasarları görülmektedir. Cd'nin, hücre işlev bozukluklarına ve geniş bir yelpazede klinik rahatsızlıklara neden olduğu savunulmaktadır. Yüksek Cd maruziyetinin insanda sıklıkla böbrek yetmezliği, kemik bozuklukları, nörolojik bozukluklar, anosm, erkek üreme sistemi sorunları ve hatta kanser gibi çeşitli sağlık sorunlarıyla ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır (37).

Cd, KBB geçerek beyinde birikebilmekte ve ciddi nöropatolojilere neden olabilmektedir (38). Cd, serebral ödeme, hücre işlev bozukluklarına, nörotransmitter iletimi ve antioksidan seviyelerinin kötüleşmesine (39) yol açabilmektedir. Beyindeki hasara bağlı dikkat, öğrenme ve hafıza bozukluklarına, agresif ve anksiyete benzeri davranışlarda artışa neden olabileceği gösterilmiştir (40). Cd nörotoksitesiyle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Cd'nin, neonatal sıçanlarda beyin kanaması ve beyin ödemi tetiklediği gözlenmiştir (41). Cd'nin yenidoğan ratlarda KBB'yi geçme hassasiyetinin yüksek olmasından dolayı (42) yaşlı ratlara göre farklı beyin bölgelerinde daha toksik olduğu gösterilmiştir (43). Cd'nin, beyinde serbest radikallerin üretimini artırdığı ve Na^+/K^+ -ATPaz gibi membrana bağlı proteinleri etkileyip hücre bütünlüğünü bozduğu tespit edilmiştir (44, 45). Cd, hücre zarı Ca geçirgenliğini ve nörotransmitter salınımını değiştirir (43). Hücreler arası boşluğa Ca salınımını azaltır ve aksiyon potansiyellerinin oluşumunu azaltır. Bunun sonucu olarak nörotransmitter salınımı da değişmektedir (44). Cd'ye maruz kalan hayvanların amigdalasında uyarıcı nörotransmitter seviyelerini değiştirdiği gösterilmiştir (46). Cd'nin, damar endotel bütünlüğünü ve geçirgenliğini etkilediği ve bu etkiye ikincil

olarak sinir hücrelerinde nekrotik değişikliklerin meydana geldiği de görülmektedir (46). Cd'nin sebep olduğu yoğun sitokin salınımına bağlı stres, hücre zarına olduğu gibi mitokondri zarlarına da hasar vermekte ve mitokondrideki yıkımı da arttırmaktadır (47). Sinir hücrelerinin yaşamaları için gerekli olan iletişimlerini sağlayan mikrotübül yapıları da Cd maruziyetinde zarar görmektedir. Bunlara ek olarak hücrel iletişim bozduğu ve apoptozu tetikleyebildiği gösterilmiştir. Cd maruziyeti insanda da geniş ölçekte davranışsal bozukluklara neden olabilir. Cd'ye maruz kalan işçilerde dikkat, psikomotor hız, hafıza (48), görsel-motor işlevlerde azalma (49) ve polinöropati riskinde artış (50) ortaya çıkmıştır.



Şekil 2.2: Cd'nin karaciğer ve böbrekteki toksisitesinin şematik gösterimi (51)'den uyarlanmıştır.

Cd, sindirim sistemi yoluyla vücudumuza girdiğinde önce sindirim kanalı organlarından emilir daha sonra karaciğere girerek metallere bağlı toksisiteyi azaltmada görevli metallothionein (MT) üretimine neden olur ve Cd- MT kompleksini oluşturur. Cd buradan glutatyon (GSH) ve sisteine bağlı olarak safra yoluna geçer buradan bağırsağa atılabilir ve bağırsak epitel hücreleri tarafından yeniden emilir. Cd'nin vücutta "enterohepatik dolaşımı" olarak kabul edilen bu döngüsünün karaciğer ve böbreklerde ciddi hasarlara neden olabileceği gösterilmiştir (Şekil 2.2) (52, 53).

Yapılan çalışmalar, karaciğerde Cd birikiminin alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, laktat dehidrojenaz ve alkalın fosfataz aktivitelerini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir (54). Cd çok sayıda hepatik histopatolojik değişikliklere neden olmaktadır. Bu hasarların karaciğerde görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu, Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ve Parankimal hasarı içerdiği belirtilmektedir (54). Eldeki bilgiler ışığında karaciğere Cd toksisitesinin moleküler mekanizmaları temel olarak sülfhidril inaktivasyonu, oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve hücre apoptozu olarak kabul edilmektedir (55). Cd toksisitesi hepatosit ölümüne yol açarak Cd-MT olarak kan dolaşımına geçer ve böbreklere aktarılır, burada glomerüllerden süzülür ve böbrek tübüleri tarafından yeniden emilir (56). Böbreklerde tekrar emilen Cd, bağlanan Cd'den daha toksik olan serbest Cd'ye ayrılır. Serbest kalan Cd böbrek epitel hücrelerinden sentezlenen MT ile yeniden birleşip buradan da serbestlenir ve böbrek tübül hücrelerinin emilim fonksiyonunun ciddi tahribatına yol açar. Cd, epitel hücre fonksiyonunu tahrip eder ve proteinüri oluşumuna neden olur(57). Çalışmalar, idrardaki Cd konsantrasyonunun 1.0 nmol/mmol kreatinin düzeyine denk geldiğinde renal tübül proteinüri prevalansında %10 gibi ciddi bir artış olduğunu göstermiştir (58). Ayrıca uzun süreli Cd maruziyeti böbreklerdeki Cd yükünü artırarak Ca atılımının artmasına ve böbrek taşı riskine yol açmaktadır (59). Bağırsak mukozasında sentezlenen endojen MT de Cd ile Cd-MT oluşturabilir ve böbrekte birikerek kronik toksisiteyi arttırabilir (60). Ayrıca maruz kalmanın yüksek ve uzun süreli olması veya tetikleyici ile birlikte ortaya çıkması durumunda böbrek hasarının kişinin ölümüne sebep olabilecek kadar ilerleyebileceği bildirilmektedir (61). Proksimal tübül epitel hücrelerinin lizozomlarındaki özellikle N-asetil- β -D-glukozaminidaz'ın ve buna ek olarak retinol bağlayıcı protein ve α -1-mikroglobulin gibi proteinlerin, başlangıçtaki renal tübül hasarın saptanması için biyobelirteçler olabileceği düşünülmektedir (62). Günümüzde böbreklerdeki Cd toksisitesinin moleküler mekanizmaları oksidatif stres, mitokondriyal stres, endoplazmik retikulum stresi, apoptoz-otofaji dengesinde kayma, DNA metilasyonu ve kalsiyum iyonu bozukluğu olarak özetlenebilir (63).

Cd gibi toksik metaller vücutta Ca ve Zn gibi elementlerin vücuda girdiği zamanki gibi metabolize edilirler. Cd emiliminin artmasının, Ca, Zn, demir (Fe), selenyum, C vitamini, D vitamini, E vitamini veya diğer eser elementlerin düşük

tüketiminden kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Özellikle, Cd'nin Ca ve Zn ile moleküler benzerliği Cd'nin yüksek emiliminde rol oynayabileceklerini düşündürmektedir (64). *In vivo* olarak Zn'nin böbrek fonksiyonu üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu (65) ve Cd'ye maruz kalan sıçanlarda artan femur boynu kırığı riskini önlediği (66) belirtilmiştir. Ayrıca birçok hayvan ve insan çalışması Ca, Zn veya Fe gibi temel metallerin eksikliğinin Cd'nin daha fazla emilmesine ve toksisitesine yol açabileceğini göstermiştir (67). Bu nedenle, gerekli temel metal elementlerin takviyesinin Cd zehirlenmesini önlemede rol oynayabileceğine inanılmaktadır. Sebze ve meyvelerin Cd'ye karşı koruyucu etkileri Cd'yi antagonize edebilecek temel metalleri ve vitaminleri içermelerinden kaynaklanabilir (68). Ayrıca bu bitkilerdeki fitokimyasalların çoğunun fenol veya izoflavon olması da Cd'ye bağlı hasara karşı koruyucu rol oynayabilmektedir. Bu biyoaktif bileşikler, radikal temizleyiciler veya metal şelatörler olarak işlev görerek Cd toksisitesine karşı doğal antagonistler olarak hareket etmelerini sağlamaktadır (69). Ancak birçok yeşil yapraklı sebzenin Cd'nin ana kaynaklarından biri olma riskinin olabileceğini de belirtmek gerekir. Öte yandan içerdikleri besin maddelerinin ve aktif maddelerin çoğu aynı zamanda Cd'nin toksisitesini de azaltır. Bu nedenle Cd içermeyen sebzelerin tüketimi, Cd toksisitesinin önlenmesinde ve azaltılmasında önemli rol oynayabilir.

Cd'nin vücudumuzda neden olduğu toksiteyi açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiş olsa da bu toksisite hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozun Cd'un tetiklediği patogeneizde kritik roller oynadığına dair genel bir fikir birliği bulunmaktadır (70). Cd başta olmak üzere diğer ağır metal toksisitesine karşı vücudu korumada bu mekanizmalar üzerinden etki gösteren maddelere ihtiyaç vardır. Bu maddelerin gerek doğrudan gerekse nanoemülsiyon formu gibi yenilikçi ilaç sistemleriyle kullanılması araştırılmaktadır (71). Bu sayede terapotik etkiden daha fazla yararlanılacağı düşünülmektedir.

2.2. Karvakrol ve Fizyolojik Özellikleri

Karvakrol (5-izopropil-2-metil fenol-CAR), çeşitli aromatik tıbbi bitkilerde bulunan ayrıca sentetik olarak da elde edilebilen monoterpenoid bir fenoldür (20). CAR'ın fiziksel özellikleri aşağıda özetlenmiştir (Şekil 2.1). CAR, çok sayıda aromatik uçucu yağ üreten bitkide yüksek miktarda bulunmaktadır (20). CAR,

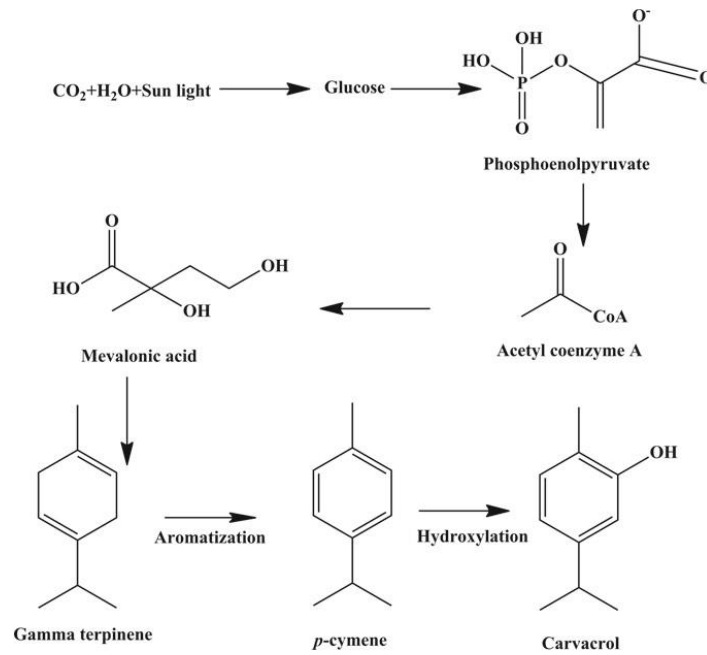
Origanum vulgare, *Thymus vulgaris*, *Lepidium flavum*, *Citrus aurantium*, başta olmak üzere bazı bitkilerin uçucu yağlarında bulunmaktadır (21, 72). CAR, genel olarak güvenli kabul edilen bileşikler arasında yer almaktadır ve ticari olarak gıda aroması olarak kullanılmaktadır (73, 74). Avrupa Komisyonu tarafından kimyasal tatlandırıcılar listesine dahil edilmiştir ve gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılmak üzere Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır. CAR diğer uçucu yağlar gibi suda çözünmezken organik çözücülerde kolaylıkla çözünebilir. CAR'ın antioksidan, antiinflamatuvar, anksiyolitik, antitümör, analjezik, antihepatotoksik, antimikrobiyal, insektisidal ve anksiyolitik etkiler gibi birçok fizyolojik özellikleri olduğu bilinmektedir (75, 76). CAR'ın güçlü antioksidan özelliğe sahip olmasından dolayı çok sayıda nörotoksik ajanın etkilerinin önlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (77). CAR'ın, KBB'yi kolay ve hızlı bir şekilde geçmesinin beyin üzerinde koruyucu anksiyolitik ve antidepresan etkilerinde rolü olduğu varsayılmaktadır (78, 79). CAR'ın GABAerjik iletimi ve dopaminerjik sistemi modüle edebilmesinin anksiyolitik benzeri etkisinde önemli olduğu da tespit edilmiştir(78).

Tablo 2.1. CAR'ın fiziksel özellikleri (80, 81)'den uyarlanmıştır.

Kimyasal Formülü	$C_{10}H_{14}O$
Lineer Formülü	$C_6H_5CH_2(OH)$ (C_3H_7),
Molekül ağırlığı	150.22 g/mol
Yoğunluğu	0.967 g/ml
Erime Noktası	~ 0 °C
Kaynama Noktası	237–238 °C
Refraksiyon Katsayısı	1.5230
Tad ve Koku	Hoş keskin bir tada sahip olup kokusu mercan köşke benzemektedir
Suda çözünürlüğü	Suda çözünmez
Organik çözücülerdeki çözünürlüğü	Etanolde yüksek çözünür
LD50	Oral alındığında sıçanlarda LD50 810 mg/kg; tavşanlarda LD50, 100 mg/kg)
Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği tanımı	5-isopropyl-2-methylphenol veya 2-Methyl-5-(1-methylethyl)-phenol

2.2.1. Karvakrol Biyosentezi

Karvakrol biyosentezi (Şekil 2.3)'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Aromatik bitkilerde karvakrol biyosentezi (82).

2.2.2. CAR'ın Nöroprotektif Etkisi

Nöroinflamasyon ve oksidatif stresin MSS bozukluklarında önemli rollere sahip olduğu, öğrenme ve hafıza bozukluklarının önemli nedenlerinden biri olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konulmaktadır.

İnflamatuvar sitokinlerin uzun süreli üretiminin hafızayı, glutamat salınımını ve hücre sinyal yollarını etkilediği daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (83). Düşük moleküler ağırlığı ve lipofilik yapısı nedeniyle kan beyin bariyerini geçtiği ve nöroprotektif etkilerini gösterdiği bildirilmiştir (84). CAR'ın, 6-hidroksidopamin tarafından tetiklenen Parkinson hastalığı hayvan modelinde (85), diabetik ratlarda (86) ve epileptik ratlarda (87) antioksidan etkilerine bağlı olarak nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, karvakrolü, nörodejeneratif

hastalıklara karşı güçlü bir antioksidan olarak tanımlanmaktadır (88, 89). Ayrıca fenolik hidroksil grubunun (OH) asetilkolinesteraza bağlanabildiği ve asetilkolinesteraz inhibitörü olarak hareket ettiği (90) gösterilmiştir. CAR'ın, kaspaz-3'ü inhibe ederek nöronal apoptozu hafifletme yeteneği olduğu da gösterilmiştir (91). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda CAR'ın antidepresan benzeri ve anksiyolitik benzeri etkilerinin, GABAerjik iletimi ve dopaminerjik sistemin modülasyonu yoluyla gerçekleştiği bildirilmiştir (92).

2.2.3. Karvakrolün Antioksidan Etkisi

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile bunu önleyen antioksidan molekül ve enzimlerin arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır (93, 94). Oksidatif stres, kronik stresin neden olduğu sitotoksistide yer alan önemli bir mekanizmadır (95). Artan metabolik hız ekstra serbest radikaller üretmekte ve bu da ROS üretimi ile antioksidan sistem arasında bir dengesizliğe yol açmaktadır (95, 96). Bu serbest radikal türleri, proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi hücrelerdeki farklı moleküllerde oksidatif hasara neden olmaktadır (96). Oksidatif stres devam ederken doğal antioksidan takviyesi alındığında vücuttaki organların işlevlerinin düzelmeye başladığı gösterilmiştir (97, 98). CAR güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir (99). CAR'ın antioksidan ve antimikrobiyal etkisinde özellikle aromatik halkaya bağlı OH⁻ önemli olduğu bildirilmiştir (100). Bir amin (NH₂) grubunun CAR'ın benzen halkasına sokulması ve ardından yapısal olarak farklı aldehitlerle reaksiyona girmesiyle oluşan Schiff bazlarının da yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu vurgulanmaktadır (101).

CAR'ın radikal süpürücü etkileri sayesinde ROS ortadan kaldırılarak GSH seviyesinin devamlılığı sağlanır (102). Böylece CAR tedavisi GSH seviyesinin artışına sebep olmaktadır (102). CAR'ın hücre kültürü ve hayvan deneylerinde total antioksidan kapasite seviyelerini de yükselttiği gösterilmiştir (103).

2.2.4. Karvakrolün Antiinflamatuvar Etkisi

Bağışıklık sistemini düzenlemek amacıyla kullanılan baskılayıcı veya uyarıcı ilaçların bazıları ciddi yan etkileri olan sitotoksik ilaçlardır. Özellikle bağışıklık

sistemini güçlendirmek için modern tedavilere yardımcı doğal, bitki bazlı bileşiklerin arayışı artmaktadır. Doğal bileşiklerden elde edilen fenollerin, dendritik hücreler, lenfositler (B veya T hücreleri), düzenleyici T hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller ile birlikte işlev gördüğü gösterilmiştir. Çalışmalar, farklı bitkilerden elde edilen terpen ve türevlerinin immün uyarıcı aktivitesinin olduğunu bildirmiştir (104).

CAR'ın inflamasyonda prostaglandin biyosentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan siklooksijenaz-2 ekspresyonunu, peroksizom proliferatör-aktive reseptörleri üzerinden baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir (105). CAR'ın antiinflamatuvar ve antinosiseptif etkisinde sahip olduğu OH grubunun esterleşebilmesi (106) veya nitrik oksid sentezini azaltabilmesine bağlı olarak makrofaj etkinliğinin azalmasının önemli olabileceği vurgulanmaktadır (107).

2.2.5. Karvakrolün Hepatoprotektif Etkisi

CAR'ın, sıçanlarda bir hepatotoksin olan D-galaktosamin ile indüklenen karaciğer yetmezliğinde, *in vivo* veya *ex vivo* olarak hepatoprotektif rolü gözlenmiştir (108). Yapılan çalışmalarda sıçanlarda 80 mg/kg vücut ağırlığı düzeyinde CAR uygulandığında, lipid peroksidasyon ürünlerinin, böbrek, karaciğer ve plazmadaki lipid konsantrasyonlarının normal değerlerine geri getirilmesine yardımcı olduğunu bildirmişlerdir (108). D-galaktozamin tarafından tetiklenen enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan konsantrasyonları da karvakrol tarafından normale döndürülür. Yukarıda bahsedilen araştırmacılar, CAR ile tedavinin, DNA hasarını ve D-galaktozamin tarafından tetiklenen mitokondriyal enzimlerdeki azalmaları düzelttiğini belirtmişlerdir.

2.3. Metabolomiks

Kompleks bir halde çalışan biyolojik sistemleri ve bu sistemler arasındaki ilişkiyi inceleyen yeni yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu yaklaşımla çalışan ve popüleritesi artan yöntemlere örnek olarak; genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik sayılmaktadır (109).

Metabolomik, hücrelerdeki ve biyolojik sıvılardaki tüm küçük moleküllü metabolitlerin kapsamlı ve kantitatif analizi olarak kabul edilmektedir (110, 111). Metabolomik yaklaşım, günümüzde biyobelirteçlerin tanımlanması, ilaç

metabolizmasının profilinin çıkarılması ve metabolik ilişkili yolların aydınlatılması için güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır (110, 112). Metabolomik yaklaşımda numunedeki maddelerin bir kromatografik yöntemle ayrılması sonrasında kütle dedektörü ile tanımlanmasına dayanmaktadır (109).

Kütle spektrometresi (MS), iyonları kütle/yük (m/z) oranına göre sıralamaktadır. Dedektörleri sayesinde yüksek seçicilik ve hassasiyetle metabolitleri iyonlarına göre kaydeder ve analiz eder. Metabolomik çalışmalarda sıvı kromatografi-MS (LC-MS) ve gaz kromatografi-MS (GC-MS) sıklıkla kullanılmaktadır (113). Her iki analiz yöntemi için de günümüzde farklı yazılım programları içeren cihaz ve markalar bulunmaktadır. Deneyimizde Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında bulunan GC-MS ve LC-MS cihazları kullanıldı (Şekil 2.4 ve 2.5).

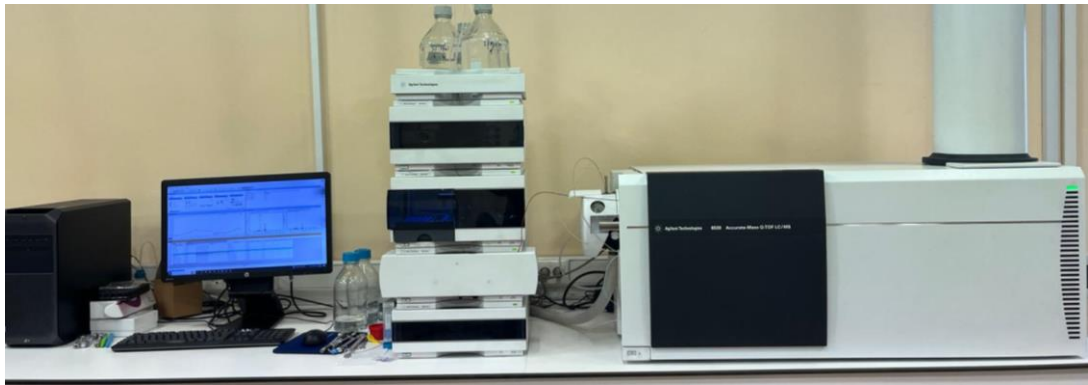
GC'de gaz haline geçerek kolonda taşınan ve MS'ye ulaşan ulaşan analitler iyonlaştırılır ve oluşan iyonlar dedektör yardımıyla kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılarak kaydedilirler. Her bir metabolit için elde edilen spektrumların, uygun kütüphane verileri ile birlikte değerlendirilmesiyle numunedeki bileşikler tanımlanabilmektedir.



Şekil 2.4. Deneyde kullanılan GC-MS cihazı (Shimadzu QP-2010)

LC/MS'de sıvı kromatografide ayrılan metabolitlerin iyonlaşması genel olarak atmosferik basınçta gerçekleştirilir ve sonrasında vakum altında detektöre doğru sürüklenir (114). Atmosfer basıncında LC/MS'deki iyonizasyon, elektrosprey

iyonizasyon (115), atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon (116), foto iyonizasyon (117) veya yüzey iyonizasyonu (118) yoluyla gerçekleştirilir. LC/MS ile arayüzlenen sıvı kromatografisi ile GC/MS karşılaştırıldığında, GC/MS daha yüksek kromatografik çözünürlük ve daha yüksek pik kapasitesi, alev iyonizasyon tespiti ile daha kolay nicelik belirleme imkanı vermekte, tek bir mobil faz (helyum), çözünürlük ve ayrışma sıcaklık programlama gibi elektronik bir kontrolle yapılabildiği için de daha az sorunla karşılaşılmaktadır (119, 120). Ancak metabolom bütün bir metabolit koleksiyonu olduğu için tüm metabolitleri tek bir analitik yöntemle ayırmak zordur. Bu yüzden her ikisinin de aynı araştırmada kullanımı tercih edilebilir (120).



Şekil 2.5. Deneylede kullanılan LC-qTOF/MS cihazı (Agilent 6530)

GC'de iyonlaşma vakum koşullarında elektron iyonizasyonu veya kimyasal iyonizasyon yoluyla gerçekleşir (121). GC-MS'de yapılan analiz, analitlerin uçucu ve termal olarak stabil olmasını gerektirir. Analizden önce uçuculuklarını arttırmak için çok polar olan analitlerin türetilmesi gerekir ki bu da bu tekniğin ana sınırlamasıdır. Bu nedenle, LC/MS kullanılarak daha fazla suda çözünür moleküller tek seferde aynı anda analiz edilebilir. Bu bağlamda, iki teknik de kullanılarak analitik performanslarının karşılaştırılmasında değer vardır (120).

Metabolomik çalışmalarda, çalışılan örnekteki metabolitlerin tesbitinde hedeflenmiş veya hedeflenmemiş hedefe yönelik teknikler kullanılmaktadır. Çoğu durumda, hedefe yönelik metabolit çalışması, çalışılan örnekteki sınırlı sayıda metabolitin tanımlanmasına ve ölçülmesine odaklanır (122). Hedefe yönelik olmayan hedeflenmemiş metabolomik ise çalışılan örnekteki en fazla sayıda metabolitin tespit

edilmesini sağlar. Hedeflenmemiş metabolomik analizlerinde etkili olabilecek metabolit veya yollarla ilgili herhangi bir bilgi sahibi olmadan mümkün olan en çok sayıda metabolit hedeflenir ve yeni biyobelirteçlerin de kapısını açar (123). Hedeflenmemiş metabolomik yaklaşım, çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip metabolitlerin eşzamanlı tespitine odaklanır ve geniş bir tespit aralığını sağlayabilir (124). Hedeflenmemiş metabolit çalışmalarında verilere temel bileşen analizi (PCA) ve kısmi en küçük kareler-diskriminant analizi (PLS-DA) yapılmaktadır. Elde edilen veriler, çok değişkenli yazılım programları ile hızla görselleştirilebilir, etkilenen yollar ve metabolitler arasındaki ilişkiyi bütüncül bir yaklaşımla bir araya getirir (125).

Hedeflenmemiş metabolit tekniğinin avantajlarına rağmen birçok dezavantajı da vardır. Bunlar arasında bileşikleri tanımlama, bileşiklerin özelliğini tespit etmek bu özelliklere göre ayırım yapmak ve miktarlarının belirlenmesi çok sayıda yazılım programı olmasına rağmen hala zorluğunu korumaktadır (126, 127). Hedeflenmiş metabolitlerin miktar tayini analizi kısmının ise daha kolay olduğu bilinmektedir. Çünkü sınırlı sayıda metabolitle çalışılmaktadır ve önceden metabolitler bilinmektedir. Hedeflenmiş metabolitlerin çalışılması da bazı dezavantajları beraberinde getirmektedir. Daha maliyetlidir ve örnek hazırlama adımı karmaşıktır. Ayrıca cihazın ve örneklerin önceden optimizasyonu gerekmektedir. Günümüzde yeni bir yaklaşım olan hibrit tekniği her iki metodun da korele çalışılabilmesini içerir. Bu teknik çok yaygın olmasa da hedeflenen ve hedeflenmeyen metabolomik analizlerin bazı güçlü yönlerini korurken bazı zayıf yönlerini de etkisiz hale getirmektedir (128). Ancak hem tekniğin yeni olması hem de verilerin analizinin daha uzun sürmesi bir dezavantaj olarak kabul edilmektedir.

Metabolomik tekniklerin (GC-MS veya LC-MS) herhangi biri kullanılarak elde edilen veriler (hedeflenmiş veya hedeflenmemiş metabolitler) analiz edilirken ticari bir yazılım programı ile çalışılır. Bu amaçla ticari veya ticari olmayan OpenMS, birçok yazılım programı (SetupX, SpectConnect, MetaboAnalyst, SIMCA gibi) kullanılmaktadır (128). Ayrıca her geçen gün yeni programlar eklenmekte, var olanların data bilgileri de güncellenmektedir. Böylece analiz programı, veriler elde edilirken örnekleri çalışan kişi veya cihaz kaynaklı hataları da minimuma getirmeye çalışmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Sağlanması ve Barınma Koşulları

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Denepleri Etik Kurulu tarafından 28.03.2023 tarihli, 2023/06-15 karar nolu toplantı ile etik kurul izni alınarak çalışma başlandı. Etik kurul onayı teze eklendi (Ek 1). 6-8 haftalık 200 - 250 g Wistar Albino türü erkek sıçanlar kullanıldı (n=48). Hayvanlar Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarından (Ankara) temin edildi. Hayvanlar deney süresince Hacettepe Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda, uygun sıcaklıkta ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ve havalandırma kontrolü bulunan odada barındırıldı. Bir haftalık ortama adaptasyon sürecinden sonra deneylere başlandı. Hayvanlar deney boyunca *ad libitum* beslendi. Deneysel çalışma boyunca hayvanlara Helsinki Deklarasyonu'na ve Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü Enstitüsü tarafından yayınlanan "Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Rehberi" (Guide for the CARE and Use of Laboratory Animals, 8th Ed.) (129)'ndeki kurallara uygun şekilde davranıldı.

3.1.1. Deney Grupları

Hayvanların laboratuvara uyum sürecinden sonra her grupta 8'er sıçan olmak üzere toplam 6 grupta 48 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlar ağırlık olarak homojen şekilde gruplara dağıtıldı.

Hayvanlara kadmiyum klorür (CdCl_2) ve CAR % 0,2'lik Tween 80 içeren serum fizyolojik içinde oral olarak 12 gün boyunca verildi. Oral gavajın hayvanlar üzerinde oluşturabileceği stres yanıtının benzer olması için uygulanacak maddeler tüm gruplara oral gavaj ile verildi.

Çalışma Grupları:

Grup 1 Kontrol grubu: % 0,2'lik Tween 80 içeren serum fizyolojik,

Grup 2 Karvakrol 20mg/kg grubu (CAR20): % 0,2'lik Tween 80 içinde CAR (20 mg/kg),

Grup 3 Karvakrol 40mg/kg grubu (CAR40): % 0,2'lik Tween 80 içinde CAR (40 mg/kg),

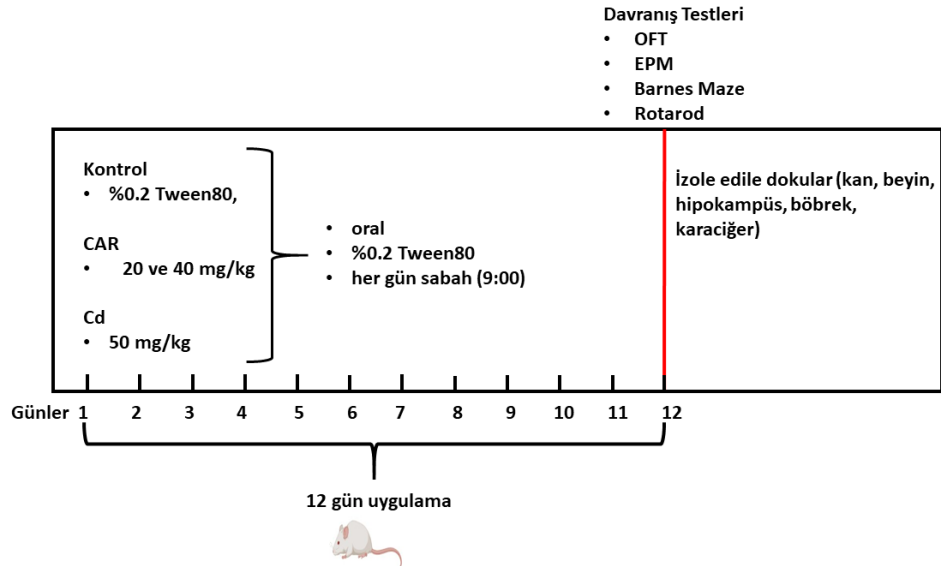
Grup 4 Kadmiyum grubu (Cd50): % 0,2'lik Tween 80 içinde CdCl₂ (50 mg/kg),

Grup 5 Kadmiyum + Karvakrol 20 mg/kg grubu (Cd50+CAR20): % 0,2'lik Tween 80 içinde CAR (20 mg/kg) + CdCl₂ (50 mg/kg),

Grup 6 Kadmiyum + Karvakrol 40 mg/kg grubu (Cd50+CAR40): % 0,2'lik Tween 80 içinde CAR (40 mg/kg) + CdCl₂ (50 mg/kg).

Hayvanlara CAR ve Cd % 0,2'lik Tween 80 içeren serum fizyolojik içinde (22) oral (130) yolla, 12 gün boyunca verildi. % 0,2'lik Tween 80, CAR ve Cd'nin çözülmesi için kullanıldığından kontrol grubuna da uygulanmıştır. Tween 80'in anksiyojenik veya anksiyolitik bir etkisi olmadığı bilinmektedir (131, 132).

Son gün CAR ve Cd verildikten 1 saat sonra (133) (12. gün) davranış testleri yapıldı ve testler tamamlandıktan sonra sıçanlara 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin ile anestezi (i.p.) uygulandı. Sıçanlar derin anestezi altındayken vena cava inferiordan kan alınarak hayvanlar eksanguinasyon ile sakrifiye edildi. Plazma metabolomiks ve Cd birikimi, serumlar biyokimyasal analiz için saklandı. Karaciğer ve böbrek dokuları da çıkarılarak histopatolojik incelemeler için %10'luk formaldehit içerisinde saklandı. Çalışma düzeni şekil olarak özetlendi (Şekil 3.1).



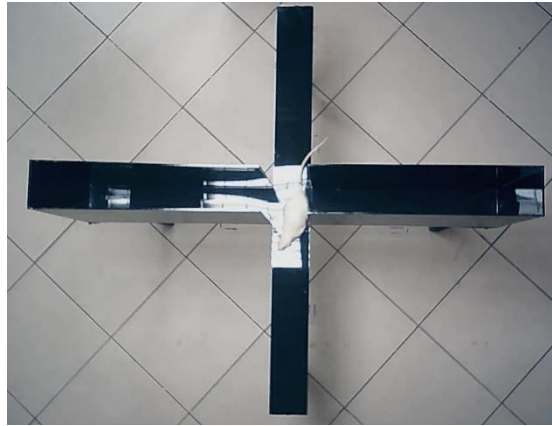
Şekil 3.1: Deney boyunca gruplara uygulanan prosedür

3.2. Davranış Testleri

Deney prosedürü uygulandıktan sonra 12. günde hayvanlara sırasıyla Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalında davranış laboratuvarında yer alan EPM, OFT, Barnes ve rotarod testleri uygulandı.

3.2.1. Yükseltilmiş artı labirent - *Elevated Plus Maze (EPM)*:

Yükseltilmiş artı labirent testi fareler ve sıçanlarda anksiyete benzeri davranışı değerlendirmek için en sık kullanılan modellerdendir. Bu testte yerden 70 cm yüksekte birbirleriyle artı şeklinde kesişen iki açık ($50 \times 10 \text{ cm}^2$), iki de kapalı kol ($50 \times 10 \times 40 \text{ cm}^3$; derinliği 40 cm olan duvar) bulunmaktadır (Şekil 3.2). Hayvanlar artı bölgesinin ortasına konularak ve yüzleri açık alana bakar durumda bırakılır. Hayvanlar labirentte 5 dakika serbest zaman geçirir. Kemirgenlerdeki açık bir platformda durma nedeniyle oluşan korkularından dolayı tercihleri daha çok kapalı kol tarafında olmaktadır. Ancak anksiyolitik moleküller kullanıldığında hayvanlar açık kolda geçirilen süreyi artırırlar (134). Gruplar arasında karşılaştırılan parametreler: açık ve kapalı kollara giriş sayısı, açık ve kapalı kollarda geçirilen süre, açık kollara giriş yüzdesi ve açık kollarda geçirilen sürenin yüzdesi (135).

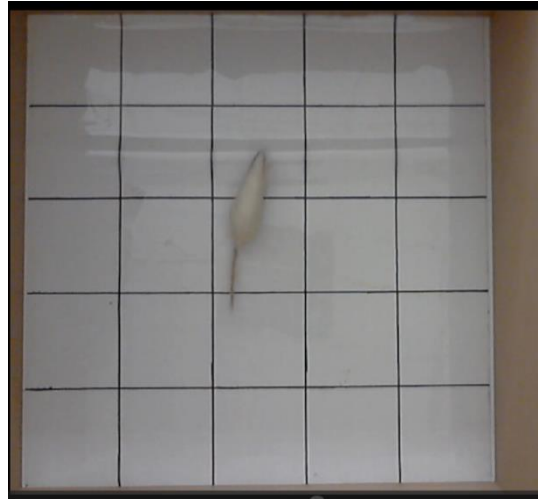


Şekil 3.2: Deneyde kullanılan yükseltilmiş artı labirent düzeneği

3.2.2. Açık alan testi -*Open Field Test (OFT)*:

Açık alan testi anksiyete benzeri davranışın değerlendirilmesinde kullanılan bir başka testtir. OFT için farklı düzenekler bulunmaktadır. Deneyimizde, altta 20 x 20 cm²'lik kare alanlar içeren 100 x 100 x 50 cm³ boyutlarında bir OFT düzeneği kullanıldı (Şekil 3.3). Düzeneğin dış kısmında 16 kare, merkez alanda ise 9 kare olmak üzere zeminde toplam 25 eş kare bulunmaktadır. Testte 5 dakikalık bir süre boyunca sıçanların serbestçe düzenek içerisinde hareket etmelerine izin verildi. Kemirgenler açık alanın ortasında vakit geçirmekten kaçınma eğilimindedir. Merkezde geçirilen sürenin ve şaha kalkma davranışının (arka ayaklar üzerinde dik durma) artması kaygı benzeri davranışlarda azalmaya işaret ederken dışkılama sayısı, tımarlanma süresi ve kenar alanda geçirdiği sürenin artışı kaygı benzeri davranışlarda artmaya işaret etmektedir (136).

OFT'de gruplar arasında karşılaştırılan parametreler, merkez ve kenar alanda geçirilen süre, merkez ve kenar alana giriş çıkış sayısı ve yüzdesi, tımarlanma süresi, şahlanma ve dışkılama sayısıdır. Bu parametreler anksiyete benzeri davranışların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (137).



Şekil 3.3. Deneyde kullanılan açık alan test düzeneği

3.2.3. Barnes Labirenti Testi

Kemirgenlerin uzaysal öğrenme ve hafıza işlevlerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir testtir. Morris Su Tankı testine alternatifi olarak kullanılmaktadır (138). Farklı tasarımlar mevcut olmasına rağmen, genellikle

kemirgenlerde yükseklik korkusu uyandıracak kadar yüksekte daire biçiminde bir platform (122cm çapında) içermektedir. Platform, yerden 1 metre yüksekliktedir ve üzerinde her biri 10 cm genişliğinde 18 delik bulundurmaktadır (Şekil 3.4). Opak bir kaçış kutusu, eşit aralıklı deliklerden birinin altına yerleştirilir. Öğrenmeyi kolaylaştırmak için kaçış kutusunun bulunduğu çeyreğin duvar dışındaki çeyreklerin duvarları farklı renk ve desenlerle işaretlenir. Sıçanlara literatürde 3 ya da 4 günlük bir eğitim sürecinin ardından 4. ya da 5. günde asıl hafıza testi olan prob testi yapılır (139). Aşağıda bu deneyde sıçanlara uygulanan Barnes testinin aşamaları özetlenmiştir.

Alışma fazı

Sıçanların yer ve yön oryantasyonunu sağlamak için kaçış kutusunun bulunduğu kadradaki duvar boş olmak üzere diğer 3 duvara renk ve şekil bakımından birbirinden farklı şekiller asıldı. 3 gün boyunca günde 2 kez alıştırmaya deneyi yapıldı. Sıçanlar platforma başlangıç kutusu ile getirildi ve kutu platformun ortasında ters çevrilerek içinde hayvan varken 10 sn bu şekilde tutuldu. Süre sonunda kutu çekilerek hayvan serbest bırakıldı. Platformun yüzeyinde 3dk geçirmesi sağlandı. Sıçan kaçış kutusunu kendisi bulup içine girince süre durduruldu. Eğer süre bitiminde kaçış kutusunu bulamadıysa, kaçış kutusu içine konarak 30 saniye orada kalmasına izin verildi. Sürenin bitiminde kafesine geri konuldu.

Son Gün Ölçüm Denemesi (Probe Trial):

Son gün ölçüm denemesinde kaçış kutusu yerinden çıkarıldı. Hayvan yine aynı usulde platforma taşındı ve tek deneme yapıldı. 3 dk boyunca kayıt alındı. Tüm gruplarda değerlendirilen parametreler ise, kemirgenin doğru çeyrekte geçirdiği süre, doğru çeyrekte harcanan zamanın yüzdesi, hedefe ulaşmak için harcanan süre ve doğru deliği bulmadan önce ve bulduktan sonra yanlış deliklere yapılan ziyaretlerin sayısı oldu (140, 141).



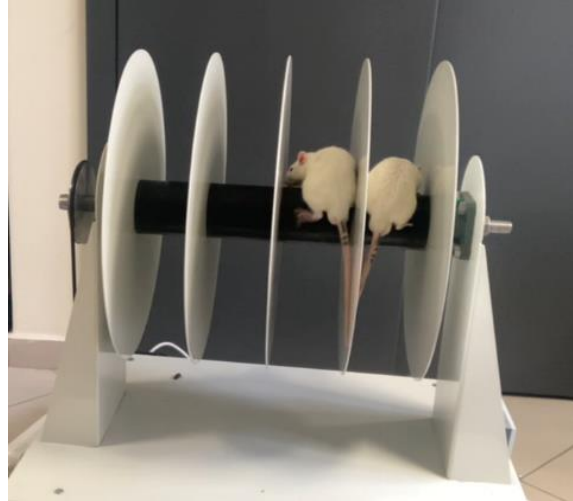
Şekil 3.4. Deneyde kullanılan Barnes Labirenti düzeneği

OFT, EPM ve Barnes deneyleri Fizyoloji Anabilim Dalı'nda tesis edilen ve hayvan davranış deneylerinin yapılabilmesi için uygun özelliklere sahip odada gerçekleştirildi. Görüntü kaydı tavana monte edilmiş bir kamera ve kameranın bağlı olduğu bilgisayar aracılığıyla yapıldı. Araştırmacı deneyler boyunca perdenin arkasındaki bilgisayar başında durarak deney hayvanı ile arasındaki etkileşim minimuma indirildi. Deney sonunda bilgisayara kaydedilen videolar Media Oynatıcı programı kullanılarak 1x'lik hızla çalıştırıldı. Tüm deneyler araştırmacılar tarafından izlendi ve manuel olarak kayıtlar incelendi. Alınan data, araştırılan parametreleri içeren tabloya yazıldı.

3.2.4. Rotarod

Sıçanların motor koordinasyonunu değerlendirmek için rotarod testi kullanıldı (142). Rotarod testinde başlangıçta farelerin çubuğa alışması için düşük hızlarda bir alıştırma aşaması oldu. Bu aşamada hız 4 rpm (dakikadaki tur sayısı) olarak başlandı ve sonrasında arttırılarak 16 rpm hıza çıkıldı. Düşen sıçanlar her seferinde çubuğa tekrar yerleştirildi. Böylece iki dakika boyunca sıçanların çubuğa alışmaları sağlandı (Şekil 3.5). Alıştırma testi sonunda rotaroddan alınan hayvanlar kafeslerinde 10 dk boyunca dinlendirildi. Her hayvandan sonra parkurlar % 70'lik etanol ile silindi ve kuruması beklendi.

Alıştırma fazı bitince rotarod aletinin tüm parkurlarını karşıdan görebilen bir kamera yerleştirildi. Her bir sıçan 16 rpm hızında dönen rotaroda yerleştirildi. Sıçanlar dakikada 16 kez dönen bu rotarod çubuğu üzerinde üç kez 60'ar saniye yürütüldüler. Rotarod çubuğu üzerinde kalma sürelerinin toplam uzunluğu hesaplanarak motor koordinasyon skoru belirlendi (23).



Şekil 3.5. Deneyde kullanılan rotarod test cihazı

Testler tamamlandıktan sonra sıçanlara 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin ile anestezi uygulandı.

3.3. Metabolomik Analizler

Metabolomik analiz, GC-MS ve LC-qTOF-MS olmak üzere iki ortogonal analitik platform kullanılarak gerçekleştirildi. GC-MS ve LC-qTOF-MS analizlerinde kullanılacak olan plazma örneklerinin hazırlık aşamaları aşağıda özetlenmiştir (143, 144). Metabolomik deneyler Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yapıldı (Şekil 2.4 ve 2.5)

3.3.1. Plazma Örneklerinin LC-qTOF-MS ve GC-MS Hazırlığı

LC-qTOF-MS ve GC-MS cihazında çalışılabilmesi için ön bir hazırlık yapıldı. -80°C'de saklanan plazma örneklerinden 200'er µL alındı, üzerine 800 µL metanol:su (9:1, h/h) kondu. 30 sn vorteks yapıldı ve 15000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda üstte kalan kısım, iki ayrı ependorf tüpüne 250 µL kondu. Ayrıca

tüm örneklerden 50 µL alınarak 15 mL'lik falkonlara kondu ve kalite kontrol numuneleri (havuz edilerek oluşturulan numuneler) oluşturmak üzere 9 adet ependorfa bölündü.

Tüm örneklerin işlemleri tamamlanınca ependorf tüpleri GC-MS ve LC-MS'de kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

3.3.2. LC-qTOF-MS Metabolomik Analizi

-80°C'de saklanan numuneler derin dondurucudan çıkarıldı. Oda sıcaklığına getirildikten sonra ependorflar tamamen kuruyuncaya kadar vakumlu santrifüj cihazında uçuruldu. Uçurulan numuneler üzerine 200 µL hareketli faz karışımı (% 0.1 formik asit içeren su ve % 0.1 formik asit içeren asetonitril) eklendi ve 40 sn boyunca vortekslenildikten sonra LC-MS viallerine alındı.

Plazma (veya doku) örneklerinin LC-qTOF-MS ile metabolomik analizi (A) %0,1 FA içeren su ile (B) %0,1 FA içeren asetonitril hareketli fazları kullanıldı. Oluşturulan gradient elüsyonla (Tablo 3.2.) 0,25 mL/dak akış hızında ve C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm) kolon kullanılarak 25 dk gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi ise 10 µL olarak belirlenmiştir. Analizler hem negatif hem de pozitif iyonizasyon modunda gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1.). Metabolitlerin otomatik tandem MS/MS spektrumları, 200 sayım eşiğinin 100 ila 1700 m/z üzerinde kaydedildi. Ortaya çıkan veri matrisindeki pikleri tanımlamak için, kalite kontrol örneklerine (örneklerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan) farklı çarpışma enerjileri (10, 20 ve 40 eV) uygulanarak elde edilen MS/MS spektrumları kütüphaneler ile karşılaştırıldı.

Tablo 3.1. LC-qTOF-MS cihaz parametreleri için gradient elüsyon programı

Zaman (dk)	%A	%B
0	90	10
1	90	10
14	10	90
15	10	90
20	90	10
25	90	10

Tablo 3.2. LC-qTOF-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri

	Pozitif ve Negatif İyonizasyon
Kütle Aralığı	100-1700amu
Tarama Hızı	2
(spektrum/s)	
Sprey Voltajı (V)	3500
Skimmer Voltajı	65
Gaz sıcaklığı (°C)	300
Gaz akışı (L/dak)	8
Nebulize (psig)	35
Parçalayıcı (V)	175

3.3.3. GC-MS Metabolomik Analizi

-80°C’de saklanan numuneler derin dondurucudan çıkarıldı. Oda sıcaklığına getirildikten sonra ependorflar tamamen kuruyuncaya vakumlu santrifüj cihazında uçuruldu. Kurumuş numunelere 20 µL metoksiamin hidroklorür (20 mg/mL şekilde piridin) eklendi ve örnekler 30 sn vortkslendi. Ependorfların hepsi etüvde 30°C’de 90 dk tutularak metoksillendirildi. İşlem sonrası numuneler üzerine 50 µL N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit+trimetil-klorosilan (MSTFA + %1 TMCS) eklendi ve etüvde 37°C’de 30 dak bekletilerek türevlendirildi. Türevlendirilen numuneler GC-MS viallerine aktarıldı.

Türevlendirilmiş plazma örnekleri GC-MS ile DB5MS (30 m + 10 m ön kolon x 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığı) kolon kullanılarak analiz edilmiştir. Enjeksiyonlar bölmesiz olarak gerçekleştirilmiş ve enjeksiyon hacmi 1 µL olarak belirlenmiştir. Analizler Tablo 3.3’de verilen optimize edilmiş GC-MS koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3. GC-MS analiz koşulları ve parametreleri

Kolon özelliği	DB5MS (30 m + 10 m ön kolon x 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığı)
Fırın sıcaklık programı	Fırın sıcaklık programı 60°C'den (1 dk tutulur) 325°C'ye 10°C/dk artışla (10dk tutulur)
Analiz Süresi	37,5 dk
Enjeksiyon Hacmi	1 µl (bölmesiz)
Taşıyıcı Gaz Akışı	Helyum 1 ml/dk
MSD Geçiş sıcaklığı	290°C
Çözücü gecikme süresi	5,90 dak
Kütle Aralığı	50-650 dalton

3.3.4. Profillerin yorumlanması

GC-MS ve LC-qTOF-MS analizlerine ait verilerin data deconvolution, peak alignment, normalizasyon ve veri matrisi üretimi MS-DIAL (ver. 4.0) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. GC-MS için metabolit tanımlaması, %70'in üzerinde bir tanımlama puanı ile ticari olarak temin edilebilen bir alıkonma indeksi kütüphanesi (*Fiehn Retention Index Library*) kullanılarak gerçekleştirildi. LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlere ait veri matrislerindeki pikler MS1 ve QC örneklerine farklı enerji (10, 20 ve 40 eV) düzeyleri uygulanarak elde edilen MS/MS spektrumlarının MS/MS spektral kütüphaneleriyle karşılaştırılması ile tanımlanmıştır. MS-DIAL'den elde edilen veri matrisleri bir Excel dosyası şeklinde aktarıldı. Kalite kontrol örneklerinde değerlerin %50'sinden fazlasının eksik olduğu tüm metabolit özellikleri veri matrisinden çıkarıldı. Veri matrisindeki eksik değerler, metabolit grubundaki en küçük değerinin yarısı ile dolduruldu. Ham veriler GC-MS için LOWESS ve LC-MS için MSTUS algoritmasına göre normalize edildi.

GC-MS ve LC-qTOF-MS analizlerinden elde edilen birleştirilmiş veriler kullanıldı. Bu verilerle herhangi bir sistemik hata ve grupların ayrılmasında önemli olan metabolitleri tanımlamak için PCA kullanıldı. PLS-DA analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlerin araştırılması için, projede önemli değişken (VIP) grafikleri kullanıldı. En yüksek VIP değerine sahip olan metabolit, gruplar arasında en fazla istatistiksel farklılığı gösteren metabolit olarak ve bir biyobelirteç olarak kabul edildi. Metabolit değişimlerini gösteren sıcak harita grafikleri, grupların ayrılmasında en

fazla etkili olan metabolit çok değişkenli analiz sonucunda elde edildi. Son olarak istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitler kullanılarak Metabolit Seti Zenginleştirme Analizi (MSEA-Enrichment) analizi yapıldı ve fenotipte en çok değişen yolak belirlendi.

3.4. Histopatoloji için Örnek Hazırlığı

Sıçanlardan karaciğer ve böbrek dokuları çıkarıldıktan sonra %40'lık formaldehit 1:3 olacak şekilde 4 kat distile su ile seyreltildi. 1ml hacim kaplayan dokular (karaciğer, böbrek) 90 ml formaldehit (%10'luk) içine kondu ve burada üç gün fikse edildi. Fiksasyonu tamamlanan dokular akan çeşme suyunda yıkandıktan sonra rutin doku takibi aşamalarından geçti. Kısaca; derecesi artan alkollerle dehidrate edilen karaciğer ve böbrek parçaları ksilen ile saydamlaştırıldı. Gömme ortamı olarak parafin kullanıldı ve dokulardan parafin bloklar elde edilmesinin ardından 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Tüm kesitler hematoksilin ve eozin (HE) boyaması ile boyandıktan sonra HE boyalı preparatlar Olympus BX53 marka mikroskopta incelendi ve Olympus DP73 CCD renkli kamera ile fotoğraflandı. Histopatoloji incelemeleri Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.5. Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi ile (ICP-OES) İncelenmesi

EDTA'lı tüplere alınan kan 5000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra üstte kalan plazma 1000 µl olacak şekilde 1,5ml'lik ependorf tüplere kondu. Tüpler deney yapılabildiği kadar -80°C'de dondurucuda saklandı. Deney günü plazmalar 1:9 oranında 10 kat seyreltildi. Alınan ependorf tüplerinde en az toplam 7ml hacim olacak şekilde (700 µl plazma : 6300 µl deiyonize su) seyreltildiler.

Deney esnasında 1000 mL'lik balon jöjeye 800 mL deiyonize su + 200 mL %69'luk Nitrik asit eklendi. Bu çözeltinin bu hali ilk blank numunesi olarak ölçüldü. Bu ana çözeltiden farklı seyreltmelerle standartlar hazırlandı. Blank ve diğer standart çözeltilerin ölçülmesi ile kalibrasyon eğrisi çizdirildi. Hazırlanmış kan plazması örnekleri cihazda (iCAP6000 – Thermo Scientific (USA)) okutuldu. Plazmada bazı

kimyasal elementlerin tespiti için indüksiyonla birleşmiş ICP-OES tekniği ile çalışıldı (Şekil 3.6). Cd'yi içeren 5 farklı element analizi elde edildi.



Şekil 3.6. Plazmadaki bazı kimyasal elementlerin ölçümünde kullanılan ICP-OES cihazı (Thermo-USA)

3.6. Serum Biyokimya Parametrelerinin Analizi

Anestezi altındaki hayvanın *vena cava inferior*ünden kan alındı, pıhtı aktivatörlü tüplere konulup 5000 rpm ile 10 dk. santrifüj edildi. Serum kısmı ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri gerekli laboratuvar analizleri yapılana dek -80°C 'de muhafaza edildi. Serum örneklerinde Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST), üre, kreatinin, kortizol miktarları ölçüldü. Ölçümler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında biyokimya otoanalizör cihazı kullanılarak yapıldı.

3.7. İstatistik Analiz

Davranış, element analizi sonuçları, IBM SPSS 20 programında Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U test sonrasında Bonferonni düzeltmesi ile değerlendirildi. Anlamlılık derecesi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Metabolomiks için farklı testler kullanıldı. Histopatolojik örnekler kalitatif olarak değerlendirildi.

3.8. Etik Kurul İzni

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 28.03.2023 tarihli, 2023/06-15 karar nolu toplantı ile etik kurul izni ile gerçekleştirilmiştir (EK 1).

4. BULGULAR

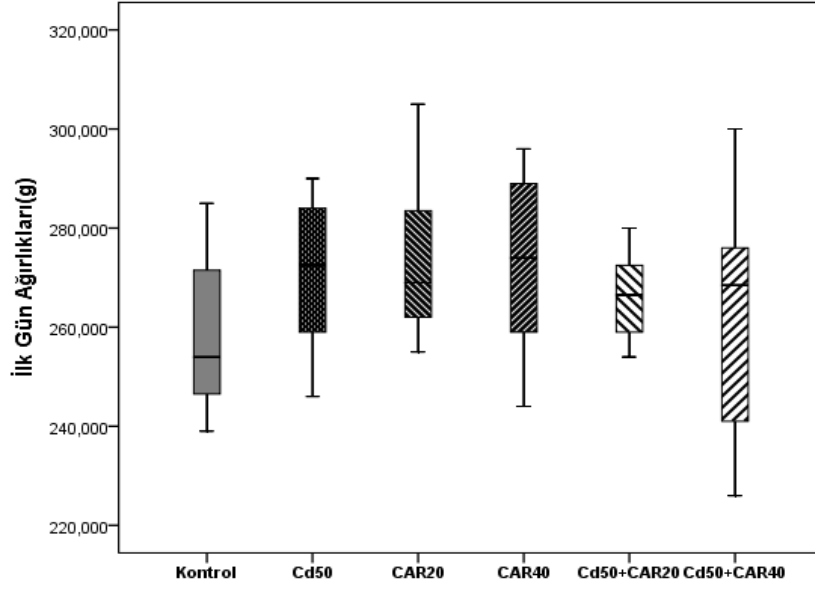
4.1. Hayvanlarda Kilo değişimi

Deney prosedürünün başında ilaç uygulanacağı ilk gün grupların arasında kilo ağırlıkları bakımından anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Deney prosedürünün sonunda, Kontrol, CAR ve Cd uygulanan grupların vücut ağırlıkları ölçüldü ve sonuçlar Tablo 4.2.de verildi. Deney prosedürü sonunda hayvan ağırlıkları bakımından gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Kontrol grubu ile Cd50, Cd50+CAR40 ve Cd50+CAR20 karşılaştırıldığında ve CAR20 mg/kg grubu ile Cd50+CAR20 ile karşılaştırıldığında hayvan kilo değişiminin anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 4.1) (Şekil 4.1 ve 4.2). Hayvan ağırlıkları bakında Cd uygulanan gruplarda baştaki kilolarının altına düşmüşlerdir. Kontrol ve Car uygulana gruplar ise başlangıçtaki kilolarının üzerine çıkmışlardır.

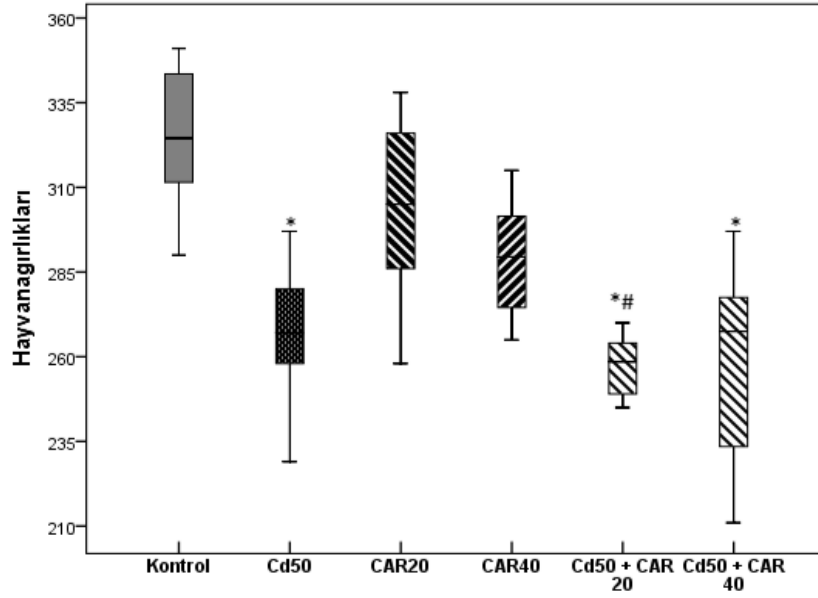
Tablo 4.1. Deney prosedürü başlangıcında ve sonunda grupların vücut ağırlıkları (g)

		K (n=8)	Cd50 (n=8)	CAR20 (n=8)	CAR40 (n=8)	Cd50+CAR20 (n=8)	Cd50+CAR40 (n=8)
	Ortanca	254	272	269	274	266	262
Hayvan Ağırlıkları İlk gün(g)	Min-Max	239-285	246-290	255-305	244-296	254-280	226-300
	Ortalama	258,5	270,8	273,2	273	266,2	262,1
Hayvan Ağırlıkları Son gün(g)	Ortanca	324,5	267 [*]	305	205,5	203 ^{*#}	204 [*]
	Min-Max	290-351	229-297	258-338	265-315	245-270	211 - 297
	Ortalama	325	267	303,7	288,8	257,7	258,1

* ($p<0,05$) Kontrol grubuna göre, #($p<0,05$) CAR20 grubuna göre.



Şekil 4.1. Deney ilk gün hayvanların vücut ağırlıkları karşılaştırılması.



Şekil 4.2. Deney prosedürü sonunda hayvanların vücut ağırlıkları karşılaştırması.
* ($p < 0,05$) Kontrol grubuna göre, # ($p < 0,05$) CAR20 grubuna göre.

4.2. Davranış Test Sonuçları

Hayvan davranış testlerinden anksiyeteyi değerlendirmek için yükseltilmiş artı labirent ve açık alan testi yapılırken, uzaysal hafızayı değerlendirmek için Barnes labirenti testi, lokomotor aktiviteyi değerlendirmede ise rotarod testi kullanıldı.

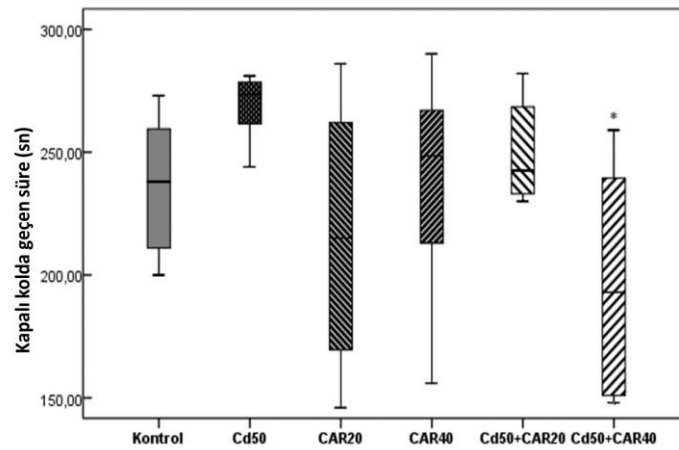
4.2.1. Yükseltilmiş Artı Labirent

Yükseltilmiş artı labirent sonuçlarında açık kollara giriş sayısı, kapalı kollara giriş sayısı, açık kollara giriş yüzdesi, açık kollarda geçirilen süre, kapalı kollarda geçirilen süre ve açık kollarda geçirilen süre yüzdesi kontrol, CAR ve Cd gruplarında değerlendirildi. Cd50 ile Cd50+CAR40mg/kg karşılaştırıldığında kapalı kolda kalma süresi bakımından anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 4.2) (Şekil 4.3).

Tablo 4.2. Yükseltilmiş artı labirent test sonuçları

		K (n=8)	Cd50 (n=8)	CAR20 (n=8)	CAR40 (n=8)	Cd50+CAR20 (n=8)	Cd50+CAR40 (n=8)
Açık Kola Giriş Sayısı	Ortanca	2,5	1,0	1,5	2	3	3
	Min-Max	1 - 5	0 - 3	0 - 5	1 - 4	1 - 5	2 - 5
	Mean	2,7	1,5	1,6	2,1	2,8	3,2
Kapalı Kola Giriş Sayısı	Ortanca	7	4	7	3,5	4	5
	Min-Max	2 - 10	2 - 8	2 - 11	1 - 10	2 - 7	0 - 9
	Mean	6,3	4,2	6,7	4,1	4	5,5
Açık Kola Giriş Yüzdesi (%)	Ortanca	29,1	22,5	17,4	35,4	37,5	34,5
	Min-Max	16,67 - 57,14	0 - 60	0 - 62,50	20 - 50	16,67 - 57,14	18,18 - 100
	Mean	32,5	26,9	20,9	35,2	39,4	41,1
Açık Kolda Geçirilen Süre (sn)	Ortanca	15,5	9,5	10,5	20,5	23	34
	Min-Max	9 - 38	0 - 42	0 - 109	3 - 46	3 - 42	10 - 269
	Mean	18,7	13,7	22,7	22	22,1	58,5
Kapalı Kolda Geçirilen Süre (sn)	Ortanca	238	273,5	215	248,5	242,5	193*
	Min-Max	200 - 273	244 - 281	146 - 286	156 - 290	67 - 282	0 - 259
	Mean	236,2	269	215,5	237,6	229,6	178,2
Açık Kolda Geçirilen Süre Yüzdesi (%)	Ortanca	5,6	3,3	4,8	7,4	8,7	17,5
	Min-Max	4,21 - 13,87	0 - 14,69	0 - 41,44	1,02 - 22,77	1,09 - 38,53	4,61 - 100
	Mean	7,3	4,8	9,5	9,4	11,1	23,6

* ($p<0,05$) Cd50 grubuna göre.



Şekil 4.3. Kapalı kolda geçen sürenin karşılaştırılması. *($p<0,05$) Cd50 grubuna göre.

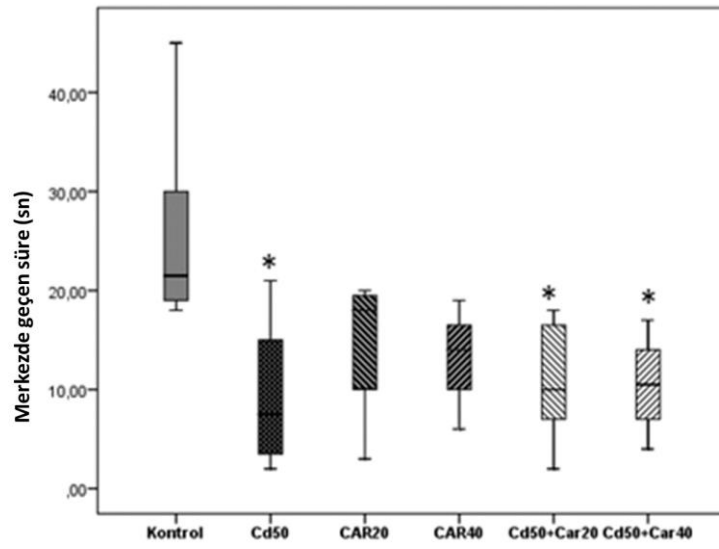
4.2.2. Açık Alan Testi

Açık alan test ile kontrol, CAR ve Cd gruplarında merkez alana giriş sayısı, merkez alanda geçirdikleri süre, merkez alana giriş-çıkış sayısı, şahlanma sayısı, tımarlanma süresi değerlendirildi (Tablo 4.3). Gruplar karşılaştırıldığında kontrol ile Cd50, Cd50+CAR20 mg/kg ve Cd50+CAR40mg/kg arasında merkez alanda geçirilen süre, kenarda geçirilen süre ve merkez alanda geçirilen süre yüzdesi bakımından anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.4-4.6). Ayrıca kontrol ile Cd50 arasında merkeze geçiş sayısı, kenara geçiş sayısı ve merkeze geçiş sayısının yüzdesi bakımından anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.7-4.9). Şahlanma sayısı karşılaştırıldığında Cd50 ile kontrol, CAR20 ve Cd50+CAR20 mg/kg arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.10). Tımarlanma süresi bakımından Cd50 ile CAR40 mg/kg grupları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.11).

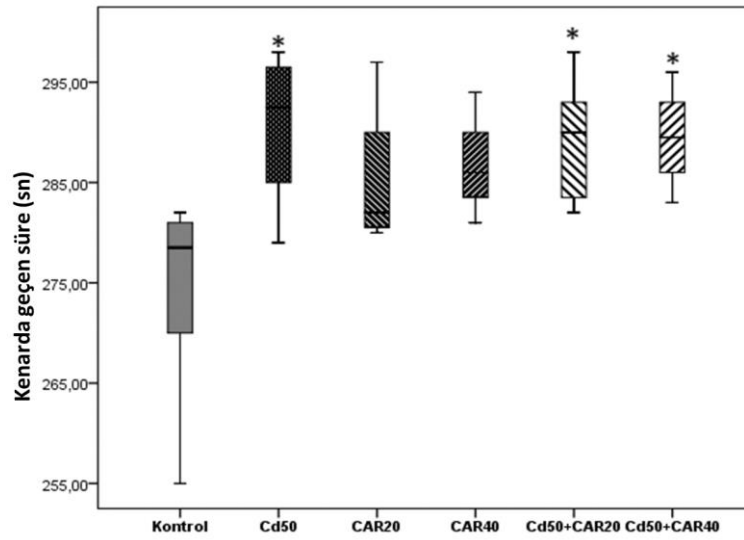
Tablo 4.3. Açık alan test sonuçları

		K (n=8)	Cd50 (n=8)	CAR20 (n=8)	CAR40 (n=8)	Cd50+CAR20 (n=8)	Cd50+CAR40 (n=8)
Merkezde Geçirilen Süre (sn)	Ortanca	21,5	7,5*	18	14	10*	10,5*
	Min -Max	18 - 45	2 - 21	3 - 20	6 - 19	2 - 38	4 - 41
	Ortalama	25,5	9,3	14,7	13,2	13,3	13,5
Kenarda Geçirilen Süre (sn)	Ortanca	278,5	292,5*	282	286	290*	289,5*
	Min -Max	255 - 282	279 - 298	280 - 297	281 - 294	262 - 298	259 - 296
	Ortalama	274,5	290,6	285,2	286,7	286,6	286,5
Merkezde Geçirilen Süre Yüzdesi (%)	Ortanca	7,16	2,5*	6	4,6	3,3*	3,5*
	Min -Max	6 - 15	0,67 - 7	1 - 6,67	2 - 6,33	0,67 - 12,67	1,33 - 13,67
	Ortalama	8,5	3,1	4,9	4,4	4,4	4,5
Merkez Giriş Sayısı	Ortanca	6	1*	5	4	3	2,5
	Min -Max	5 - 8	0 - 4	1 - 9	2 - 6	1 - 10	1 - 7
	Ortalama	6,6	1,7	4,8	4	3,3	3,2
Kenar Giriş Sayısı	Ortanca	7	2*	6	5	4	3,5
	Min -Max	6 - 9	1 - 5	2 - 10	3 - 7	2 - 11	2 - 8
	Ortalama	7,5	2,7	5,7	5	4,3	4,2
Merkez Giriş Sayı Yüzdesi	Ortanca	46,6	33,3*	45,4	44,4	42,8	41,4
	Min -Max	45,45 - 50	0 - 44,44	33,33 - 50	40 - 46,15	33,33 - 47,62	33,33 - 46,67
	Ortalama	46,8	32,7	43,5	43,9	41,5	41,5
Şahlanma Sayısı	Ortanca	25,5 [#]	9	27 [#]	26	15 [#]	21,5
	Min -Max	15 - 38	5 - 18	16 - 36	15 - 42	5 - 54	12 - 30
	Ortalama	25	9,3	26,7	26,5	19,2	20,7
Tımarlanma Süresi (sn)	Ortanca	15,5	0,5	8,5	14,5*	5	4,5
	Min -Max	1 - 37	0 - 18	0 - 54	5 - 39	0 - 10	0 - 13
	Ortalama	16	3	15	18,1	4,3	5
Defakasyon Sayısı	Ortanca	0,5	0	0,5	0,5	0	0
	Min -Max	0 - 2	0 - 2	0 - 7	0 - 6	0 - 4	0 - 3
	Ortalama	0,8	0,5	1,6	1,6	0,8	1,5

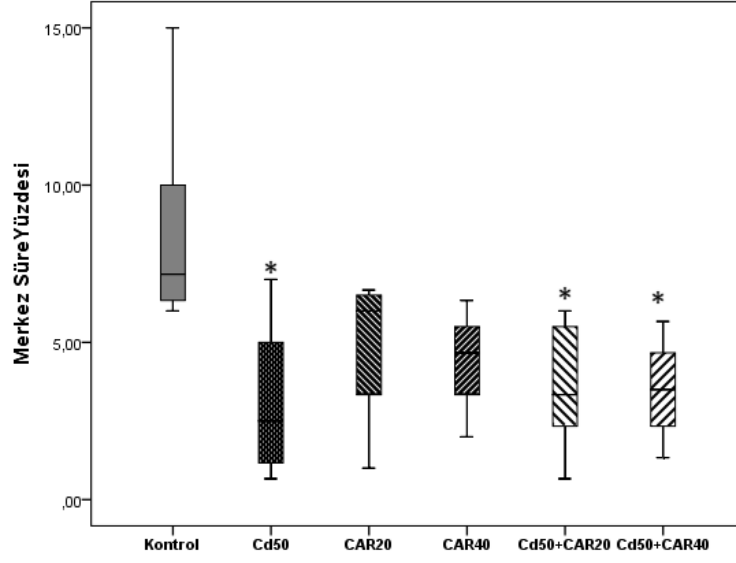
* (p<0,05) Kontrol grubuna göre. # (p<0,05) Cd50 grubuna göre.



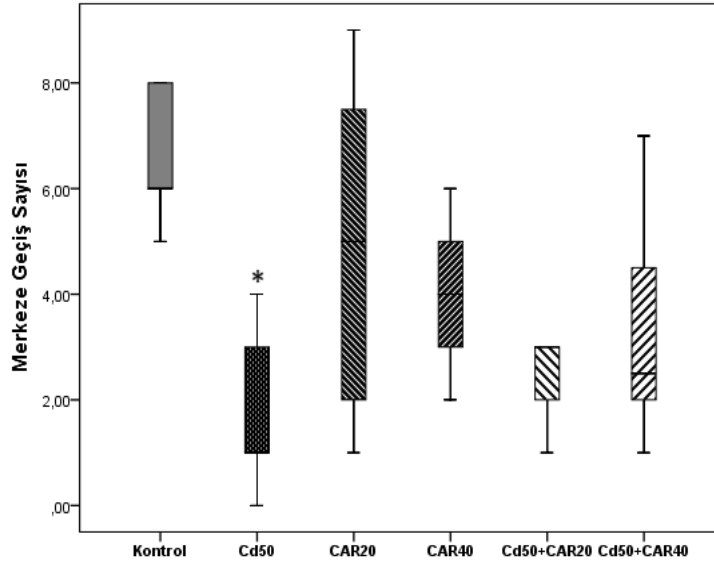
Şekil 4.4. Merkezde geçen sürenin karşılaştırılması. *(p<0,05) Kontrol grubuna göre.



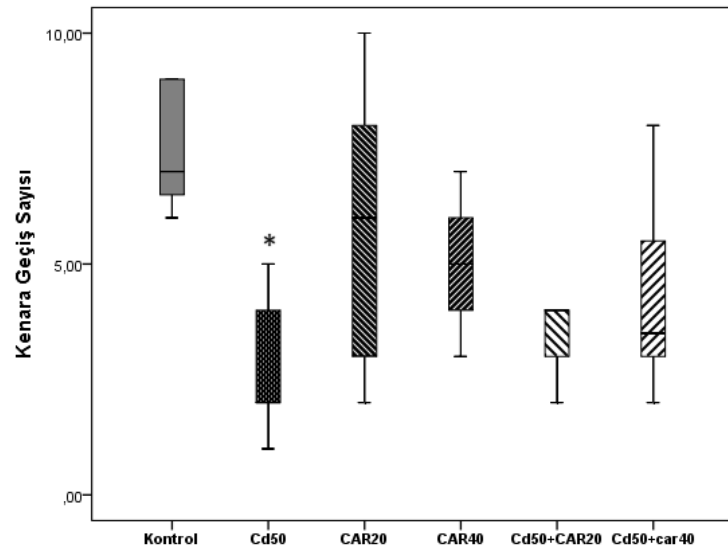
Şekil 4.5. Kenarda geçen sürenin karşılaştırılması. *(p<0,05) Kontrol grubuna göre.



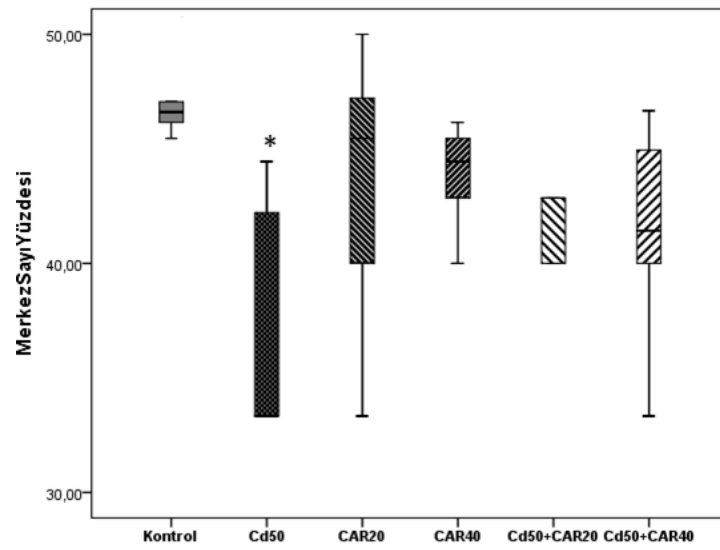
Şekil 4.6. Merkezde geçen sürenin yüzde karşılaştırılması. *($p < 0,05$) kontrol grubuna göre



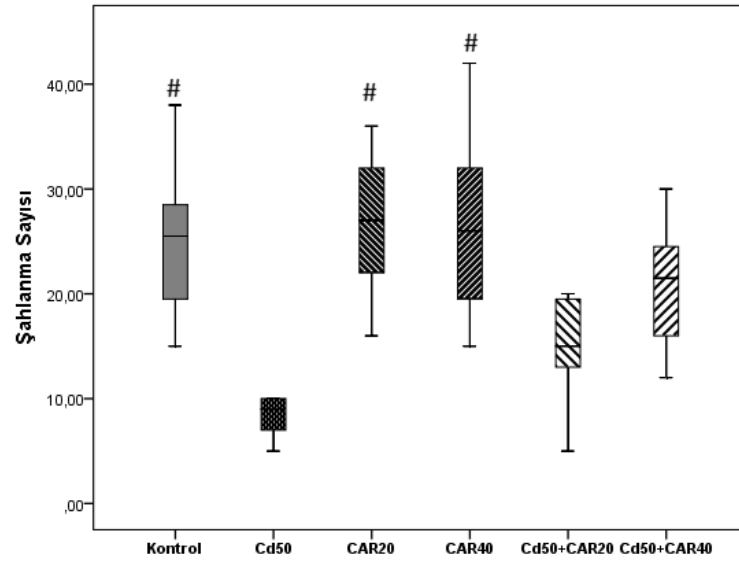
Şekil 4.7. Merkeze geçiş sayısının karşılaştırılması. *($p < 0,05$) kontrol grubuna göre.



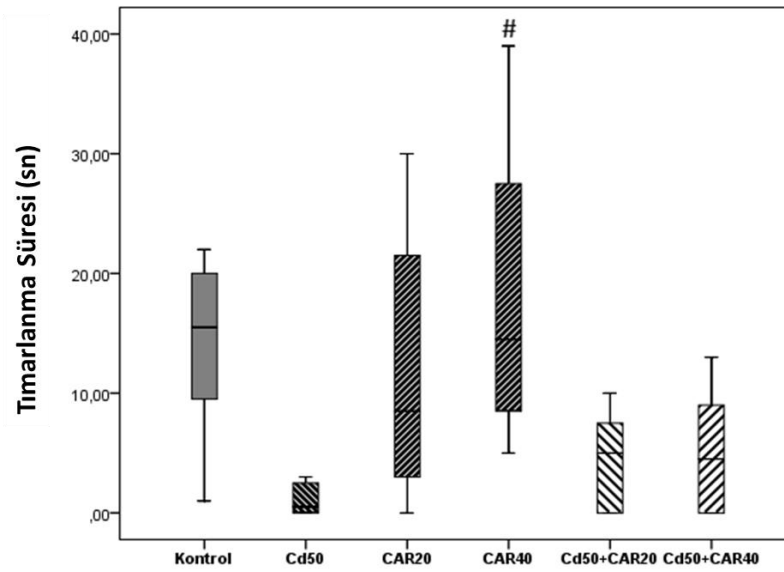
Şekil 4.8. Kenara geçiş sayısının karşılaştırılması. *($p < 0,05$) kontrol grubuna göre.



Şekil 4.9. Merkeze geçiş sayısının yüzdesinin karşılaştırılması. *($p < 0,05$) kontrol grubuna göre.



Şekil 4.10. Şahlanma sayısının karşılaştırılması. #($p < 0,05$) Cd50 grubuna göre.



Şekil 4.11. Tımarlanma süresinin karşılaştırılması. #($p < 0,05$) Cd50 grubuna göre.

4.2.3. Barnes Labirenti

Kontrol, CAR ve Cd uygulanan gruplarda doğru kadranda geçen süre, doğru kadranda geçen süre yüzdesi, hedefi bulana kadar geçen süre, doğru delikten önce bakılan yanlış delik sayısı ve doğru delikten sonra bakılan yanlış delik sayısı karşılaştırıldı. Gruplar karşılaştırıldığında doğru kadranda geçen süre ve doğru kadranda geçen süre yüzdesi bakımından gruplar arasında Kruskal-Wallis testine göre anlamlı fark olduğu görülürken Bonferonni düzeltilmesi yapıldığında anlamlı farkın ortadan kalktığı görüldü ($p>0,05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Barnes Labirenti sonuçları

		K (n=8)	Cd50 (n=8)	CAR20 (n=8)	CAR40 (n=8)	Cd50+CAR20 (n=8)	Cd50+CAR40 (n=8)
Doğru Kadranda Geçen Süre (sn)	Ortanca	67	81	89,5	102	103,5	61,5
	Min - Max	17 - 117	30 - 120	35 - 117	62 - 128	78 - 146	3 - 137
	Ortalama	72,6	74,1	84,2	98,3	108,8	62,5
Doğru Kadranda Geçen Süre Yüzdesi (%)	Ortanca	37,2	45	49,7	56,6	57,5	34,1
	Min - Max	9,44 - 65	16,67 - 66,67	19,44 - 65	34,44 - 71,11	43,33 - 81,11	1,67 - 76,11
	Ortalama	40,3	41,1	46,8	54,6	60,5	34,7
Hedefi Bulana Kadar Süre (sn)	Ortanca	15	49	23,5	14	9,5	31,5
	Min - Max	2 - 90	2 - 180	5 - 58	12 - 42	3 - 42	4 - 180
	Ortalama	26,3	75,5	28,6	23,1	14,1	72,0
Doğru Delikten Önce Yanlış Delik Sayısı	Ortanca	3	5,5	3,5	2,5	1	4
	Min - Max	0 - 8	0 - 20	0 - 14	1 - 6	0 - 8	0 - 18
	Ortalama	3,6	8	4,7	2,8	2	6
Doğru Delikten Sonra Yanlış Delik Sayısı	Ortanca	19,5	13,5	14,5	9,5	14,5	7
	Min - Max	3 - 41	0 - 24	9 - 19	6 - 24	4 - 36	0 - 31
	Ortalama	18,5	12,5	14,5	10,7	15	9,8

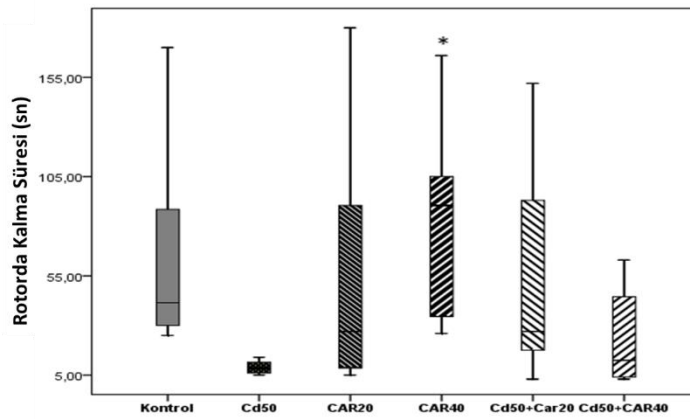
4.2.4 Rotarod Testi Bulguları

Rotarod testinde, gruplar arasında sıçanların rotarod çubuğu üzerinde kalma süreleri karşılaştırıldı. Yapılan istatistik analizine göre Cd50 ile CAR40 arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.12).

Tablo 4.5. Rotarod testi sonuçları

	K (n=8)	Cd50 (n=8)	CAR20 (n=8)	CAR40 (n=8)	Cd50+CAR20 (n=8)	Cd50+CAR40 (n=8)
Düzenek Üzerinde						
Ortanca	41,5	8,5	27,0	90,5*	27,0	12,5
Kalma Süresi (sn)						
Min - Max	25 - 170	5 - 37	5 - 180	26 - 166	3 - 152	3 - 156
Ortalama	64,3	11,7	54,6	81,5	53,7	35,1

* ($p<0,05$) Cd50 grubuna göre.



Şekil 4.12. Rotarod deney düzeneğinde kalma süreleri karşılaştırılması.

*($p<0,05$) Cd50 grubuna göre.

4.3. Metabolomiks Sonuçları

Plazma numunelerindeki metabolitlerin kapsamlı analizleri için iki ortogonal analitik teknik GC-MS ve LC-qTOF-MS kullanıldı. GC-MS ve LC-qTOF-MS analizleri sonucu elde edilen kompleks kromatogramlar MS-DIAL yazılımı kullanılarak ayrıştırıldı ve alıkonma zamanları düzeltildi. GC-MS analizlerinde 294 pik tespit edildi ve bunlardan 83'ü Fiehn ve Golm kütüphaneleri kullanılarak tanımlandı. LC-qTOF-MS analizleri sonucunda pozitif iyonizasyon modunda 866 pik ve negatif iyonizasyon modunda 571 pik tespit edilirken, pozitif iyonizasyon modunda 159, negatif iyonizasyon modunda 41 tanımlandı. Elde edilen veri matrisleri excel dosyasına aktarıldı ve tüm verilen birleştirilerek nihai bir veri matrisi elde edildi.

4.3.1. Tek değişkenli analizler

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren metabolitleri belirlemek için Mann-Whitney U testi uygulandı. Gruplar arası karşılaştırma sonucu Kontrol-Cd50 arasında 54 tane, Kontrol-CAR40 arasında 77 tane, Kontrol-Cd50+CAR20 arasında 69 tane, Cd50-Cd50+CAR40 arasında 52 metabolitte tanesinin birbirinden anlamlı olarak değiştikleri tespit edildi ($p < 0,05$). Bu metabolitler metaboanalyst 7.0 vers. programı kullanılarak MSEA grafikleri elde edildi (Şekil 4.15.a-d).

4.3.2. Çok değişkenli veri analizi

Elde edilen veriler üzerinde ilk önce PCA analizi ile veri setinde herhangi bir aykırı değer olup olmadığı araştırıldı (Şekil 4.13a). Kontrol grubuna ait aykırı değerler veri setinden uzaklaştırıldıktan sonra grupların metabolit profillerinin incelenmesi PLS-DA analizleri ile yapıldı (Şekil 4.13b). Gruplar arasındaki profil farklılıklarının ve bu farkın oluşmasında en yüksek katkıyı veren ilk 20 metabolit VIP grafikleri ile gösterildi (Şekil 4.14b).

Elde edilen metabolitler kullanılarak zenginleştirme analizi yapıldı ve fenotipte en çok değişen metabolitler belirlendi. Önce 4 grup olacak şekilde kontrol, Cd50, CAR40 ve kontrol-Cd50+CAR40 kendi aralarında karşılaştırma yapıldı. Daha sonra gruplar arasında ikili karşılaştırma yapılarak farklılaşmada etkili olan ilk 50 metaboliti içeren sıcak harita analizi yapıldı ve sonuçlar eklendi. Metabolomik analizler sonrasında gruplar arasında anlamlı fark çıkan metabolitler tespit edildi. GC-MS ve

LC-qTOF-MS analizlerinden elde edilen birleştirilmiş veriler PCA ve PLS-DA kullanılarak değerlendirildi (Şekil 4.13a,b). PCA analizi, veri kümesinde herhangi bir sistemik hata veya aykırı değer olmadığını gösterdi. Daha sonra PLS-DA analizi ile yapılan ikili karşılaştırmalar, grupların farklı metabolomik profillere sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.15a, d,g,j). PLS-DA'da farklılaşmaya neden olan metabolitler, VIP grafikleri kullanılarak analiz edildi (Şekil 4.15 b,e,h,k). En yüksek VIP değerine sahip metabolitler, gruplar arasında ayrışmada en etkili metabolitler olarak kabul edilmektedir. VIP grafiklerinden önemli metabolitler tanımlanmış olmasına rağmen gruplar içinde anlamlı değişimler sıcak harita analizleri ile gösterildi (Şekil 4.15 j, k,l).

Ayrıca metabolitler kullanılarak fenotipte en fazla değişiklik yapan yollar, MSEA analizi ile belirlenmeye çalışıldı. Metabolit analizinin bulguları, hem Cd'nin hem de CAR'ın her iki dozunun da sıçanlarda birincil ve ikincil metabolit profillerini değiştirdiğini gösterdi.

Metabolomik çalışmasındaki başlıca amaçlarımız arasında Cd ve CAR uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırılması ayrıca Cd50 uygulanan gruba CAR40 verilmesi sonucu değişen metabolitlerin kontrol ve Cd50 ile karşılaştırılması yer almaktadır. Bu yüzden grup karşılaştırmalarında Cd50 ile CAR40'ın kontrol ile karşılaştırılması Cd50 ile Cd50+CAR 40'ın karşılaştırılması seçildi. Bu grupların karşılaştırılması bize asıl değişen metabolitler hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadır.

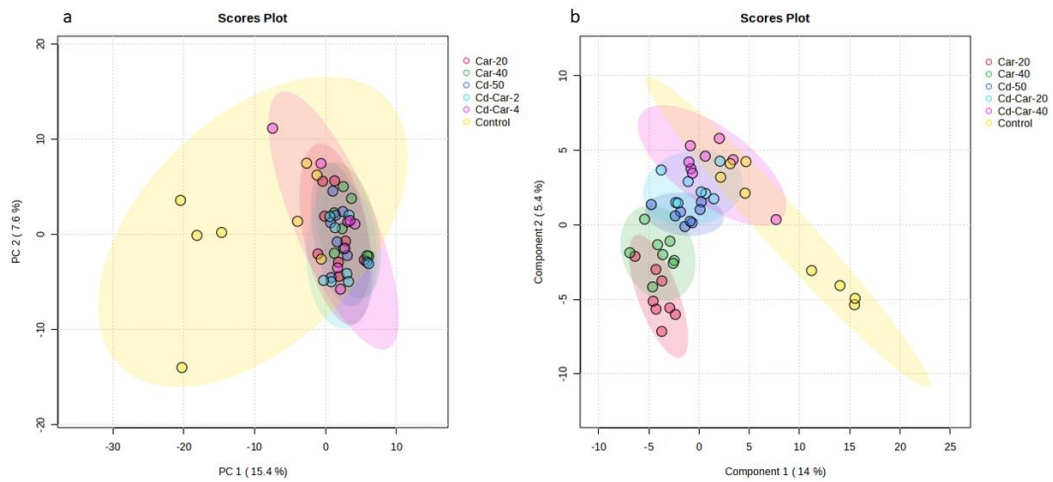
Elde edilen metabolitlere göre yapılan sıcak haritaya göre quinoline, phytospingosine, glycocholate, arachidoyl ethanolamid, benzyl glucopyranosid seviyeleri Cd50 grubunda kontrol grubuna göre daha yüksekti. Benzethonium, pyroglutamic asit, lactamide, linoleik asit, fosforik asit, gamabufotalin, homoserine, araşidonik asit, histidin ise kontrol grubunda daha yüksek olan bazı metabolitlerdi. Benzer bir karşılaştırma CAR40 ve kontrol grupları arasında yapıldığında CAR40 grubunda urocanate, palmitik asit, estragole, rangiformik asit, araşidol etanol, phytospingosine, 8-deoxy-lactucin düzeylerinin daha yüksek olduğu, kontrol grubunda ise 2-ketocaproic asit, lactamide, phosalone, histidine, harpagide, cholic asit düzeylerinin daha yüksek olduğu bulundu.

İkili karşılaştırmalara göre Cd50 grubunda 6,3'-dimethoxyflavone, 8-hydroxy-8-(3-octyloxiran-2-yl)octanoic asit, 9-trans-palmitelaidic asit, arachidonic asit, chlorcyclizine, choline, corynoxine, desferrioxamine B, gamabufotalin, glucosaminic asit, glyceric asit, glycocholate, histidine düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek çıkan metabolitlerden bazılarıdır. 13-oxyingenol dodecanoat, 8-deoxy-lactucin, arachidoyl ethanolamide, benzethonium, cholic asit, indole-3-carbinol düzeyi ise kontrole göre Cd50'de anlamlı derecede düşük çıkan metabolitlerden bazılarıdır.

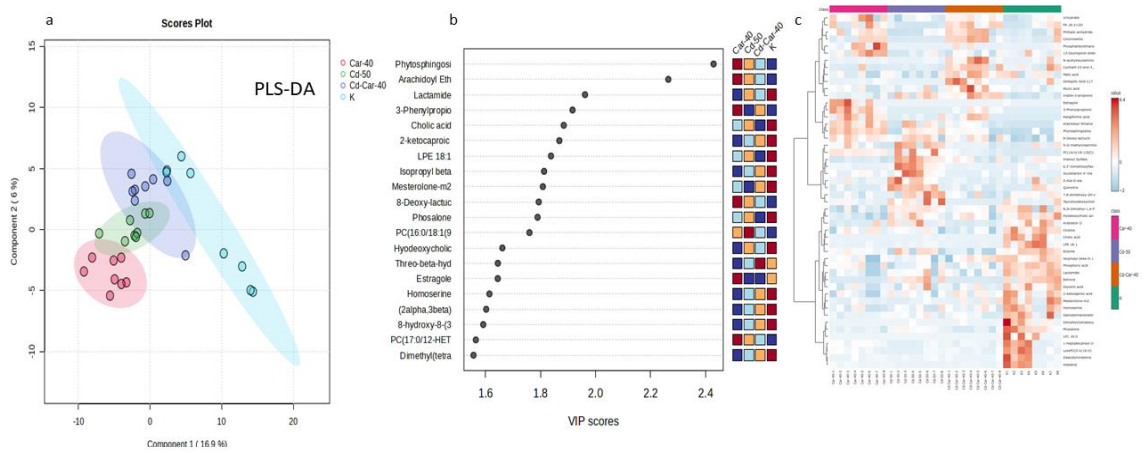
CAR40 ile kontrol grubu karşılaştırılmasında ise CAR40'da kontrole göre anlamlı olarak fazla çıkan metabolitlerin bazıları 2-ketocaproic asit, 2-Methylindole, 3-phosphoglyceric asit, arachidonic asit, cholestane, choline, methionine, oleamide, glyceric asit iken anlamlı olarak düşük çıkanların bazıları arachidoyl ethanolamide, cholic asit, dioctylphthalate, estrone, fucose, glycohyodeoxycholic asittir.

Gruplar arasında değişen metabolomik yolları bulabilmek için gruplar arasında anlamlı değişen metabolitler ($p < 0,05$) kullanılarak MSEA analizi yapıldı.

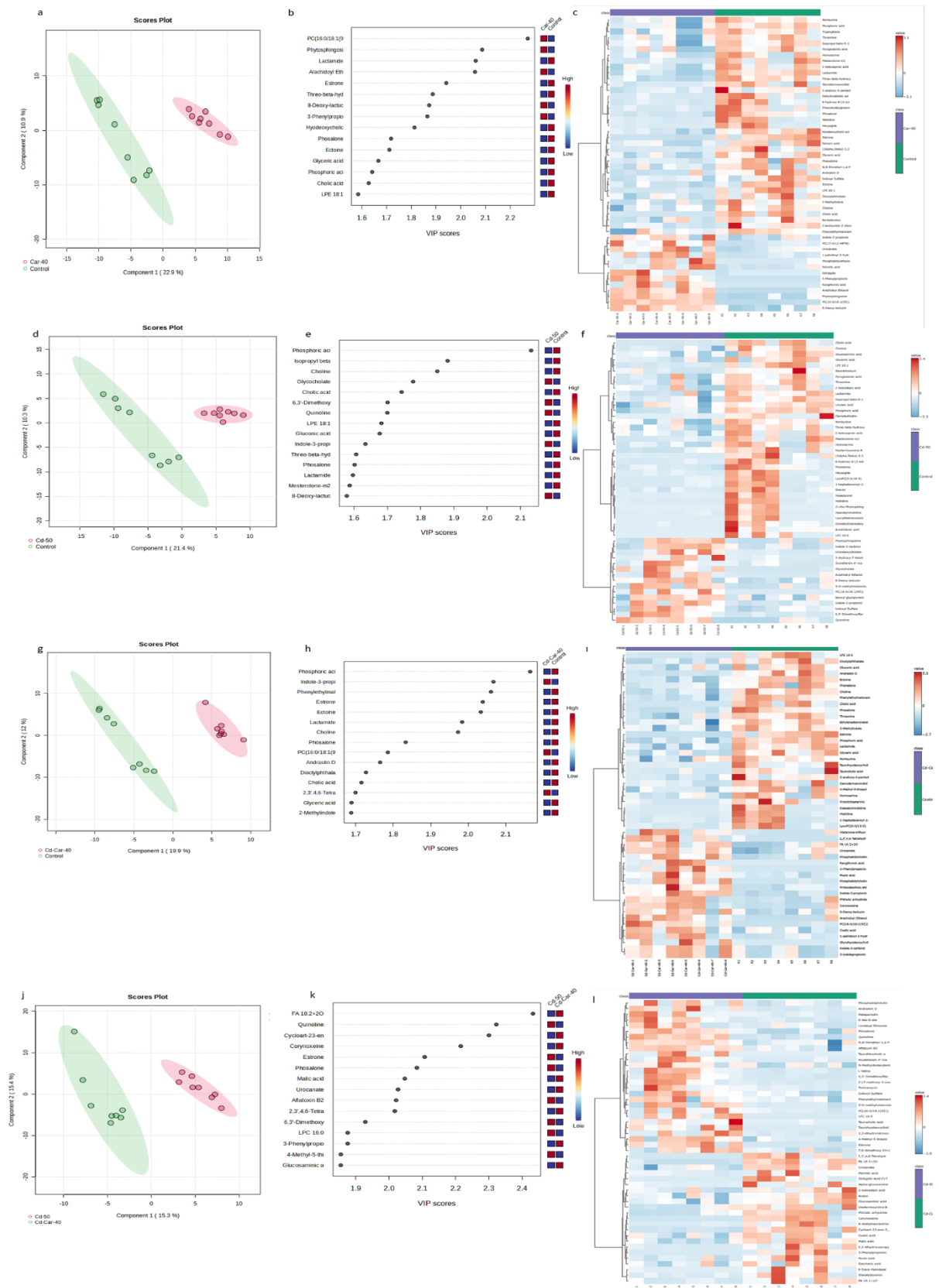
Cd50 ve kontrol grupları karşılaştırıldığında metiyonin metabolizması, fosfotidil fosfat metabolizması, inositol fosfat metabolizması, metilhistidin metabolizmasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gözlemlendi. CAR40 kontrol grubunda karşılaştırıldığında ise glisin ve serin metabolizması, metionin metabolizması, glyserolipid metabolizması, betain metabolizması, fosfatidiletanolamin biyosentezinde anlamlı değişiklikler tespit edildi. Kontrol ve CD50+CAR40 grubu karşılaştırıldığında ürik asit metabolizması, alfa-linolenik asit ve linoleic asit biyosentezi, mitokondriyel elektron transport zinciri, glutatyon metabolizması gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişen yollarlardır.



Şekil 4.13: Kontrol, Cd50, CAR20, CAR40, Cd50+CAR20 ve Cd50+CAR40 grupları plazma örneklerindeki metabolit düzeylerine ait (a)PCA ve (b)PLS-DA skor grafiği



Şekil 4.14: Kontrol, Cd50, CAR40, Cd50+CAR40 grupları plazma örneklerindeki (a)PLSDA, (b)VIP skor grafiği ve (c)ilk 50 metabolit düzeylerine ait sıcak harita analizi.

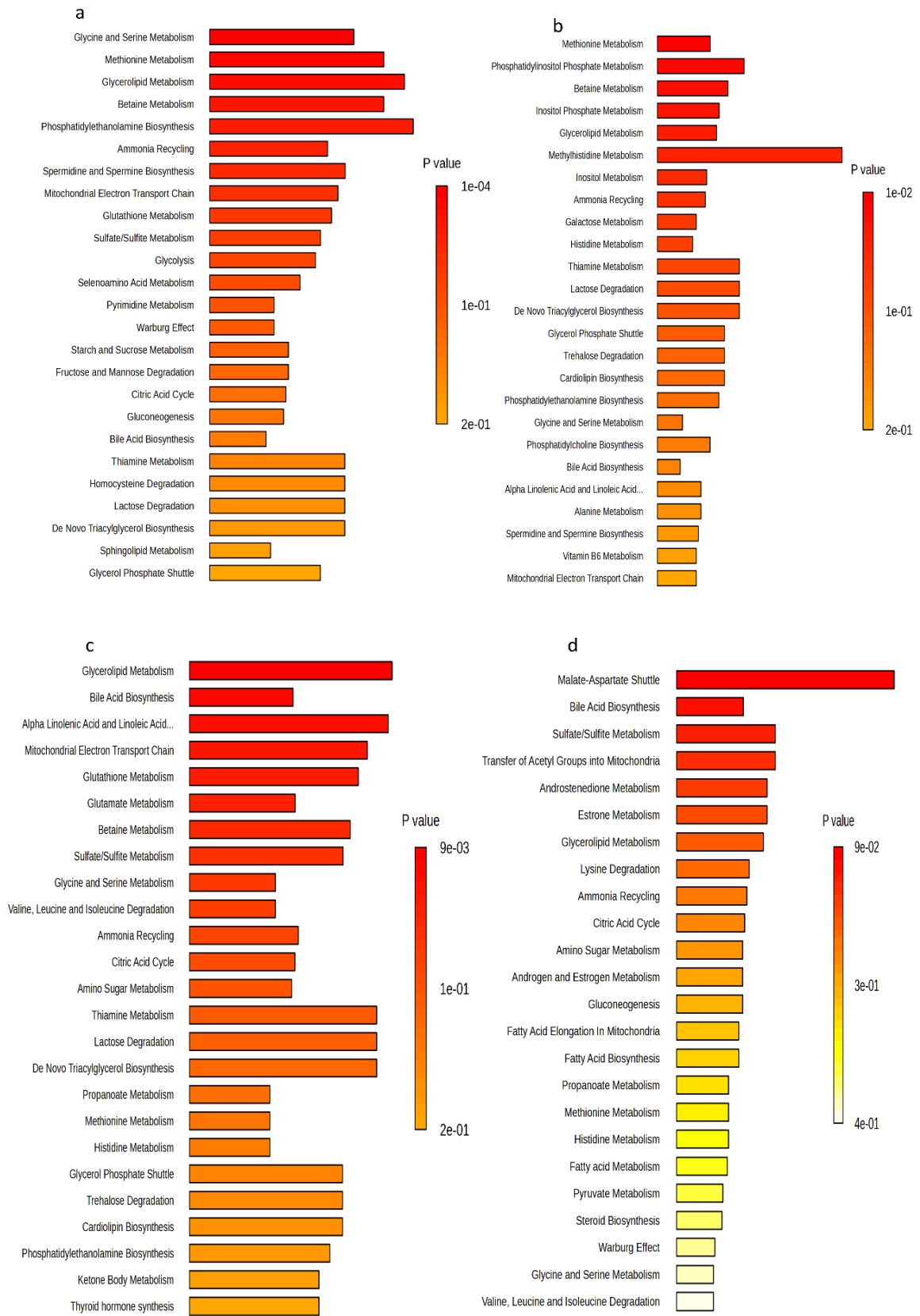


Şekil 4.15. Kontrol, Cd50, CAR40, Cd50+CAR40 plazmalarının ikili karşılaştırma sonucu anlamlı değişen metabolitlere ait PLSDA, VIP ve sıcak harita

grafikleri. (a) Kontrol ve CAR40 gruplarının PLS-DA skor grafiği (b) Kontrol ve CAR40 gruplarını ayırmada etkili olan metabolitlerin VIP grafikleri, (c) Kontrol ve CAR40 gruplarındaki metabolitler için sıcak harita grafiği, (d) Kontrol ve Cd50 gruplarının PLS-DA skor grafiği (e) Kontrol ve CD50 gruplarını ayırmada etkili olan metabolitlerin VIP grafikleri, (f) Kontrol ve CD50 gruplarındaki metabolitler için sıcak harita grafiği, (g) PLS-DA kontrol ve Cd50+CAR40 gruplarının skor grafiği (h) Kontrol ve Cd50+CAR40 gruplarını ayırmada etkili olan metabolitlerin VIP çizelgeleri, (i) Kontrol ve Cd50+CAR40 gruplarındaki metabolitlerin Sıcak harita grafiği, (j) PLS-DA Cd50 ve Cd50+CAR40 gruplarının skor grafiği (k) Cd50 ve Cd50+CAR40 gruplarını ayırmada etkili olan metabolitlerin VIP çizelgeleri, (l) Cd50 ve Cd50+CAR40 gruplarındaki metabolitlerin sıcak harita grafiği. PCA, Temel bileşen analizi; PLS-DA, Kısmi en küçük kareler diskriminant analizi; VIP, Projede önemli olan değişkenler.

4.3.4. Metabolit seti Zenginleştirme Analizi (MSEA)

Yukarıda bahsedilen analizlere ek olarak gruplar arasında ikili karşılaştırma yapılarak gruplar arası anlamlı olarak değişen metabolitlerle MSEA analizi yapıldı ve sonuçlar eklendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Kontrol, Cd50, CAR40 ve Cd50+CAR40 plazmalarının ikili karşılaştırma

sonucu anlamlı değişen metabolitlerle yapılan MSEA analiz sonuçları. (a) Kontrol ve CAR40, (b) Kontrol ve Cd50, (c) Kontrol ve Cd50+CAR40, (d) Cd50 ve Cd50+CAR40

4.4. Karaciğer ve Böbrek Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

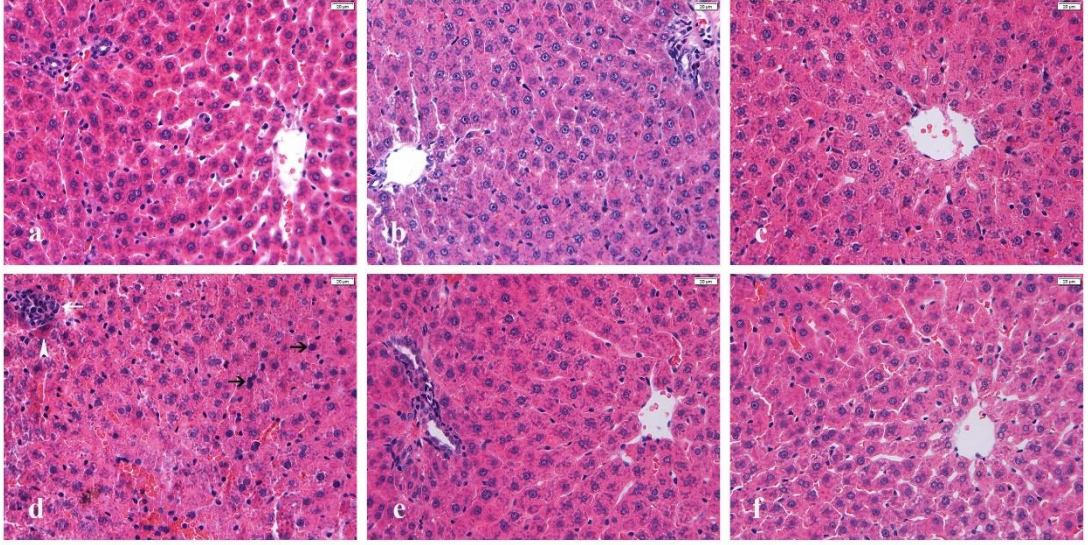
Kontrol, CAR ve Cd'li gruplardan elde edilen karaciğer ve böbrek dokularına ait morfolojik değişiklikler değerlendirildi. Dokular Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda HE ile boyandı ve görüntüledi.

Karaciğer

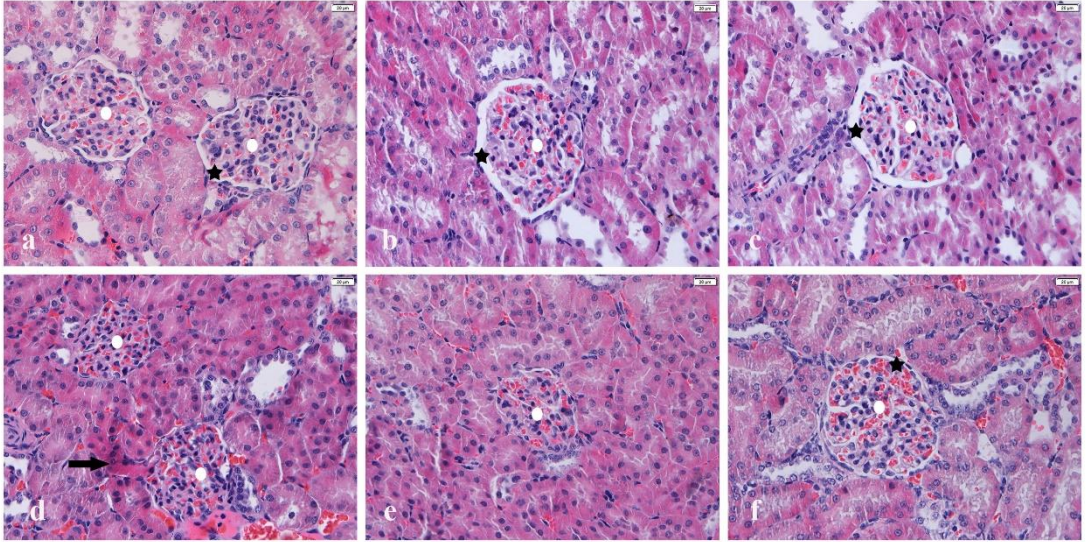
Kontrol, CAR20 ve CAR40 gruplarında normal morfoloji gözlemlendi. Cd50 grubunda, Lökosit infiltrasyonu (beyaz ok), piknotik hepatosit çekirdekleri (siyah ok) ve hepatosit sitoplazmasında artmış asidofilik (beyaz ok başı) tespit edildi. Cd+CAR20 ve Cd+CAR40 gruplarında ise karaciğer normal morfolojide gözlemlendi (Şekil 4.16).

Böbrek

Kontrol, CAR20 ve CAR40 gruplarında böbrek, normal morfolojide gözlemlendi. Cd50 grubunda glomerüllerde dilatasyon, Bowman boşluğunun daralması, tübül epitel hücrelerinde artmış asidofilik boyanma görüldü. Cd+CAR20 grubunda, glomerüllerde dilatasyon, Bowman boşluğunun daralması bir miktar düzelmiş, ancak hala belirgin olarak tespit edildi. Cd+CAR40 grubunda ise, glomerüllerde dilatasyon, Bowman boşluğunun daralması çok daha az gözlemlendi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Karaciğer dokularına ait histopatolojik analiz. Kontrol grubu (a), CAR20 grubu (b), CAR40 grubu (c), Cd50 grubu (d), Cd50 + CAR20 grubu (e), Cd50 + CAR40 grubunda (f). Hematoksilen ve eozin boyaması, bar 20 mikrometre uzunluğu temsil etmektedir.



Şekil 4.18. Böbrek dokularına ait histopatolojik analiz. Kontrol grubu (a), CAR20 grubu (b), CAR40 grubu (c), Cd50 grubu (d), Cd50+CAR20 grubu (e), Cd50+CAR40 grubu (f), Hematoksilen ve eozin boyaması, bar 20 mikrometre uzunluğu temsil etmektedir.

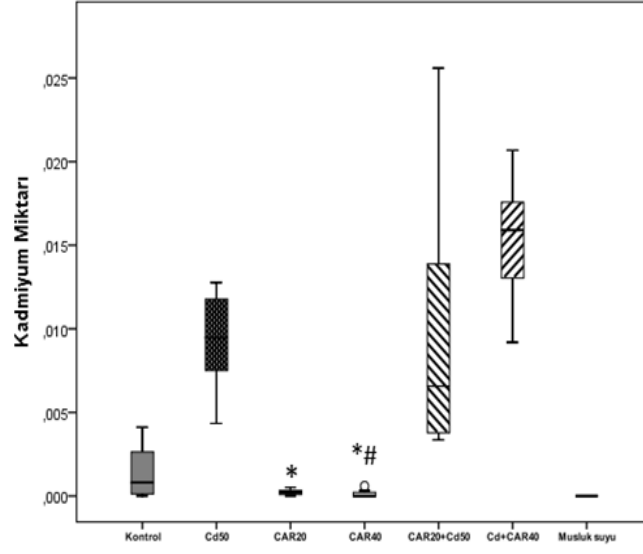
4.5. Plazmada Bulunan Elementlerin Değerlendirilmesi

ICP-OES analizinde, sıçanlardan alınan plazmada As, Cd, Ca, Fe ve Zn değerleri gruplar arasında karşılaştırıldı. Cd'un plazmadaki elementleri etkilediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan istatistik analizine göre plazma Cd miktarı Cd50+CAR40 ile CAR40 ve CAR20 mg/kg karşılaştırıldığında ayrıca Cd50+CAR20 ile CAR40 mg/kg karşılaştırıldığında anlamlı fark elde edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.18). Yapılan istatistik analizine göre Cd50 grubu plazma Zn miktarı Cd50+CAR40 ve CAR20 ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edildi ($p<0,05$) (Tablo 4.6) (Şekil 4.18 ve 4.19).

Tablo 4.6. Plazmada bulunan bazı elementlerin miktarları (ppm)

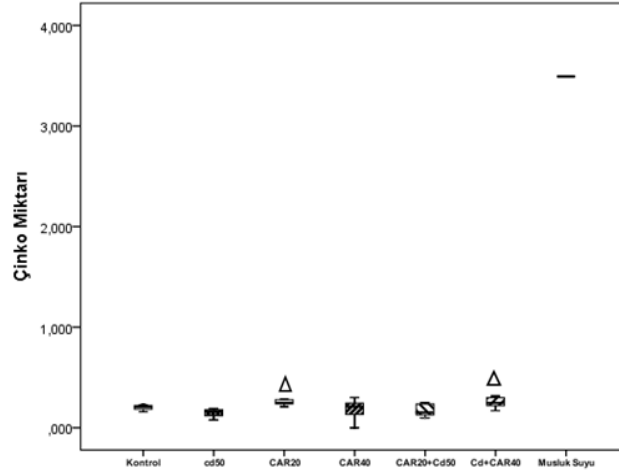
		K (n=8)	Cd50 (n=6)	CAR20 (n=8)	CAR40 (n=7)	Cd50+CAR20 0 (n=6)	Cd50+CAR40 (n=8)	Musluk suyu (n=1)
Arsenik miktarı (ppm)	Ortanca	0,018	0,02	0,028	0,020	0,026	0,030	0,011
	Min-max	0,012-0,87	0,012,0,026	0,23-0,34	0,01-0,33	0,022-0,031	0,025-0,038	
	Ortalama	0,026	0,021	0,028	0,020	0,026	0,031	
Kalsiyum miktarı (ppm)	Ortanca	14,05	16,51	18,01	14,56	14,20	17,09	47,59
	Min-max	10,69-21,45	10,85-19,04	13,65-21,45	0-19,21	12,47-15,51	13,68-21,44	
	Ortalama	14,7	15,7	17	12,1	14,1	16,8	
Kadmiyum miktarı (ppm)	Ortanca	0,0008	0,094	0,0002*	0,000005*#	0,065	0,15	0
	Min-max	0-0,051	0,004-0,12	0-0,0005	0-0,0006	0,0034-0,25	0,0092-0,02	
	Ortalama	0,008	0,009	0,0002	0,0001	0,009	0,015	
Demir miktarı (ppm)	Ortanca	0,23	0,23	0,35	0,23	0,20	0,30	0,017
	Min-max	0,12-0,36	0,15-0,29	0,20-0,49	0-0,32	0,14-0,24	0,22-0,44	
	Ortalama	0,24	0,24	0,33	0,19	0,19	0,31	
Çinko miktarı (ppm)	Ortanca	0,20	0,16	0,24 ^Δ	0,20	0,15	0,24 ^Δ	3,49
	Min-max	0,15-0,28	0,07-0,19	0,021-0,28	0-0,3	0,097-0,24	0,17-0,31	
	Ortalama	0,20	0,14	0,25	0,18	0,16	0,25	

*($p<0,05$) Cd50+CAR40 grubuna göre. # ($p<0,05$) Cd50+CAR20 grubuna göre. ^Δ ($p<0,05$) Cd50 grubuna göre.



Şekil 4.19. Plazmadaki kadmiyum miktarının karşılaştırılması.

*($p < 0,05$) Cd50+CAR40 grubuna göre. # ($p < 0,05$) Cd50+CAR20 grubuna göre.



Şekil 4.20. Plazmadaki çinko miktarının karşılaştırılması. Δ ($p < 0,05$) Cd50 grubuna göre.

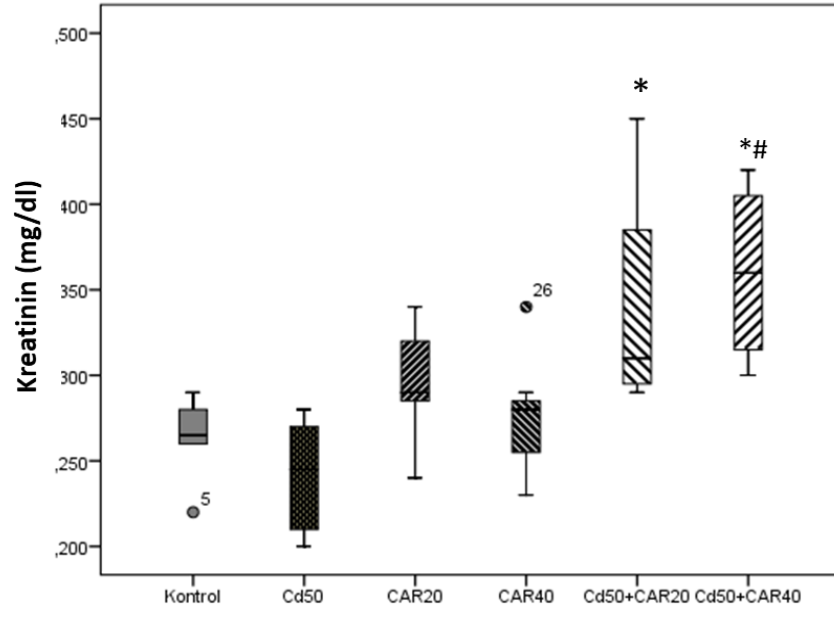
4.6. Serum Biyokimya Parametrelerine ait Bulgular

Serum biyokimya parametreleri analizinde, sıçanlardan alınan serumda kreatinin, üre, ALT, AST, kortizol değerleri gruplar arasında karşılaştırıldı. Yapılan istatistik analizine göre serum kreatinin miktarı kontrol ile Cd50+CAR40 grupları arasında; Cd ile de Cd50+CAR20 ve Cd50+CAR40 arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.21). Serum üre miktarı Cd50+CAR20 ile kontrol, CAR20 ve CAR40 grupları arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.22). Serum ALT miktarı Cd50+CAR20 ile kontrol, CAR20 ve CAR40 arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$). (Şekil 4.23). Serum kortizol miktarı Cd50+CAR40 ile kontrol, CAR20 ve CAR40 grupları arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$). (Şekil 4.24).

Tablo 4.7. Serum biyokimya parametreleri

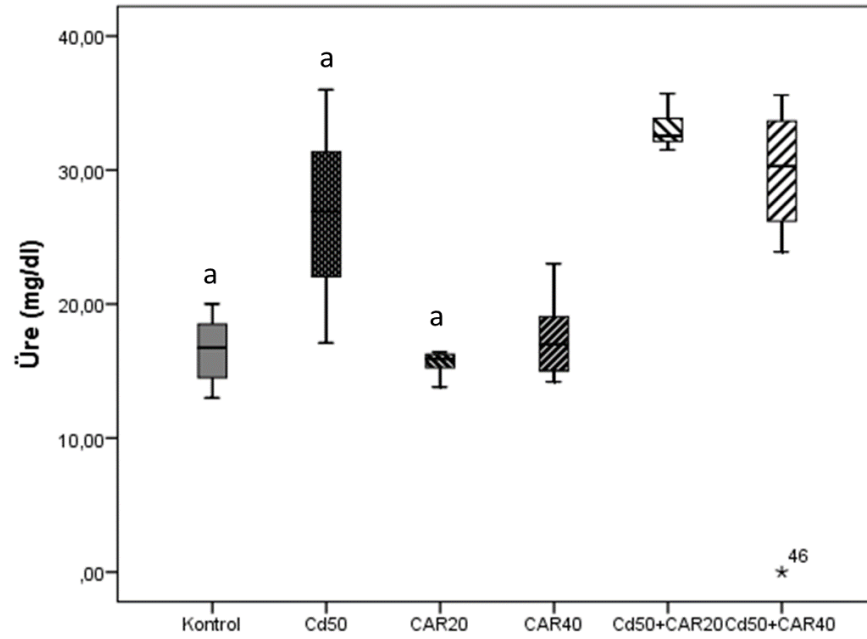
		K (n=8)	Cd50 (n=8)	CAR20 (n=7)	CAR40 (n=7)	Cd50+CAR20 (n=8)	Cd50+CAR40 (n=7)
Kreatinin (mg/dl)	Ortanca	0,26	0,24	0,29	0,28	*0,31	*#0,36
	Min-max	0,22-0,29	0,24-0,008	0,24-0,34	0,23-0,34	0,29-0,45	0,30-0,42
	Ortalama	0,26	0,26	0,29	0,17	0,34	0,36
Üre (mg/dl)	Ortanca	^a 16,7	^a 26,9	^a 15,9	17	32,5	30,3
	Min-max	13-20	17-36	13,9-19	14,2-23	31,5-35,7	0-35,6
	Ortalama	16,5	26,7	15,9	17,4	33,0	33,0
AST (U/L)	Ortanca	132	132,5	137	124	156	158
	Min-max	92-142	97-198	93-161	107-186	131-200	149-187
	Ortalama	126,8	140,3	134	133	155	164,5
ALT (U/L)	Ortanca	^{ab} 73	^a 91,5	^{ab} 75	71	158	154
	Min-max	59-94	67-106	56-102	58-105	123-170	126-224
	Ortalama	73,8	89	75,5	75	155,5	164,8
Kortizol (µg/dL)	Ortanca	^b 0,20	^b 0,54	0,48	^b 0,16	0,40	0,67
	Min-max	0,12-0,54	0,18-1,04	0,14-0,8	0-0,33	0,10-0,81	0,37-1,04
	Ortalama	514,2	177,7	355	239,8	155,6	152,2

#Kontrol grubuna göre *($p<0,05$) Cd50 grubuna göre. # ($p<0,05$) Cd50+CAR40 grubuna göre. ($p<0,05$) Cd50 grubuna göre.

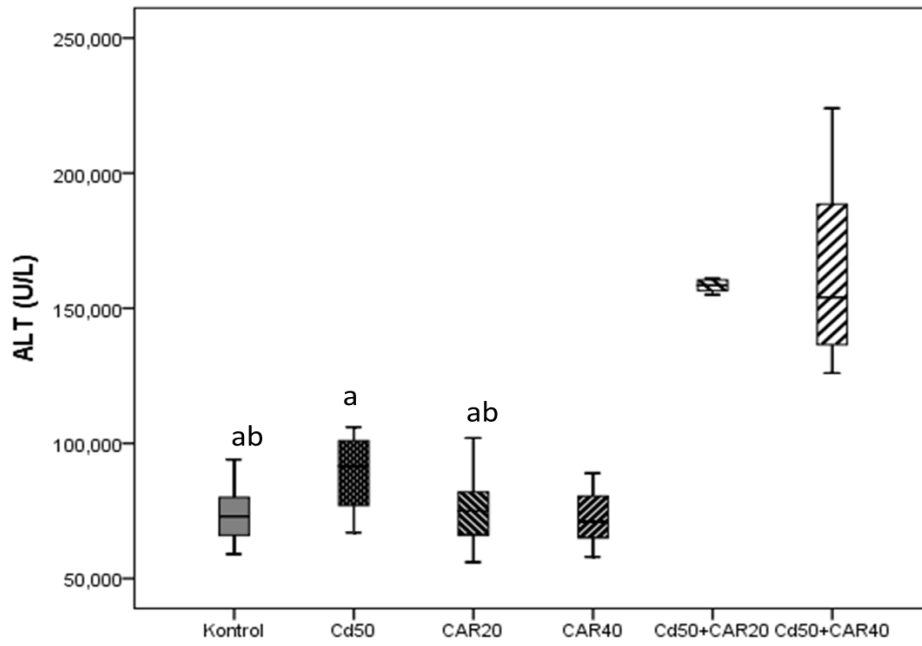


Şekil 4.21. Serum biyokimya kreatinin parametrelerine ait bulgular.

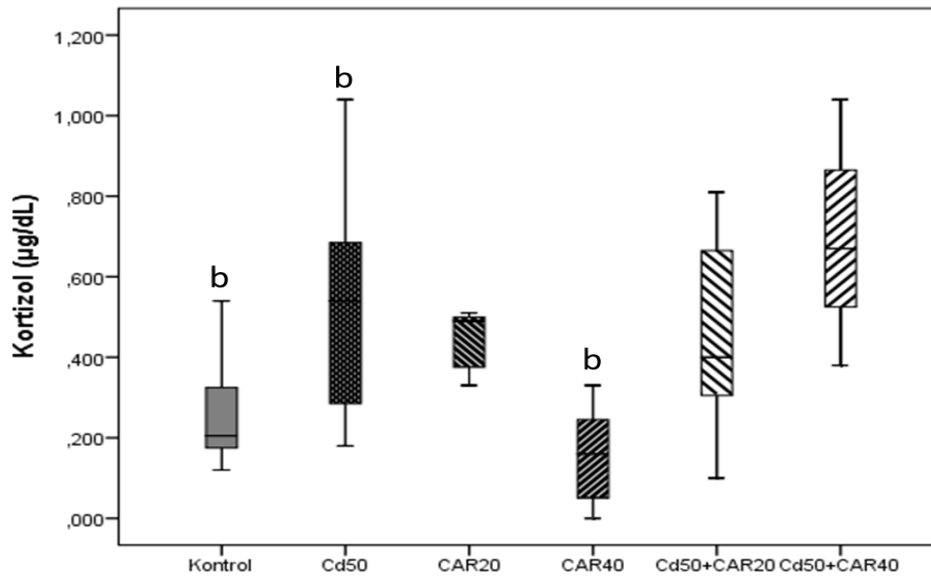
($p < 0,05$) Kontrolle göre, * ($p < 0,05$) Cd50 grubuna göre.



Şekil 4.22. Serum biyokimya üre parametrelerine ait bulgular. ^a Cd+CAR20 grubuna göre



Şekil 4.23. Serum biyokimya ALT parametrelerine ait bulgular. ^a Cd+CAR20 grubuna göre, ^b Cd+CAR40 grubuna göre.



Şekil 4.24. Serum biyokimya Kortizol parametrelerine ait bulgular. ^b Cd+CAR40 grubuna göre.

5. TARTIŞMA

5.1. Hayvanlarda kilo değişimi

Hayvanların uygulamaların başlayacağı ilk gün grupların kilo ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktu. Bu durum grupların kilo dağılımlarına göre homojen dağıtılarak protokollere başlandığını göstermektedir. İlk gün ve son gün hayvan kilo ortalamalarına bakıldığında Cd uygulanan gruplar dışında diğer grupların kilo aldığı tespit edilmiştir. Hayvanların son gün ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında Cd uygulanan tüm gruplarda kontrole göre anlamlı olarak kilolarının az olduğu tespit edilmiştir. Cd'nin tek başına veya CAR ile beraber uygulandığı gruplarda ortalamalara bakıldığında hayvanların kilo verdiği tespit edildi. Cd50+CAR20 son gün ağırlığında CAR20'ye göre anlamlı olarak kilo kaybı görüldü. Bu durum Cd uygulanan gruplarda CAR'ın kilo alımı üzerine koruyucu bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Kontrol grubuna benzer şekilde hayvan ağırlığı artışı CAR20 grubunda görülmüştür. Bu kilo kaybının Cd'nin toksik etkisine bağlı olarak organ işlevlerinin bozulmasından dolayı olabileceği savunulmaktadır (145).

5.2. Davranış Testleri

5.2.1. Açık Alan Testi ve Yükseltilmiş Artı Labirent

Açık alan testinde anksiyolitik (anksiyete azaltıcı) ve anksiyojenik (anksiyeteyi arttırıcı) etkileri değerlendirebilmek için merkez ve kenar alanda geçirilen süre, merkez ve kenar alana giriş çıkış sayısı ve yüzdesi, tımarlanma süresi, şahlanma ve dışkılama sayısı incelenmiştir. Açık alan testinde merkeze giriş sayısı ve süresi hem anksiyolitik benzeri davranışlar hakkında bilgi verirken hem de hayvanların lokomotor aktiviteleri hakkında da bilgi verebilmektedir. Açık alan testinde anksiyete benzeri davranışların değerlendirilmesinde merkez veya kenar alanlara giriş-çıkış sayısı ve bu alanlarda geçirilen süre bulguları ana parametreler olarak kabul edilmektedir. Tımarlanma ve şahlanma aktiviteleri bulguları ise grupları kıyaslamada destekleyici parametreler olarak kullanılabilir (146). Merkeze giriş sayısı ve merkez alanda geçirilen süre artarsa kullanılan molekülün hayvanlar üzerinde anksiyete azaltıcı tam tersi durumda ise anksiyeteyi arttırıcı bir molekül olabileceği kabul edilmektedir. Cd uygulanan tüm gruplarda merkez alanda geçirilen süre, kenarda geçirilen süre ve

merkez alanda geçirilen süre yüzde, kenara geçiş sayısı ve süresi birlikte değerlendirildiğinde kontrole göre Cd'nin anksiyete benzeri davranışları artırdığı yorumu yapılabilir. CAR'ın Cd ile birlikte olduğu gruplarda bu açıdan iyileşme olmadığı hatta genel olarak anksiyete benzeri etkileri artırdığı söylenebilir. Açık alan testi sonuçlarımıza göre Cd'nin toksik etkilerinden dolayı hayvanlarda lokomotor hareket kısıtlılığına ve anksiyojenik benzeri hareketlerin artışına neden olabildiği, CAR'ın ise bu durumu geri çevirmede etkili olmadığı söylenebilir.

Hayvanlarda anksiyetenin azaldığına dair bir parametre olarak değerlendirilen şahlanma sayısının Cd50 grubunda diğer Cd uygulanmayan gruplara göre daha az görülmesi Cd'ye bağlı anksiyete artışı olarak değerlendirilebilir. Cd50 ile karşılaştırıldığında Cd50+CAR20 grubunda anlamlı fark artış gözlenmesi bu parametre açısından CAR'ın kısmen koruyucu etkisine işaret etmektedir.

Gruplar karşılaştırıldığında tımarlanma süresi bakımından Cd50'nin CAR40 mg/kg'a göre anlamlı derecede düşük gözlenmesi iki yönde değerlendirilebilir. Tımarlanma süresinin uzamasının kullanılan molekülün anksiyojenik etkisinin bir göstergesi olduğuna dair bir görüş varken diğer görüşe göre bu durum hayvanın motor aktivitesi hakkında bilgi verebildiğidir. Cd50 grubunda CAR40 mg/kg grubuna göre anlamlı oranda tımarlanma süresi azdır. Tımarlanma ve şahlanma sayısındaki azalma birbirinden zıt anksiyete göstergeleri olmakla birlikte her ikisinin de Cd 50'de azalması bu gözlemlerin daha çok lokomotor aktivite azalmasına bağlı olarak gerçekleştiğini düşündürmektedir. Cd'nin sıçanlara uygulandığı çalışmalarda da Cd'nin rotarod testle gösterildiği üzere hayvanların lokomotor aktivitesini azalttığı bilinmektedir (147).

İnsanlarda Cd'ye bağlı depresif semptomların artan oksidatif stres, inflamasyon ve bozulmuş amino asit metabolizmasına bağlı olduğunu ortaya koyan çalışmalar gözönüne alındığında anksiyete benzeri davranışların artışında da yine bu anılan faktörlerin etkili olduğu düşünülebilir (148).

Anksiyolitik benzeri davranışları değerlendirmede bir diğer önemli test olan yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollara giriş sayısı, kapalı kollara giriş sayısı, açık kollara giriş yüzdesi, açık kollarda geçirilen süre, kapalı kollarda geçirilen süre ve açık kollarda geçirilen süre yüzdesi sıklıkla olarak değerlendirilmektedir (149).

Çalışmamızda gruplardan Cd50 ile Cd50+CAR40mg/kg karşılaştırıldığında kapalı kolda kalma süresi bakımından Cd'nin anlamlı derecede uzun olması Cd50'nin anksiyojenik etkisinin olduğu, CAR'ın yüksek doz (40mg/kg) oral uygulanmasının subakut dönemde Cd+CAR40 grubunda bu etkiyi düzeltici yönde olduğu şeklinde değerlendirilebilir. Yapılan davranış çalışmalarında da akut dönem intraperitoneal uygulanan Cd gruplarında doza bağlı, anksiyete ve depresyon benzeri davranışlarda ayrıca oksidatif stres parametrelerinde artış gösterilmiştir (133). Çalışmamızda oksidatif stres parametrelerine bakılmamakla birlikte Cd'nin davranış parametrelerini değiştirmesinde KBB'ni kolay geçmesi (38) ve burada oksidatif strese neden olmasıyla (149) beraber davranış parametrelerinin olumsuz yönde etkilendiğine dair literatür verilerini destekleyen bulgular gözlemlendi.

5.2.2. Barnes Labirenti

Kontrol, CAR ve Cd uygulanan gruplarda doğru kadranda geçen süre, doğru kadranda geçen süre yüzdesi, hedefi bulana kadar geçen süre, doğru delikten önce bakılan yanlış delik sayısı ve doğru delikten sonra bakılan yanlış delik sayısı en çok irdelenen parametrelerdir (139).

Test sonuçlarında Cd50 grubunda diğer CAR uygulanan veya Cd ile beraber CAR uygulanan gruplara göre doğru kadranda geçen süre ve süre yüzdesi daha az olmasına rağmen anlamlı farklılık tespit edilemedi. Barnes labirenti testinde Cd'nin nörotoksik etkisine bağlı olarak öğrenme bellek test sonuçlarını etkileme potansiyeli taşıdığı düşünülebilir ancak bu önermenin doğrulanması için daha çok hayvan ve/veya daha uzun maruziyet süreleri test edilebilir.

Cd maruziyetinin sinir sistemi fonksiyonunu etkileyerek (150) anksiyete benzeri davranışlarda artışa, konsantrasyonda azalmaya, öğrenme güçlüğü'nün ortaya çıkmasına sebep olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (18). Çalışmamızın davranış bulguları birlikte değerlendirildiğinde Cd'nin sinir sistemi üzerinde olumsuz etkiye neden olduğuna dair literatür verilerini destekler niteliktedir. Bu kapsamda günümüzde çeşitli aromatik tıbbi bitkilerde bulunan etken maddeler çok sayıda nörotoksik ajanın etkilerinin önlenmesi amacıyla araştırılmaktadır (25). Çalışmamızın bu anlamda Cd nörotoksitesine karşın CAR'ın incelenen parametreler dahilinde kısmen koruyucu etkisini gösterdiğini ve bu alana veri sağlandığını düşünmekteyiz.

Cd'nin hem anksiyete benzeri davranışlar hem öğrenme-bellek üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar bizim bulgularımızı desteklemektedir. Lamtai ve ark. kronik dönemde intraperitoneal Cd uygulanmasında depresyon benzeri davranışların, erkeklerde tüm Cd dozlarında, dişilerde sadece 1 mg/kg Cd dozunda gözlenmiş olduğunu ve daha düşük dozlarda anlamlı değişiklik gözlenmediğini belirtmişlerdir (18). Anksiyojenik etkisi her iki cinsiyette de doza bağlı olarak 0,25 mg/kg'da başlamış ve 1 mg/kg dozunda maksimuma ulaşmıştır. Ayrıca çalışan hafıza, uzaysal öğrenme ve belleğin 1 mg/kg'da önemli ölçüde bozulduğu gösterilmiştir. Cd'nin hipokampustaki nitrik oksit ve lipid peroksidasyon seviyelerini her iki cinsiyete de arttırdığı, incelenen tüm parametrelerde değişikliklerin cinsiyete ve doza bağlı olabileceği ortaya konmuştur (18). Bizim çalışmamızda intraperitoneal yerine oral gavaj uygulamasının seçilmiş olmasının nedeni intraperitoneal uygulamada hayvanlarda Cd'ye bağlı organ yapışıklıklarının gözlenmiş olması, oral gavajda ise böyle bir durumun tespit edilmemiş olmasıdır. Kamel ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada gebe ratlara gebeliğin 7. gününden yavruyu süttten kesene kadarki süreçte içme sularına Cd katılmıştır. Annenin yüksek dozlarda Cd'ye maruziyetinin, yeni doğanların doğum ağırlıklarının daha az olmasına, yavrularda bazı gelişimsel olaylarda gecikmenin yanı sıra anksiyete benzeri davranışların artışına neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yavruların motor gelişiminde ve motor koordinasyonlarında Cd maruziyetine bağlı gerilik olduğu da gösterilmiştir (151).

5.3. Lokomotor Aktivite Testi

5.3.1. Rotarod Testi

Rotarod testinde, gruplar arasında sıçanların rotarod çubuğu üzerinde kalma sürelerinin karşılaştırılması, Cd50 grubunda gözlenen motor aktivitedeki azalışın Cd'nin gerek beyindeki gerekse nöromüsküler etkileşimde rol oynayan yapılar üzerinde olumsuz etkide bulundu ve CAR'ın bu durumu tersine çevirici etkide yeterli olmadığı şeklinde değerlendirilebilir.

Davranış parametreleri bir bütün olarak değerlendirildiğinde CAR'ın Cd toksisitesine bağlı anksiyete, öğrenme ve lokomotor aktivite testlerinde Cd'ye karşı koruyucu etkide bulunmadığı söylenebilir. Cd'ye karşı denenen bazı fitokimyasalların koruyuculuğu kurkumin (130), melatonin (152) ve kersetin (153) gibi etken

maddelerin davranış parametreleri üzerinden gösterilmiştir. Cd gibi diğer çevre kirleticilerin toksisitesine karşı fitokimyasalların koruyucu etkilerini gösteren çalışmalar gün geçtikçe artmakta ve bu alandaki veri birikimi derinleşmektedir (154, 155). CAR'ın farklı süre ve dozlarda denenmesi Cd'ye karşı beklenen etkilerin çıkmasına imkan verebilir.

5.4. Metabolomiks

Literatürde Cd eklenmesi sonucu metabolomiks daha çok idrar, beyin, karaciğer dokularında bakılmış olup plazma örnekleri az sayıda çalışmada araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda ise plazmadan alınan örneklerle özellikle primer ve sekonder metabolitleri tespit etmek üzere GC-MS ve LC-qTOF-MS yöntemleri kullanıldı.

Fitokimyasalların Cd gibi ağır metallerin toksisitesi üzerine etkilerini gösteren az sayıda çalışma bulunmakla beraber Cd üzerine CAR'ın kullanımında metabolitlerin nasıl değiştiğiyle ilgili bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda Cd ve CAR'ın tek başına değiştirdiği metabolitler araştırıldı. Buna ek olarak CAR'ın Cd maruziyetinde etkisi olup olmadığı incelendi.

PCA ve PLS-DA analizlerinde grupların tam ayrışması sonrasında yapılan ikili karşılaştırmalar ve MSEA analizleri Cd'nin ve CAR'ın farklı metabolomik yollar üzerindeki etkilerini gösterdi.

Cd maruziyetinden önemli ölçüde etkilenen yollardan bir tanesi mitokondride bulunan elektron taşıma zinciridir (156, 157). Cd, taşıma zincirinde yer alan membran enzimlerini-proteinlerini etkilemektedir (158). Ayrıca Cd bu mekanizmaya destek olarak sistemde bulunan antioksidan enzimleri ve maddeleri (glutatyon gibi) olumsuz etkilemektedir (158).

Proglutamik asitin oksidatif stres gibi nedenlerle GSH'ın azaldığı durumlarda artan bir molekül olduğu bilinmektedir. GSH hücrelerdeki antioksidan savunma sisteminin en önemli moleküllerden biridir. Bu molekülün Cd50 ile kontrole göre anlamlı düzeyde azalmış olması hücrelerde Cd'ye bağlı oksidatif stresin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir (159).

Elektron taşıma sisteminin bileşenlerinin ve mitokondrideki oksidatif stresin bir bütün olarak değerlendirilmesi sonrasında organizmada bir enerji yetersizliğinden bahsedebiliriz. Cd 50 grubundaki hayvanlarda gözlemlediğimiz lokomotor aktivite kaybı bu açıdan değerlendirilebilir. Sıçanlarda Cd'ye uzun süre maruziyet sonrasında oksidatif stresin yanı sıra aminoasit, enerji, lipid ve pürin metabolizmasının bozulan metabolik yollar olduğu savunulmaktadır (157).

Yapılan çalışmalarda Cd maruziyetinde bizim bulgularımızla uyumlu olarak enerji ve amino asit metabolizması, fosfolipid membranlar ve serbest yağ asitleri ile ilgili önemli metabolik değişiklikler tespit edilmiştir (160, 161). Metabolomiks çalışmalarında azaldığı gösterilen valin ve treonin bizim bulgularımızda da Cd50 ve Cd50+CAR40 grubunda kontrole göre azaldı. Diğer çalışmalarla uyumlu olarak Cd gruplarında linoleik, oleik, araşidonik, palmitik veya laurik gibi çeşitli serbest yağ asitlerinin seviyelerinde artış gözlemlendi. Bu yağ asitlerinin seviyelerindeki artış, plazma zarlarını bütünleştiren fosfolipidlerin bozunma ürünleri gibi, Cd'nin metal toksisitesi tarafından indüklenen bir hücrel apoptoz süreci hipotezini desteklemektedir (161, 162). Böbrek hasarına neden olabilecek önemli bir molekül olarak kabul edilen doymamış yağ asitlerinden palmitik asidin Cd ile arttığı gösterilmiştir (163). Yüksek kan Cd seviyelerinin doymamış yağ asidi biyosentezini etkilediği bilinmektedir (148). Bizim çalışmamızda da Cd50 uygulanan gruplarımızda palmitik asit artış gösterdi. Yine doymamış yağ asidi metabolizmasındaki lineolik asidin bir türevi olan linoleoyl etanolamid ve linoleik asidin (18:2) azaldığı, araşidonik asidin (20:4) arttığı çalışmamızda gösterilmiş olup literatürle uyumludur (164, 165). Cd'nin membranlar üzerindeki etkisiyle eritrosit membranlarında yağ asidi peroksidasyonunun arttığı bilinmektedir. Linoleik asit Cd etkisiyle araşidonik aside yıkılmaktadır (164). Liu ve diğ. kan Cd düzeylerinin artışıyla kan proglutamik asit, palmitik asit ve stearik asidin arttığını, buna karşın nikotinamid, tirozin ve levodopanın azaldığını göstermişlerdir. Anılan araştırmacılar Cd'ye bağlı metabolizması bozulan yolları şu şekilde sıralamışlardır; tirozin, arjinin, prolin, Vit B₆, niasin, nikotinamid, doymamış yağ asidi sentezi, glutatyon ve primidin metabolizması (148). Çalışmamızdan elde edilen bulgularda Cd maruziyetinde digliserit ve trigliserit seviyelerinin arttığı gösterildi. Lipid seviyelerindeki artışın, Cd toksitesinin etkisindeki sıçanlarda hücre apoptozuna bağlı olabildiği savunulmaktadır (166).

CAR'ın lipofilik özelliği nedeniyle membran lipitleri ile etkileşime geçtiği ve özellikle deneysel modellerde membran stabilizasyonunu etkilediği bilinmektedir (167). MSEA analizi, kontrol ve CAR40 karşılaştırmasında fosfatidiletanolamin biyosentezinde anlamlı bir değişime işaret etmektedir. Fosfatidiletanolaminler hücrelerde yaygın olarak bulunan ve tüm fosfolipitlerin %25'ini oluşturan bir hücre zar lipitidir. Bu lipitlerin yağ açısından daha zengin olan sinir dokusu gibi yapılarda bulunma sıklığı daha yüksektir. Hücre bölünmesinden membran işlevine pek çok görevleri vardır (168). CAR40 grubunda fosfatidiletanolamin artışı CAR uygulamasının membran lipitlerine de güçlü bir etkide bulunduğunu düşündürmektedir.

Diğer taraftan membran lipitleri üzerine Cd'nin de etkisi bulunmaktadır. Cd'nin hücre membran lipitlerine bağlandığı ve onları daha rijit hale getirdiği bilinmektedir. Cd'nin vücutta emilimi sonrasında potansiyel hedeflerinden birisi eritrositlerin membranıdır. Cd'ye bağlı olarak MSEA analizinde artışı gözlenen fosfatidil inositol fosfat metabolizması da bu bağlamda düşünülebilir. Cd'ye bağlı membran fosfolipidlerinin yıkımı literatürde gösterilmiştir (169).

Cd amino asit metabolizmasını da etkilemektedir. Çalışma sonuçlarımız amino asit metabolizmasına ait farklı metabolitlerin de Cd maruziyeti sonrasında değiştiğini göstermektedir (metionin, betain, amonyak döngüsü, tiamin gibi). Literatür çalışmaları daha çok idrar örneklerinde çalışılmış olsa da Cd'ye bağlı metabolik değişiklikler hakkında fikir vermektedir. Cd'ye maruz kalan Sprague Dawley sıçanlarda valin, lösin, izölösinin arttığı, fenilalanin, tirozin ve taurinin azaldığı yani Cd'nin amino asit metabolizması üzerinde güçlü bir etkide bulunduğu gösterilmiştir (162). Japonya'da insan plazma ve idrar örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada idrar Cd miktarının artışıyla alanin, kreatinin, izölösinin azaldığı ve plazma metabolitlerinden de altı katyon ve bir anyonun arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu metabolitleri mitokondriyel disfonksiyonla ilişkilendirmişlerdir. Anılan çalışmada plazmada azalan bu üç aminoasidin glomerüler hasar ve hiperfiltrasyon için belirteç olduğu ifade edilmektedir. Cd maruziyeti her ne kadar tübüler hasarla ilişkilendirilmiş olsa da erken dönem düşük doz maruziyetin glomerülerde etkide bulunarak hasar oluşturduğunu göstermeleri plazma ve idrar metabolitlerinin glomerül hasarının gösterilmesinde önemli bir belirteç olarak kullanılabilir (170). Literatürdeki Cd üzerine yapılan diğer

çalışmalar özellikle idrar örnekleri üzerine odaklanmakla birlikte hepsindeki genel örüntü amino asit metabolizmasının belirgin şekilde etkilendiği yönündedir (171). Benzer durumlar sadece kemirgenlerde değil, Rhesus maymunu gibi gelişmiş memelilerde de gösterilmiştir (172).

Çalışma sonuçlarımız Cd maruziyetine bağlı olarak metilhistidin yolağında artış olduğunu göstermektedir. Cd, nikel ve kobalt gibi ağır metallerin bazı amino asitlerin (metil veya benzil) histidin gruplarına bağlandıkları bilinmektedir (173). Metilhistidin fazla protein tüketimi ya da protein katabolizmasının artışı ile ilişkilendirilmektedir. Metilhistidin'in endojen kaynağı sadece kas hücreleridir. Bu molekül miyozin ve aktin metillendiğinde üretilir, iskelet kas proteinlerinin parçalanması sonucu kanda ve idrarda oldukça yüksek çıkmaktadır (174). Metilhistidin protein sentezi için geri dönüştürülmez, bu da onu ideal bir idrar biyobelirteçi haline getirir (174). Kas hücreleri içinde aktin filamentinin histidinlerinden birinin metilasyonu sonucunda oluşur. Kanda ve idrarda kas yıkımının bir sonucu olarak görülebilmekte ve literatürdeki makalelerde belirtildiği üzere sarkopeni ve kas kaybının bir belirteci olarak kullanabilmektedir (175). Bizim çalışmamızda da Cd grubunun kontrol grubuyla karşılaştırıldığı MSEA analizinde, sıralanan tüm metabolitler içinde en fazla değişim gösterenin metilhistidin metabolizma yolağı olduğu tespit edildi. Cd verilen hayvanların ağırlık kaybı, rotarod testindeki yürüme başarısızlıkları, genel olarak tüm davranış testlerindeki hareketsizlikleri, MSEA analizi ile birlikte değerlendirildiğinde Cd'ye bağlı kas yıkımıyla ilişkili olduğu sonucu çıkartılabilir. Bunlara ek olarak Cd'nin trikarboksilik asit döngüsü ile ilişkili metabolitleri etkilemesi ve mitokondriyel işlev bozukluklarına sebep olması rotaroddaki başarısızlığın bir başka sebebi olabilir (170). Cd metilhistidin metabolizmasını belirgin bir şekilde etkilerken Cd+CAR40 grubunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığı MSEA analizinde metilhistidin gözlenmedi. Diğer taraftan Cd50+CAR20 ve Cd50+CAR40'ta da gerek ağırlık alımının anlamlı ölçüde azalması gerekse rotarod yürüme başarısının bu iki grupta da anlamlı olmamakla birlikte kontrole göre düşük gözlenmesi Cd'nin bu gruplarda da kaslar üzerinde olumsuz etkide bulunduğunu ancak bu düzeyin metabolomiks MSEA analizinde gözlenecek düzeyde olmadığına işaret edebilir.

Cd'nin safra oluşumunu olumsuz yönde etkileyerek sıçan karaciğerinde hasara neden olduğu bilinmektedir. Kandaki safra asitleri Cd'ye bağlı karaciğer hasarının belirteçleri olarak değerlendirilmektedir (176). Söz konusu çalışmada glikorsodeoksikolik asit, glikolitokolik asit, taurolitokolik asit, ve taurodeoksikolat asitlerinin biyobelirteç olarak kullanılabilceği söylenmiştir ve bu asitlerin artışıyla kolestaz ile karaciğer hasarının oluştuğu söylenmektedir (176). Bizim çalışmamızda da kontrol-Cd50 karşılaştırılmasında taurikolik asit ve taurodeoksikolik asidin Cd50 grubunda artması bu durumu destekler bir bulgudur.

Çalışmamızdaki metabolit seti zenginleştirme analizinde Cd50 ile Cd50+CAR40 grubu karşılaştırıldığında androsten metabolizması ve estron metabolizmasının iki grup arasında anlamlı olarak farklı olduğu görüldü. Cd steroid hormon sentez yolağını etkilediği için Cd'ye bağlı endokrin bozucu etkilerinde bu metabolitler belirteç olarak değerlendirilmektedir (157).

Vücutta uzun süre kalan ve pek çok dokuda önemli hasarlara neden olan Cd'nin etkilerinin azaltılması için çeşitli fitokimyasallar denenmektedir. Sıçanlara Cd ye karşı kersetinin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada metabolomiks ile incelenen parametrelerde kersetinin antioksidan savunma sistemini arttırarak ve lipid, amino asit, pürin metabolizmasını düzenleyerek koruyucu etkide bulunduğu gösterilmiştir. Bu makaledeki böbrek, plazma ve idrar metabolomiks sonuçları, lipit ve aminoasit metabolizmalarının Cd'ye bağlı olarak olumsuz etkilendiğini göstermektedir (177).

Dünya nüfusunun yaklaşık %10'unun düşük doz Cd maruziyeti riski altında olduğu düşünüldüğünde Cd maruziyetini azaltma ve patofizyolojik etkilerini azaltmakta etken maddelerin bulunması günümüzde olduğu kadar gelecekte de önemli bir araştırma konusu olacaktır (157).

Cd uygulanmasından dolayı değişen metabolitler hem davranış parametrelerinin kötüye gitmesinde hem de biyokimyasal sonuçların değişmesinde etkili olmuş olabilirler.

5.5. Histopatoloji sonuçları

Cd toksitesinin karaciğer ve böbrek dokularında neden olduğu morfolojik değişiklikler histopatolojik yöntemlerle gözlemlendi ve kalitatif olarak gösterildi. Hemotoksilen eozin ile karaciğer hücrelerin boyanması sonucunda Cd50 grubunda dokuda patolojik değişikliklerin olduğu, diğer gruplardan farklı bir morfolojiye sahip olduğu kalitatif olarak gösterildi. Çalışmamız sonucunda Cd50 mg/kg dozunda karaciğerde patolojik süreçlerin başladığını, dokunun içerisinde lökositlerin infiltrasyonunu ve çekirdeğin bozulmaya başladığını tespit ettik. Cd50'nin dokuda neden olduğu inflamasyon ve oksidatif stres söz konusu morfolojik değişikliklerin nedeni olabilir.

Cd50 + CAR20 grubu ve Cd50 + CAR40 grubunda ise karaciğer dokusunun normal morfolojik yapıda olması, CAR'ın her iki dozunun da Cd'ye karşı karaciğer üzerinde koruyucu etkileri olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızdaki böbrek morfolojisi incelemelerinde Cd50+CAR40 grubunda, glomerüllerde dilatasyon ve Bowman boşluğunun daralmasının çok daha az olduğu, bu nedenle normal böbrek yapısına daha benzer bir durum gözlenmesinin CAR'ın koruyucu etkisine dair bir işaret olarak değerlendirilebilir. Cd'ye bağlı daralma durumu böbreklerin Bowman boşluğuna doğru plazmanın infiltrasyonunu olumsuz etkileyebilir. CAR'ın her iki dozunun da Cd'nin böbrekteki patolojisine karşı kısmen koruyucu etki gösterdiği iddia edilebilir.

Cd'nin emilimi sonrasındaki hedefleri arasında böbrek ve karaciğer hücreleri de bulunmaktadır. Bu hücrelerde Cd'nin birikim yaptığı da bilinmektedir (178). Cd'nin vücuttan atılması için uzun bir süreye gereksinim olması nedeniyle insan sağlığını uzun süre tehdit etmektedir (179).

Cd'nin özellikle kemiklerde ve böbreklerde ciddi miktarlarda birikmesinin histolojik sonuçları bilinmektedir (180, 181). Cd'nin birçok mekanizmayla böbrek epiteline girdiği, özellikle sülfhidril içeren proteinlere bağlandığı ve böbreklerde de bu bağlanmayla beraber nefropatiye neden olduğu gösterilmiştir (182). Bizim bulgularımız da böbreklerdeki epitel yapının bozulduğunu gösterdi.

Bizim çalışmamız önceki çalışmalardaki Cd maruziyetiyle oluşan histopatoloji sonuçlarıyla uyumludur. Yapılan bir araştırmada Cd kaynaklı glomerüllerde yapısal

değişiklikler olduğu, mezangial matriksin ve glomerüllerde boşlukların genişleyerek şiştiği tespit edilmiştir (183). Cd maruziyetinin sıçanlarda tübüler disfonksiyona ve çekirdek membran hasarına neden olduğu gösterilmiştir (180). Cd'ye bağlı kronik toksisite sonucunda proksimal tübüler disfonksiyonun ortaya çıktığı bilinmektedir (184). Bunlara ek olarak çalışmamızda çekirdeklerin asidofilik boyanması Cd'ye bağlı hasarın sadece membran düzeyinde kalmadığı ve sitoplazmanın da etkilendiğini düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada devedikeni bitkisinin bir türünden elde edilen silimarin Cd uygulanan sıçanlara verilmiştir. Bir fitokimyasal olan silimarin ekstresinin böbrek dokusunda gelişen patolojiyi düzelttiği, böbreklerde Cd seviyesini azalttığı ve böbrek DNA fragmantasyonunu düzelttiği gösterilmiştir (185). Tam olarak mekanizma bilinmemekle birlikte fenolik bileşiklerin Cd toksitesine karşı koruyucu olduğu savunulmaktadır.

Cd'nin hasar verdiği organlardan birtanesi de karaciğerdir ve karaciğer hücrelerinde apoptoz yaptığı gösterilmiştir (186). Yapılan bir çalışmada da CAR'ın Cd üzerine antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir (6). Bizim çalışmamız da CAR'ın Cd'ye karşı karaciğer ve böbrekte koruyucu etkisini desteklemektedir.

Karaciğerde Cd'ye bağlı inflamatuvar değişimler, portal alanda fibroz hiperplazi ve farklı düzeylerde ödem gözlenmiştir (176). Arsenik ve Cd gibi ağır metallerin karaciğer yağlanması steatoz ve kan hücrelerinin Disse aralığına infiltrasyonu ayrıca Cd'ye bağlı olarak sinozoidlerde kalınlaşma meydana geldiği bilinmektedir (169). Bizim bulgularımız da Cd'ye bağlı karaciğer hücrelerinde farklı hasarların oluştuğu ve CAR'ın her iki dozunun da histopatolojik olarak koruyucu etkide bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Cd'nin dokulara olan zararlı etkisi sadece bu dokularla sınırlı değildir. İçme suyu ile verilen Cd'nin farelerde akciğer hasarına neden olduğu gösterilmiştir (187).

5.6. Plazmada Bulunan Elementlerin Değerlendirilmesi

Çalışmada ICP-OES yöntemi kullanılarak sıçanlardan alınan plazmadaki elementler karşılaştırıldığında Cd50 grubunda kontrole göre Cd birikimi açısından fark gözlenmemesi plazma örnek sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Standart yem ve musluk suyu ile *ad libitum* beslenen hayvanlarda düşük de olsa bir Cd maruziyeti bulunuduğu ileri çalışmalarla değerlendirilebilir. Cd50+CAR40 grubuyla CAR20 grubu, ayrıca Cd50+CAR20 grubuyla CAR40 grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmiş olması bizim deney modelimizde uygulanan gibi yüksek doz bir Cd maruziyeti olmadığı durumda CAR'ın her iki dozunun da vücuttan Cd atılımı ile ilgili bir etkide bulunduğu iddia edilebilir.

Huyut ve Arihan, herhangi bir ağır metal maruziyeti olmadan aralıklı açlık uygulamasının sıçanlarda kan kurşun değerini düşürdüğünü buna karşın Zn değerini artırdığını göstermişlerdir (188). Bu tür çalışmaların işaret ettiği durum, bazı uygulamaların hayvanların besin ve suyla maruz kaldığı çevresel kirleticilerin vücuttan atılımını artırabileceğidir. CAR da hayvanların pellet yem ile aldıkları Cd'nin atılımını hızlandırmış olabilir. Diğer taraftan en yüksek Cd ortanca değerinin Cd50+CAR40 grubunda gözlenmesi bu iddiayı zayıflatmaktadır. Bu konuyla ilgili farklı doz ve sürelerin denendiği çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Plazma Zn miktarının Cd grubunda kontrol ve CAR gruplarına göre daha az gözlenmesi ve azalmanın sadece CAR20'ye göre anlamlı olması, Cd'ye bağlı olarak diğer elementlerin emilimindeki bozulmalarla ilişkili olabilir (189). Pek çok enzimin bileşeni olan Zn elementinin Cd maruziyetiyle düşüyor olması Cd'nin dikkate alınması gereken bir başka toksisitesine işaret etmektedir.

5.7. Serum Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Ürenin Cd50 grubunda kontrole göre hafif bir artış gösterirken Cd'nin CAR ile beraber uygulandığı durumda bu artışın anlamlı hale gelmesi ikisinin beraber kullanımında böbrek fonksiyonlarının daha da kötüye gittiğini göstermektedir.

ALT miktarının, Cd'nin CAR ile beraber uygulandığı gruplarda anlamlı olarak artması karaciğerin hasara uğradığının bir göstergesidir. CD50+CAR20 ve Cd50+CAR40 gruplarındaki metabolomiks MSEA sonuçlarındaki amonyak döngüsündeki artış karaciğerdeki bu hasar bulgusunu desteklemektedir.

Serum kortizol düzeylerinde Cd50+CAR40 grubundaki, kontrol ve CAR uygulanan gruplara göre anlamlı artış davranış testlerindeki anksiyete benzeri

davranışlardaki artışı da açıklamakta biyokimyasal bir destek olarak değerlendirilebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1) Cd kilo kazanımını ve lokomotor aktiviteyi azaltırken CAR bu azalışı önlemede etkili olmadı.
- 2) Cd anksiyete benzeri davranışa neden olurken CAR bu etkiyi zayıflatamadı.
- 3) Cd böbrek ve karaciğerde histopatolojik bir hasara neden olurken CAR bunu özellikle karaciğerde kısmen önleyici etkide bulundu. CAR, böbrek üzerinde Cd'ye karşı koruyucu etki gösterdiği histopatolojik olarak kalitatif yöntemle gösterilmiştir.
- 4) Cd, metabolomik analizde metilhistidin ile görülebildiği üzere kas kaybına neden oldu. CAR kullanımı ile metilhistidin yolağının değişmemesi CAR'ın bu açıdan yeterli koruyuculuk göstermediğine işaret etmektedir.
- 5) Metabolomik analizde kontrol ile Cd50+CAR40 grubu arasındaki koruyucu yollarda değişim görülmedi.
- 6) Cd+CAR gruplarında plazma zarlarını bütünleştiren fosfolipidlerin bozunma ürünleri olan metabolit yolağı arttı. Bu durum, Cd tarafından indüklenen bir hücrel apoptoz süreci hipotezini desteklemektedir.
- 7) Cd'nin plazmadaki birikiminin kontrole göre CAR40 mg/kg'da anlamlı olarak daha az olması Cd'nin çevresel faktörlerle düşük düzeyde maruziyeti söz konusu olduğunda CAR'ın plazmada düşürücü etkisi olabileceğini düşündürdü. Diğer taraftan CAR'ın Cd ile birlikte uygulandığı deney protokolümüzde, plazmadaki Cd miktarının daha da arttığı görüldü.
- 8) Serum ALT, AST, Üre, Kreatinin değerlerine göre CAR'ın Cd'ye bağlı hasarı biyokimyasal parametreler açısından düzeltilmediği, hatta daha da yükselttiği söylenebilir.
- 9) Cd uygulanmasından dolayı değişen metabolitler hem davranış parametrelerinin kötüye gitmesinde hem de biyokimyasal sonuçların değişmesinde etkili olmuş olabilir.
- 10) Kontrol Cd50 karşılaştırmasında değişen metabolomik yollardan biri olan metilhistidin yolağı Cd50'nin Car ile beraber uygulandığı yollarda çıkmamıştır.

11) Çalışmamızda Cd'nin, toksik etkisine bağlı olarak davranış dahil birçok histolojik, kimyasal ve metabolit değişimlerine neden olabildiği ve Cd'nin CAR ile beraber uygulanmasında CAR'ın koruyucu etkisinin olmadığı tespit edildi.

ÖNERİLER :

- 1) Cd ve CAR maruziyetinin farklı doz ve sürelerde denenmesi histopatoloji ve serum biyokimyasında gözlenen zıt durumları aydınlatılabilir.
- 2) Metabolomik parametrelerin biyoinformatik tarzı detaylı yaklaşımları Cd, CAR ve birlikte uygulanmalarının etkilerini daha detaylı şekilde ortaya koyabilir.
- 3) Cd+CAR'ın neden olduğu etkilere bütüncül bakıldığında yüksek düzeyde Cd maruziyeti olan insanların CAR kullanımında dikkatli olması tavsiye edilebilir.
- 4) Cd'nin beyindeki birikimine bakılması önemlidir. Sıçan standart yemi olan pelletlerdeki Cd birikime bakılması da kontrol grubu plazmasında gözlenen Cd miktarını açıklayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Kandemir FM, Caglayan C, Darendelioğlu E, Küçükler S, İzol E, Kandemir Ö. Modulatory effects of carvacrol against cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by molecular targeting regulation. *Life Sciences*. 2021;277:119610.
2. Yıldız MO, Çelik H, Caglayan C, Genç A, Doğan T, Satici E. Neuroprotective Properties of Carvacrol Against Cadmium-induced Neurotoxicity in Male Rats. 2021.
3. Refaie MM, El-Hussieny M, Zenhom NM. Protective role of nebivolol in cadmium-induced hepatotoxicity via downregulation of oxidative stress, apoptosis and inflammatory pathways. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2018;58:212-9.
4. Kar I, Patra AK. Tissue Bioaccumulation and Toxicopathological Effects of Cadmium and Its Dietary Amelioration in Poultry-a Review. *Biological Trace Element Research*. 2021;199(10):3846-68.
5. Yildiz MO, Celik H, Caglayan C, Genc A, Dogan T, Satici E. Neuroprotective effects of carvacrol against cadmium-induced neurotoxicity in rats: role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Metab Brain Dis*. 2022;37(4):1259-69.
6. Kandemir FM, Caglayan C, Darendelioğlu E, Kucukler S, Izol E, Kandemir O. Modulatory effects of carvacrol against cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by molecular targeting regulation. *Life Sci*. 2021;277:119610.
7. Vukićević T. Toxic effects of cadmium. *Acta med Mediterr*. 2012;51(4):65-70.
8. Sinha M, Manna P, Sil PC. Induction of necrosis in cadmium-induced hepatic oxidative stress and its prevention by the prophylactic properties of taurine. *J Trace Elem Med Biol*. 2009;23(4):300-13.
9. Mendez-Armenta M, Villeda-Hernandez J, Barroso-Moguel R, Nava-Ruiz C, Jimenez-Capdeville ME, Rios C. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicol Lett*. 2003;144(2):151-7.
10. Provias JP, Ackerley CA, Smith C, Becker LE. Cadmium encephalopathy: a report with elemental analysis and pathological findings. *Acta Neuropathol*. 1994;88(6):583-6.
11. Holloway Jr WR, Thor DH. Social memory deficits in adult male rats exposed to cadmium in infancy. *Neurotoxicol Teratol*. 1988;10(3):193-7.
12. Tercariol SG, Almeida AA, Godinho AF. Cadmium and exposure to stress increase aggressive behavior. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2011;32(1):40-5.
13. Erboga M, Kanter M, Aktas C, Sener U, Fidanol Erboga Z, Bozdemir Donmez Y, et al. Thymoquinone Ameliorates Cadmium-Induced Nephrotoxicity, Apoptosis, and Oxidative Stress in Rats is Based on its Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Properties. *Biol Trace Elem Res*. 2016;170(1):165-72.
14. Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A. Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environ Health Perspect*. 2002;110(12):1185-90.
15. Akiskal HS. Toward a definition of generalized anxiety disorder as an anxious temperament type. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1998;393:66-73.

16. Baddeley A. Working memory: theories, models, and controversies. *Annu Rev Psychol.* 2012;63:1-29.
17. Cao Y, Chen A, Radcliffe J, Dietrich KN, Jones RL, Caldwell K, et al. Postnatal cadmium exposure, neurodevelopment, and blood pressure in children at 2, 5, and 7 years of age. *Environ Health Perspect.* 2009;117(10):1580-6.
18. Lamtai M, Chaibat J, Ouakki S, Berkiks I, Rifi E-H, El Hessni A, et al. Effect of chronic administration of cadmium on anxiety-like, depression-like and memory deficits in male and female rats: possible involvement of oxidative stress mechanism. *Journal of Behavioral and Brain Science.* 2018;8(5):240-68.
19. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.* 2011;46(10):4769-807.
20. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother Res.* 2007;21(6):501-6.
21. Cantalapiedra A, Gismera MJ, Sevilla MT, Procopio JR. Sensitive and selective determination of phenolic compounds from aromatic plants using an electrochemical detection coupled with HPLC method. *Phytochem Anal.* 2014;25(3):247-54.
22. Melo FH, Venancio ET, de Sousa DP, de Franca Fonteles MM, de Vasconcelos SM, Viana GS, et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010;24(4):437-43.
23. Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, et al. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci.* 2002;22(5):1592-9.
24. Melusova M, Slamenova D, Kozics K, Jantova S, Horvathova E. Carvacrol and rosemary essential oil manifest cytotoxic, DNA-protective and pro-apoptotic effect having no effect on DNA repair. *Neoplasma.* 2014;61(6):690-9.
25. Liang WZ, Lu CH. Carvacrol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sci.* 2012;90(17-18):703-11.
26. Savelev SU, Okello EJ, Perry EK. Butyryl-and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives.* 2004;18(4):315-24.
27. Almeer RS, Alarifi S, Alkahtani S, Ibrahim SR, Ali D, Moneim A. The potential hepatoprotective effect of royal jelly against cadmium chloride-induced hepatotoxicity in mice is mediated by suppression of oxidative stress and upregulation of Nrf2 expression. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:1490-8.
28. Baskaran R, Priya LB, Kumar VS, Padma VV. extract prevents cadmium-induced oxidative stress and hepatotoxicity in experimental rats. *J Ayurveda Integr Me.* 2018;9(4):252-7.
29. Chen SH, Liu G, Long MF, Zou H, Cui HM. Alpha lipoic acid attenuates cadmium-induced nephrotoxicity the mitochondrial apoptotic pathways in rat. *J Inorg Biochem.* 2018;184:19-26.

30. Méndez-Armenta M, Ríos C. Cadmium neurotoxicity. *Environ Toxicol Phar.* 2007;23(3):350-8.
31. Stohs SJ, Bagchi D, Bagchi M. Toxicity of trace elements in tobacco smoke. *Inhal Toxicol.* 1997;9(9):867-90.
32. Russell KR, Mukherjee S, Das SK, Kabiru W, Ademoyero AA, Grimes EM, et al. The effect of cadmium toxicity on reproductive characteristics of male rats. *Biol Reprod.* 1997;56:476-.
33. Refaie MMM, El-Hussieny M, Zenhom NM. Protective role of nebivolol in cadmium-induced hepatotoxicity via downregulation of oxidative stress, apoptosis and inflammatory pathways. *Environ Toxicol Phar.* 2018;58:212-9.
34. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:83-106.
35. Stannard LM, Doherty A, Chapman KE, Doak SH, Jenkins GJ. Multi-endpoint analysis of cadmium chloride-induced genotoxicity shows role for reactive oxygen species and p53 activation in DNA damage induction, cell cycle irregularities, and cell size aberrations. *Mutagenesis.* 2024;39(1):13-23.
36. Hossein-Khannazer N, Azizi G, Eslami S, Mohammed HA, Fayyaz F, Hosseinzadeh R, et al. The effects of cadmium exposure in the induction of inflammation. *Immunopharm Immunot.* 2020;42(1):1-8.
37. Zhang H, Reynolds M. Cadmium exposure in living organisms: A short review. *Sci Total Environ.* 2019;678:761-7.
38. Haque MM, Im HY, Seo JE, Hasan M, Woo K, Kwon OS. Acute toxicity and tissue distribution of CdSe/CdS-MPA quantum dots after repeated intraperitoneal injection to mice. *J Appl Toxicol.* 2013;33(9):940-50.
39. Méndez-Armenta M, Villeda-Hernández J, Barroso-Moguel R, Nava-Ruíz C, Jiménez-Capdeville ME, Ríos C. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicol Lett.* 2003;144(2):151-7.
40. Holloway WR, Thor DH. Social Memory Deficits in Adult Male-Rats Exposed to Cadmium in Infancy. *Neurotoxicol Teratol.* 1988;10(3):193-7.
41. Mendez-Armenta M, Barroso-Moguel R, Villeda-Hernández J, Nava-Ruiz C, Rios C. Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone. *Toxicology.* 2001;161(3):189-99.
42. Wong KL, Klaassen CD. Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982;63(3):330-7.
43. Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol Lett.* 1996;89(1):65-9.
44. Antonio MT, Lopez N, Leret ML. Pb and Cd poisoning during development alters cerebellar and striatal function in rats. *Toxicology.* 2002;176(1-2):59-66.
45. Gupta A, Gupta A, Shukla GS. Development of brain free radical scavenging system and lipid peroxidation under the influence of gestational and lactational cadmium exposure. *Hum Exp Toxicol.* 1995;14(5):428-33.
46. Minami A, Takeda A, Nishibaba D, Takefuta S, Oku N. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Res.* 2001;894(2):336-9.

47. Fern R, Black JA, Ransom BR, Waxman SG. Cd²⁺-induced injury in CNS white matter. *J Neurophysiol.* 1996;76(5):3264-73.
48. Hart RP, Rose CS, Hamer RM. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *Journal of clinical and experimental neuropsychology.* 1989;11(6):933-43.
49. Viaene MK, Masschelein R, Leenders J, De Groof M, Swerts LJ, Roels HA. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. *Occup Environ Med.* 2000;57(1):19-27.
50. Viaene MK, Roels HA, Leenders J, De Groof M, Swerts LJ, Lison D, et al. Cadmium: a possible etiological factor in peripheral polyneuropathy. *Neurotoxicology.* 1999;20(1):7-16.
51. Wang M, Chen ZF, Song W, Hong DZ, Huang L, Li YH. A review on Cadmium Exposure in the Population and Intervention Strategies Against Cadmium Toxicity. *B Environ Contam Tox.* 2021;106(1):65-74.
52. Aziz R, Rafiq MT, Yang J, Liu D, Lu L, He Z, et al. Impact assessment of cadmium toxicity and its bioavailability in human cell lines (Caco-2 and HL-7702). *Biomed Res Int.* 2014;2014:839538.
53. Zhai QX, Liu Y, Wang C, Zhao JX, Zhang H, Tian FW, et al. Increased Cadmium Excretion Due to Oral Administration of Strains by Regulating Enterohepatic Circulation in Mice. *J Agr Food Chem.* 2019;67(14):3956-65.
54. Djurasevic S, Jama A, Jasnica N, Vujovic P, Jovanovic M, Mitic-Culafic D, et al. The Protective Effects of Probiotic Bacteria on Cadmium Toxicity in Rats. *J Med Food.* 2017;20(2):189-96.
55. Huang Y, He C, Shen C, Guo J, Mubeen S, Yuan J, et al. Toxicity of cadmium and its health risks from leafy vegetable consumption. *Food Funct.* 2017;8(4):1373-401.
56. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:267-94.
57. Yang H, Shu Y. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2015;16(1):1484-94.
58. Jarup L, Hellstrom L, Alfvén T, Carlsson MD, Grubb A, Persson B, et al. Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occup Environ Med.* 2000;57(10):668-72.
59. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol.* 2006;1:22.
60. Elsenhans B, Strugala GJ, Schafer SG. Small-intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein. *Hum Exp Toxicol.* 1997;16(8):429-34.
61. Hellstrom L, Elinder CG, Dahlberg B, Lundberg M, Jarup L, Persson B, et al. Cadmium exposure and end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(5):1001-8.
62. Chaumont A, De Winter F, Dumont X, Haufroid V, Bernard A. The threshold level of urinary cadmium associated with increased urinary excretion of retinol-

binding protein and beta 2-microglobulin: a re-assessment in a large cohort of nickel-cadmium battery workers. *Occup Environ Med*. 2011;68(4):257-64.

63. Yuan-yuan J, Rong Z, Xing-ya K. Research progress on renal injury induced by cadmium. *Journal of Environmental and Occupational Medicine*. 2018;35(2):180-4.

64. Bhattacharya S. Protective Role of the Essential Trace Elements in the Obviation of Cadmium Toxicity: Glimpses of Mechanisms. *Biol Trace Elem Res*. 2022;200(5):2239-46.

65. Jacquillet G, Barbier O, Cougnon M, Tauc M, Namorado MC, Martin D, et al. Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(1):F127-37.

66. Brzóška MM, Roszczenko A, Galazyn-Sidorczuk M, Majewska K. Zinc supplementation can protect from enhanced risk of femoral neck fracture in male rats chronically exposed to cadmium. *Exp Toxicol Pathol*. 2011;63(5):491-8.

67. Reeves PG, Chaney RL. Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based. *Environ Res*. 2004;96(3):311-22.

68. Bhattacharya S. Protective Role of the Essential Trace Elements in the Obviation of Cadmium Toxicity: Glimpses of Mechanisms. *Biological Trace Element Research*. 2022;200(5):2239-46.

69. Bhattacharya S. The Role of Spirulina (Arthrospira) in the Mitigation of Heavy-Metal Toxicity: An Appraisal. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2020;39(2):149-57.

70. Zhu QL, Guo SN, Yuan SS, Lv ZM, Zheng JL, Xia H. Heat indicators of oxidative stress, inflammation and metal transport show dependence of cadmium pollution history in the liver of female zebrafish. *Aquat Toxicol*. 2017;191:1-9.

71. Abd-Allah ER, Abd El-Rahman HA. Ameliorative effects of a curcumin vitamin E nanocomposite coated with olive oil against cadmium chloride-induced testicular damage. *Andrologia*. 2022;54(4).

72. Hajimehdipoor H, Shekarchi M, Khanavi M, Adib N, Amri M. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacogn Mag*. 2010;6(23):154-8.

73. Ramos M, Beltrán A, Valdés A, Peltzer MA, Jiménez A, Garrigós MC. Active Packaging Based on the Release of Carvacrol and Thymol for Fresh Food. *Chemistry and Physics of Complex Materials: Concepts and Applications*. 2014:1-22.

74. Hajibonabi A, Yekani M, Sharifi S, Nahad JS, Dizaj SM, Memar MY. Antimicrobial activity of nanoformulations of carvacrol and thymol: New trend and applications. *OpenNano*. 2023:100170.

75. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Del Mar Contreras M, et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res*. 2018;32(9):1675-87.

76. Friedman M. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. *J Agric Food Chem*. 2014;62(31):7652-70.

77. Coccimiglio J, Alipour M, Jiang ZH, Gottardo C, Suntres Z. Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1404505.

78. Melo FH, Moura BA, de Sousa DP, de Vasconcelos SM, Macedo DS, Fonteles MM, et al. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol*. 2011;25(3):362-7.
79. Yu HL, Zhang ZL, Chen J, Pei AJ, Hua F, Qian XC, et al. Carvacrol, a Food-Additive, Provides Neuroprotection on Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Plos One*. 2012;7(3).
80. Jirovetz L, Wlcek K, Buchbauer G, Gochev V, Girova T, Stoyanova A, et al. Antifungal activity of various Lamiaceae essential oils rich in thymol and carvacrol against clinical isolates of pathogenic *Candida* species. 2007.
81. Gandova V, Lazarov A, Fidan H, Dimov M, Stankov S, Denev P, et al. Physicochemical and biological properties of carvacrol. *Open chemistry*. 2023;21(1):20220319.
82. Mondal A, Bose S, Mazumder K, Khanra R. Carvacrol (*Origanum vulgare*): Therapeutic properties and molecular mechanisms. *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications*. 2021:437-62.
83. Galic MA, Riazi K, Pittman QJ. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol*. 2012;33(1):116-25.
84. Lee B, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. Inhibitory effect of carvacrol on lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2020;24(1):27-37.
85. Haddadi H, Rajaei Z, Alaei H, Shahidani S. Chronic treatment with carvacrol improves passive avoidance memory in a rat model of Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr*. 2018;76(2):71-7.
86. Deng W, Lu H, Teng J. Carvacrol attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats. *J Mol Neurosci*. 2013;51(3):813-9.
87. Khalil A, Kovac S, Morris G, Walker MC. Carvacrol after status epilepticus (SE) prevents recurrent SE, early seizures, cell death, and cognitive decline. *Epilepsia*. 2017;58(2):263-73.
88. Azizi Z, Majlessi N, Choopani S, Naghdi N. Neuroprotective effects of carvacrol against Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases: A review. *Avicenna J Phytomed*. 2022;12(4):371-87.
89. Zamanian M, Kujawska M, Zadeh MN, Hassanshahi A, Ramezanpour S, Kamiab Z, et al. Carvacrol as a Potential Neuroprotective Agent for Neurological Diseases: A Systematic Review Article. *Cns Neurol Disord-Dr*. 2021;20(10):942-53.
90. Kurt BZ, Gazioglu I, Dag A, Salmas RE, Kayik G, Durdagi S, et al. Synthesis, anticholinesterase activity and molecular modeling study of novel carbamate-substituted thymol/carcacrol derivatives. *Bioorgan Med Chem*. 2017;25(4):1352-63.
91. Dati LM, Ulrich H, Real CC, Feng ZP, Sun HS, Britto LR. Carvacrol Promotes Neuroprotection in the Mouse Hemiparkinsonian Model. *Neuroscience*. 2017;356:176-81.
92. Manayi A, Nabavi SM, Daglia M, Jafari S. Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. *Pharmacol Rep*. 2016;68(4):671-9.

93. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Samini F. Preventive effect of safranal against oxidative damage in aged male rat brain. *Exp Anim Tokyo*. 2015;64(1):65-71.
94. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Samini F, Farkhondeh T. Chrysin treatment improves diabetes and its complications in liver, brain, and pancreas in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharm*. 2016;94(4):388-93.
95. Halliwell B. Free-Radicals, Antioxidants, and Human-Disease - Curiosity, Cause, or Consequence. *Lancet*. 1994;344(8924):721-4.
96. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023;97(10):2499-574.
97. Gupta V, Lahiri SS, Sultana S, Tulsawani RK, Kumar R. Anti-oxidative effect of root extract in rats during cold, hypoxia and restraint (C-H-R) exposure and post-stress recovery. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(4):1019-25.
98. Samarghandian S. Crocus sativus L. (Saffron) Stigma Aqueous Extract Induces Apoptosis in Alveolar Human Lung Cancer Cells through Caspase-Dependent Pathways Activation (Expression of Concern of Vol 2013, art no 417928, 2013). *Biomed Research International*. 2019;2019.
99. Javed H, Mohamed Fizur NM, Jha NK, Ashraf GM, Ojha S. Neuroprotective Potential and Underlying Pharmacological Mechanism of Carvacrol for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2023;21(6):1421-32.
100. Zinno P, Guantario B, Lombardi G, Ranaldi G, Finamore A, Allegra S, et al. Chemical composition and biological activities of essential oils from *Origanum vulgare* genotypes belonging to the carvacrol and thymol chemotypes. *Plants*. 2023;12(6):1344.
101. Beena, Kumar D, Rawat DS. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(3):641-5.
102. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol*. 1994;32(1):31-6.
103. Aydin E, Türkez H, Keles MS. The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*. 2014;66(1):149-57.
104. Del Prado-Audelo ML, Cortés H, Caballero-Florán IHH, González-Torres M, Escutia-Guadarrama L, Bernal-Chávez SAA, et al. Therapeutic Applications of Terpenes on Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol*. 2021;12.
105. Hotta M, Nakata R, Katsukawa M, Hori K, Takahashi S, Inoue H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. *J Lipid Res*. 2010;51(1):132-9.
106. Damasceno SRB, Oliveira FRAM, Carvalho NS, Brito CFC, Silva IS, Sousa FBM, et al. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. *Life Sciences*. 2014;94(1):58-66.
107. Guimaraes AG, Xavier MA, de Santana MT, Camargo EA, Santos CA, Brito FA, et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012;385(3):253-63.

108. Guimaraes AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Bonjardim LR, et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;107(6):949-57.
109. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. 2007;26(1):51-78.
110. Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(9):763-9.
111. Nicholson JK, Wilson ID. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(8):668-76.
112. Cho K, Chung JY, Cho SK, Shin HW, Jang IJ, Park JW, et al. Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXRalpha/POMC pathway. *Sci Rep*. 2015;5:8145.
113. Gika HG, Theodoridis GA, Plumb RS, Wilson ID. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;87:12-25.
114. Horning E, Carroll D, Dzidic I, Haegele K, Horning M, Stillwell R. Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream. *Journal of chromatographic science*. 1974;12(11):725-9.
115. Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem*. 1985;57(3):675-9.
116. Carroll D, Dzidic I, Stillwell RN, Haegele KD, Horning EC. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system. *Analytical Chemistry*. 1975;47(14):2369-73.
117. Robb DB, Covey TR, Bruins AP. Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem*. 2000;72(15):3653-9.
118. Cappiello A, Balogh M, Famiglini G, Mangani F, Palma P. An efficient liquid chromatography--mass spectrometry interface for the generation of electron ionization spectra. *Anal Chem*. 2000;72(16):3841-6.
119. He P, Aga DS. Comparison of GC-MS/MS and LC-MS/MS for the analysis of hormones and pesticides in surface waters: advantages and pitfalls. *Analytical methods*. 2019;11(11):1436-48.
120. McEwen CN, McKay RG. A combination atmospheric pressure LC/MS:GC/MS ion source: advantages of dual AP-LC/MS:GC/MS instrumentation. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2005;16(11):1730-8.
121. Sparkman OD, Penton Z, Kitson FG. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*: Academic press; 2011.
122. Wang H, Muehlbauer MJ, O'Neal SK, Newgard CB, Hauser ER, Bain JR, et al. Recommendations for Improving Identification and Quantification in Non-Targeted, GC-MS-Based Metabolomic Profiling of Human Plasma. *Metabolites*. 2017;7(3).

123. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016;27(12):1897-905.
124. Reçber T, Nemutlu E, Beksac K, Aksoy S, Kır S. Optimization and validation of a HILIC-LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous analysis of targeted metabolites: Cross validation of untargeted metabolomic studies for early diagnosis of breast cancer. *Microchemical Journal.* 2020;159:105559.
125. Sweetlove LJ, Fernie AR. The spatial organization of metabolism within the plant cell. *Annu Rev Plant Biol.* 2013;64:723-46.
126. Brown M, Dunn WB, Dobson P, Patel Y, Winder CL, Francis-McIntyre S, et al. Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst.* 2009;134(7):1322-32.
127. Xiao JF, Zhou B, Ressom HW. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends Analyt Chem.* 2012;32:1-14.
128. Chen L, Zhong F, Zhu J. Bridging Targeted and Untargeted Mass Spectrometry-Based Metabolomics via Hybrid Approaches. *Metabolites.* 2020;10(9).
129. Care IoLARCo, Animals UoL. Guide for the care and use of laboratory animals: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National ...; 1986.
130. Akinyemi AJ, Okonkwo PK, Faboya OA, Onikanni SA, Fadaka A, Olayide I, et al. Curcumin improves episodic memory in cadmium induced memory impairment through inhibition of acetylcholinesterase and adenosine deaminase activities in a rat model. *Metab Brain Dis.* 2017;32(1):87-95.
131. Costa CA, Kohn DO, de Lima VM, Gargano AC, Florio JC, Costa M. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). *J Ethnopharmacol.* 2011;137(1):828-36.
132. Pultrini Ade M, Galindo LA, Costa M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci.* 2006;78(15):1720-5.
133. Haider S, Anis L, Batool Z, Sajid I, Naqvi F, Khaliq S, et al. Short term cadmium administration dose dependently elicits immediate biochemical, neurochemical and neurobehavioral dysfunction in male rats. *Metab Brain Dis.* 2015;30(1):83-92.
134. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322-8.
135. Emamghoreishi M, Khasaki M, Aazam MF. *Coriandrum sativum*: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(3):365-70.
136. Trabace L, Zotti M, Morgese MG, Tucci P, Colaianna M, Schiavone S, et al. Estrous cycle affects the neurochemical and neurobehavioral profile of carvacrol-treated female rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;255(2):169-75.
137. Duszczuk M, Gamczyk M, Ziembowicz A, Boguszewski PM, Lazarewicz JW, Salinska E. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of mild hypobaric hypoxia in mice: possible involvement of neuropeptide Y. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2015;75(4):364-71.
138. Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res.* 2009;203(2):151-64.

139. Gawel K, Gibula E, Marszalek-Grabska M, Filarowska J, Kotlinska JH. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents-methodological consideration. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2019;392(1):1-18.
140. Holmes A, Wrenn CC, Harris AP, Thayer KE, Crawley JN. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav*. 2002;1(1):55-69.
141. Sunyer B, Patil S, Höger H, Lubec G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. 2007.
142. Monville C, Torres EM, Dunnett SB. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J Neurosci Methods*. 2006;158(2):219-23.
143. Eylem CC, Yilmaz M, Derkus B, Nemutlu E, Camci CB, Yilmaz E, et al. Untargeted multi-omic analysis of colorectal cancer-specific exosomes reveals joint pathways of colorectal cancer in both clinical samples and cell culture. *Cancer Lett*. 2020;469:186-94.
144. Gonulalan EM, Nemutlu E, Bayazeid O, Koçak E, Yalçın FN, Demirezer LO. Metabolomics and proteomics profiles of some medicinal plants and correlation with BDNF activity. *Phytomedicine*. 2020;74:152920.
145. Rencuzogullari N, Erdogan S. Oral administration of lycopene reverses cadmium-suppressed body weight loss and lipid peroxidation in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2007;118(2):175-83.
146. Roth KA, Katz RJ. Stress, behavioral arousal, and open field activity—a reexamination of emotionality in the rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1979;3(4):247-63.
147. Ukoro B, Olorunfemi O. Investigation of Sub-Chronic Exposure to Lead and Cadmium Contaminated Diets on BDNF, Acetylcholinesterase and fine motor functions in Albino Wistar Rats.
148. Yang L, Yu Q, Dou S, Li X, Wen S, Zhang J, et al. Whole blood cadmium levels and depressive symptoms in Chinese young adults: A prospective cohort study combing metabolomics. *J Hazard Mater*. 2024;465:132968.
149. Moragrega I, Carrasco MC, Vicens P, Redolat R. Spatial learning in male mice with different levels of aggressiveness: effects of housing conditions and nicotine administration. *Behav Brain Res*. 2003;147(1-2):1-8.
150. Pihl RO, Parkes M. Hair element content in learning disabled children. *Science*. 1977;198(4313):204-6.
151. Kamel MM, Abd El-Razek AH. Perinatal exposure to cadmium affects neurobehavioural development and anxiety-like behaviour in rat offspring. *Life Sciences Journal*. 2011;8(4):529-36.
152. Lamtai M, Azirar S, Zghari O, Ouakki S, El Hessni A, Mesfioui A, et al. Melatonin Ameliorates Cadmium-Induced Affective and Cognitive Impairments and Hippocampal Oxidative Stress in Rat. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199(4):1445-55.
153. Abdalla FH, Schmatz R, Cardoso AM, Carvalho FB, Baldissarelli J, de Oliveira JS, et al. Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in

rats exposed to cadmium: Possible involvement of the acetylcholinesterase and Na(+),K(+)-ATPase activities. *Physiol Behav.* 2014;135:152-67.

154. Nabavi SF, Nabavi SM, Mirzaei M, Moghaddam AH. Protective effect of quercetin against sodium fluoride induced oxidative stress in rat's heart. *Food & function.* 2012;3(4):437-41.

155. Nabavi SF, Moghaddam AH, Eslami S, Nabavi SM. Protective effects of curcumin against sodium fluoride-induced toxicity in rat kidneys. *Biological trace element research.* 2012;145:369-74.

156. Go YM, Sutliff RL, Chandler JD, Khalidur R, Kang BY, Anania FA, et al. Low-Dose Cadmium Causes Metabolic and Genetic Dysregulation Associated With Fatty Liver Disease in Mice. *Toxicol Sci.* 2015;147(2):524-34.

157. Chen XX, Xu YM, Lau ATY. Metabolic effects of long-term cadmium exposure: an overview. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2022;29(60):89874-88.

158. Gao Y, Lu Y, Huang S, Gao L, Liang X, Wu Y, et al. Identifying early urinary metabolic changes with long-term environmental exposure to cadmium by mass-spectrometry-based metabolomics. *Environ Sci Technol.* 2014;48(11):6409-18.

159. Yudkoff M. Disorders of Amino Acid Metabolism. *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*, 8th edition. 2012:737-54.

160. Rodriguez-Moro G, Roldan FN, Baya-Arenas R, Arias-Borrego A, Callejon-Leblic B, Gomez-Ariza JL, et al. Metabolic impairments, metal traffic, and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;27(2):1762-75.

161. Garcia-Sevillano MA, Jara-Biedma R, Gonzalez-Fernandez M, Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza JL. Metal interactions in mice under environmental stress. *Biometals.* 2013;26(4):651-66.

162. Garcia-Sevillano MA, Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza JL. Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity. *Electrophoresis.* 2015;36(18):2348-65.

163. Turolo S, Edefonti A, Syren ML, Marangoni F, Morello W, Agostoni C, et al. Fatty Acids in Nephrotic Syndrome and Chronic Kidney Disease. *J Ren Nutr.* 2018;28(3):145-55.

164. Donaldson WE. Effects of dietary lead, cadmium, mercury, and selenium on fatty acid composition of blood serum and erythrocyte membranes from chicks. *Biol Trace Elem Res.* 1985;7(4):255-62.

165. Ishida T, Nishiumi S, Tanahashi T, Yamasaki A, Yamazaki A, Akashi T, et al. Linoleoyl ethanolamide reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact dermatitis in mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;699(1-3):6-13.

166. Griffin JL, Walker L, Shore RF, Nicholson JK. High-resolution magic angle spinning 1H-NMR spectroscopy studies on the renal biochemistry in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the effects of arsenic (As3+) toxicity. *Xenobiotica.* 2001;31(6):377-85.


167. Yang Y, Li C, Nie X, Feng X, Chen W, Yue Y, et al. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning 1H NMR

- spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. *J Proteome Res.* 2007;6(7):2605-14.
168. Vance JE, Tasseva G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(3):543-54.
169. Garcia-Sevillano MA, Garcia-Barrera T, Navarro-Roldan F, Montero-Lobato Z, Gomez-Ariza JL. A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J Proteomics.* 2014;104:66-79.
170. Ishibashi Y, Harada S, Eitaki Y, Kurihara A, Kato S, Kuwabara K, et al. A population-based urinary and plasma metabolomics study of environmental exposure to cadmium. *Environ Health Prev Med.* 2024;29:22.
171. Nogawa K, Honda R, Kobayashi E, Ishizaki A. [Clinico-chemical studies on chronic cadmium poisoning. (Part 4). Aminoaciduria (author's transl)]. *Nihon Eiseigaku Zasshi.* 1980;34(6):723-32.
172. Nomiyama K, Nomiyama H, Nomura Y, Taguchi T, Matsui K, Yotoriyama M, et al. Effects of dietary cadmium on rhesus monkeys. *Environ Health Perspect.* 1979;28:223-43.
173. Ritsma JH. Stereoselectivity in Divalent Cobalt, Nickel and Zinc Bis Complexes of Some Amino(Methyl or Benzyl) Substituted Histidines. *J Inorg Nucl Chem.* 1976;38(4):907-15.
174. Menke A, Muntner P, Silbergeld EK, Platz EA, Guallar E. Cadmium levels in urine and mortality among US adults. *Environmental health perspectives.* 2009;117(2):190-6.
175. Kochlik B, Gerbracht C, Grune T, Weber D. The Influence of Dietary Habits and Meat Consumption on Plasma 3-Methylhistidine-A Potential Marker for Muscle Protein Turnover. *Mol Nutr Food Res.* 2018;62(9):e1701062.
176. Tian M, Yan J, Zhang H, Wei Y, Zhang M, Rao Z, et al. Screening and validation of biomarkers for cadmium-induced liver injury based on targeted bile acid metabolomics. *Environ Pollut.* 2022;300:118837.
177. Guan T, Xin Y, Zheng K, Wang R, Zhang X, Jia S, et al. Metabolomics analysis of the effects of quercetin on renal toxicity induced by cadmium exposure in rats. *Biomaterials.* 2021;34(1):33-48.
178. Kerek EM, Prenner EJ. Inorganic cadmium affects the fluidity and size of phospholipid based liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(12):3169-81.
179. Orr SE, Bridges CC. Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
180. Adi PJ, Burra SP, Vataparti AR, Matcha B. Calcium, zinc and vitamin E ameliorate cadmium-induced renal oxidative damage in albino Wistar rats. *Toxicol Rep.* 2016;3:591-7.
181. Wongmekiat O, Peerapanyasut W, Kobroob A. Catechin supplementation prevents kidney damage in rats repeatedly exposed to cadmium through mitochondrial protection. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2018;391(4):385-94.

182. Lee CH, Yu HS. Role of mitochondria, ROS, and DNA damage in arsenic induced carcinogenesis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2016;8(2):312-20.
183. Rafati A, Hoseini L, Babai A, Noorafshan A, Haghbin H, Karbalay-Doust S. Mitigating Effect of Resveratrol on the Structural Changes of Mice Liver and Kidney Induced by Cadmium; A Stereological Study. *Prev Nutr Food Sci*. 2015;20(4):266-75.
184. Kocak M, Akcil E. The effects of chronic cadmium toxicity on the hemostatic system. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2006;35(6):411-6.
185. Dkhil MA, Diab MSM, Lokman MS, El-Sayed H, Bauomy AA, Al-Shaebi EM, et al. Nephroprotective effect of *Pleurotus ostreatus* extract against cadmium chloride toxicity in rats. *An Acad Bras Cienc*. 2020;92(1):e20191121.
186. Pham T, Marion M, Denizeau F, Jumarie C. Cadmium-induced apoptosis in rat hepatocytes does not necessarily involve caspase-dependent pathways. *Toxicology in vitro*. 2006;20(8):1331-42.
187. Hu X, Chandler JD, Park S, Liu K, Fernandes J, Orr M, et al. Low-dose cadmium disrupts mitochondrial citric acid cycle and lipid metabolism in mouse lung. *Free Radic Biol Med*. 2019;131:209-17.
188. Huyut Z, Arihan O. Effect of intermittent fasting during acrylamide exposure on blood copper, zinc and lead levels in rats. *Eastern Journal of Medicine*. 2018;23(4).
189. Brzóška M, Moniuszko-Jakoniuk J. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem Toxicol*. 2001;39(10):967-80.

8. EKLER

EK 1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-73

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 23.08.2023 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2023/06
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2022/62 (ONAY TARİHİ: 29.11.2022)
KARAR NUMARASI	: 2023/06- 15
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 29.11.2027
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Okan ARIHAN
HAYVAN DENEYLERİNDE	Doç. Dr. Okan ARIHAN, Öğr. Gör. Dr. Aslı Şan
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Dağlı GÜL, Arş. Gör. Nigar ABBAK (Doktora Tezi)
DİĞER YARDIMCI	: Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU, Dr. Öğr. Üyesi Tuba
ARAŞTIRMACILAR	REÇBER
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 69 Adet Wistar Sıçan (6-8 Haftalık, 200-250 Gram)

Kurulumuzun 29.11.2022 tarihli toplantısında 2022/62 dosya kayıt numarasıyla onaylanmış olan Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Okan ARIHAN'ın araştırma yürütücüsü olduğu "*Sıçanlarda Kadmium Maruziyetinde Oluşan Davranışsal, Biyokimyasal ve Metabolik Parametreler Üzerinde Korvakrol'ün Koruyucu Etkisinin Araştırılması*" başlıklı proje için verilen 11.08.2023 tarihli protokol revizyonu konulu dilekçe Kurulumuzun 23.08.2023 tarihli toplantısında görüşülmüş ve uygun bulunmuştur. Proje için onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı "*69 Adet Wistar Sıçan (6-8 Haftalık, 200-250 Gram)*" olarak güncellenmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmele yükümlüdür.

Prof. Dr. Nüket ÖRNEK BÜKEN
Etik Kurul Başkan Vekili

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06100 Sıhhiye-Ankara Ayrıntılı Bilgi için:
Telefon: 0 (312) 305 1090-1042 • Faks: 0 (312) 310 0530
www.etikkurui.hacettepe.edu.tr/index_bak.php

EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı

NİGAR ABBAK DOKTORA TEZ-2024

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 11	% 6	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 3
2	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
6	Yılmaz, Serap Çelebi. "Deguelin'in Deneysel Meme Kanseri Tedavisindeki Etkinliğinin Araştırılması", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
7	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1

EK 3. Dijital Makbuz

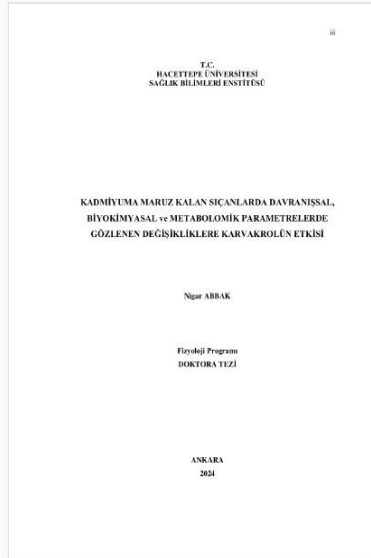


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Nigar taşdemiroğlu
Ödev başlığı: NİGAR ABBAK-DOKTORA TEZ-2024
Gönderi Başlığı: NİGAR ABBAK DOKTORA TEZ-2024
Dosya adı: N_GAR_ABBAK_DOKTORA_TEZ_-2024.docx
Dosya boyutu: 18.49M
Sayfa sayısı: 68
Kelime sayısı: 11,579
Karakter sayısı: 82,813
Gönderim Tarihi: 23-May-2024 07:12ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2386135467



9. ÖZGEÇMİŞ