



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**Akut bakır-oksit nanopartikül (CuO NP)  
uygulamasının sıçan karaciğer dokusundaki  
histopatolojik etkilerinin araştırılması**

**TEZ TİPİ  
DOKTORA TEZİ**

**PARIA SHOJAOLSADATI**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. FERRUH YÜCEL  
PROF.DR. BAYRAM UFUK ŞAKUL**

**Mayıs-2018**





**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**Akut bakır-oksit nanopartikül (CuO NP)  
uygulamasının sıçan karaciğer dokusundaki  
histopatolojik etkilerinin araştırılması**

**TEZ TİPİ  
DOKTORA TEZİ**

**PARIA SHOJAOLSADATI**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. FERRUH YÜCEL  
PROF.DR. BAYRAM UFUK ŞAKUL**

**Proje No:2016-1355  
(ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu)**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

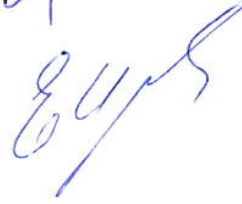
**Paria SHOJAOLSADATI**'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "**Akut bakır-oksit nanopartikül (CuO NP) uygulamasının sıçan karaciğer dokusundaki histopatolojik etkilerinin araştırılması**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih  
11 / 05 / 2018

Üye: Prof. Dr. Ferruh YÜCEL (Danışman)



Üye : Prof. Dr. Emel ULUPINAR



Üye : Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP



Üye : Prof. Dr. İhsaniye COŞKUN



Üye : Prof. Dr. Ayhan CÖMERT



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21. / 05. 2018 tarih ve 1174 / 5780 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Hasan Veysi Güneş**  
**Enstitü Müdürü**





## Özet

Karaciğer hastalıkları günümüzde giderek artan bir ölüm nedenidir. Vücuda farklı yollarla alınan bakır oksit nanopartikülleri (CuO-NP) karaciğer hücrelerine hasar vermektedir.

CuO-NP çok farklı sektörlerde ve farklı hedefler için kullanılır. CuO-NP'ünün hayvanların dokularında dağılarak yapısal değişikliklere neden olduğu saptanmıştır. CuO-NP için karaciğer hedef organlardan birisidir. Bu çalışmada CuO-NP 'nin sıçan karaciğerinde oluşturduğu hasar hücre ve organel seviyesinde incelenmiş ve bu hasarın mekanizması araştırılmıştır. Bu çalışma CuO-NP'ye maruz kalan sıçanlarda, karaciğer hasarını kantitatif yöntemlerle ele alan ilk stereolojik çalışmadır.

Bu çalışmada, Kontrol Grubunda 20, CuO-NP Grubunda (200 mg/kg) 20 olmak üzere, toplam 40 adet 6-8 haftalık 250-300 gr ağırlığında Sprague-Dawley ırkı erkek sıçan kullanılmıştır. Kontrol ve CuO-NP gruplardaki sıçanların karaciğerleri, ışık ve elektron mikroskobu (TEM) ile histopatolojik ve morfometrik yöntemlerle incelenmiştir. Apoptotik hücre ölümünü ortaya koymak üzere; Kaspaz-3 ve TUNEL yöntemleri de kullanılmıştır.

Biyokimyasal parametre olarak Malondialdehid (MDA), Katalaz (CAT), Nitrik oksit (NO), TNF- $\alpha$ , IL-6, Alanin aminotransferaz (ALT), Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri ve Kalpain aktivitesi ölçülmüştür.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre: CuO-NP verilen deney grubu hayvanların karaciğerlerinde sinüzoid'lerin karaciğer dokusundaki hacim oranı ( $V_v$ ) anlamlı olarak artarken; hepatosit hücrelerinin sitoplazmalarında, birim alana düşen mitokondri sayısı ( $N_a$ ) ve mitokondrilerin hepatosit Sitoplazmasındaki hacim oranı ( $V_v$ ) kontrol sıçanlara göre anlamlı olarak azaldı. Diğer taraftan, CuO-NP maruziyeti sonrasında, karaciğer dokusunda MDA ve Kalpain aktivasyonlarının arttığı buna karşın, Katalaz ve NO düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. Yine, serum AST, TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinde yükselme; ALT düzeylerinde ise azalma saptandı.

CuO-NP karaciğerde hücre ve doku düzeyinde hasara neden olmaktadır. Kalpain grubu enzimlerin artması karaciğerdeki hasarın oksidatif bir hasar olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hepatositlerde gözlenen apoptozun mitokondri yolağını aktive ettiği sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak CuO-NP nanopartiküllerin karaciğerde doku hasarına yol açtığı histomorfolojik ve biyokimyasal verilerle ortaya konmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Bakır-oksit nanopartikül (CuO-NP), Hepatotoksisite, Oksidatif stres

---

Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı ve REMER laboratuvarları, ESOGÜ Arum ve ESOGÜ Histoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

## Summary

Diseases of the liver are the cause of death which increase rapidly. The copper oxide nanoparticles (CuO-NP) consumption also damages the liver cells. We aimed to investigate damage of the acute consumption of (CuO-NP) in rat liver cells and hepatocyte organelles and mechanism of this damage.

CuO-NP is used in many different industries and for different targets. CuO-NP entering the body of animals diffuses in tissues and causes structural changes. The liver is a target organ for CuO-NP. This is the first stereological study of liver damage in rats exposed to CuO-NP.

This study was carried out at Istanbul Medipol University Faculty of Medicine, Department of Anatomy and REMER laboratories. In this study, a total of 40 Sprague-Dawley male rats 6-8 week (250-300 gr) were used. These rats divided into two groups: control and CuO-NP (200 mg/kg) groups. The livers of both groups were examined histopathologically and morphometrically by light and electron microscopy (TEM). To demonstrate apoptotic cell death; Caspase-3 and TUNEL methods were used.

According to the results obtained in this study: the volume ratio of sinusoids in the liver tissue ( $V_v$ ), of the experimental group CuO-NP was significantly increased; in the cytoplasm of hepatocyte cells, the number of mitochondria per unit area ( $N_a$ ) and the volume ratio of the mitochondria in the cytoplasm of hepatocyte cell ( $V_v$ ) decreased significantly compared to control rats. On the other hand, after CuO-NP exposure, MDA and calpain activations increased in the liver, whereas catalase and NO levels decreased. Serum AST, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels increased, but ALT levels decreased.

CuO-NP causes damage at the cell and tissue level in the liver. Enhancement in the calpain group enzymes indicates an oxidative damage to the liver. Furthermore, apoptosis observed in hepatocytes is the result of activation of the mitochondrial pathway. In conclusion, histomorphological and biochemical results of CuO-NP nanoparticles cause tissue damage in the liver.

**Key words:** Copper oxide nanoparticles (CuO-NP), Hepatotoxicity, Oxidative stress

# İÇİNDEKİLER

<b>1</b>	<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Karaciğer</b> .....	<b>4</b>
2.1.1	Karaciğer Embriyolojisi .....	4
2.1.2	Karaciğer Anatomisi.....	5
2.1.2.1	Karaciğerin kenarları ve projeksiyonu .....	8
2.1.2.2	Karaciğerin lobları .....	10
2.1.2.3	Karaciğerin ligamentleri .....	11
2.1.2.4	Karaciğeri yerinde tutan faktörler.....	12
2.1.2.5	Karaciğeri besleyen arterler ve venler .....	13
2.1.2.6	Karaciğerin lenf drenajı ve inervasyonu.....	13
2.1.2.7	Karaciğer segmentasyonu .....	14
2.1.3	Karaciğer Histolojisi .....	17
2.1.3.1	Karaciğer hücreleri .....	21
2.1.4	Karaciğer Fonksiyon Testleri .....	23
2.1.5	Aminotransferazlar (AST, ALT).....	24
<b>2.2</b>	<b>Nanopartikül</b> .....	<b>26</b>
2.2.1	Nanopartikül Toksikolojisi.....	27
2.2.2	Metal oksid nanopartiküller .....	28
2.2.3	Bakırın Özellikleri ve Kullanım Alanları .....	28
2.2.4	Bakır Oksit Nanopartiküllerinin Özellikleri ve Kullanım Alanları .....	29
<b>2.3</b>	<b>Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-<math>\alpha</math>) ve İnterlökin-6</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Antioksidanlar ve oksidatif stres hasarı</b> .....	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>Serbest radikaller</b> .....	<b>31</b>
2.5.1	Malondialdehit (MDA) ve Lipid peroksidasyonu.....	31
2.5.2	Nitrik oksit (NO) .....	31
2.5.3	Katalaz (CAT).....	32
2.5.4	Kalpainer.....	32
<b>3</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Deneyde kullanılan kimyasal maddelerin ve fiksatiflerin hazırlanması</b> .....	<b>33</b>
3.2.1	Bakıroksit nanopartikül çözeltisi (CuO-NP) .....	33
3.2.2	Serum fizyoloji .....	33
3.2.3	Nötral tamponlu formalin çözeltisi (%4 NBF) .....	33
3.2.4	Anestezikler .....	34
<b>3.3</b>	<b>Kontrol ve Deney Grupları</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4</b>	<b>Akut bakıroksid nanopartikül uygulaması</b> .....	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>Doku Alımı ve Histolojik İnceleme</b> .....	<b>36</b>
3.5.1	Histolojik doku takibi .....	36
3.5.2	Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi .....	36
3.5.3	Kaspaz 3 immunohistokimya boyama yöntemi .....	37
3.5.4	TUNEL boyama yöntemi .....	37
3.5.5	Transmisyon Elektron Mikroskop'una (TEM) preparat hazırlama yöntemi.....	38
<b>3.6</b>	<b>Morfometrik metotlar</b> .....	<b>38</b>
3.6.1	Karaciğer hacminin hesaplanması (V).....	39
3.6.2	Işık mikroskopunda elde edilen fotoğraflar üzerinde yapılan stereolojik ölçümler.....	40
3.6.2.1	Karaciğerde ortalama lobül alanının hesaplanması .....	40

3.6.2.2	Karaciğerde ortalama vena centralis çaplarının saptanması .....	40
3.6.2.3	Sinüzoid / karaciğer dokusu oranının (Volume fraction) ( $V_v$ ) hesaplaması .....	42
3.6.3	TEM mikroskopunda elde edilen fotoğraflar üzerinde yapılan stereolojik ölçümler .....	43
3.6.3.1	Nükleus / total hepatosit hücresi oranı ( $V_v$ ) .....	43
3.6.3.2	Mitokondri / Sitoplazma oranı .....	44
3.6.3.3	Birim alana düşen mitokondri sayısı ( $N_a$ ) .....	45
<b>3.7</b>	<b>Kan alımı ve Biyokimyasal değerlendirmeler .....</b>	<b>46</b>
3.7.1	Serum örneklerin hazırlanması .....	46
3.7.1.1	Tümör nekrozan faktör (TNF- $\alpha$ ) düzeyinin ölçümü .....	46
3.7.2	TNF- $\alpha$ Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi .....	46
3.7.2.1	İnterlökin 6 (IL-6) düzeyinin ölçülmesi .....	47
3.7.2.2	Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyinin ölçümü .....	48
3.7.2.3	Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyinin ölçümü .....	49
3.7.2.4	Kalpain Aktivitesi (CAPN1) düzeyleri ölçümü .....	50
3.7.3	Doku örneklerinin hazırlanması .....	51
3.7.3.1	Malondialdehit (MDA) düzeyinin ölçümü .....	51
3.7.3.2	Doku Nitrik oksit (NO) düzeyinin ölçümü .....	53
3.7.3.3	Doku homojenatının hazırlanması .....	54
3.7.3.4	Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçümü .....	56
3.7.3.5	Karaciğer dokusunda protein ölçümü .....	57
<b>3.8</b>	<b>İstatistiksel Analiz .....</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Ortalama vücut ağırlığı .....</b>	<b>60</b>
<b>4.2</b>	<b>Ortalama karaciğer ağırlığı ve hacmi .....</b>	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b>Histolojik bulgular .....</b>	<b>64</b>
4.3.1	Işık mikroskopu bulguları .....	64
4.3.2	Transmisyon elektron mikroskopu (TEM) incelemesi sonucu elde edilen bulguları .....	70
<b>4.4</b>	<b>Morfometrik bulgular .....</b>	<b>72</b>
4.4.1	Karaciğer ortalama lobül alanı .....	72
4.4.2	Karaciğerde ortalama vena centralis çapı .....	73
4.4.3	Sinüzoid / karaciğer dokusu oranı ( $V_v$ ) .....	75
4.4.4	Nükleus/ hepatosit hücre gövdesi oranı ( $V_v$ ) .....	77
4.4.5	Mitokondri/ Sitoplazma oranı .....	78
4.4.6	Birim alana düşen mitokondri sayısı ( $N_a$ ) .....	80
<b>4.5</b>	<b>Biyokimyasal Analiz Bulgular .....</b>	<b>81</b>
4.5.1	Sıçan serumundan ölçülen markerlerin bulguları .....	81
4.5.1.1	Tümör nekroz faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) düzeyi bulguları .....	81
4.5.1.2	İnterlökin-6 (IL-6) düzeyi bulguları .....	82
4.5.1.3	Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyini bulguları .....	83
4.5.1.4	Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyi bulguları .....	84
4.5.1.5	Kalpain (CAPN1) aktivitesi düzeyi bulguları .....	85
4.5.2	Doku homojenatından ölçülen biyokimyasal markerlerin bulguları .....	86
4.5.2.1	Malondialdehid (MDA) düzeyi bulguları .....	86
4.5.2.2	Nitrik oksit (NO) düzeyi bulguları .....	87
4.5.2.3	Katalaz (CAT) düzeyi bulguları .....	88
<b>5</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>97</b>
	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>99</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>110</b>

## Tablo Dizini

Tablo 2.1 Karaciğer fonksiyonlarını gösteren test ve biyokimyasal markerlar .....	24
Tablo 3.1 MDA deney prosedürü .....	52
Tablo 3.2 Nitrik Oksit deney Protokolü .....	55
Tablo 3.3 Katalaz deney Protokolü .....	57
Tablo 4.1 Kontrol gurubu hayvanlarına ait ortalama vücut ağırlıkları (gr). .....	60
Tablo 4.2 Deney grubu hayvanlarına ait ortalama vücut ağırlıkları (gr)...	61
Tablo 4.3 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait ortalama vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	61
Tablo 4.4 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait karaciğer ağırlıkları (gr) ve hacimleri (ml) ile ortalama değerleri.....	62
Tablo 4.5 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarına ait karaciğer ağırlığının istatistiksel değerlendirmesi .....	63
Tablo 4.6 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarına ait karaciğer hacminin istatistiksel değerlendirmesi .....	63
Tablo 4.7 Kontrol ve deney grubuna ait hayvanların karaciğer dokusunda gözlenen doku hasarı skorlaması (H&E).....	67
Tablo 4.8 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait ortalama karaciğer lobül alanları ve grup ortalamaları ( $\mu\text{m}^2$ ) değerler. ....	72
Tablo 4.9 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait ortalama karaciğer lobül alanının ( $\mu\text{m}^2$ ) istatistiksel değerlendirmesi.....	72
Tablo 4.10 Kontrol grubu hayvanlarına ait karaciğerdeki ortalama .....	73
Tablo 4.11 CuO-NP grubu hayvanlarına ait karaciğerdeki ortalama v. centralis çapları ( $\mu\text{m}$ ) .....	74
Tablo 4.12 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait ortalama v. centralis çaplarının ( $\mu\text{m}$ ) istatistiksel değerlendirmesi .....	74
Tablo 4.13 Kontrol grubundaki sinüzoid / karaciğer dokusu oranı .....	75
Tablo 4.14 CuO-NP grubundaki sinüzoid / karaciğer dokusu oranı .....	75
Tablo 4.15 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarına ait sinüzoid / karaciğer dokusu oranının istatistiksel değerlendirmesi .....	76
Tablo 4.16 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanların karaciğerlerinde nukleus/ hepatosit hücre gövdesi oranlarının istatistiksel değerlendirmesi.....	77
Tablo 4.17 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarında hepatositlerdeki Mitokondri/ Sitoplazma oranları ( $V_v$ ). .....	78
Tablo 4.18 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarında hepatositlerdeki Mitokondri/ Sitoplazma oranlarının ( $V_v$ ) istatistiksel değerlendirmesi.....	78
Tablo 4.19 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanların hepatositlerinde birim alana düşen mitokondri sayılarının ( $N_a$ ) istatistiksel değerlendirmesi.....	80
Tablo 4.20 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum TNF- $\alpha$ düzeyi.....	81
Tablo 4.21 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum IL-6 düzeyi. ....	82
Tablo 4.22 Kontrol ve deney grubu hayvalarındaki serum ALT düzeyi.....	83
Tablo 4.23 Kontrol ve deney grubu hayvalarındaki serum AST düzeyi. ....	84
Tablo 4.24 Kontrol ve deney grubu hayvalarındaki serum CAPN1 düzeyi.....	85

Tablo 4.25 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda MDA düzeyleri .....	86
Tablo 4.26 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda NO düzeyleri .....	87
Tablo 4.27 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda CAT düzeyleri .....	88



## Şekil Dizini

Şekil 2.1 Karaciğer gelişimi .....	5
Şekil 2.2 Karaciğerin anatomik yapısı, önden görünüm .....	7
Şekil 2.3 Karaciğerin anatomik yapısı, visseral yüz görünümü.....	8
Şekil 2.4 Karaciğer lobül modelleri .....	19
Şekil 2.5 Karaciğer asinüs'ü ve zonları.....	20
Şekil 2.6 AST ve ALT fonksiyonu.....	25
Şekil 3.1 Karaciğerin toplam hacim hesaplaması .....	39
Şekil 3.2 Karaciğer lobül alanının hesaplanması .....	40
Şekil 3.3 Karaciğerde ortalama vena centralis çapının ölçülmesi.....	41
Şekil 3.4 Sinüzoid / karaciğer dokusu oranının ( $V_v$ ) hesaplaması .....	42
Şekil 3.5 Nukleus / total hepatosit hücresi oranı ( $V_v$ ) .....	43
Şekil 3.6 Mitokondri / Sitoplazma oranının ( $V_v$ ) hesaplanması .....	44
Şekil 3.7 Birim alana düşen mitokondri sayısının hesaplanması .....	45
Şekil 3.8 TNF- $\alpha$ kalibrasyon eğrisi .....	47
Şekil 3.9 IL-6 kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 3.10 ALT kalibrasyon eğrisi .....	49
Şekil 3.11 AST kalibrasyon eğrisi .....	50
Şekil 3.12 CAPN1 kalibrasyon eğrisi .....	51
Şekil 3.13 MDA kalibrasyon eğrisi .....	53
Şekil 3.14 Nitrik Oksit kalibrasyon eğrisi .....	56
Şekil 3.15 Protein kalibrasyon eğrisi.....	58
Şekil 4.1 Kontrol ve CuO-NP gruplarının karaciğer ağırlığını gösteren grafik .....	63
Şekil 4.2 Kontrol ve CuO-NP gruplarının karaciğer hacmini gösteren grafik .....	64
Şekil 4.3 Kontrol grubuna ait H&E kesit görüntüsü .....	65
Şekil 4.4 CuO-NP grubuna ait H&E kesit görüntüsü .....	66
Şekil 4.5 Kontrol grubu hayvanların karaciğerlerinde, TUNEL negatif boyanma .....	68
Şekil 4.6 CuO-NP grubu hayvanların karaciğerlerinde, TUNEL pozitif boyanma gösteren apoptotik hücreler.....	68
Şekil 4.7 Kontrol grubu hayvanların karaciğerlerinde Kaspaz-3 negatif boyanma .....	69
Şekil 4.8 CuO-NP grubu hayvanların karaciğerlerinde Kaspaz-3 pozitif boyanma .....	69
Şekil 4.9 Kontrol grubu Karaciğerin transmisyon elektron mikroskopik görüntüsü.....	70
Şekil 4.10 CuO-NP grubu: Karaciğerin transmisyon elektron mikroskopik görüntüsü.....	71
Şekil 4.11 Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ortalama karaciğer lobül alanlarının karşılaştırılması gösteren grafik .....	73
Şekil 4.12 Kontrol ve deney grubu hayvanlarının karaciğerlerinde, ortalama v. centralis çaplarının karşılaştırılması gösteren grafik.....	74
Şekil 4.13 Kontrol ve CuO-NP gruplarının sinüzoid / karaciğer dokusu oranını gösteren grafik.....	76

Şekil 4.14 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarının karaciğerlerinde nukleus/ hepatosit hücre gövdesi oranını gösteren grafik.....	77
Şekil 4.15 Kontrol ve CuO-NP gruplarının Mitokondri/Sitoplazma oranını gösteren grafik .....	79
Şekil 4.16 Kontrol ve deney grubu hayvanlarının karaciğerlerinde birim alana düşen mitokondri sayısını ( $N_a$ ) gösteren grafik.....	80
Şekil 4.17 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum TNF- $\alpha$ düzeyleri .....	81
Şekil 4.18 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum IL-6 düzeyi ...	82
Şekil 4.19 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum ALT düzeyleri	83
Şekil 4.20 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum AST düzeyleri	84
Şekil 4.21 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum CAPN1 düzeyi	85
Şekil 4.22 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda MDA düzeyleri .....	86
Şekil 4.23 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda NO düzeyleri.....	87
Şekil 4.24 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda CAT düzeyleri .....	88



## Simge ve Kisaltmalar Dizini

CAT:	katalaz
cm:	santimetre
CuO-NP:	bakır oksit nanopartikülü
IL-6:	İnterlökin-6
IU/L:	İnternasyonal ünite bölü litre
KC:	karaciğer
Kg:	kilogram
L:	litre
MDA:	Malondialdehid
mg:	miligram
mm:	milimetre
NK:	doğal öldürücü
nm:	nanometre
NO:	nitrik oksit
NOS:	nitrik oksit sentaz
PUFA:	poli doymamış yağ asidi
ROS:	reaktif oksijen türleri
TEM:	Elektron mikroskobu
TNF- $\alpha$ :	Tümör nekrozis faktör- $\alpha$
$\mu$ m:	mikrometre



# 1 GİRİŞ VE AMAÇ

Modern çağın gereklilikleri sebebiyle hızla değişen ve gelişen teknoloji, günlük hayatta kullanılan ürünlere, ihtiyaç duyulan işlevlerin kazandırılması amacıyla farklı malzemelerin üretilmesine neden olmuştur. Bu malzemeler, kullanıldıkları ürünlerin hayat döngüleri içerisinde çeşitli yollarla çevresel ortamlara girmeye başlamış ve çevre için "öncelikli kirleticiler" adı altında, çevredeki davranışları ve çevreye olan etkileri tam olarak bilinmeyen, yeni bir kirletici gurubu oluşmasına neden olmuştur (Dowling, 2004).

Nano malzemeler üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda yoğun bir şekilde devam edip sayıca artış göstermektedir. Bir nanometre (nm) metrenin milyarda biri ( $10^{-9}$ ) kadardır. Nano ölçekteki maddeler nano boyutta, normal hallerine göre çok farklı özellikler gösterirler (Banfield ve Zhang, 2001). Küçük boyutlu nanotozlar, nanoteknolojinin temelini oluştururlar. Bu partiküller diğer malzemelere göre genellikle daha farklı ve üstün özelliklere sahiptirler.

Nanoteknolojinin hızla gelişmesine paralel olarak nanopartiküllerin insan sağlığı ve çevre üzerinde bıraktıkları etki büyük önem kazanmıştır. Deneysel çalışmaların sonuçlarına göre; bu nano malzemeler insan sağlığı üzerine hem pozitif (nano ilaçlar gibi) hem de negatif etkiye sahiptirler. Nano boyuttaki partiküller normal boyutta olan parçacıklarına göre daha farklı kimyasal, fiziksel, elektronik ve manyetik özellikler taşırlar. Nano partiküllerin, kimyasal aktivitesi, yüzey alanı ve kuantum etkileri farklı üretim metotları ile değişebilir. Son yıllarda çevreye ve sağlığa duyarlı (biouyumlu) nano malzemelerin üretilmesi hız kazanmıştır. Bu malzemelere örnek olarak çevre kirliliğini azaltmaya yardımcı nanokatalizörler ve kendi kendini temizleyen duvar boyaları verilebilir. Buna karşın, yine aynı özellikler çevreyi ve insan sağlığını son derece etkileyebilecek zehirli etkilere de yol açabilmektedir. Nano malzemeler su, yiyecek, kozmetik ürünleri, güneş koruyucu kremler, nano-ilaçlar ve ilaç taşıyıcı sistemleri aracılığıyla vücut içerisine taşınabilir. Bu şekilde vücut içerisine giren farklı nanopartiküller insan sağlığını tehdit eden maddelere dönüşebilmektedir.

Endüstriyel olarak nano boyutunda bakır partiküllerin üretiminin diğer metal nanopartiküllerinin üretilmelerine oranla daha az maliyetli olması, bu partiküllerin farklı sektörlerde yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur. Bakır nanopartikülü üstün özellikleri nedeniyle birçok kullanım alanına sahiptir. Diğer nano malzemelerde olduğu gibi bakır nanopartikülleri de atık sulara karışarak ya da farklı maddelere katılmak suretiyle çevreye ve insan sağlığına zarar verebilir.

Son yıllarda, nanoteknolojinin gelişmesiyle, nanopartiküller farklı alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Üstün özelliklere sahip metal nanopartiküller, gıda işleme, üretim ve besin emiliminin kolaylaştırılması ve

görselliğin arttırılması, ürün kalitesinin korunması için gıda sektörünün yanısıra ambalaj sektöründe de kullanılmaktadır.

Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve safranın salgılandığı büyük bir bezdir. Karaciğer aynı zamanda gelen ilaçları ve nanopartikülleri safra sistemine aktararak dışkı ile atılmasını sağlayan bir organdır. Karaciğerin bu fonksiyonu hepatobiliyer klirens olarak adlandırılmaktadır (Zhang, Poon, Tavares, McGilvray ve Chan, 2016). Değişik hastalıklara bağlı olarak karaciğerde farklı seviyelerde hasar meydana gelebilir. Bu hasar görme durumu devam ederse, karaciğer dokusundaki hasar geri dönüşümsüz hale gelebilir. Zamanla karaciğer sertleşir, küçülür ve fonksiyonunu yerine getiremez hale gelir. Karaciğerin geri dönüşümsüz hasarına siroz adı verilir. Karaciğer sirozunu oluşturan farklı sebepler vardır. Örneğin toksik maddeler, parazit larvalar ve farklı enfeksiyonlar. Ama bu faktörler arasında en sık ve en önemli nedenlerden birisi ilaçlara bağlı toksik maddelerin oluşturduğu hasardır (ARICI, 2008).

Bakır-oksit nanopartikülleri başta karaciğer olmak üzere diğer organlarda da (kalp, böbrek, akciğer) hasara neden olur. Bakır-oksit nanopartikülü ile oluşturulan toksik etki akut ve kronik olarak sıçan modellerinde iki şekilde oluşturulmuştur. Bu çalışmada akut model üzerinde araştırma yapılmıştır. Sıçanlarda, farklı dozajlarda akut bakır-oksit nanopartikül hepatotoksisitesi oluşturulan bir çalışmada sadece 200 mg/kg bakır-oksit nanopartikülü verilen deney grubunda hepatotoksisite ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu grubun karaciğer kesitlerinde nekrotik odaklar gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, *in vivo* çalışmalardan elde edilen veri miktarı halen yetersizdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar bakır nanopatiküllerinin toksik etkisini ortaya koymuştur. Bu partiküllerin böbrek, karaciğer ve dalak dokusunda morfolojik ve patolojik değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir.

Bu nedenle bakır oksit nanopartiküllerinin insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkilerini araştırmak üzere pek çok çalışma yapılmıştır, ancak bu hasar mekanizmasının altında yatan birçok yolak halen belirlenememiştir.

Hepatositlerde oluşan nekroz ve apoptoz yolakları ve bu yolaklarda aktive olan enzim grubunun yanısıra hasar gören organeller de belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla farklı histolojik boyama teknikleri kullanılmaktadır. Örneğin; TUNEL boyama tekniği ile DNA hasarının tespiti yapılmaktadır. Hücrelerdeki hasarın etkisi lizozom, mitokondri ve çekirdekteki değişikliklere bakılarak araştırılmaktadır. Diğer taraftan, nekrotik ve apoptotik yolaklarda oluşan hasar sonucu aktive olan kalpain enzim grubunun aktivasyonunu göstermek için biyokimyasal parametreler kullanılmıştır (Derksen, 2016.; Pal, 2015.)

Reaktif oksijen türleri, oksijenin normal metabolizması ile oluşan ve eşlenmemiş elektron taşımaları nedeniyle reaktivitesi çok yüksek ürünlerdir.

Reaktif oksijen türlerinin yıkıcı özelliklerine karşı dokularda antioksidan savunma sistemleri bulunur. Reaktif oksijen metabolitlerinin üretimindeki artış ve antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilmeleri arasındaki dengesizlik sonucunda oksidatif stres artmaya başlar. Nitekim, son yıllarda oksidatif stresin nanopartikül toksisitesinde önemli bir etken olduğu tezi öne çıkmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada oksidatif stres markerleri olarak tanınan Malondialdehid (MDA), Katalaz (CAT) ve Nitrik Oksid (NO) ölçülmüştür.

CuO-NP'nin karaciğer dokusundaki toksik etkilerini en son morfometrik yöntemlerle araştıran ve sonuçları kantitatif olarak ortaya koyan bir çalışma bulunmadığından, bu çalışmada, akut bakır-oksit nanopartikül (CuO-NP) uygulamasının sıçan karaciğerinde ortaya çıkaracağı histopatolojik değişikliklerin morfometrik yöntemlerle kantitatif olarak saptanması amaçlanmıştır.



## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Karaciğer

#### 2.1.1 Karaciğer Embriyolojisi

Karaciğer, en erken gelişen embriyonik organlardan biridir ve fetustaki homeostazisin sağlanmasında önemli bir rol üstlenir. Karaciğer, safra kesesi ve safra kanalları, embriyonel dönemin dördüncü haftasının başında ön bağırsağın kaudalinden ventral yönde bir çıkıntı (hepatik divertikül) olarak belirir. Son çalışmalara ait bulgular, hepatik divertikül ve pankreas'ın ventral tomurcuğunun embriyonik endoderm'e ait iki farklı hücre topluluğundan geliştiğini ileri sürmektedir (Şekil 2.1).

Hepatik divertikül, gelişmekte olan kalp ve mide arasındaki splanknik mezoderm kitlesi olan septum transversum'a doğru uzanır ve iki parçaya bölünür. Hepatik divertikülünün daha geniş olan kranial parçası karaciğer taslağıdır. Çoğalan endodermal hücreler, ışınal tarzda oluşan hepatosit kordonlarını ve intrahepatik safra kanallarını döşeyen epitel hücrelerini oluştururlar. Karaciğer divertikül'ünün küçük kaudal parçası safra kesesini, divertikülün sapı da ductus cysticus'ü oluşturur. Başlangıçta, ekstrahepatik safra sistemi epitel hücreleriyle tıkalıdır. Daha sonra merkezdeki hücrelerin dejenerasyonu ile lümeni açık bir kanal gelişmiş olur. Hepatik ve sistik kanalları duodenum'a bağlayan sap, safra kanalını oluşturur. Başlangıçta duodenumun ön yüzünde yerleşik olan safra kanalı, duodenumun büyümesi ve onun rotasyonu ile arka yüze taşınır (Moore KL ve TVN, 2009a; S. Standring, Anand, N., Birch, R., Collins, P., Crossman, A.R., Gleeson, M., Jawaheer, G., Smith, A.L., Spratt, J.D., Stringer, M.D., Tubbs, R.S., Tunstall, R., Wein, A.J., Wigley, B.C, 2016).

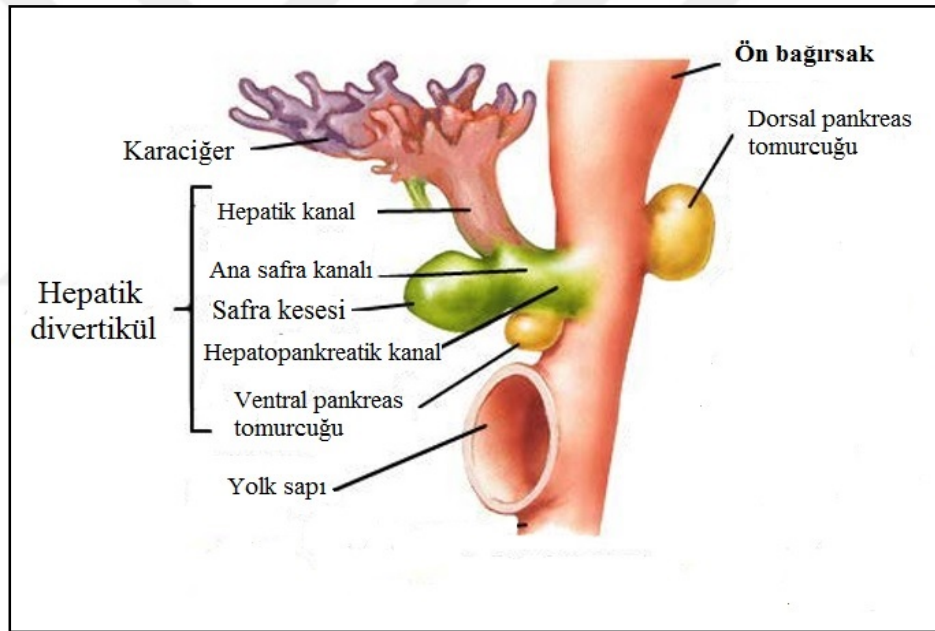
Hepatik kordonlar, endotelle döşeli boşlukların çevresinde ağ oluşturarak hepatik sinüzoid taslaklarını oluştururlar. Karaciğerin fibröz dokusu, hematopoietik dokusu ve Kupffer hücreleri septum transversum mezenşiminden köken alır (Moore KL ve TVN, 2009a).

Başlangıçta birbirleriyle anastomoz yapan hücre toplulukları şeklindeki hepatositler, çevrelerindeki mezenşim doku tarafından poligonal lobüller şeklinde sınırlandırılırlar. Daha sonra lobüllerin köşelerinde portal dolaşıma ait küçük damarlar, merkezinde ise v. centralis gelişir (Moore KL ve TVN, 2009b; Şeftalioğlu, 1998).

Vena umbilicalis'den gelen oksijen saturasyonu yüksek olan kanın miktarı, karaciğerin gelişimini ve fonksiyonunu belirler. Gelişimin erken dönemlerinde hepatik kordonların bölünmesi simetriktir, gelişim ilerledikçe sağ lobun büyümesi hızlanır ve daha fazla büyür. Karaciğer beşinci haftadan

onuncu haftaya kadar büyümeye devam eder ve onuncu haftada, üst abdominal kavitenin büyük bir kısmını kaplar (Zhao ve Duncan, 2005).

Fetusun 6. haftasında başlayan hematopoietik fonksiyon 7. aya kadar artarak devam eder. Yedinci aydan doğuma kadar azalarak da olsa hematopoietik aktivite sürer. Dokuzuncu haftayla birlikte karaciğer, fetüsün toplam ağırlığının yaklaşık %10'ununu oluşturur. On ikinci haftada, karaciğer hücreleri safra üretimine başlar (Moore KL ve TVN, 2009b; Sadler, 1990). Hepatositlerde safra yapımı intrauterin 12. haftada başlar ve 13. haftadan itibaren, üretilen safranın duodenuma boşalmasına bağlı olarak sindirim kanalı içeriğinin rengi koyu yeşil renk alır (Moore KL ve TVN, 2009b; S. Standring, Anand, N., Birch, R., Collins, P., Crossman, A.R., Gleeson, M., Jawaheer, G., Smith, A.L., Spratt, J.D., Stringer, M.D., Tubbs, R.S., Tunstall, R., Wein, A.J., Wigley, B.C, 2016). Doğumda karaciğerde birkaç kan adacığı kalmıştır. Karaciğerin hematopoietik potansiyeli bütün yaşam süresince devam eder (Moore KL ve TVN, 2009a; Şeftalioğlu, 1998).



Şekil 2.1 Karaciğer gelişimi (Netter)

### 2.1.2 Karaciğer Anatomisi

Vücuttaki en büyük bez olan karaciğer, karın boşluğunun üst tarafında, regio hypochondriaca dextra'nın tümünü, regio epigastrica'nın büyük bir kısmını doldurur. Regio hypochondriaca sinistra'da da, linea medioclavicularis sinistra'ya kadar uzanır (Arıncı, 1997). Karaciğer boyutu cinse, yaşa ve vücut boyutuna bağlıdır. Karaciğerin sağ tarafı ön-arka yönde 14-16 cm, yüksekliği ise 8 cm kadardır. Karaciğer erkeklerde 1400 ilâ 1800 gr, kadınlarda ise 1200 ilâ 1400 gr kadardır. Bununla beraber karaciğer 1000 - 2500 gr arasında da olabilir. Ayrıca, canlılarda içinde bir kilogram kan bulunur. Fetus'ta, karaciğerin vücut ağırlığına göre oranı,

erişkinlerdekinden daha fazladır. Erişkinlerde vücut ağırlığının %2'si kadardır. Bu nedenle, çocukların karnı biraz şiş gibi görülür. Kırmızımtırak kahverengi renginde olan karaciğer, sağlam ve elastiki olmasına rağmen, gevrek ve kolaylıkla parçalanabilen bir yapıya sahiptir. Çok damarlı olması nedeniyle, yaralanmaları büyük kanamalara yol açar (Moore K.L. , 2007). Nitekim, künt karın travmalarında dalaktan sonra en fazla yaralanan organ karaciğerdir (Velmahos vd., 2003).

Karaciğerin facies diaphragmatica ve facies visceralis olmak üzere iki yüzü vardır.

**Facies diaphragmatica:** Büyük olan bu yüz diafragma ile komşudur ve bölümlere ayrılır.

**Pars superior:** Facies diaphragmatica'nın üst kısmıdır. Bu yüz diafragma kubbesi aracılığı ile sağ tarafta plevra ve akciğerle, sol tarafta da kalp ve kalbi örten pericardium ile komşudur. Pars superior'un büyük bir kısmı periton ile kaplıdır. Sadece arka kısmına yakın bölümünde periton bulunmaz. Bu peritonsuz alana area nuda adı verilir ve diafragmaya gevşek bağ dokusu aracılığı ile yapışıktır. Area nuda, lig. coronarium tarafından sınırlanır. Bu sahanın arkadaki büyük kısmı pars posterior'da, öndeki küçük kısmı ise pars superior'un arka bölümünde bulunur (S. Standring, Borley, N.R., Collins, P., Crossman, A.R., Gatzoulis, M.A., Healy, J.C., Johnson, D., Mahadevan, V., Newell, R.L., Wigley, B.C., 2016).

**Pars anterior:** Karaciğerin diafragmatik yüzünün ön bölümüdür. Bu bölüm sağ tarafta 6.-10. kaburga ve kıkırdakları ile sol tarafta ise 7-8. kıkırdak kaburgalarla komşudur. Ortada ise proc. xiphoideus ve hemen aşağısındaki karın ön duvarı bölümü ile komşuluk yapar. Pars anterior, lig. falciforme hepatis'in bulunduğu yer hariç, tamamen peritonla kaplıdır (Şekil 2.2)(Arıncı, 1997).

**Pars posterior:** Sağ tarafta geniş ve künt, sol tarafta ise dardır. Orta kısmı omur gövdeleri üzerine oturduğu için konkavdır. Bu konkavlığın biraz sağ tarafında v. cava inferior'un oturduğu sulcus venae cavae bulunur. Bu oluşun da 2-3 cm sol tarafında fissura ligamenti venosi denilen dar bir yarık bulunur. Bu yarıқта, embriyolojik bir yapı olan ductus venosus'un kapanması ile oluşan lig. venosum bulunur. Lobus caudatus, sulcus venae cavae inferioris ile fissura ligamenti venosi arasında yer alır. Sulcus venae cavae inferioris'in biraz sağında ve kısmen de visceral yüzde, gl. suprarenalis'in oturduğu, impressio suprarenalis denilen çukurluk bulunur. Fissura ligamenti venosi'nin arka ucunun biraz solundaki çukura, oesophagus'u mideye bağlayan bölümü oturur. Buraya impressio oesophagea denilir.

**Pars dextra:** Diafragmatik yüzün peritonla örtülü sağ kısmıdır. Bu bölüm diafragma aracılığı ile kaburgalarla komşudur (Moore K.L. , 2007).

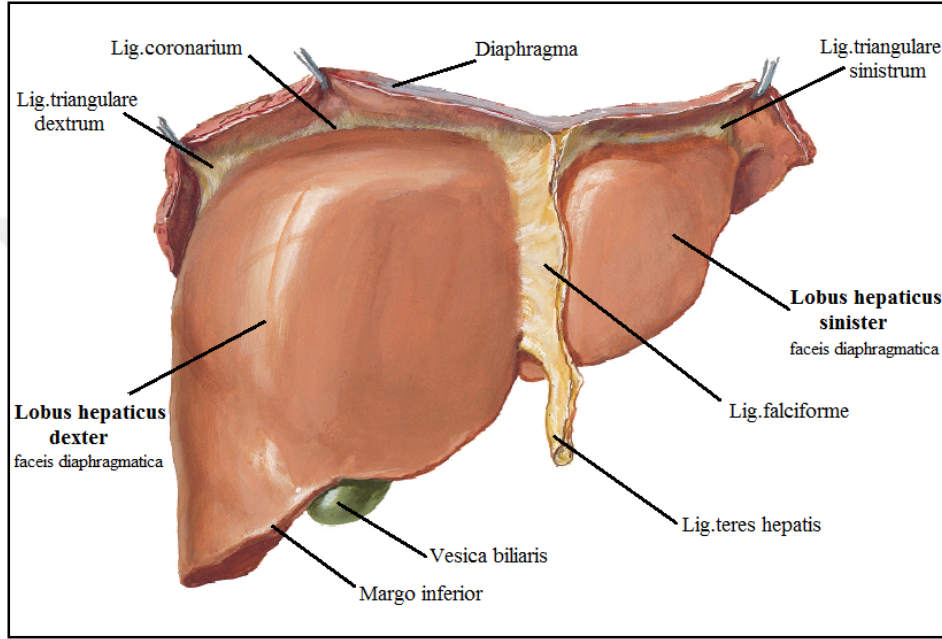


Facies dexteri üç eşit parçaya bölecek olursak:

1/3 üst kısmı, 7.ve 8. kosta aralarında bulunur

1/3 orta kısmı, 9.ve 10. kosta ile ve recessus costodiaphragmaticus ile komşudur.

1/3 alt kısmı, thorax duvarı ile direk temastadır (Arıncı, 1997; S. Standring, Borley, N.R., Collins, P., Crossman, A.R., Gatzoulis, M.A., Healy, J.C., Johnson, D., Mahadevan, V., Newell, R.L., Wigley, B.C., 2016).



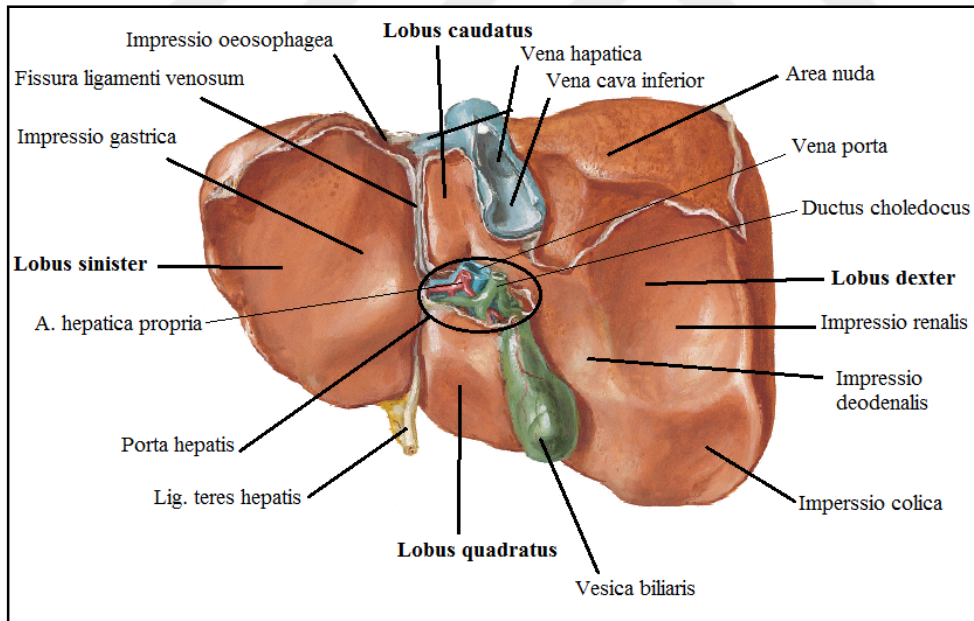
Şekil 2.2 Karaciğerin anatomik yapısı, önden görünüm (Netter, 2011).

**Facies visceralis:** Karaciğerin karın organları ile komşu olan konkav alt yüzüne facies visceralis denilir (Şekil 2.3). Bu yüz arkaya, aşağıya ve biraz da sol tarafa bakar. Tespit edilerek çıkarılmış karaciğerin visseral yüzünde, komşu olduğu organların izleri bulunur. Bu yüzün ortalarında porta hepatis denilen büyük bir geçit bulunur. Porta hepatis'ten v. portae hepatis ve etrafındaki sinir ağı ile birlikte a. hepatica propria'nın dalları girer, safra kanalları ile lenf damarları çıkarlar. Porta hepatis'in her iki tarafında, arka kenardan ön kenara doğru sagittal yönde uzanan iki oluk bulunur. Sağ taraftaki oluğa sulcus sagittalis dextra, sol taraftaki yarığa ise fissura sagittalis sinistra denilir. Sulcus sagittalis dextra'nın ön yarısına fossa vesica biliaris, arka yarısına ise sulcus venae caeve inferioris denilir. Fossa vesica biliaris'e vesica biliaris, sulcus venae caeve inferioris'e ise v.cava inferior oturur. Fissura sagittalis sinistra'nın lig. teres hepatis'in oturduğu ön yarısına fissura ligamenti teretis, lig. venosum'un oturduğu arka yarısına ise, fissura ligamenti venosi denilir. Visseral yüzün porta hepatis, fossa vesica biliaris, sulcus venae caeve inferioris, fissura ligamenti teretis ve fissura ligamenti venosi hariç, her tarafı peritonla kaplıdır. Bu iki sagittal oluğu ortada porta hepatis birleştirir, böylece H harfi şeklinde bir oluşum

ortaya çıkar. Bu oluklar karaciğerin visseral yüzünü dört loba ayırır. Sulcus sagittalis dextra'nın sağ tarafında kalan bölüme lobus hepatis dexter, fissura sagittalis sinistra'nın solunda kalan bölüme ise lobus hepatis sinister denilir. Bu iki oluk arasında ve porta hepatis'in önünde kalan kısma lobus quadratus, arkasında kalan bölüme ise lobus caudatus denilir.

Sağ lobun visseral yüzünde önden arkaya doğru impressio colica, impressio renalis ve impressio suprarenalis'in bir bölümü (diğer bölümü arka yüzdendir) bulunur. Impressio renalis'in sol tarafında da impressio duodenalis bulunur. Impressio colica'ya flexura coli dextra, impressio renalis'e sağ böbrek, impressio suprarenalis'e sağ böbreküstü bezi, impressio duodenalis'e ise duodenum'un ikinci bölümü oturur.

Sol lobun alt yüzünde midenin oturduğu impressio gastrica denilen tek bir iz bulunur. Bu yüzün lobus caudatus'a yakın bölümündeki çıkıntılı kısma tuber omentale denilir. Tuber omentale, omentum minus'un ön yüzünde curvatura gastrica minor'a oturur. V. cava inferior'un hemen ön tarafındaki lobus caudatus'a ait çıkıntıya proc. caudatus denilir (Arıncı, 1997; Moore K.L. , 2007; S. Standring, Borley, N.R., Collins, P., Crossman, A.R., Gatzoulis, M.A., Healy, J.C., Johnson, D., Mahadevan, V., Newell, R.L., Wigley, B.C., 2016) .



Şekil 2.3 Karaciğerin anatomik yapısı, visseral yüz görünümü (Netter, 2011).

### 2.1.2.1 Karaciğerin kenarları ve projeksiyonu

Karaciğerin pozisyonu vücut yapısına, vücudun pozisyonuna ve solunum durumuna göre değişir. İspirasyonda 3 cm aşağı, ekspirasyonda

da 3 cm yukarı çıkar. Ayakta iken biraz aşağı iner, yatar pozisyonda ise biraz yukarı çıkar. Yaşlılarda biraz daha aşağıdadır.

Karaciğerin arka (margo posterior) ve alt (margo inferior) olmak üzere iki kenarı vardır. Arka kenar facies visceralis ile facies diaphragmatica arasında arka tarafta oluşan kenardır. Sağ tarafta künt olan bu kenar, sol tarafa doğru gittikçe incilir. Tam bir kenara benzememesi nedeni ile bazı kaynaklarda arka kenardan bahsedilmez. Arka kenar, sağda ve linea axillaris'in biraz arkasında, 11. kaburganın altında alt kenarın devamı şeklinde başlar ve 12. kaburganın alt kenarını takip ederek columna vertebralis'i, 12. göğüs omurunun ortası hizasında keser. Daha sonra, konveksliği sola ve aşağı bakan bir kavis çizerek, sola ve yukarı doğru uzanır ve arkada 8. interkostal aralıkta, sol linea medioclavicularis hizasında, karaciğerin sol ucunda alt kenarla birleşir.

Alt kenar (margo inferior), facies visceralis ile facies diaphragmatica arasında ön, kısmen de yan tarafta oluşan kenardır. Bu kenarın sağ yanda kalan bölümü biraz küntçedir. Buna karşılık ön taraftaki bölümü ince ve keskindir. Bu keskin bölümde iki çentik bulunur. Bunlardan birisi orta hattın hemen sağ tarafında yer alır ve incisura lig. teretis denilir. Bu çentik visceral yüzde görülen fissura ligamenti teretis'in başlangıç yeridir ve buradan lig. teres hepatis geçer. İkinci çentik, orta hattın 4-5 cm sağ tarafında bulunur ve sağ m. rectus abdominis'in dış kenarının sağ arcus costarum'ü kestiği yere uyar (Murphy noktası). Burada safra kesesinin fundus'u, margo inferior'u biraz taşarak aşağı uzanır. Margo inferior sol tarafta 5. interkostal aralıkta, genellikle linea medioclavicularis'den başlar. Buradan sağa ve aşağıya doğru uzanan margo inferior, sol arcus costarum'ü 7. ve 8. kıkırdak kaburgaların birleştiği yerde, sağ arcus costarum'ü ise 9. ve 10. kıkırdak kaburgaların birleştiği yerde keser. Buradan itibaren alt kenarın seyri, hemen hemen sağ arcus costarum'un seyrine uyar. Sağ linea axillaris'in biraz arkasında 11. kaburganın altında arka kenarla birleşir. Arkada 12. kaburganın alt kenarını takip ederek 8. interkostal aralıkta başladığı yere gelir. Epigastrium bölgesinden geçen margo inferior orta çizgiyi, proc. xiphoideus'un tabanı ile umbilicus arasındaki mesafenin ortasından veya proc. xiphoideus'un tabanının bir el genişliği aşağısından çaprazlar. Burası aynı zamanda planum transpyloricum'a uymaktadır. Alt kenarın iki arcus costarum arasında kalan bölümü, Labbe üçgenini yukarıdan sınırlar. Labbe üçgeni'nin diğer sınırlarını ise sol arcus costarum ile her iki tarafın 9.-10. kıkırdak kaburgaların birleşme yerlerini birbirine bağlayan yatay çizgi belirler. Diğer bir deyişle Labbe üçgeni, midenin karın ön duvarı ile doğrudan komşuluk yaptığı saha olarak tarif edilebilir. Karaciğer, angulus infrasternalis'in aşağısında ve Labbe üçgeni'nin yukarısında, karın ön duvarının arka yüzü ile doğrudan temas eder (S. Standring, Borley, N.R., Collins, P., Crossman, A.R., Gatzoulis, M.A., Healy, J.C., Johnson, D., Mahadevan, V., Newell, R.L., Wigley, B.C., 2016).

**Karaciğerin projeksiyonu;** Önde karaciğerin üst sınırı, sağda linea medioclavicularis üzerinde 4. interkostal aralıktan (en yüksek nokta) sola ve biraz aşağıya uzanır; 5. kıkırdak kaburga hizasından geçerek orta çizgi üzerinde processus xiphoideus'un tabanını ve solda 6. kıkırdak kaburganın sternum'la birleştiği noktayı çaprazlayarak orta hattın 7-8 cm soluna kadar uzanır. Arkada üst kenarı orta hatta 9. göğüs omurunun alt kenarı hizasında, sağ linea paravertebralis'te 10. interkostal aralığa, sağ linea axillaris media'yı 7. interkostal aralıkta keser. Alt kenarı arkada linea mediana posterior'da 12. göğüs omurunun gövdesinin ortasından başlar, sağ 12. kaburganın alt kenarını takip eder, sağ 9. ve 10. kıkırdak kaburgaların birleşme yerinden geçerek sol 7. ve 8. kıkırdak kaburgaların birleşme yerini keser.

### 2.1.2.2 Karaciğerin lobları

Karaciğer biri büyük, lobus hepatis dexter, diğeri küçük, lobus hepatis sinister olmak üzere iki lobdan oluşur. Ön ve üst yüzde bu iki lobu birbirinden lig. falciforme hepatis ayırır. Visseral yüzde lobları birbirinden ayıran yapılar daha belirgindir. Daha önce de anlatıldığı gibi, visseral yüzde bulunan H harfi şeklindeki oluklar, karaciğerin visseral yüzünü dört loba ayırır. Sulcus sagittalis dextra'nın sağ tarafında kalan bölüme lobus hepatis dexter, fissura sagittalis sinistra'nın solunda kalan bölüme ise lobus hepatis sinister denilir. Bu iki oluk arasında ve porta hepatis'in önünde kalan kısma lobus quadratus, arkasında kalan kısma ise lobus caudatus adı verilir.

**Lobus hepatis dexter:** Sağ hypochondrium bölgesinde bulunur. Sol lobdan 6 kat daha büyüktür ve tüm karaciğerin 5/6'sını oluşturur. Sağ ve sol lobun sınırını diaframatik yüzde lig. falciforme hepatis, visseral yüzde ise fissura sagittalis sinistra belirler.

**Lobus quadratus:** Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in ön tarafında bulunur. Bu lobu önden karaciğerin margo inferior'u, arkadan porta hepatis, sağ taraftan fossa vesica biliaris ve sol taraftan da fissura ligamenti teretis sınırlar.

**Lobus caudatus:** Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in arka tarafında, 10.-11. göğüs omurları hizasında bulunur. Bu lobu önden porta hepatis, sağdan sulcus venae cavae inferioris ve soldan da fissura ligamenti venosi sınırlar. Lobus caudatus'un ön tarafta iki uzantısı vardır. Bunlardan daha dik olan sol taraftakine proc. papillaris, sağ taraftakine ise proc. caudatus denilir. Proc. papillaris porta hepatis'in arka kenarının sol yarısını, proc. caudatus ise sağ yarısını oluşturur ve sağ lobla birleşir. Proc. caudatus'u örten periton, for. bursa omentalis'i ön-üst kısımdan sınırlar.

**Lobus hepatis sinister;** Sağ lobdan daha küçük ve yassıdır. Tüm karaciğerin 1/6'sını oluşturur. Epigastrium'da ve kısmen de sol hipokondrium'da bulunur. Biraz konveks olan üst yüzü diafragma ile,

konkav olan alt yüzü ise mide ile komşudur. Sol ucu genellikle linea medioclavicularis'de sonlanır, fakat bazen dalağa kadar uzanır. Bu uçta bulunan bağ dokusu yapıya appendix fibrosa hepatis denilir (Arıncı, 1997; Moore K.L. , 2007; S. Standring, Borley, N.R., Collins, P., Crossman, A.R., Gatzoulis, M.A., Healy, J.C., Johnson, D., Mahadevan, V., Newell, R.L., Wigley, B.C., 2016).

### 2.1.2.3 Karaciğerin ligamentleri

Karaciğer diafragmanın alt yüzüne ve karın ön duvarına 6 bağ aracılığı ile tutunur. Bunlardan beşi (lig. falciforme hepatis, lig. coronarium, lig. hepatorenale, lig. triangulare dextrum ve lig. triangulare sinistrum) peritoneum'un oluşturduğu bağlardır. Birisi ise (lig. teres hepatis) embriyolojik v. umbilicalis'in kapanması ile oluşan bir bağdır. Karaciğer ayrıca peritoneal bir yapı olan omentum minus (lig. hepatogastricum + lig. hepatoduodenale) aracılığı ile mide ve duodenum'a bağlanır.

#### **1-Lig. falciforme hepatis:**

Karaciğerin sağ ve sol loblarının diafragmatik yüzlerini örten periton yaprakları, orta hattın biraz sağ tarafında biraraya gelerek karın ön duvarı ve diafragmanın alt yüzüne uzanır. Lig. falciforme hepatis denilen bu bağ, embriyoda mesenterium ventrale'nin karaciğer taslağı ile karın ön duvarı arasında kalan bölümüne uyar. Lig. falciforme hepatis'i oluşturan bu iki yaprak, arka ve yukarıda tekrar birbirinden ayrılarak lig. coronarium'un ön iki yaprağını oluşturur. Bu yapraklar diafragmaya geçerek, diafragmanın alt yüzünü örten peritonla uzanır. Bu bağın karın duvarına tutunan kısmı orta hatta, karaciğere tutunan kısmı ise orta hattın biraz sağında bulunur. Bu nedenle bağ, arkadan öne ve sağdan sola doğru oblik olarak uzanır. Buna göre bağın sağ yaprağı ön tarafa bakar ve sağ m. rectus abdominis'in arka yüzünü örten peritona yaslanır. Sol yaprağı ise arkaya doğru bakar ve karaciğerin sol lobunu örten peritona yaslanır. Bağın alt kenarı serbest ve orak şeklindedir. Bu nedenle de, lig. falciforme hepatis denilmiştir. Bu serbest kenarında ve iki yaprağı arasında lig. teres hepatis bulunur.

#### **2- Lig. coronarium hepatis:**

Karaciğerin ön yüzünü örten periton, diafragmanın alt yüzüne geçer ve ön tarafa doğru uzanır. Arka yüzünü örten periton ise yine diafragmanın alt yüzüne geçer, fakat arka tarafa doğru uzanır. Karaciğerden diafragmaya geçen ön ve arka yapraklar arasında biraz mesafe vardır ve karaciğerin bu bölümünde periton bulunmaz (Area nuda). İşte area nuda'yı çevreleyen bu periton yapıya lig. Coronarium hepatis denilir.

### **3- Lig. hepatorenale:**

Lig. coronarium hepatis'in arka yaprağı diafragmanın alt yüzünden hemen sağ böbrek ve böbreküstü bezinin ön yüzünde uzanır. Bu nedenle peritoneum'un bu bölümüne lig. hepatorenale denilir.

### **4- Lig. triangulare dextrum:**

Lig. coronarium hepatis'in ön ve arka yaprakları, area nuda'nın sağ ucunda birleşerek lig. triangulare dextrum'u oluşturur. Bu bağ karaciğeri diafragmaya bağlar.

### **5- Lig. triangulare sinistrum:**

Aynı şekilde, lig. coronarium hepatis'in ön ve arka yaprakları, area nuda'nın sol ucunda birleşerek lig. triangulare sinistrum'u oluşturur. Karaciğeri diafragmaya bağlayan bu bağ, appendix fibrosa hepatis ile devam eder.

### **6- Lig. teres hepatis:**

Doğumdan sonra görevi sona eren v. umbilicalis, oblitere olarak lig. teres hepatis denilen bağı oluşturur. Bu bağ lig. falciforme hepatis'in iki yaprağı arasında ve serbest alt kenarı boyunca uzanır. Karaciğerin visseral yüzünde fissura ligamenti teretis'de uzanarak porta hepatis'e gelir ve burada lig. venosum ile birleşir.

#### *2.1.2.4 Karaciğeri yerinde tutan faktörler*

Daha önce de anlatıldığı gibi, karaciğeri yerinde kalması birçok faktörlerin katkısıyla olur. Bunlardan lig. coronarium, lig. triangulare dextrum, lig. triangulare sinistrum ve area nuda aracılığı ile diafragmaya tutunur. Bunun yanısıra v. cava inferior ve v. hepatica'lar da karaciğeri arka bölümünün karın arka duvarına tutunmasına yardımcı olurlar. Lig. falciforme hepatis'in karaciğeri taşımada bir rolü yoktur. Ancak karaciğeri yan hareketlerini biraz sınırlar. Derin inspirasyonda diafragma ile birlikte karaciğer de, biraz aşağı iner ve bu pozisyonda karaciğeri alt kenarını palpe edebiliriz. Karaciğer, ağır bir organ olması nedeniyle, diğer organlar gibi pozisyonunda durabilmesi sadece peritona olan bağlantıları ile sağlanamaz. Bunun yanısıra birçok faktörlere de bağlıdır. Bunlardan en önemlisi karın boşluğunun özellikle, diafragmanın altındaki negatif hava basıncıdır. Yine, diğer organların üzerine oturması ve karın kaslarının tonusu sayesinde de yerinde tutulması sağlanmaktadır. V. hepaticaların yukarıda v. cava inferior'a bağlanmış olması da karaciğeri bir dereceye kadar yukarıdan askıya almaktadır. Özet olarak karaciğeri yerinde tutulması negatif hava basıncı, periton plikaları, damarların asma özelliği, area nuda ile diaphragma'ya tutunması, karın organlarının üzerine oturması ve karın

kaslarının tonusunun birlikte uygulanması ile temin edilmektedir (Arıncı, 1997; Moore K.L. , 2007; S. Standring, Borley, N.R., Collins, P., Crossman, A.R., Gatzoulis, M.A., Healy, J.C., Johnson, D., Mahadevan, V., Newell, R.L., Wigley, B.C., 2016).

#### 2.1.2.5 Karaciğeri besleyen arterler ve venler

##### **Arterleri:**

Karaciğeri a. hepatica propria besler. Bu arter, truncus coeliacus'un bir dalı olan a. hepatica communis'in dalıdır. Lig. hepatoduodenale içinde v. portae hepatis ve ductus choledochus ile birlikte uzanan bu arter, porta hepatis'e gelince r. dexter ve r. sinister olmak üzere iki dala ayrılır. V. portae hepatis'in dalları ile birlikte karaciğerde dağılır. A. hepatica propria'nın dalları arasında anastomoz yoktur. Komşu arterlerden gelen a. hepatica accessoria bulunabilir.

##### **Venleri:**

V. portae hepatis ve v. hepaticae olmak üzere iki grup veni vardır. V. portae hepatis, v. mesenterica superior ile v. lienalis'in birleşmesiyle oluşur. A. hepatica propria ile birlikte lig. hepatoduodenale içinde uzanarak porta hepatis'e gelir. Karaciğerde a. hepatica propria'nın dalları ile birlikte uzanır ve sonunda, beraber seyrettiği arterle birlikte v. centralis'e açılır. V. centralis'ler birleşerek v. hepatica'ları oluşturur. Bu venler porta hepatis'ten giren kanları v. cava inferior'a taşırlar. V. hepatica'lar karaciğer segmentasyonuna uymazlar.

#### 2.1.2.6 Karaciğerin lenf drenajı ve inervasyonu

##### **Lenf drenajı:**

Karaciğerin derinlerinden gelen lenf damarlarının çoğu porta hepatis'e gelerek buradaki nodi lymphatici hepatici'ye açılırlar. Bunların bir kısmı da safra kesesi boynunun etrafındaki nodus cysticus ile for. bursa omentalis çevresindeki lenf nodüllerine (nodus foraminalis) açılır. Nodi lymphatici hepatici'den çıkan lenf damarları da nodi lymphatici coeliaci'den geçerek ductus thoracicus'a açılırlar. Derin lenf damarlarının bir kısmı v. hepatica'ları takip ederek diafragmadaki for. venae cavae inferioris'e gelirler. Bu lenf damarları nodi lymphatici phrenici superiores'e, buradan da nodi lymphatici parasternales'e açılırlar. Karaciğerin yüzeysel lenf damarlarının çoğu porta hepatis'e giden derin lenf damarları ile birleşerek nodi lymphatici hepatici'ye, daha sonra da nodi lymphatici coeliaci'ye açılırlar. Area nuda'dan kaynaklanan lenf damarları, diafragmaya geçer. Önde, sternum'un hemen yanından, arkada ise for. venae cavae inferioris'den göğüs boşluğuna geçerek nodi lymphatici phrenici superiores, nodi lymphatici mediastinales anteriores ve posteriores'e açılırlar. Buralardan

çıkan lenf damarları da truncus lymphaticus dexter ve ductus thoracicus'a açılırlar.

### **Sinirleri:**

Sempatikleri nn. splanchnici'den, parasempatikleri ise sağ ve sol n. vagus'tan gelir. Bu lifler önce plexus coeliacus'u oluştururlar. Sempatik ve parasempatik lifler karaciğerin hilusunda, damarlar çevresinde plexus hepaticus'u oluşturur. Bu pleksus'tan çıkan uzantılar interlobüler bağ dokusu aralıklarında seyrederek karaciğer hücrelerinin çevrelerinde veya bu hücrelerle kan kapillerleri arasında sonlanır. Buradan çıkan lifler a. hepatica propria ve v. portae hepatis etrafında plexus hepaticus adı altında karaciğere gider. Hepatik damarlarda sadece sempatik liflerin bulunduğu, buna karşılık safra kanalları ve safra kesesinde ise her ikisinin de bulunduğu belirtilmektedir. Sensitif lifler, sempatik liflerle birlikte uzanır ve torakal medulla spinalis'in T8.-11. segmentlerine gider. Bu nedenle karaciğerin ağrıları 10. interkostal sinirin dağılma alanı ve karnın yukarı bölümünde hissedilir (akseden ağrı). Karaciğeri örten peritonda sağ n. phrenicus'un dalları dağılır. Bu nedenle karaciğer peritonundan kaynaklanan ağrılar, sağ omuzda hissedilir (Moore K.L. , 2007; S. Standring, Borley, N.R., Collins, P., Crossman, A.R., Gatzoulis, M.A., Healy, J.C., Johnson, D., Mahadevan, V., Newell, R.L., Wigley, B.C., 2016).

#### **2.1.2.7 Karaciğer segmentasyonu**

Sulcus sagittalis dextra'nın her iki yanında kalan pars dextra hepatis ve pars sinistra hepatis olmak üzere iki ana bölüme ayrılır. Bunlar da aşağıdaki şekilde segmentlere ayrılır.

### **Pars dextra hepatis**

#### *Divisio medialis dextra*

Segmentum anterius mediale dextrum; Segmentum V  
Segmentum posterius mediale dextrum; Segmentum VIII

#### *Divisio lateralis dextra*

Segmentum anterius laterale dextrum; Segmentum VI  
Segmentum posterius laterale dextrum; Segmentum VII

### **Pars sinistra hepatis**

#### *Divisio lateralis sinistra*

Segmentum laterale sinistrum; Segmentum II  
Segmentum anterius laterale sinistrum; Segmentum III

#### *Divisio medialis sinistra*

Segmentum mediale sinistrum; Segmentum IV  
Pars posterior hepatis; lobus caudatus segmentum posterior; lobus caudatus; Segmentum I



Karaciğerin en küçük fonksiyonel birimi olan lobcukların (lobuli hepatis) birçoğu birleşerek karaciğer segmentlerini oluştururlar. Bu lobcukların ortasındaki v. centralis'ler doğrudan veya bir bağlantı parçası vasıtasıyla karaciğer venlerine, segmental venlere, bağlanırlar. Bunlar da kendi aralarında birleşmek suretiyle v. hepatica'yı oluşturur ve bu damarlarda hemen diafragmanın altında, ayrı ayrı v. cava inferior'a bağlanırlar. Histolojik kesitlerde v. portae hepatis, arter ve safra kanalı dalları müşterek bir kılıfla sarılmış olarak lobcukların köşelerinde bulunan az miktarda bağ dokusunun içinde yer aldıkları halde, karaciğerden kanı götüren v. hepatica'nın dalları ayrı ve tek başlarına görünürler. Evvelce karaciğerin aynı damarlar ve safra kanallarına bağlı olan ve birkaç lobcuktan oluşan segmentleri ile ilgili bilgilere büyük önem verilmiş ve karaciğerde lokalize olan bazı hastalıklarda, bir veya birkaç segmentin çıkarılabilmesi yolunda araştırma ve çalışmalar yapılmıştır. Ancak bugün için daha ziyade karaciğerin tümünün değiştirilmesi yolundaki çalışmalar daha da ön plana çıkmıştır.

**Karaciğer dolaşımı ve fonksiyonu:** Vücut metabolizmasında önemli bir yer tutan karaciğerin damarları fonksiyonel bir yapı düzeni içerisinde organa girer ve çıkarlar. Karaciğerin özellikle ihtiyacı olan taze ve oksijence zengin kanı ileten a. hepatica propria, doğrudan doğruya pars abdominalis aortae'dan ayrılan truncus coeliacus'un bir dalını oluşturan a. hepatica communis'in devamı şeklinde olan bir ana daldır. Porta hepatis'te bir sağ ve bir de sol loba giden iki dala ayrılan bu damar, içindeki taze kanı karaciğer dokusuna, lobcukların arasında seyreden a. interlobularis ile organın derinliklerine gönderir. Bu ince damarlar v. portae hepatis'in dalları ile beraber, interlobuler bağ dokusu (spatium intertobulare hepatis = Kierman aralığı) içinde dallanarak v. portae hepatis ve v. hepatica'nın incecik dalları ile, safra kanallarını kuşatan ağlar meydana getirir. Bunların kapillerleri de karaciğerin kapiller sistemine ve v. portae hepatis'in dallarına da bağlanır. Sonuçta bu damarların v. centralis'lere açıldığını ve v. hepatica üzerinden v. cava inferior'a bağlandığı bilinmektedir.

Yukarıda karaciğerin damarları arasında adı geçen v. portae hepatis, mide bağırsak kanalıyla pankreastan gelen kanı toplar. Karın boşluğundaki tek organların venlerinin v. portae hepatis'i oluşturduğunu söyleyebiliriz. Bu damar dalları bağırsak kanalından emilen birçok maddelerin yanısıra, dalaktan dışarı atılması gereken maddeleri de karaciğere getirir. Bu maddeler karaciğerde işlendiği gibi, depo da edilebilir veya doğrudan v. hepatica sistemine verilir. Bu nedenle karaciğerin içerisindeki kan miktarı fonksiyonel durum veya fazına göre büyük değişiklikler gösterir. Vücudun zorlu çalışmalarında karaciğer, içindeki kanın dolaşım için önemli bir kısmını derhal genel dolaşıma sevk edebilir. Bu şekilde karaciğer kan depo görevi de yapmaktadır. Bu değişiklikler sırasında karaciğerin hacim ve büyüklüğünde de değişikliklerin olması mümkündür. Karaciğerin bazı fonksiyonlarının bilinmemesine rağmen, çok geniş ve çeşitli fonksiyonlar yapan bir laboratuvar şeklinde çalıştığı da bilinmektedir.

Karbonhidratlar kan şekeri halinde dolaşımında bulunur. Bu kan şekeri insülin'in etkisiyle glikojen halinde depo edilir. Bu fonksiyon için gerekli insülin'in bulunmadığı hallerde, idrarda şeker bulunur ve diabetes mellitus denilen şeker hastalığı tablosu oluşur. Karaciğer'in kanın pıhtılaşması mekanizmasında etkili kendi iç salgıları olan heparin ve belki de fibrinojen gibi özel iç salgıları yanında, diğer iç salgı bezlerinin ürünleri üzerinde de etkisi vardır. Mesela; adrenalin ve tiroksin karaciğerde parçalanırlar. Tiroksin'in parçalanmasından açığa çıkan iyot safraya karışarak dışarı atılır. Kanın, daha doğrusu eritrositlerin boyalı maddesini oluşturan hemoglobinden ise, bazı görüşlere göre bizzat karaciğer hücrelerinde, bazı görüşlere göre de kapiller kan damarlarının endotelinde, safra boyaları yapılır. Bu şekilde salgılanan veya ortaya çıkan maddelerin bir kısmı venöz yol vasıtasıyla genel kan dolaşımına gönderilirken, diğer bir kısmı da safra olarak salgılanır.

Karaciğer'in madde değişimindeki önemli fonksiyonları yanısıra, iç salgısı (heparin) ve dış salgısı (safra) vardır. Karaciğer hücreleri tarafından dış salgı maddesi olarak yapılan safra sarımtırak, yeşil kahverengi renkteki bir sıvı olup, hafifçe asidik bir reaksiyon gösterir. Çok acı lezzeti olan bu madde fermentler yerine sindirim için önemli maddeleri içerir. Mesela; pankreasın yağlar üzerine etki yapan fermentleri ancak safranın bulunduğu ortamda, yağları yağ asitlerine ve gliserine parçalayabilir. Safra asitleri yağ asitlerine bağlanarak bu maddelerin bağırsak duvarından emilmesini sağlarlar. Sonra da tekrar ayrılarak karaciğer üzerinden safra halinde geri dönmek suretiyle, özel bir dolaşım çemberi oluştururlar. Kolesterolün, lesitin ve safra boyaları sindirim için önemsiz maddeler olup atık olarak atılırlar. Bu arada safra boyalarından ürobilinojen ve ürobilin şeklinde idrarın ve gaitanın boya maddeleri oluşur. Safra yollarındaki herhangi bir iltihap veya taş nedeniyle safra akımı engellenecek olursa, hastaların gaitası kil rengini alır. Çünkü yağlar, safra olmadığı için bağırsaklarda parçalanamamış ve safra boyaları da gaitaya tipik rengini verememiştir. Safra, safra yollarında birikip geri döndüğü için, safra kapillerlerinden ince kan damarlarına geçebilir ve bu da evvela gözün beyaz kısmında ve deride sarılık olarak kendini belli eder.

Safra salgısı yağların ve protein yapı taşlarının duodenum'a geçmesi, safra asitlerinin kanda artması ve bağırsak epitelinin salgıladığı secretin hormonunun salgılanması sırasında artar. Genellikle safranın devamlı salgılandığı, ancak yukardaki hallerde salgının arttığı ve hazır bekleyen safranın daha çabuk bağırsağa boşaldığı bilinmektedir. Sindirimin yavaşladığı ve azaldığı istirahat halinde safra, safra kesesinde birikir ve suyu emilerek hacmi 1/10'nuna kadar azalmak suretiyle koyulaşır. Bu arada safra kesesi duvarlarının mukoz salgısı da safranın daha koyu ve yapışkan bir şekilde, rengi de koyulaşmış olarak, duodenuma geçebilir hale gelmesini sağlar.

Karaciğerin ana işlevi, besin maddelerini alıp depolamak ve diğer organlara besin sağlamaktır. Aynı zamanda, portal dolaşıma karışan bakteriler, mikroorganizmalar, ilaçlar ve onların yan ürünleri gibi potansiyel olarak zararlı maddelerin atılması karaciğerin görevlerindedir.

Karaciğer sadece vücudun önemli bir enerji üretim merkezi ve atık kanalizasyon tesisi değildir. Aslında, karaciğer muhtemelen ucuz bir geri dönüşüm sistemi için en iyi örnektir. Hem parankimal hem de parankimal olmayan karaciğer hücreleri, klirens görevine katılır.

Bununla birlikte, karaciğerin klirens yapan bir organ olarak işlev görmesi, bozulması ve / veya yok edilmesi gereken maddelerin doku hasarına yol açma tehlikesini de içerir. Bunun için etkili savunma mekanizmaları gereklidir. Parankim dışı hücreler arasında Kupffer hücreleri, sinüzoidal endotel hücreleri ve doğal öldürücü (NK) lenfositler tüm vücut için hücresel savunma işlevleri yerine karaciğer için de kullanılmaktadır. Dahası, hepatositleri de içeren karaciğerin her hücre tipi, kendi has savunma donanımına sahiptir (G Ramadori, Moriconi, Malik ve Dudas, 2008).

### **2.1.3 Karaciğer Histolojisi**

Dört adet zayıfça sınırlanmış lobdan oluşan karaciğerde loblar arasında H harfi şeklinde porta hepatis (karaciğer hilusu) bulunur (Kierszenbaum, 2006). Organa giren ve çıkan büyük damarlar, lenf yolları, sinirler ve safra kanalı bu bölgeden geçer.

Karaciğer, safra kanalları yolu ile salgısını duodenuma boşaltması nedeniyle ekzokrin, sentezlediği maddeleri doğrudan kana vermesinden dolayı da endokrin bez özelliği taşır (Bioulac-Sage, Le Bail ve Balabaud, 2007).

Karaciğere kan v. portae hepatis ve a. hepatica aracılığı ile gelir. Gelen kan hacminin %75-80'ini sağlayan portal ven, sindirim yolu, dalak ve pankreastan gelen venöz kanı taşırken a. hepatica propria ise oksijenlenmiş kanın %20-25'ini taşımaktadır. Bu iki damarla karaciğere gelen kan, karaciğer lobül'lerinin sinüzoid'lerinde birbirlerine karışır (Kierszenbaum, 2006).

Bağırsaklarda absorbe edilen ve kan yolu ile gelen sindirim ürünleri karaciğerde metabolize edilir, sonra depolanır veya diğer organlarda kullanılmak üzere kana verilir. Karaciğer dıştan visseral peritonla örtülüdür. Peritonun altında capsula fibrosa adı verilen, elastik fibrillerden zengin bir kapsül bulunur (Bioulac-Sage vd., 2007). Bu kapsül sıkı bağ doku yapısındadır. Ortalama kalınlığı 70- 100 µm kadardır. Kapsülün peritona bakan yüzünü seröz mezotel örter. Capsula fibroza karaciğere dışarıdan destek verir, organın şeklini korur ve bunun yanında karaciğer parankimine

uzantılar göndererek destek stromasına katkıda bulunur (Eroschenko, 2008,; Eşrefoğlu, 2009).

Porta hepatis bölgesinde kapsülden ayrılan ince bağ dokusu septumları organ içine doğru girerek, karaciğeri lob ve lobüllere ayırır. Karaciğer lobülü karaciğerin yapısal bir birimidir ve ortalama 0.7x2 mm boyutlarında poligonal bir doku kitlesidir. Bazı hayvanlarda (domuz gibi) bu lobüller bir bağ dokusu bölmesi ile birbirinden ayrılırlar ama insanda bu söz konusu değildir (Junqueira LC ve J., 2006).

Lobüllerin birleştiği bölümlerde bağ dokusu artarak üçgen bir yapı oluşturur, portal aralık olarak adlandırılan bu bölgede vena porta'nın bir dalı, a. hepatica ve ductus biliaris'in bir dalı bulunur. V. porta'nın bir dalı, a. hepatica ve ductus biliaris'ten oluşan üçlü yapıya 'portal triad' adı verilir (Roos ve Pawlina, 2011). Karaciğer lobülünü saran capsula fibroza devamı daha sağlam bir bağ dokusu, glisson kapsülü ismini alır.

Venül, genelde çapı en büyük olandır. Venül duvarı ince ve lümen düzensizdir. V. mesenterica superior, v. mesenterica inferior ve v. lienalis'den gelen kanı taşır. Arter, venüle göre daha düzgün lümenli ve daha kalın duvarlıdır. Çapı venüle göre daha küçüktür. Safra kanalı ise hepatositlerden gelen safrayı hepatik kanal içine boşaltır (Roos ve Pawlina, 2011).

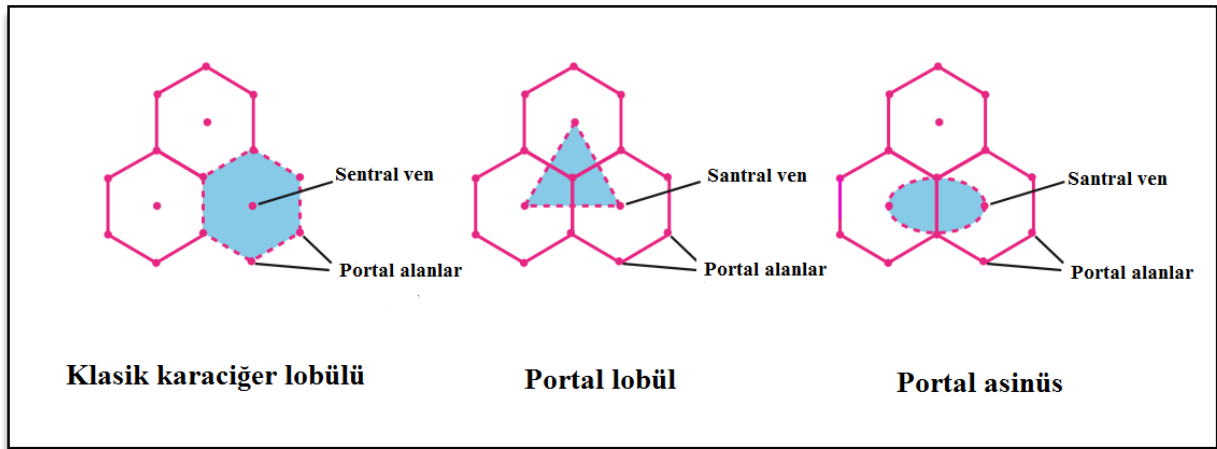
Portal alanlarda bu üçlü yapının yanı sıra lenf damarları ve sinir fibrilleri de bulunur. Portal kanalı lobülün dışında yer alan hepatositler çevreler. Bağ dokusu stroması ile hepatositler arasındaki alan Mall bölgesi olarak tanımlanmaktadır. Portal alanda yer alan sempatik (postganlionik) sinir fibrilleri ganglion coeliacum'da parasempatik (preganglionik) sinir fibrilleri ise n. vagus'tan gelir. Her iki sistem de portal alandaki arter duvarındaki düz kasların innervasyonunu sağlar (Roos ve Pawlina, 2011).

Karaciğerin yapısal organizasyonunu ve fonksiyonlarını açıklamak için üç farklı karaciğer lobül kavramı tanımlanmıştır (Şekil 2.4). Bunlar; yapısal parametrelere dayalı olan karaciğer lobülünün klasik kavramı, birbirine komşu lobüllerden aynı safra kanalına safra boşalımı yaklaşımına dayalı portal lobül kavramı ve birbirine komşu lobüllerin venöz sinüzoidleri boyunca oksijenin dağılım derecelendirilmesine dayalı karaciğer asinusu (hepatik asinus, portal asinus) kavramıdır (Kierszenbaum, 2006). Karaciğer asinüs'ü kavramı karaciğerin yenilenme koşullarını, metabolik aktiviteyi ve siroz gelişimini tanımlamak açısından daha uygundur. Karaciğer asinüs'ü interlobuler damarlar ekseninde iki santral ven ve iki portal triad arasında, yer alan eşkenar dörtgen bölgedir. Burada kan asinus'un merkezinden v. centralis'e doğru akar (Roos ve Pawlina, 2011).

Klasik karaciğer lobülü poligonal şekilde olup merkezde vena centralis ve köşelerde portal alan bulunur. Sinüzoid'lerden gelen kan lobülün merkezinde bulunan v. centralis'e drene olur. Hepatositler ışınsal olarak dizilmiş ve bir duvarın tuğlaları gibi düzenlenmişlerdir. Bu hücre plakları

lobülün periferinden merkezine doğru yönelmişlerdir. Labirent şeklinde ve sünger benzeri bir yapı oluşturacak biçimde serbestçe anastomozlaşırlar. Bu plaklar arasında sinüzoid kapillerler uzanır. Klasik karaciğer lobülünde kan akışı periferden merkeze doğrudur. Safra ise kan akışının tam tersi yönde akar. Safra, safra kanaliküllerinden intralobüler safra kanallarına daha sonra Herring kanalına geçerek portal alandaki safra kanallarına boşalır (Kierszenbaum, 2006).

Safranın salgılanışı dikkate alınarak yapılan bir diğer lobülasyon tipi olan portal lobülde, merkezde portal kanal, üçgen biçimindeki lobülün köşelerinde birer v. centralis bulunmaktadır (Bioulac-Sage vd., 2007). Portal lobülde kan akışı merkezden perifere, safra akışı ise periferden merkeze doğrudur (Kierszenbaum, 2006).



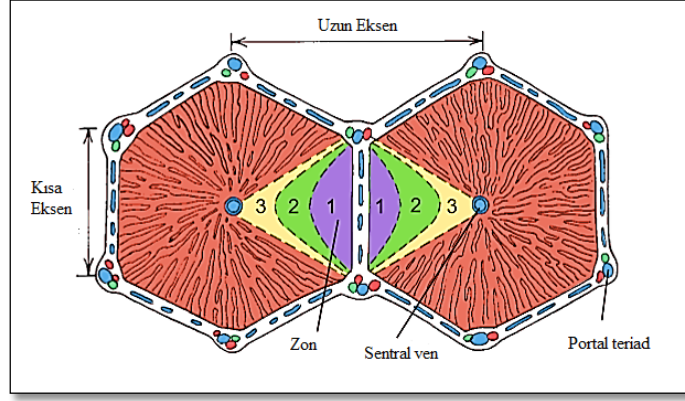
Şekil 2.4 Karaciğer lobül modelleri (Roos & Pawlina, 2011)

Karaciğer asinüsünde sınırlar hepatik arterin son dalı ile belirlenebilmektedir. Arterden gelen kanın venöz sinüzoidler boyunca akışı oksijenlenmede ve beslenmede zon I, zon II ve zon III olarak adlandırılan bir derecelendirme oluşturur (Kierszenbaum, 2006) (Şekil 2.5).

Zon I (periferik zon); gerek besin, gerekse oksijenden en zengin bölgedir. Zon I' deki hücreler damarlara en yakın hücrelerdir. Bu bölgede kan lobülün merkezinden perifere doğru ilerlediğinden oksijen ve besinden zengin kanla karşılaşan zon I hücreleri sürekli aktivite gösterirler. Bu bölge kanla karşılaşan ilk bölge olduğu için kanda bulunacak olası bir toksik maddeden etkilenecek ilk bölge de yine zon I' dir.

Zon II, ise gerek besin maddeleri gerekse oksijen miktarı bakımından ara bir zon durumdadır.

Zon III santral vene en yakın olan bölümdür ve bu bölge oksijenden en fakir bölümdür. Dolayısıyla hipoksi durumunda ilk etkilenecek bölge zon' III tür. Karaciğerde oluşan fizyolojik ve patolojik yağlanmanın ilk görüldüğü bölge de zon III tür (Kierszenbaum, 2006).



Şekil 2.5 Karaciğer asinüs'ü ve zonları (Roos & Pawlina, 2011)

Bu şekilde zonlara ayrılarak yapılan tanımlama ile hepatositlerin çeşitli toksik maddelere karşı farklı derecelerde gördükleri hasarın nedeni açıklanmaya çalışılmıştır (Eroschenko, 2008,; Eşrefoğlu, 2009). Karaciğerdeki patolojik değişiklikler genelde klasik lobül ile ilişkili olarak tanımlansa da karaciğerin fonksiyonlarını açıklamada birbirlerinin tamamlayıcı unsurları olduğu belirtilmektedir (Kierszenbaum, 2006).

V. centralis'den başlayarak perifere doğru anastomozlaşarak ilerleyen hepatosit kordonları arasında sinüzoid kapillerleri yer alır (Eşrefoğlu, 2009; Roos ve Pawlina, 2011). Karaciğerin önemli yapılarından olan sinüzoidler, geniş lümenli 9- 12 mikron çapa sahip ve düzensiz şekilli özel tipte kapillerlerdir (Junqueira LC ve J., 2006).

Sinüzoidler v. portae hepatis ve a. hepatica propria'dan gelen kanı alır ve v. centralis'e doğru gönderirler. Zon I'de sinüzoidler kıvrımlı, dar ve anastomotik olup zon III'e göre daha paralel ve genişleme eğilimindedir (Bioulac-Sage vd., 2007). Kan akışı tek yönlü olarak sinüzoid'lerde zon I'den zon III'e doğru olur. (Bioulac-Sage vd., 2007; Roos ve Pawlina, 2011)

Sinüzoidlerde endotelial hücreler, Kupffer hücreleri ve perisinüzoidal yağ depolayıcı hücreler (ito hücreleri) bulunur. Sinüzoidal hücreler lobüler parankimanın % 6'sını (% 2,5 endotelial, % 2 Kupffer ve % 1,4 ito hücreleri) ve karaciğer plazma membranının % 26,5'ini oluştururlar (Bioulac-Sage vd., 2007; Oda, Yokomori ve Han, 2003).

Endotelial hücreler sinüzoid duvarında yerleşen ince sitoplazmalı, heterokromatik çekirdekli hücrelerdir. Sitoplazmalarında az miktarda pinositotik veziküllerin bulunması, pinositoz aktivitesine sahip olduklarının bir göstergesidir. Gerek endotelial hücrelerin aralıklı yerleşimleri, gerekse endotelial hücrelerin bazal laminasının kesintili olması, kandan Disse aralığına madde geçişini kolaylaştırmaktadır (Junqueira LC ve J., 2006).

Sinüzoid duvarında endotel hücrelerine ek olarak mononükleer fagositer sistem hücresi olan Kupffer hücreleri olarak adlandırılan makrofajlar da bulunmaktadır (Junqueira LC ve J., 2006).

Sinüzoid duvarında yer alan diğer bir hücre tipi de yağ depolayıcı (Ito) hücrelerdir. Bu hücreler Disse aralığında yer alırlar ve lipid ile A vitamini içerirler. Bu hücrelerde, endotelyal hücreleri çevreleyen ince ve uzun sitoplazmik bir yapıdadır (Braet ve Wisse, 2002).

### 2.1.3.1 Karaciğer hücreleri

#### 1. Hepatosit:

Hepatositler ile sinüzoid endoteli arasında kalan bölge Disse aralığı, perisinüzoidal aralık veya subendotelyal aralık olarak tanımlanır. Retiküler fibriller ve az miktarda da kollagen fibril içerir. Hepatositlerin bu aralığa bakan yüzlerinde bol miktarda mikrovillus bulunur. Ara madde içermeyen bu bölge kanın şekilli elemanlarını bulundurmaz. Ancak kan plazmasının varlığı, kan ile hepatositler arasında metabolitlerin aktif değişiminin gerçekleştiği ve karaciğer hücre yüzeyinde bulunan mikrovillus'ların bu değişimi arttırıcı rol oynadıkları belirtilmektedir (Oda vd., 2003).

Hepatosit'ler lobül içerisinde yerleşen fonksiyonel parankim hücreleridir. Karaciğer hücre topluluğunun %80 kadarını oluşturan bu hücrelerin yaşam süresinin 200-400 gün olduğu belirtilmektedir. 20-30 µm çapındaki bu hücreler poligonal biçimli olup, dallanma, anastomozlaşma gösteren plakalar şeklinde düzenlenmişlerdir. Hepatosit'ler, kan damarları ile safra kanalikülü arasında madde transferinde önemli rol oynayan sinüzoidal, kanaliküler ve intersellüler olmak üzere üç yüzeye sahiptir. Hepatosit yüzeyinin %70'ini oluşturan sinüzoidal yüzey, hepatosit'lerin Disse aralığına bakan bol mikrovillus içeren yüzeyi olup, sinüzoidler ve hepatositler arasında materyal transferinin yapıldığı alanlardır. Birbirine komşu iki hepatosit arasında bulunan kanaliküler yüzey, hepatosit yüzeyinin yaklaşık %15'i kadardır ve hepatositlerden kanalikül içine safranin verildiği yüzeydir.

Safra kanalikülü komşu iki karaciğer hücrelerinin düzgün seyreden membranları arasındaki 0.5- 2.5 µm çapındaki tübüler bir aralıktır. Bu bölgeyi sınırlayan hepatosit membranları lümen içerisine uzanan mikrovillus'ları oluşturur. Hepatosit'lerin intersellüler yüzeyleri sinüzoidler veya kanaliküllerle temasta olmayan, komşu hepatositler arasındaki yüzeydir ve hepatosit yüzeyinin diğer %15'lik bölümüdür. Hepatositler büyüklüğü hücreden hücreye değişen, merkezi yerleşimli, büyük yuvarlak ve düzgün yüzeyli nükleuslara sahiptir. Çoğunlukla tek nükleus içeren karaciğer hücrelerinin %25 kadarı çift nükleuslu olabilir. Nükleus birkaç dağınık kromatin grubu ile birlikte bir ya da daha çok veziküler nükleolus içerir.

Portal alanlardan farklı uzaklıklarda bulunan hepatosit'ler yapısal, biyokimyasal ve histokimyasal farklılık gösterirler. Yani hepatosit sitoplazması, işlevsel durumuna bağlı olarak farklı oranda organel ve

inklüzyon içerir. Bazofilik karakterde olan sitoplazmasında hem granüler hem de agranüler endoplazmik retikulum (GER, SER) bulunur. Dallanma gösteren tübüler bir ağ yapısında olan SER glikojen yapımında fonksiyon görmektedir. Birbirine paralel sisternalar şeklinde izlenen GER, protein sentezinden sorumlu organeldir.

Golgi kompleksi hepatositlerde tipik olarak safra kanalikül'lerine yakın ve çekirdek etrafında yerleşmiştir. Salgılanan proteinlerin glikolizasyonuna ve lizozomal enzimlerin çeşitlenmelerine katkı sağlar. Lizozom'un oluşumu, plazma proteinlerinin sentezi, glikoprotein ve düşük dansiteli lipoproteinlerin salgılanması fonksiyonlarını görürler. Hepatosit'lerde glikoz, glikojen olarak depo edilir. Elektron mikroskopik incelemelerde glikojen, düz endoplazmik retikulum kümeleri içinde toplanmış granüller halinde görülür (Junqueira LC ve J., 2006; Kierszenbaum, 2006).

Bu hücreler protein sentezi, protein depolama ve karbonhidratların transformasyonu, kolesterol, safra tuzları ve fosfolipidlerin sentezi ve eksojen ve endojen maddelerin detoksifikasyonu, modifikasyonu ve atılımı ile ilgilidir. Hepatosit aynı zamanda safra oluşumunu ve salgılanmasını başlatır. Hepatositler sayısız mitokondriayı yansıtan bir eozinofilik sitoplazmaya ve büyük miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve serbest ribozomlara bağlı bazofilik damarlara sahiptir. Hepatositin ortalama ömrü 5 aydır, yeniden üretilebilirler. Hepatositler vasküler kanallar (sinüzoidler) ile ayrılmış plakalar halinde düzenlenir.

## **2. Sinüzoidal epitelyal hücreleri:**

Bu hücreler sinüzoid duvarında bulunurlar ve aralarında boyutu 100-150 nm fenestralar vardır. Sinüzoid duvarında epitel hücreleri altında bazal membran bulunmaz ve bu hücreler ve hepatositler arasında Disse aralığı vardır. Bu boşluk vasıtasıyla lenf, portal lenf sistemine drene olur.

## **3. Stellat hücresi (Ito hücresi):**

Hepatositler ve endotel hücreleri arasındaki Disse boşluğunda bulunurlar. Hepatik yıldız hücreleri (HSC) (veya karaciğer (myo) fibroblastları) sitokin ve kemokin üretim yeteneğine sahip olduğu için inflamatuvar koşullarda modülatörlüdür. Aktive olmamış Stellate (Ito) hücreleri (HSC) vitamin A'yı depolar ancak aktif hale getirildiğinde ekstraselüler matriks ve kollajen üretirler. Bunun örneğini karaciğer fibrozunda görebiliriz (Giuliano Ramadori ve Saile, 2004; Saile ve Ramadori, 2007).

## **4. Kupffer hücresi**

Kupffer hücreleri karaciğer sinüzoidinde dağılırlar. Bu hücreler, retikuloendotel sisteminin büyük bölümünü oluşturan karaciğerin



uzmanlaşmış makrofajlarıdır (mononükleer fagosit sistemi)(Zhang vd., 2016).

Stoplazmatik uzantılara sahip olan yıldız biçimini andıran hücrelerdir. Lümene ve sinüzoid duvarını sınırlayan endotel'e doğru uzanan stoplazmik çıkıntıları vardır. Belli aralıklarla endotelyal hücreleri arasında bulunurlar. Kan monositlerinden köken alırlar ve fagositoz yetenekleri vardır (Eşrefoğlu, 2009).

Zon I'de zon III'den daha fazla bulunan (Bioulac-Sage vd., 2007) Kupffer hücreleri, oval şekilli büyük bir çekirdeğe sahiptirler. Bu hücrelerde granüllü endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı iyi gelişmiştir. Bu da aktif şekilde protein sentezi yaptıklarını gösterir. Sitoplazmalarında bol lizozom bulunur (Kierszenbaum, 2006; Roos ve Pawlina, 2011).

Kupffer hücrelerinin başlıca görevleri; yaşlanmış eritrositleri ortadan kaldırmak, kalın bağırsaktan portal kan yoluyla gelen bakterileri fagosite etmek ve immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamaktır. Kupffer hücreleri karaciğer hücrelerinin %15'ini oluşturur (Junqueira LC ve J., 2006). Kupffer hücreleri KP1 (antiCD68) gibi monoklonal antikor ile tanımlanabilmektedir (Bioulac-Sage vd., 2007).

## **5. Pit hücresi**

Kupffer hücrelerine ek olarak, karaciğer, Pit hücreleri olarak adlandırılan bir lenfosit alt grubuna ev sahipliği yapar (Wisse vd., 1997). Pit hücreleri sayısı, parankimal olmayan hücrenin yaklaşık %1'idir (Bioulac-Sage, Kuiper, Van Berkel ve Balabaud, 1996). Pit hücreleri, diğer organların doğal öldürücü NK hücrelerine karşılık gelir. Birlikte büyük granüler lenfositlerin (LGL) ailesini oluştururlar. Muhtemelen kemik iliği kaynaklı olup, kan yoluyla karaciğere gelen hücreler, yoğunluklarını düşürerek ve granül sayısını arttırarak pit hücrelerine dönüşürler. Pit hücrelerinin yaklaşık iki haftalık ömürleri vardır ve hayatta kalmaları Kupffer hücrelerinin varlığına bağlıdır (Vanderkerken vd., 1995).

### **2.1.4 Karaciğer Fonksiyon Testleri**

Laboratuvar testleri karaciğer hastalığı diagnostik ve etiyolojik ayırım yapılmasında önemlidir.

Şu anki karaciğer testi kabaca üç ayrılabilir:

- 1) karaciğer fonksiyonu göstergeleri
- 2) karaciğer hasarının göstergeleri
- 3) viral hepatit serolojileri

Karaciğer fonksiyon testlerinden, koagülasyon testleri (örn. Protrombin zamanı, INR), serum bilirübin ve serum proteini (total veya albumin), Karaciğer hasarı testleri arasında serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalın fosfat (ALP), karaciğer fonksiyon

testleri,  $\gamma$ -glutamil transferaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve bazen de glutilat dehidrogenaz (GLDH) 'dir. Alfa-fetoprotein (AFP), hepatosit çoğalmasının biyolojik belirteçleri (örn. Karaciğer gelişimi, hepatoselüler karsinom, karaciğer rejenerasyonu) olarak dördüncü bir kategoride tek başına durmaktadır. Karaciğer hasarı belirteçleri arasında ALT ve AST muhtemelen hem klinik tanıda hem de can kaybı ile ilgili araştırmalarda en sık kullanılanlardır (McGill, 2016; Senior, 2012). Karaciğer Testlerini özetleyen bir tablo aşağıda verilmiştir (Tablo 2.1).

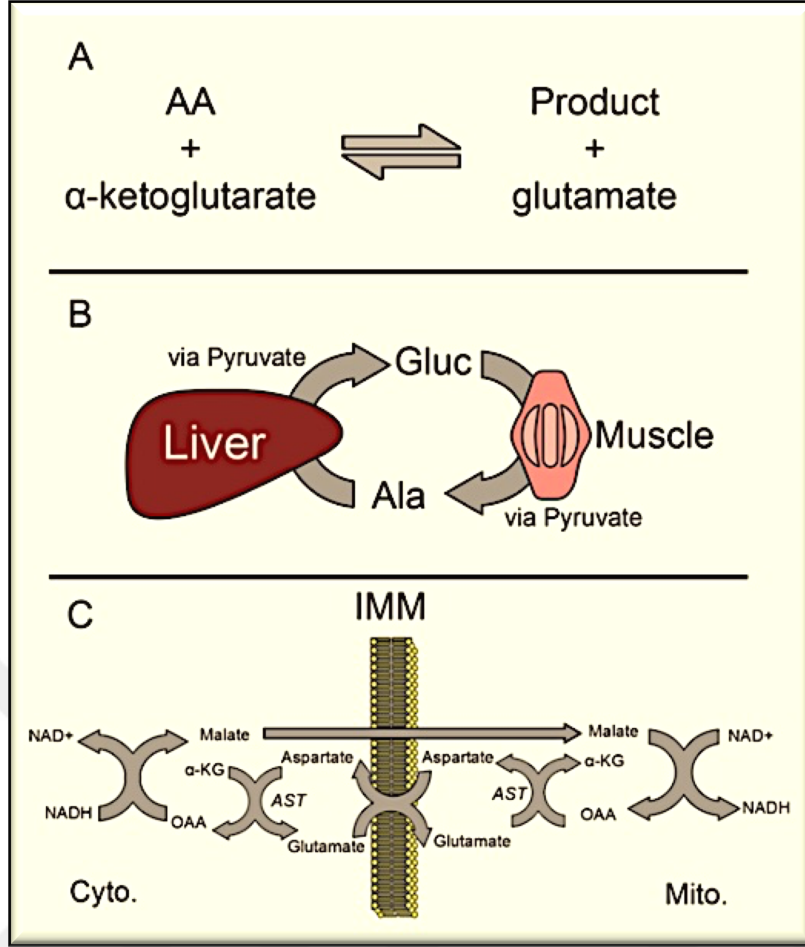
Tablo 2.1 Karaciğer fonksiyonlarını gösteren test ve biyokimyasal markerlar

Hepatosellüler nekrozu gösteren testler	Duktular hasarı ve kolestazi gösteren testler	Karaciğerin biyosentetik kapasitesini gösteren testler	Karaciğerin organik anyon transportu ve ilaç metabolizma yeteneğini gösteren testler
Aminotransferazlar	Alkalen fosfataz	Albumin	Bilirubin
Laktat dehidrogenaz	Gama glutamil transpeptidaz	Seruloplazmin	Bromsulfalein
İsositrat dehidrogenaz	Lösin aminopeptidaz	Ferritin	Indocyanine gren
Glutamat dehidrogenaz	5' Nükleotidaz	$\alpha$ -1- antitripsin	Serum safra asitleri
Sorbital dehidrogenaz	Safra asitleri	Lipoproteinler	Serum caffeine
	Bilirubinler	Pıhtılaşma faktörleri (Protrombin zamanı, faktör VII)	Serum lidocain metabolitleri ve nefes testleri

### 2.1.5 Aminotransferazlar (AST, ALT)

Aminotransferaz enzim grubu içinde hepatosellüler hasarı gösteren, alanin aminotransferaz (ALT), ve aspartat aminotransferaz (AST)'dir. Serumda her iki aminotransferaz da normalde düşük konsantrasyonlarda bulunur (30-40 IU/l). Bunun tam kaynağı bilinmese de, normal hücre "turnover"ına ve rejenerasyona bağlı olduğu düşünülmektedir. Hem ALT hem de AST bir amino grubunun bir amino asitten  $\alpha$ -ketoglutarata transferini katalize eder. Amino asitler L-alanin ve L-aspartat olup tepkime ürünleri sırasıyla L-glutamat ve piruvat veya okzaloasittir (Şekil 2.6) (McGill, 2016).

Hepatosit yıkımının artması ile artan permeabilite sonucu bu enzimler hücre zarı dışına çıkar ve serum düzeyleri yükselir.



Şekil 2.6 AST ve ALT fonksiyonu (McGill, 2016).

- A:** Hem alanin hem de aspartat aminotransferazlar (sırasıyla ALT ve AST), alfa-ketoglutaratın ( $\alpha$ -KG) ve bir amino asitin, glutamata ve başka bir ürüne dönüşümünü katalize eder. ALT durumunda amino asit ve ürün alanin ve piruvattır. AST durumunda amino asit ve ürün aspartat ve okzalasetattır (OAA).
- B:** Glikoz-alanin döngüsü.
- C:** Mitokondrinin iç membranı'ndan(IMM) malat-aspartat geçişi

Aminotransferazlar organizmada plazma gibi dağılım göstererek interstisyel sıvılara geçer. Her ikisi de karaciğer sinüzoidal hücreleri ve diğer retikuloendotelial hücrelerce katabolize edilir. Bu nedenle biliyer ve üriner yol ile AST ve ALT'nin atılımı söz konusu değildir. ALT ve AST'nin organizmada içinde bulunduğu doku ve hücre kompartmanlar arasında bazı farklar vardır.

Hücrede ALT sitozolik bir enzim iken, AST hem sitozolde hem de mitokondride bulunmaktadır. ALT rölatif olarak karaciğere spesifik iken, AST hepatositten başka iskelet ve kalp kası, böbrek, beyin, pankreas ve eritrositlerde de bulunmaktadır. Bu nedenle ALT yüksekliği hepatosellüler yıkımı, AST'ye göre daha spesifik yansıtmaktadır.

AST yüksekliklerinde artışın karaciğer kökenli olup olmadığına karar vermek için birlikte ALT düzeylerine bakılmalıdır. ALT düzeyindeki artış, artmış AST'nin karaciğer kökenli olduğunu destekler. Tek başına orantısız AST yüksekliği ekstrahepatik bir tabloyu düşündürmelidir. Miyokard enfarktüsü, emboli, bazı kas hastalıkları, aşırı fiziksel aktivite ve hemolitik anemi gibi bazı durumlarda izole AST yüksekliği görülebilir (McGill, 2016).

Aminotransferaz düzeyleri ile hepatosellüler hasar arasında beklenenden daha zayıf bir paralellik vardır. Fakat seri ölçümler, ayırıcı tanı, tedaviye yanıt ve prognoz hakkında ipuçları verir. Birçok karaciğer hastalığında aminotransferaz düzeyleri 300 IU/L 'nin altındadır. Akut hepatitlerin başlangıç ve iyileşme dönemleri, hepatosteatoz, alkolik hepatit ve biliyer obstrüksiyonlarda aminotransferaz düzeyleri yaklaşık olarak 10 kat'ın (<300 IU/L) altındadır (Babadi, 2012).

ALT ve AST düzeylerinin 50-100 kat gibi aşırı derecede artması ilaçlar, karbon tetraklorür ve phalloidin gibi hepatotoksik maddelere maruz kalma, akut viral hepatit, iskemik hepatit ya da şok karaciğeri tablolarında ortaya çıkmaktadır. Bu gruptaki olguların ilaç kullanımı ve kimyasal maddelere maruz kalma açısından ısrarlı sorgulanması gerekmektedir (McGill, 2016).

İskemik hepatik hasar, miyokard infarktüsü, aritmiler, ağır kalp yetersizliği, sepsis, geniş yanıklar, ısı çarpması gibi ciddi tablolarda AST ve ALT artışı gözlenir. Aminotransferazlar çok hızlı ve ani olarak aşırı derecede yükselir, genellikle bir hafta içinde normale döner. Birlikte LDH'nın yükselmesi ayırıcı tanıda önemlidir. Aminotransferaz yüksekliği ilaç ve kimyasal maddeye bağlı karaciğer hasarlarında iskemik hepatit ve akut viral hepatitlere göre daha uzun süre yüksek olarak devam eder.

AST/ALT oranı ayırıcı tanıda yararlı ipuçları verebilir. Birçok karaciğer hastalığında AST, ALT artışı paralel olup, AST/ALT oranı 1'e eşit ya da daha azdır.

Alkolik KC hastalığı, Wilson sirozu, konjesyon ve metastatik tümörlerde AST yüksekliği ALT'ye göre daha fazladır. Genellikle AST/ALT oranınının 2'den fazla olması alkolün neden olduğu karaciğer hasarını düşündürmelidir.

## 2.2 Nanopartikül

Nanopartikül bir çekirdek (core) ve bu merkezi kaplayan bir katmandan oluşur. Çekirdek kısmı metaller, organik polimerler ve karbon gibi farklı malzemelerden oluşabilir ve bu çekirdeği stabilize etmek için inorganik veya organik bir katman ile kaplıdır.

Boyutları 1-100 nm arasında değişen bileşikler nanotoz olarak adlandırılmaktadır. Nanotoz olarak üretilen maddeler; metaller, metal

oksitler, sülfidler, nitritler, boritler, ve karpitler iken metal olmayan materyaller ise silika, silikon karpitler, karbon ve kalay olarak sıralanabilir (Garcia vd., 2016).

### **2.2.1 Nanopartikül Toksikolojisi**

Nanotoksikoloji, nanopartiküllerin potansiyel toksik etkileri, risk değerlendirmesi ve güvenilirlik boyutlarının belirlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmaları ifade eder. Nanoteknoloji endüstrisi, maddelerin nano ölçekte alışılmamış bir takım özellikler kazanmasının keşfedilmesiyle hızlı bir gelişme kaydetmiştir ve nanopartiküllerin bu özellikleri aynı zamanda potansiyel toksisiteleri ve ekotoksikolojileri hakkında bir takım endişelere sebep olmuştur. Değişen kuantum davranışları ve reaktivitelerinin artması, imal edilmiş nanopartikülleri endüstride pek çok uygulamada kullanılabilir hale getirmiştir, ancak bu maddeler çevre ve canlı organizmalar üzerinde beklenmedik bazı olumsuz etkiler meydana getirebilmektedir (Handy, Owen ve Valsami-Jones, 2008) .

Hücre zarı ve hücrelerarası bağlantılar kimyasal maddelere, bir bariyer oluşturarak girişini engellemektedir. Ama nanopartiküller küçük boyutları sayesinde hiçbir bariyere takılmadan kolaylıkla transfer olabilirler(Lanone ve Boczkowski, 2006).

Nano malzemelerin olumsuz sağlık etkileri ile ilgili birkaç mekanizma önerilmiştir. Bunlar arasında, oksidatif stres en önemlilerinden biri olarak kabul edilir. In vitro çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; reaktif oksijen türleri üretir ve bu maddeler mitokondriyal fonksiyonu değiştirebilir ve DNA'da oksidatif hasar oluşturur (Horie vd., 2011; Sizova, Miroshnikov, Polyakova, Gluschenko ve Skalny, 2011; Xia vd., 2006).

Nanoteknoloji gelişmekte olan bir alandır. Bu nedenle, işlenmiş nanomalzemelerin (genel ve biyomedikal kullanımını destekleyen ve bunun ticari potansiyelini oluşturan) eşsiz özelliklerinin aynı zamanda mesleki sağlık riskleri oluşturup oluşturmadığı konusunda pek çok belirsizlik vardır. Bu belirsizlikler, maruz kalmanın yolları, materyallerin vücuda girdikten sonra evrimleşmesi ve materyallerin vücudun biyolojik sistemleri ile etkileşimi gibi faktörler sağlık risklerini öngörmek için gerekli faktörler hakkındaki bilgi boşluklarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bir maddeye maruz kaldıktan sonraki potansiyel sağlık riski, maruziyetin büyüklüğüne ve süresine, maddenin vücuttaki ısrarına, maddenin doğasında bulunan toksisitesine ve kişinin duyarlılığına veya sağlık durumuna bağlıdır.

Hayvanlar üzerinde veya insanlarda ultra ince veya diğer solunabilir parçacıklara maruz kalma ve tepki üzerine mevcut çalışmaların sonuçları, nano ölçekte benzer materyallere maruz kalmalardan kaynaklanabilecek olumsuz sağlık etkilerinin ön tahminleri için bir temel oluşturabilir. Boyut ve yüzey alanı da dahil olmak üzere parçacık özelliklerinin etkisinin tam olarak

anlaşılacağı kabul edilmelidir. Belli bir materyal hakkında mevcut toksisite bilgileri, aynı materyalin nano ölçeğe maruz kalmasından kaynaklanabilecek olumsuz sağlık etkilerini öngörmeye bir temel oluşturur. Bununla birlikte, mühendisliğe tabi tutulmuş nanomalzemelere maruz kalma ile ilişkili sağlık riskleri ile ilgili daha fazla veri gereklidir (Lanone ve Boczkowski, 2006).

Malzemenin metalik niteliği veya üretim sürecinin geri kalan kısmı olarak geçiş metallerinin varlığı da biyolojik etkilerin bir belirleyicisi olabilir, çünkü geçiş metalleri oksijen serbest radikallerin oluşumunda rol oynar (Lanone ve Boczkowski, 2006).

Son yıllardaki in vitro çalışmalara göre, bakır oksit nanopartikülünün (CuO-NP) diğer metal nanopartiküller ile karşılaştırıldığında, son derece zehirli olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, in vivo çalışmalar sonucu, elde edilen veri miktarı halen yetersizdir (Hanna L Karlsson, Cronholm, Gustafsson ve Moller, 2008; M. F. Song, Y. S. Li, H. Kasai ve K. Kawai, 2012).

### **2.2.2 Metal oksid nanopartiküller**

Bu malzemeler, teorik olarak, neredeyse her kimyasal maddeden, örneğin yarı iletken nanokristaller, organik dendrimerler ve karbon fullerenlerden üretilebilir. Genel olarak, tasarlanmış nanomalzemeler, ticari, tıbbi ve çevresel sektörlerdeki uygulamalar için son derece istenen eşsiz elektrik, termal, mekanik ve görüntüleme özelliklerine sahiptir.

Nanomalzemelerin yenilikçi özellikleri, ilk ticari ve gelişmekte olan biyomedikal uygulamalarını zaten bulmuştur. Örneğin, nanomalzemeler şimdi bazı güneş kremi, diş macunu, sıhhi tesisat kaplamaları ve hatta gıda ürünlerinde mevcuttur. Şu anda araştırmacılar, hücre etiketleme, ilaç hedefleme, gen iletim, biyosensörler ve hipertermi terapisi gibi alanlarda nanomalzemelerin biyomedikal kullanımlarını araştırmaktadır (Jeng ve Swanson, 2006).

### **2.2.3 Bakırın Özellikleri ve Kullanım Alanları**

Bakır hayvan ve bitki hücrelerinin metabolizması için vazgeçilmez bir elementtir. Çoğu organizmada bulunan bir esas elementtir ve onu içeren 30'dan fazla protein türü vardır. Bakır, altınla birlikte, 9000 yıl önce insan tarafından ilk kullanılan metaldir. Günümüzde dünya genelinde bakır tüketimi yılda yaklaşık 18 milyon tondur (Sánchez-Sanhueza, Fuentes-Rodríguez ve Bello-Toledo, 2016).

Bakır, son yıllarda hastaneler ve tıp merkezleri için bir yapı malzemesi olarak kullanılmaktadır ve antimikrobiyal özellikleri sayesinde

enfeksiyonlarla mücadelede yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Prado, Vidal ve Durán, 2012).

Patojenler, insan ve hayvan sağlığı için sürekli tehdit oluşturmaktadır. Antimikrobiyal özelliklere sahip nanoparçacıklar gibi bileşiklerin sentezi veya ekstraksiyonu önemlidir. Mevcut antimikrobiallere dirençli patojenlerin artan sayılarına karşı mücadelede bu nanoparçacıkların ümit vaat eden uygulamaları bulunmaktadır (Kruk, Szczepanowicz, Stefańska, Socha ve Warszyński, 2015; Usman vd., 2013).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmaya göre : Bakır nanopartikülleri karaciğer dokusu üzerinde nekroza ve morfolojik bazı bozukluklara neden olmuştur (Sizova vd., 2011).

Hepatolentiküler dejenerasyon (HLD) olarak da bilinen Wilson hastalığı (WD), bir otozomal genetik bozukluktur. Bu hastalıkta bakır metabolizmasındaki bir sorun oluşarak vücut dokularında birikmesine neden olan nadir bir hastalıktır (Xu vd., 2015).

#### **2.2.4 Bakır Oksit Nanopartiküllerinin Özellikleri ve Kullanım Alanları**

CuO gibi geçiş metaloksit nanomalzemeler, kuantum boyut etkisi ve yüksek spesifik yüzey alanlarından ötürü özel fiziko-kimyasal özelliklere sahiptirler.

CuO-NP ve diğer çoğu nanomalzemelerin toksik etki mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmış değildir (Chen vd., 2006).

CuO-NP (15-20 nm), hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) ve nitrik oksid (NO) üretir ve mitokondri bağımlı yolak aracılığıyla apoptotik hücre ölümünü uyarır. Sinyal iletimi çalışmaları, nanobakıra maruz bırakılan sıçanlarda kaspaz 9 ve kaspaz 3'un aktive olduğunu göstermiştir (Manoranjan Ghosh, Sankhadeep Pal ve Parames C. Sil, 2014).

Yapılan in vitro çalışmalar, CuO-NP'lerin, akciğer epitelyal hücreleri, deri, periferik kan ve hücre kültüründe kullanılan kanser hücre hatlarında genotoksisite ve sitotoksik etkisi olduğunu göstermektedir (Alarifi, Ali, Verma, Alakhtani ve Ali, 2013; Carmona, Inostroza-Blancheteau, Obando, Rubio ve Marcos, 2015; Semisch, Ohle, Witt ve Hartwig, 2014).

In vivo çalışmalarda, artmış neoplastik lezyonlar, noktasal mutasyonlar gibi CuO-NP'lerin potansiyel genotoksik riskleri bildirilmiştir. DNA mutasyonları ve DNA kırıkları da bu maddenin yan etkilerinden sayılabilir (M. F. Song vd., 2012; Yokohira vd., 2009).

Son dönemde yapılan çalışmalara göre, CuO-NP'ler sonunda su döngüsüne girer ve su ile temas bazlı toksisite konusunda endişelerin artmasına neden olurlar (Y. Sun vd., 2016).

Son yıllarda nanotoksikoloji konusuna yapılan çalışmalara bakıldığında, nanomateryallerin nekroz ve apoptoz mekanizmalarının tam olarak açıklanamadığı görülmektedir (Elsaesser,2012).

### **2.3 Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) ve İnterlökin-6**

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) ve İnterlökin-6 (IL-6), erken inflamatuvar olaylarda rol oynayan önemli pro-inflamatuvar sitokinlerdir. Bu iki madde çeşitli inflamasyonda rol oynayan molekülleri tetikleyerek, aktive olmalarını sağlarlar.

TNF- $\alpha$ , tümör regresyonu, septik şok ve kaşeksi içinde rol oynayan monosit türevi bir sitokindir. Tümör hücrelerine zarar verir, ancak normal hücreler üzerinde herhangi bir etkisi yoktur. Bu madde doğrudan etki veya interlökin-1 sekresyonunun uyarılması yoluyla ateşe neden olan güçlü bir pirojendir ve belirli koşullar altında hücre proliferasyonunu uyarabilir ve farklılaşmasını inhibe edebilir.

IL-6 interlökin tipi sitokin, farklılaşma, hayatta kalma, apoptoz ve proliferasyona katılan hedef genleri aktive eder. Bu sitokin ailesinin üyeleri hem anti-inflamatuvar özelliklere sahip hem de hematopoezisin yanı sıra organizmanın akut faz ve bağışıklık yanıtlarında da önemli rol oynar (Heinrich vd., 2003).

### **2.4 Antioksidanlar ve oksidatif stres hasarı**

Antioksidanlar, kolay okside olabilen maddelerdir ve diğer substratlara (karbonhidratlar, lipidler, proteinler veya nükleik asitler) kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunan, belirtilen substratların oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya inhibe eden herhangi bir madde olarak tanımlanırlar (Mut-Salud vd., 2015). Daha sonra, "bir hedef molekülün oksidatif hasarını önleyen, geciktiren veya ortadan kaldıran herhangi bir madde" veya "doğrudan veya dolaylı olarak reaktif oksijen türünü ortadan kaldıracak herhangi bir madde, antioksidan düzenleyici olarak görev yapan Antioksidan savunma ya da bu türlerin üretimini engellemeye yarayan maddelerdir (Pham-Huy, He ve Pham-Huy, 2008).

Reaktif oksijen türleri (ROS), mitokondrilerdeki oksidazların veya diğer hücresel bölmelerin etkisiyle, bazı metabolik süreçler tarafından üretilen bir molekül grubudur. ROS'un yüksek reaktivitesi vardır çünkü eşleşmemiş elektron reaksiyonları yoluyla oksitlenebilir (Mut-Salud vd., 2015).



Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oksidatif hasara ve kanser, diabet ve Parkinson hastalığı gibi yaşlanmaya bağlı hastalıkların başlıca nedeni olabilir. Buna göre, yaşlı bireylerin mitokondri'lerinin ROS seviyesi daha yüksektir. Bununla birlikte, ROS hücrel sınıyalizasyona katılır, çeşitli fizyolojik süreçler için ara maddedir ve model organizmalardaki ROS düzeylerini artırmak için çalışılan materyalin ömrünü uzatır. Mevcut fikir birliği, düşük ROS seviyelerinin faydalı olduğu ve sinyal yoluyla stres adaptasyonunu kolaylaştırdığı, buna karşın yüksek seviyeli ROS'un oksidatif stresi tetiklediği için zararlı olduğu görüşünü savunmaktadır. Bu modele dayanarak ROS miktarının fizyolojik etkiyi belirlediği söylenebilir (Scialo, Fernández-Ayala ve Sanz, 2017).

Oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki denge (redoks dengesi) sağlıklı bir hücrel mikro ortamın korunması için şarttır. ROS üretimi ile hücrelerin antioksidan savunma sistemi arasındaki denge üzerinde bir değişiklik ortaya çıkarsa, hücrelerde oksidatif stres meydana gelir(Hekimi, Lapointe ve Wen, 2011).

## **2.5 Serbest radikaller**

### **2.5.1 Malondialdehit (MDA) ve Lipid peroksidasyonu**

Malondialdehit (MDA), çoklu doymamış yağ asitlerin peroksidasyonuna neden olan başlıca etkilerinden biridir. 1960'lardan beri bu molekül in vivo ve in vitro çalışmalarda oksidatif stresin düzeyini ölçmede kullanılmaktadır (Del Rio, Stewart ve Pellegrini, 2005).

Kontrolsüz oksidatif stres (pro-oksidan ve antioksidan seviyeleri arasındaki dengesizlik) hücreler, dokular ve organlarda hasar oluşturabilir. Yüksek seviyedeki serbest radikallerin veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) lipidlere doğrudan zarar verebileceği uzun zamandır bilinmektedir. Mitokondri, plazma membranı, endoplazmik retikulum ve peroksisomlar, primer endojen ROS üretim kaynaklarıdır (Ayala, Muñoz ve Argüelles, 2014).

Lipid peroksidasyon oluşum süreci; Lipid peroksidasyonu genel olarak, serbest radikaller veya radikal olmayan türler gibi oksidanların, karbon-karbon çift bağ (lar) içeren lipidlere, özellikle de bir karbondan hidrojen soyutlamasını içeren poli doymamış yağ asitlerine (PUFA'lar) saldırdığı ve oksijen eklemeye sonuçlandığı bir işlem olarak tanımlanabilir.

### **2.5.2 Nitrik oksit (NO)**

Nitrik oksit (NO), başka türlere kıyasla ılımlı reaktiviteye sahip serbest radikaldir ve bu da organa özgü birçok düzenleyici fonksiyona neden olur. NO, genel olarak nitrik oksit sentazı (NOS) olarak adlandırılan bir ailenin

oluşturduğu enzim ile amino asit L-argininden sentezlenir (Kolios, Valatas ve Ward, 2004).

### **2.5.3 Katalaz (CAT)**

Katalaz, oksijene maruz kalan neredeyse tüm canlı organizmalarda bulunan, hidrojen peroksidin su ve oksijene ayrışmasını katalize eden bir ortak enzimdir. Hidrojen peroksit, birçok normal metabolik sürecin zararlı bir yan ürünüdür. Hasarı önlemek için, çabucak daha az tehlikeli maddelere dönüştürülmelidir. Bu amaçla, katalaz hidrojen peroksidin daha az reaktif gaz halindeki oksijen ve su moleküllerine ayrışmasını hızla katalize etmek için hücreler tarafından sıklıkla kullanılır. Bilindiği üzere hayvanların tüm organlarında, özellikle karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan katalaz bu amaçla kullanılır (Lobo, Patil, Phatak ve Chandra, 2010).

### **2.5.4 Kalpainler**

Kalpainler 15 farklı üyeden oluşan bir enzim ailesidir. Kalpainler hücre iskeleti ve sinyal iletiminde görev alan proteazlar olup, ayrıca hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptoz, inflamasyon, iskemi, nekroz gibi diğer fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde yer alırlar (Akdemir vd., 2008; Kuralay ve Çavdar, 2006).

Genellikle apoptoz sırasında sitoplazmalardaki proteazların aktive olmaları sebebiyle, hücre iskeletinin bütünlüğü bozulur, bunun asıl nedeni bu bütünlüğü koruyan proteinlerin yapısının bozulmasıdır. Bu proteazların diğer bir grubu ise kalpainlerdir (Mani vd., 2008).

Nekrotik hücre ölümü sırasında aktive olmuş kalpainlerin lizozomal zarlara zarar verdiği belirlenmiştir. İskemik olaylardan sonra ilk olarak kalpainler, lizozomların zarlarına tutunurlar ve sonrasında da katepsinler sitoplazmaya sızar. Bu gözlemler kalpain-katepsin hipotezinin oluşumuna neden olur. Kalsiyum aracılı kalpain aktivasyonu; lizozomların yırtılması, öldürücü katepsinlerin sızması ve hücrenin parçalanması ile sonuçlanır (Syntichaki ve Tavernarakis, 2003).

## 3 GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 3.1 Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

Bu çalışma için İstanbul medipol üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Komite raporu alınmıştır (Karar No:71 – 07.09.2016) ve bu araştırma için gerekli kaynak, Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenen 2016-1355 nolu projeden sağlanmıştır.

Çalışmamızda 250-300 gr ağırlığında toplam 40 adet Sprague-Dawley ırkı erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngü içerisinde, su ve yem alımlarına dikkat edilen, sıcaklığı sabit tutulan ( $21^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) hayvan saklama odasında, 4-5 sıçan kapasiteli kafeslerde barındırıldı ve standart sıçan yemi ile beslenerek musluk suyu verildi.

### 3.2 Deneyde kullanılan kimyasal maddelerin ve fiksatiflerin hazırlanması

#### 3.2.1 Bakıroksit nanopartikül çözeltisi (CuO-NP)

Her şişesinde (25 gr) pudra şeklinde olan CuO-NP (Sigma-544868 partikül büyüklüğü  $<50$  nm (TEM)) maddesinden 200 mg/kg günlük 2 ml serum fizyolojik içerisinde çözülerek deney grubu hayvanlara her gün tek doz olacak şekilde 5 gün boyunca oral gavaj yolu ile verildi.

#### 3.2.2 Serum fizyolojik

Beş gün boyunca, her gün tek doz olacak biçimde 2 ml serum fizyolojik çözeltisi gavaj yolu ile kontrol grubu hayvanlara verildi.

#### 3.2.3 Nötral tamponlu formalin çözeltisi (%4 NBF)

Solüsyonu hazırlamak için aşağıdaki maddeler kullanıldı;

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .....4 gr
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ..... 8gr
- Formaldehit %37.....100 ml
- Distile su .....900 ml

Solüsyonu hazırlamak için aşağıdaki aşamalar takip edildi;

- 4 gr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (sodyum dihidrojenfosfat) tartıldıktan sonra bir miktar saf su içerisinde çözüldü.

- 8 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (disodium hidrojenfosfat) tartıldıktan sonra bir miktar saf su içerisinde çözüldü.
- Yaklaşık 400 mL saf su üzerine 100 ml formaldehit eklenip karıştırıldıktan sonra 1000 ml lik bir mezür içine alındı. Hazırladığımız ilk solüsyonlar üzerine saf su eklenerek 1000 ml 'ye tamamlandı.
- PH 7.4 olarak ayarlandı.

### **3.2.4 Anestezikler**

Tüm işlemler anestezi altında gerçekleştirildi. Genel anestezik olarak tüm hayvanlara, intraperitoneal 50 mg/kg ketamin (Ketalar®) ve kas gevşetici olarak 10 mg/kg intraperitoneal ksilazin (Rhompun ®) verildi.

### **3.3 Kontrol ve Deney Grupları**

Deneye tabi tutulacak sıçanlar rastgele seçilerek, her grupta n=20 olacak şekilde iki ayrı gruba ayrıldı.

**Kontrol Grupları:** Bu gruptaki hayvanlara beş gün boyunca aynı saatte gavaj yolu ile 2 ml serum fizyoloji gavaj aleti (steel feeding tube) ile verildi. Her gün gavaj verilmeden önce hayvanların ağırlıkları aynı saatte tartılıp not edildi. Son gavajdan 24 saat sonra hayvanlar rastgele her grupta 10'ar hayvan olacak şekilde iki ayrı (kontrol A (n=10) ve kontrol B (n=10)) gruplarına ayrıldı;

**Kontrol A** grubundaki sıçanların deney bitiminde anestezi verildikten sonra göğüs kafesleri açıldı ve kalbin sağ ventrikülünden kan alındıktan sonra kardiyak perfüzyon yöntemi kullanarak dokular tespit edildi. Karaciğerleri çıkarılarak ağırlıkları ölçüldü, hacimleri saptandı ve daha sonra rastgele örnekleme metodu ile doku örnekleri alınarak, fiksatif solüsyonu içerisine konuldu ve histopatolojik değerlendirme için kullanıldı.

**Kontrol B** grubundaki sıçanların deney bitiminde 7 tanesine anestezi verildikten sonra göğüs kafesleri açıldı ve kalbin sağ ventrikülünden kan örneği alındıktan sonra karaciğer dokusu diseke edildi ve ağırlıkları hassas terazi ile tartılarak -80 dolabında donduruldu. Kan örnekleri ise oda sıcaklığında iki saat bekletildikten sonra santrifüj edildi ve serum kısmı eppendorf tüplere alınarak -80 derin dondurucuda saklandı. Geride kalan doku ve serum örnekleri biyokimyasal marker ölçümleri için saklandı. Bu grupta elde kalan 3 sıçana anestezik madde verildikten sonra hayvanların karın ön duvarı açıldı ve bağırsaklar yana doğru yatırılarak v.porta hepatis'e ulaşıldı. Bu ven aracılığıyla bu hayvanlara 0.1 Mol buffer çözeltisi içinde %2.5'luk gluteraldehit fiksatif verilerak karaciğerleri perfüze edildi. Hayvanların karaciğerleri fikse edildikten sonra sistemik örnekleme

yöntemiyle yaklaşık  $1 \text{ mm}^3$ 'lük doku örnekleri alınarak transmisyon elektron mikroskobu (TEM) incelemesi için ayrıldı.

**Deney grupları (CuO-NP verilen gruplar):** Bu gruptaki hayvanlara pudra şeklindeki CuO-NP 200 mg/kg/günlük 2 mL serum fizyoloji içerisinde çözülerek 5 gün süre boyunca ve günde bir kere olmak üzere gavaj aleti (steel feeding tube) ile verildi. Her gün aynı saatte gavaj verilmeden önce hayvanların ağırlıkları tartılıp not edildi. Son gavajdan 24 saat sonra hayvanlar rastgele her grupta 10'ar hayvan olacak şekilde iki ayrı gruba (deney A (n=10) ve deney B (n=10)) ayrılarak farklı prosedürlere tabi tutuldu.

**Deney A** grubundaki sıçanlara deney bitiminde anestezi madde verildikten sonra bu hayvanların göğüs kafesleri açıldı ve kalplerinin sağ ventriküllerinden kan örnekleri alındıktan sonra kardiyak perfüzyon yöntemi kullanarak dokuları fikse edildi. Karaciğerleri çıkarılarak ağırlıkları ölçüldü, hacimleri saptandı ve daha sonra rastgele örnekleme metodu ile doku örnekleri alınarak, fiksatif solüsyonu içine alınarak histopatolojik değerlendirmeler için saklandı.

**Deney B** grubundaki sıçanların deney bitiminde 7 tanesine anestezi madde verildikten sonra göğüs kafesleri açıldı ve kalplerinin sağ ventriküllerinden kan örnekleri alınarak karaciğerleri diseke edildi ve ağırlıkları hassas terazi ile tartıldıktan sonra -80 dolabında donduruldu. Kan örnekleri ise oda sıcaklığında 2 saat bekledikten sonra santrifüj edildi ve serum kısmı eppendorf tüplere alınarak -80'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Geride kalan doku ve serum örnekleri biyokimyasal marker ölçümleri için ayrıldı. Bu grupta elde kalan 3 sıçana anestezi madde verildikten sonra hayvanların karın ön duvarı açıldı ve bağırsaklar yana yatırılarak v.porta hepatis'e ulaşıldı. Bu ven aracılığıyla bu hayvanlara 0.1 Mol buffer çözeltisi içinde %2.5'lük gluteraldehit fiksatif verilerek karaciğerleri perfüze edildi. Hayvanların karaciğerleri fikse edildikten sonra sistemik örnekleme yöntemiyle yaklaşık  $1 \text{ mm}^3$ 'lük doku örnekleri alınarak transmisyon elektron mikroskobu (TEM) incelemesi için ayrıldı.

### 3.4 Akut bakır oksit nanopartikül uygulaması

Akut bakır oksit modeli oluşturmak için her gün 200 mg bakır oksit nanopartikül pudrası hassas terazide tartıldıktan sonra falkon tüplerine aktarıldı, üzerine 2 mL serum fizyoloji eklendikten sonra vorteks cihazı ile karıştırıldı, enjektör içine aktarıldı ve daha sonra metal gavaj enjektörüne takıldı. Bir kişi tamamen hayvan sabit tutarak, ve diğeri gavaj aleti ile özofagus ve daha sonra mideye ulaşıp enjektörün içindeki karışımı hayvanın midesine aktarıldı. Bu madde anlatılan yöntemle 5 gün boyunca günde bir kere deney grubu hayvanlarına verildi.

## **3.5 Doku Alımı ve Histolojik İnceleme**

Histolojik deneyler için ayrılan sıçanlara anestezi verildikten sonra karın ön duvarı vertikal insizyonla açıldı. Daha sonra diafragma açılarak kalbe ulaşıldı ve %4 'lük nötral buffer formalin (%4 NBF) solüsyonu kullanarak kardiyak perfüzyon metodu ile fikse edildikten sonra karaciğer bağlarından ve damarlarından serbestleştirilip diseke edildi.

### **3.5.1 Histolojik doku takibi**

Kontrol ve CuO-NP gruplarını oluşturan tüm sıçanlardan histopatolojik değerlendirmeler için karaciğer örnekleri alındı. Alınan karaciğer örneklerinin 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonun ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'er dakika ksilolde bekletildi. Karaciğer örneklerinin şeffaflanmasının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutulularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Bu kesitlerden bir kısmı Hematoksilen-Eozin boyama işlemi için, bir kısmı ise immünohistokimyasal değerlendirme amacıyla apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla TUNEL yöntemi uygulamak için bir kısmı ise Kaspaz-3 boyama için ayrıldı. Hematoksilen-Eozin boyama için kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatların 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi.

### **3.5.2 Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi**

Daha önceden parafin blok haline getirilip kesitleri alınarak hazırlanmış preparatların boyanmasında Hematoksilen-Eozin ikili boyası kullanıldı. Hematoksilen-Eozin ikili boyası ile boyanan ve deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eozin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflaştırılarak ve şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapılarak karaciğer örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

### **3.5.3 Kaspaz-3 immunohistokimya boyama yöntemi**

Bu boyamadaki bütün basamaklarda kesitler oda ısısında, nemli bir ortamda ve kesitlerin ışıktan korunarak işlemleri yapıldı. Bu boyamada sırası ile 2X5 dk ksilolde, 2X5 dk %95 alkolde, 1X5 dk %70 alkolde, 1X5 dk %50 alkolde, 1X5 dk %25 alkolde tutuldu ve sonra 2X5 dk PBS de yıkama yapıldı. Bu aşamadan sonraki tüm basamaklarda kesitlerin kurumamasına dikkat edildi. Boyama aşamaları Formaldehit fiksasyonlarında ve parafin bloklarda yapıldı. Boyama için gerekli olan ve yapıda bulunan antijenin maskelenmiş olabileceği için kaynatma işlemi ile antijeni açığa çıkarıldı.

Kesitler kaba yerleştirildi ve kesitleri kaplayana kadar içine 0.01 M sitrat buffer ile dolduruldu. Daha sonra düdüklü tencere içine distile su ekledi ve sonra kesitlerin düdüklü tencere içine yerleştirildi ve kaynatmaya bırakıldı. Kaynatma işleminde düdüklü tencere 3 dakika beklendi ve sonra kapatıldı. Daha sonra kesitlerin soğuması için 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Böylece antijen açığa çıkartma işlemi tamamlandı (360 cc distile su + 40 cc EDTA) EDTA ile çok iyi boyanma gözlemlendi. Boyanmada Sitrat buffer de kullanıldı ancak EDTA'nın tercih etmemiz nedeni boyamanın kalitesini artmasıdır. Bu aşamalardan sonra 1x5 dk çeşme suyunda yıkandı ve Kesitler PBS'ye alındı. Daha sonra doku sınırlayıcı kalem ile doku daire içine alındı ve Hidrojen peroxidase (%3'lük) ile 10 dk ve sonra distile suda tutuldu. Bu evreden sonra Ultra V blok 5dk tutuldu ve Primer antikor Chemicon rabbit polyclonal anti-active antibody oda ısısında 1 saat beklendi ve 50µl rabbit polyclonal anti-active Kaspaz-3 antibody eklendi. Daha sonra 1 ml dilüe solüsyonu eklendi ve PBS 2x1 dk tutuldu ve Sekonder antikor polyvalentli biotinylated goat anti polyvalent 30 dk beklendi. Bu aşamalardan sonra PBS 2x1 dk tutuldu ve Streptavidin peroxide 30 dk beklendi. Polyvalen ile PBS 2x1 dk tutuldu ve AEC kromojen 30 dk beklendi. Daha sonra Akan çeşme suyu tutarak Hemotoksilen boyası 10 sn tutuldu ve tekrar Akan çeşme suyu tutarak ile distile su yıkandı ve sonra su bazlı kapatma sıvısı ile montaj gerçekleştirildi.

### **3.5.4 TUNEL boyama yöntemi**

Daha önceden parafin blok haline getirilip kesitleri alınarak hazırlanmış preparatlar 60 derece etüvde 1 saat bekletilerek parafinin erimesi sağlandı. Daha sonra 3 kez değiştirilen ksilolde 5'er dk tutuldu ve sonra 2 kez %100 alkolde 3 dk tutuldu ve 1 kez %95 alkolde 3 dk tutuldu ve devamında 1 kez %70 alkolde 3 dk tutuldu ve bu işlemlerden sonra PBS solüsyonunda 5 dk tutuktan sonra Proteinaz K solüsyonunda oda ısısında 15 dk tutuldu ve 2 kez değiştirilmiş distile suda 2 dk yıkama yapıldı ve bundan sonraki aşamada %3 'lük hidrojen peroxidaz içerisinde oda ısısında 5 dk tutuldu ve PBS içerisinde 5-10 dk çalkalama yapıldı. Sonra örnekler Equilibration buffer içinde oda ısısında 5 dk inkübe edildi ve Kesitler TdT enzimi uygulanarak etüvde 37 derecede nemli ortamda 1 saat tutuldu ve

Kesitleri daha sonra Working Stop/ Wash buffer solüsyonunda 15 saniye çalkalan

dı ve 10 dk oda ısında inkübe edildi ve sonraki aşamada 3 kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda 1 dk tutuldu ve oda ısında kesitlere anti-digoxigenin peroxidaz damlatarak, üzerleri plastik coverslip ile kapatıldı ve oda ısısında nemli ortamda 30 dk bekletildikten sonra 4 kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda oda ısında 2 dk yıkama yapıldı. Kesitler üzerine DAB solüsyonu damlatıp, 10 dk bekletildi ve Kesitler 3 kez değiştirilmiş distile suda 1 dk yıkandıktan sonra distile suda 5dk tutuldu ve Metil green'de 15 dk tutuldu. Bu aşamalardan sonra kesitler 3 kez değiştirilmiş distile suya 10 kez daldırıldı ve % Butanol şale içine 2 kez daldırılıp çıkarıldı ve Ksilol I 2 dk tutuldu ve Ksilol II 2 dk tutuldu ve devamında Ksilol III 5 dk tutuldu ve daha sonra Kapama yapıldı.

### **3.5.5 Transmisyon Elektron Mikroskop'una (TEM) preparat hazırlama yöntemi**

Peristaltik pompa yardımı ile 0.1 M fosfat tampon içeren %2.5'lük glutaraldehit solüsyonu v. portae yoluyla karaciğer perfüzyonu yaptıktan sonra karaciğer diseke edilerek çıkarıldı ve keskin bisturi yardımıyla 1mm<sup>3</sup> 'lük küçük örnekler alınarak, zaman kaybetmeden 0.1 M fosfat tampon içeren %2.5'lük glutaraldehit içinde 24 saat 4°C'de primer fiksasyona alınmış, sonra fosfat tamponuyla 3 kez 15'er dakika yıkandı. Daha sonra 0.1 M fosfat tampon içeren %1'lik osmiyum tetroksit içinde, oda sıcaklığında ve rotatorda 2 saat sekonder fiksasyonları sağlandı, devamında dokular tamponla tekrar 3 kez yıkandı. Dokudaki fazla suyun alınması (dehidrasyon) için örnekler giderek artan derecelerde ve 4 0C'de ikişer kez belirli sürelerde etil alkol serilerinden geçirildi (%30, %50, %70, %90, %96, %100 (son yıkama ve sonraki işlemler oda ısısında) ve propilen oksitte 30 dk boyunca (iki kez) şeffaflaştırma işlemine alındı. 1/1 oranında propilen oksit- araldite karışımında 2 saat rotatorda bekletildikten sonra saf araldite alınan dokular bir gece boyunca rotatorda tutuldu ve ertesi gün araldite gömülerek 60 0C'de 48 saat polimerize edildi. Elde edilen bloklar ultramikrotomda (Leica Ultracut R) 700 nm kalınlığında kesilerek toluidin mavisiyle boyandı ve biyofilm olması muhtemel olan yüzey kısımları ışık mikroskobunda (Olympus BX50) incelendi. TEM'de görüntülenmesi istenilen alanlar belirlendikten sonra dokular tekrar trimlendi ve ultramikrotomda 60 nm kalınlığında tam ince kesitleri alındı. 300 meshlik bakır gridlere alınan bu kesitler uranil asetat-kurşun sitrat ile boyandıktan sonra JEOL JEM 1220 marka ve modeldeki TEM de incelenmeye alındı.

### **3.6 Morfometrik metotlar**

Karaciğerler diseke edildikten sonra önce dilimlere, sonra şeritlere bölündü ve sistematik örnekleme yöntemiyle elde edilen bu şeritlerden her bir hayvan için yaklaşık 1 cm<sup>3</sup>'lük dört doku parçası alındı. Daha sonra bu



dokular 24 saat %4'luk NBF içinde bekletildikten sonra, standart doku takip prosedürü takip edilerek parafin blokları içine gömüldü. Hematoksilen-Eozin ile boyanan 5 µm kalınlığındaki kesitler üzerinde aşağıdaki parametreler hesaplandı;

1. Ortalama lobül alanı
2. Ortalama vena centralis çapı
3. Sinüzoid / karaciğer dokusu oranı ( $V_v$ )

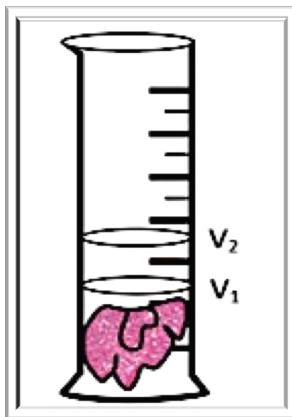
TEM'de çekilen fotoğraflar üzerinde ise aşağıdaki parametreler hesaplandı;

1. Nucleus hücrenin yüzde kaçını oluşturur
2. Mitokondri / Sitoplazma oranı ( $V_v$ )
3. Birim alana düşen mitokondri sayısı ( $N_a$ )

### 3.6.1 Karaciğer hacminin hesaplanması ( $V$ )

Karaciğer kardiyak perfüzyon yöntemi ile fikse edildikten sonra dikkatli bir şekilde bağlarından serbestleştirildi ve damarları organa yakın bir şekilde kesilerek çıkarıldı. Çıkarılan karaciğerler içerisinde belli bir seviyeye kadar su bulunan ( $V_1$ ) 250 mL'lik mezür içerisine tamamıyla batırıldı. Oluşan yeni su seviyesi ( $V_2$ ) kaydedildi. Bu iki değer arasındaki fark total karaciğer hacmi olarak not alındı.

Düzensiz yapıların hacimlerini hesaplamada sıklıkla kullanılan bir hacim hesaplama yöntemi olan bu metot (sıvının yer değiştirmesi metodu) tüm hayvanların karaciğer hacimlerinin hesaplanmasında kullanıldı (Şekil 3.1.) (Marcos, Monteiro ve Rocha, 2006, 2012).



$$V = V_2 - V_1$$

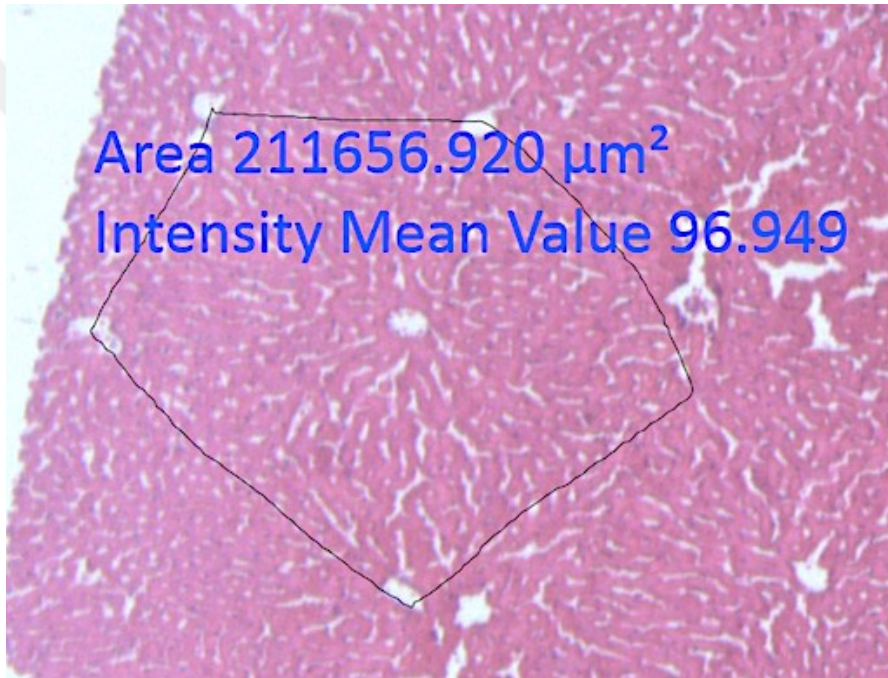
$V_1$  = suyun ilk hacmi  
 $V_2$  = suyun karaciğer daldırdıktan sonraki hacmi  
 $V$  = karaciğerin toplam hacmi (total volüm)

Şekil 3.1 Karaciğerin toplam hacim hesaplaması (sıvının yer değiştirme methodu) (Marcos, Monteiro, & Rocha, 2012).

### **3.6.2 Işık mikroskobunda elde edilen fotoğraflar üzerinde yapılan stereolojik ölçümler**

#### **3.6.2.1 Karaciğerde ortalama lobül alanının hesaplaması**

Tüm preparatlar ışık mikroskobu (Zeiss Axio Zoom V16) altında 40'lik objektifte ( $\times 40$  büyütme) sistematik rastgele örnekleme yöntemiyle her hayvan için 10 adet lobül incelendi ve fotoğraf olarak kayıt edildi. Ölçümler fotoğraflar üzerinde ZEN 2 software kullanarak gerçek boyutu, mikrometre kare ( $\mu\text{m}^2$ ) olarak hesaplandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Karaciğer lobül alanının hesaplanması.  
Karaciğer lobülü ışık mikroskobik görüntüsü (Çekilen fotoğraf üzerinde Zen 2 software kullanarak otomatik olarak Lobül alanını ( $\mu\text{m}^2$ ) olarak hesaplanması.

#### **3.6.2.2 Karaciğerde ortalama vena centralis çaplarının saptanması**

Her hayvandan sistematik rastgele örnekleme yöntemiyle, 120-140 adet vena centralis'den fotoğraf çekildi. Elde edilen, görüntüler bilgisayar ortamına Zen 2 software kullanarak, v. centralis'lerin çapları ölçüldü. Bu program bir görüntü analizi programıdır.

Bu programda uzunluk kalibrasyonu yapıldı. 1 pixel'in kaç  $\mu\text{m}$ 'ye eşit olduğu hesaplanarak programa girildi ve programda v. centralis'lerin büyük

(a) ve küçük (b) çapları  $\mu\text{m}$  olarak ölçüldü (Şekil 3.3). Daha sonra ölçülen bu değerlerin aşağıdaki formüle göre ortalama çapları bulundu (Marcos vd., 2006).

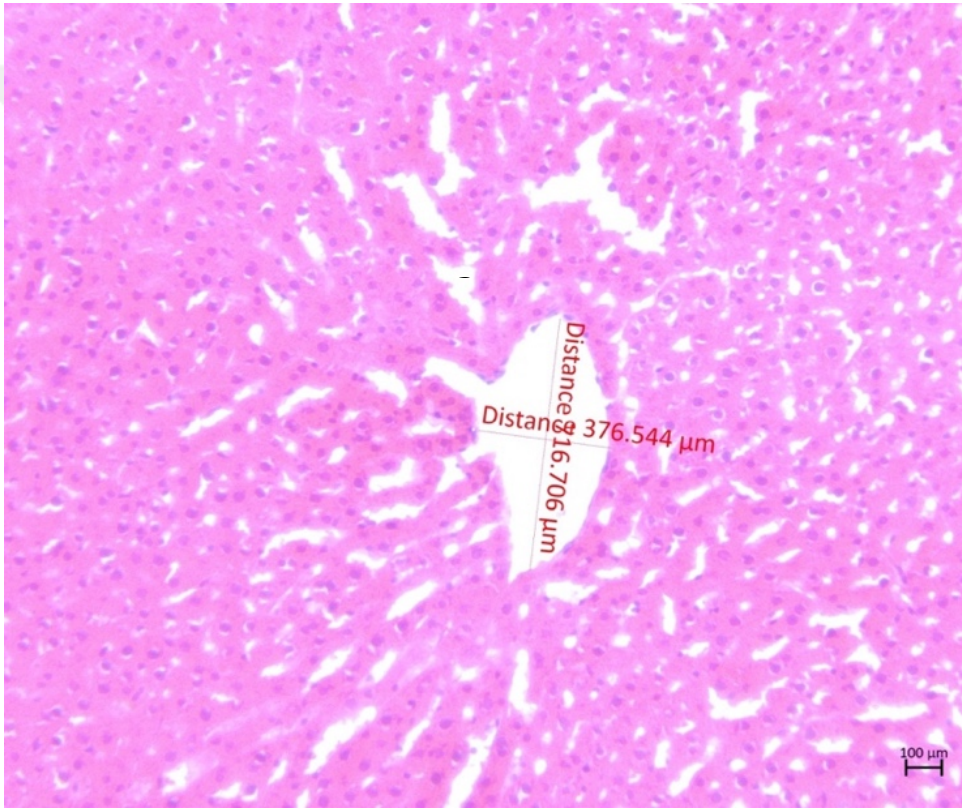
$$\bar{D} = \sqrt{a \times b}$$

$\bar{D}$  = Ortalama çap

a=Büyük çap

b=Büyük çapın orta noktasından dik olarak geçen ve onu iki eşit parçaya bölen çap

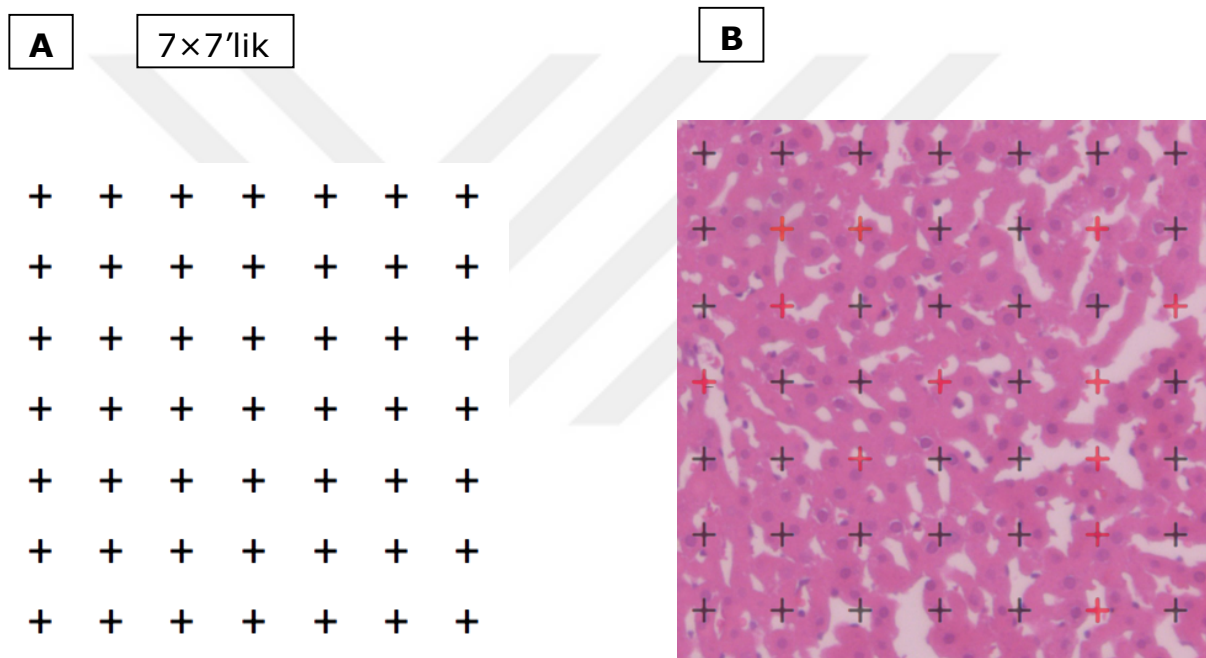
Bu formül kullanılarak çizilen tüm v. centralis'lerin ortalama çapları bulundu ve bu değerlerin aritmetik ortalamaları hesaplandı.



Şekil 3.3 Karaciğerde ortalama vena centralis çapının ölçülmesi.

### 3.6.2.3 Sinüzoid / karaciğer dokusu oranının (Volume fraction) ( $V_v$ ) hesaplaması

Bakır oksit nanopartikül sıçanlara uygulandıktan sonra, bu işlemin karaciğer dokusu üzerindeki etkilerini kantitatif olarak saptamak amacıyla, sinüzoid'lerin karaciğer dokusuna olan oranı (Volum fraction,  $V_v$ ) hesaplandı. Bunun için, 180'lik objektif altında, nokta sayım yöntemi (point counting metod) aracılığıyla 7x7'lik bir grit (noktalı sayım cetveli) kullanarak, kesitler sistematik rastgele örnekleme yöntemiyle taranarak 10 farklı alanda sayım yapıldı ve toplam 49 noktadan kaçının sinüzoidler üzerine düştüğü kaydedildi (Şekil 3.4.) (Junatas vd., 2016)



Karaciğer dokusu üzerine superimpose edilen grit.

Şekil 3.4 Sinüzoid / karaciğer dokusu oranının ( $V_v$ ) hesaplaması.

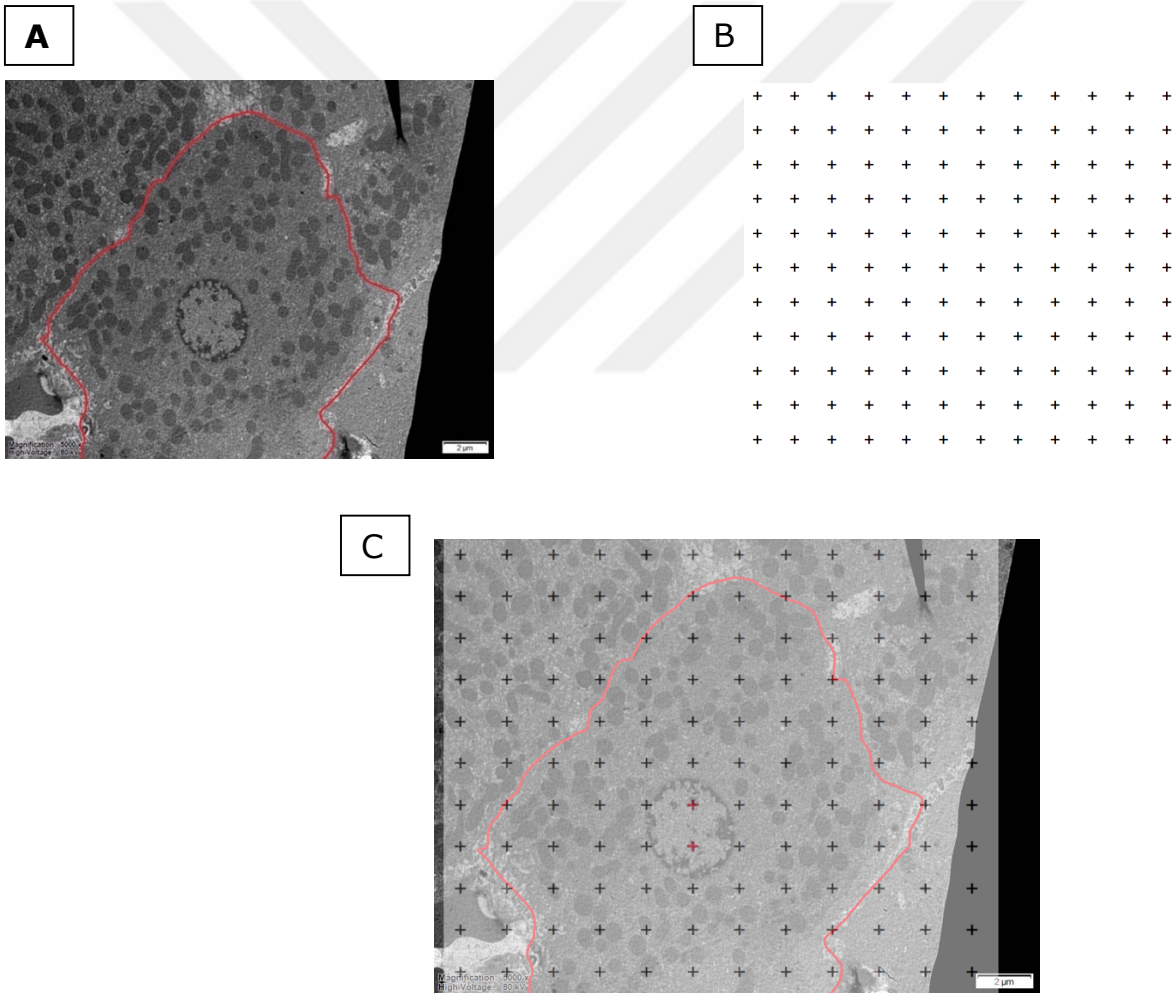
**A:** Asetat üzerine işaretlenmiş 10 mm'lik aralıklardan oluşan 7x7'lik noktalı grid.

**B:** 180'lik objektifle çekilen karaciğer dokusu resmi üzerine 7x7 nokta sayım cetvelinin (point grit) atılması. Buna göre; Sinüzoid / karaciğer dokusu oranı ( $V_v$ ) 12 (kırmızı nokta) / 49 ( kırmızı nokta + siyah nokta)

### 3.6.3 TEM mikroskopunda elde edilen fotoğraflar üzerinde yapılan stereolojik ölçümler

#### 3.6.3.1 Nükleus / total hepatosit hücresi oranı ( $V_V$ )

TEM mikroskopunda bir hepatositin tamamen sınırlarını görecek şekilde fotoğraflar çekildi. Her hayvandan 5000 büyütmede en az 10 fotoğraf bu şekilde çekildi. Bu fotoğraflar üzerine nokta sayım cetveli atılarak, nokta sayım yöntemi (point counting metod) aracılığıyla hepatosit hücresinin nucleus'u üzerine düşen nokta sayısı ile hücrenin tamamının sınırları içine denk gelen nokta sayısı oranından yüzde değeri hesaplandı (Şekil 3.5). (tüm sayımlar 3 kez tekrarlandı, ortalamaları alındı).

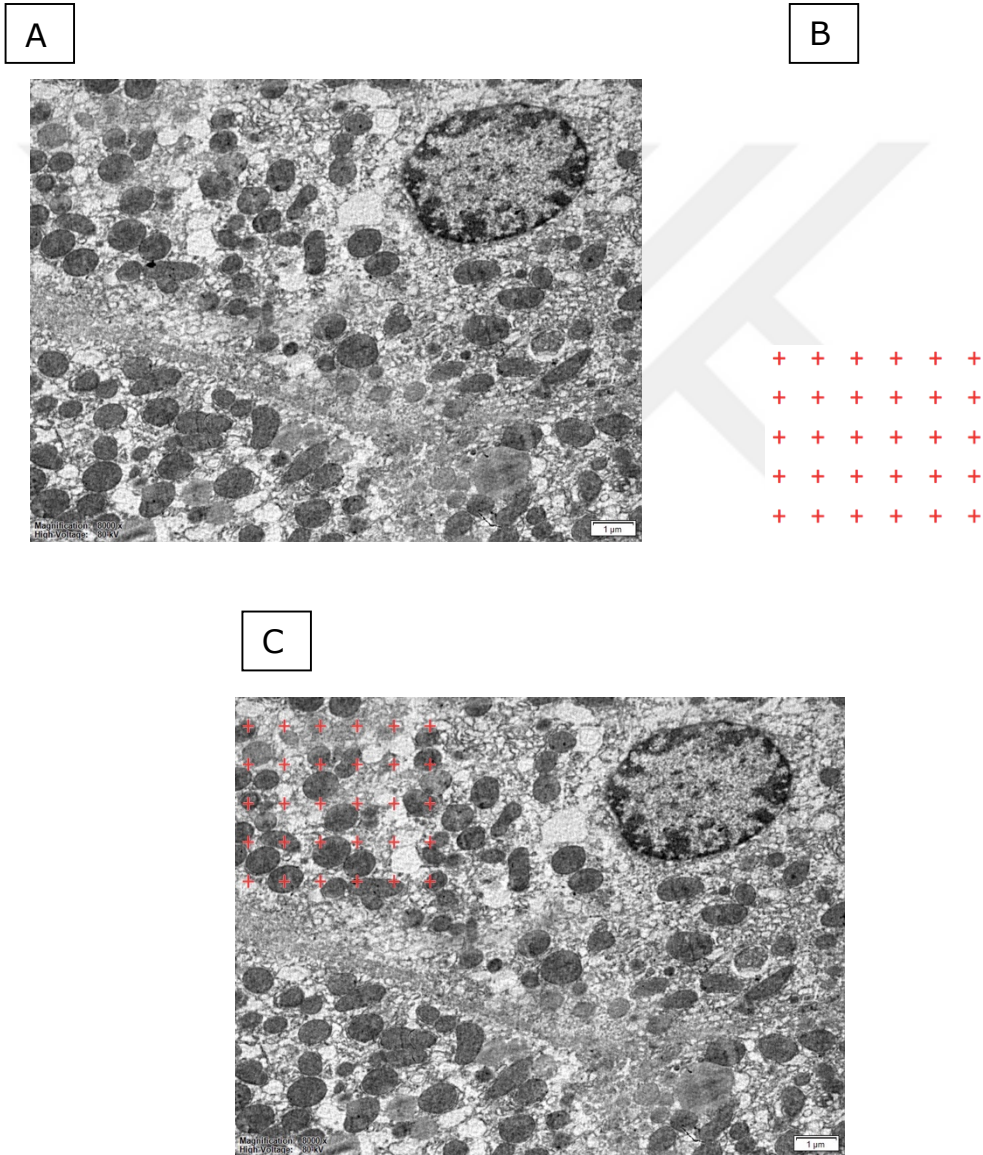


Şekil 3.5 Nükleus / total hepatosit hücresi oranı ( $V_V$ ).  
**A:** TEM fotoğrafı üzerinde hepatosit sınırları çizildi.  
**B:** Asetat üzerinde işaretlenmiş nokta sayım cetveli (point grit).  
**C:** Fotoğraf üzerine superimpose edilen grit.



### 3.6.3.2 Mitokondri / Sitoplazma oranı ( $V_v$ )

TEM mikroskopunda hepatosit'lerden 8000x büyütmede çekilen fotoğraflar üzerinde bu parametre hesaplandı. Bu fotoğraflar üzerine nokta sayım cetveli atılarak, nokta sayım yöntemi (point counting metod) aracılığıyla mitokondri üstüne denk gelen nokta sayısı nokta sayım cetvelinde bulunan total nokta sayısına bölünerek hesaplandı (Şekil 3.6) (tüm sayımlar 3 kez tekrarlandı, ortamaları alındı).



Şekil 3.6 Mitokondri / Sitoplazma oranının ( $V_v$ ) hesaplanması.

**A:** 8000X büyütmede çekilen örnek TEM fotoğrafı.

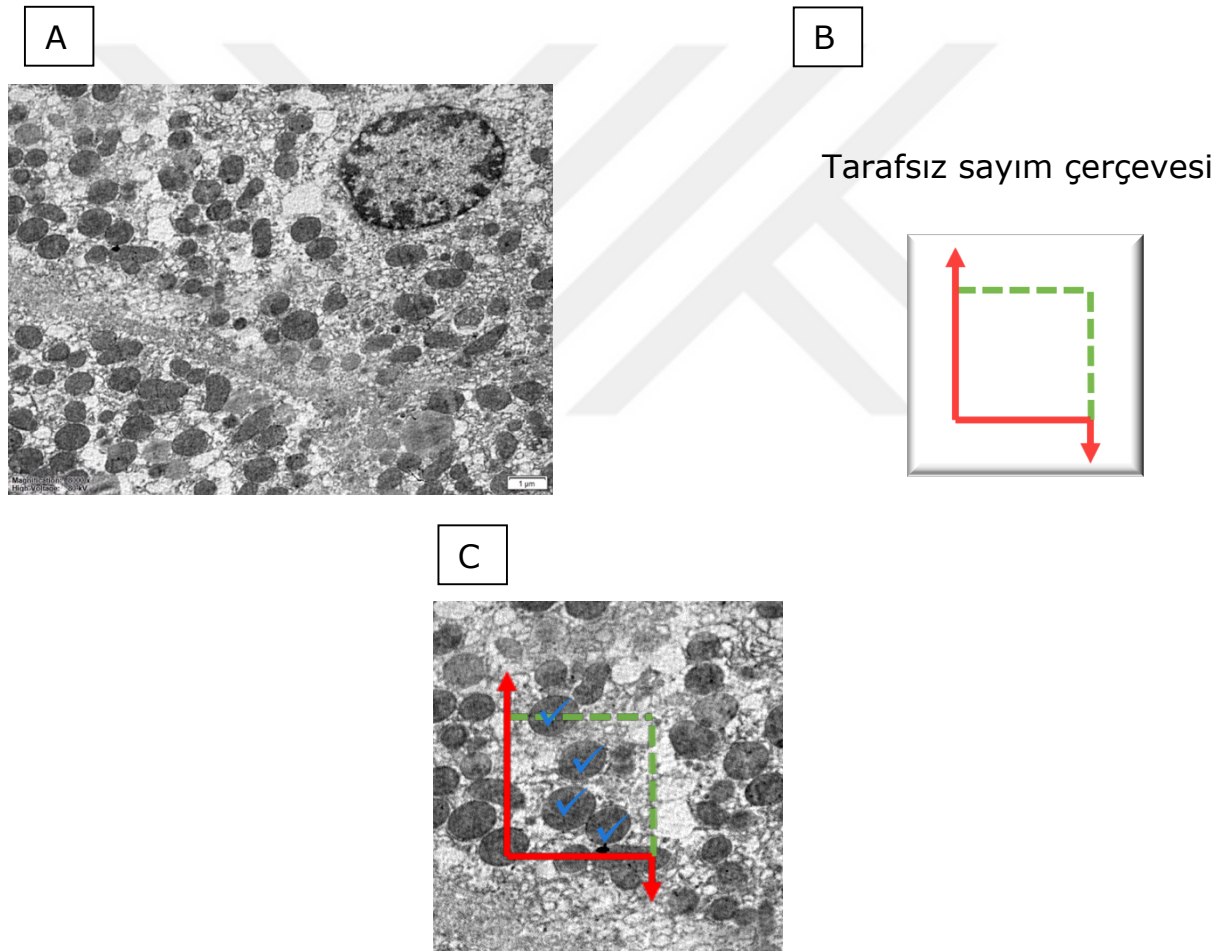
**B:** Asetat üzerinde işaretlenmiş nokta sayım cetveli (point grid).

**C:** Fotoğraf üzerine superimpose edilen grid.

### 3.6.3.3 Birim alana düşen mitokondri sayısı ( $N_a$ )

Birim alana düşen mitokondri sayısını saptamak için, TEM mikroskobunda 8000x büyütmede çekilen fotoğraflar üzerinde, sistematik rastgele örnekleme yöntemiyle 10 farklı alanda birim alan içerisinde düşen mitokondri sayısı saptandı. Sayımlarda tarafsız sayım çerçevesi (Unbiased counting frame) kullanıldı. Sayım çerçevesinin sağ ve üst çizgileri üzerine düşen mitokondriler sayılırken, sol ve alt çizgileri üzerine düşen nukleuslar sayıma dahil edilmedi (Mühlfeld vd., 2010).

Büyütme faktörü göz önünde bulundurularak, çerçeve alana düşen mitokondri sayısı saptandıktan sonra, birim alandaki mitokondri sayısı ( $N_a$ ) hesaplandı (Şekil 3.7) (Knust, Ochs, Gundersen ve Nyengaard, 2009).



Şekil 3.7 Birim alana düşen mitokondri sayısının hesaplanması.

**A:** 8000X büyütmede çekilen örnek TEM fotoğrafı.

**B:** Tarafsız sayım çerçevesi

**C:** Fotoğraf üzerine superimpose edilen sayım çerçevesi.

✓ : Tarafsız sayım çerçevesine düşen ve sayılan mitokondrileri göstermektedir

## 3.7 Kan alımı ve Biyokimyasal değerlendirmeler

Anestezi altında karın ön duvarı vertikal insizyonla açıldı ve diaphragma açılarak kalbe ulaşıldı, sonra sağ atriumdan 10 ml enjektör ile 4-5 ml kan alındı daha sonra biyokimyasal tüplere alındı.

### 3.7.1 Serum örneklerin hazırlanması

Biyokimyasal tüplerde olan kan 2 saat oda ısısında bekletildikten sonra ilgili kitlerin kılavuzunda açıklanan santrifüj koşulları dikkate alınarak santrifüj edildi ve daha sonra serum kısmı 4 ayrı eppendörf tüp içine aktarılıp  $-80^{\circ}$  derece buzdolabına kaldırıldı.

#### 3.7.1.1 Tümör nekrozan faktör (TNF- $\alpha$ ) düzeyinin ölçümü

Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri Elabscience Rat TNF- $\alpha$  (E-EL-R0019) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü.

### 3.7.2 TNF- $\alpha$ Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi

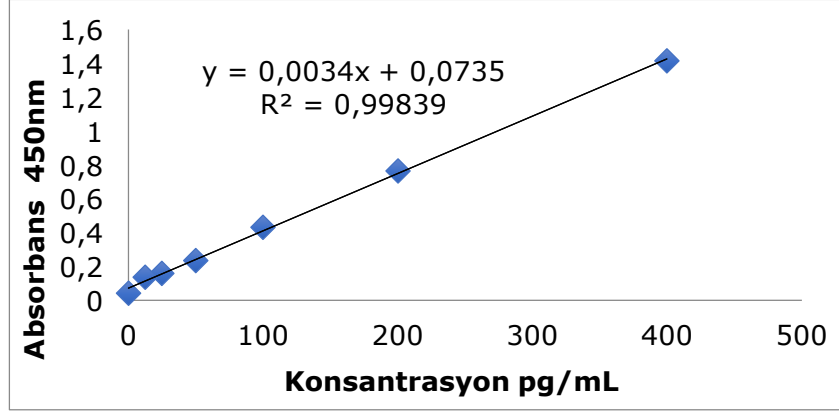
Elabscience TNF- $\alpha$  kiti solid faz sandviç Enzim Bağlı Immün Ölçüm (ELISA) prensibine dayanır. Rat TNF- $\alpha$  molekülüne spesifik monoklonal antikolar strip halindeki 8'li kuyucuklara kaplanmıştır.

### Deney Prosedürü

Kitin içerisinden çıkan 96'lık plakadaki standart, kör ve serum kuyucuklarına 100  $\mu$ l pipetlendi ve daha sonra  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 90 dk inkübe edildi. Kuyucukların içi boşaltıldı ve 100  $\mu$ l Biotinylated Detection Ab solüsyonu pipetlendi sonra  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dk inkübe edildi. Yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Kuyucuklara 100  $\mu$ l HRP konjugatı pipetlendi.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. 90  $\mu$ L substrat solüsyon pipetlendi ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk inkübe edildi. 50  $\mu$ L stop solüsyonu pipetlendi. Oluşan renk 450 nm de ELISA okuyucu ile ölçüldü. Daha sonra kit içerisinde bulunan standart ile seri dilüsyon yapıldı. Standartların absorbans değerleri ölçüldü ve kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.8). TNF- $\alpha$  sonuçları pg/mL olarak ifade edildi.

Kontrol ve deney grubuna ait numunelerde TNF- $\alpha$  konsantrasyonlarının saptanması için Şekil 3.8'deki kalibrasyon eğrisi dikkate alındı. Spektrofotometre cihazının hesapladığı x (absorbans) değeri formüle konularak y (konsantrasyon) değeri elde edildi.





Şekil 3.8 TNF- $\alpha$  kalibrasyon eğrisi

### 3.7.2.1 İnterlökin 6 (IL-6) düzeyinin ölçülmesi

Serum IL-6 düzeyleri Elabscience Rat IL-6 (E-EL-R0015) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü.

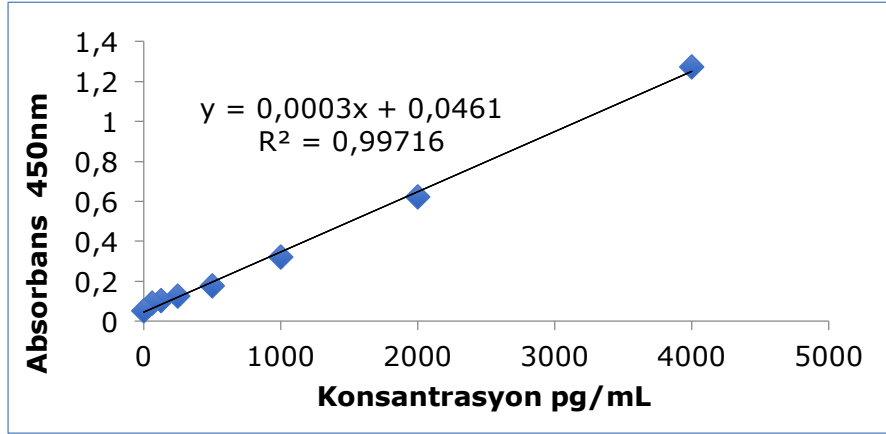
#### IL-6 Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi

Elabscience IL-6 kiti solid faz sandviç ELISA prensibine dayanır. Rat IL-6 molekülüne spesifik monoklonal antikorlar strip halindeki 8'li kuyucuklara kaplandı.

#### Deney prosedürü

Kitin içerisinden çıkan 96'lık plakadaki standart, kör ve serum kuyucuklarına 100  $\mu$ l pipetlendi ve daha sonra 90 dk 37<sup>0c</sup> inkübe edildi. Kuyucukların içi boşaltıldı ve 100  $\mu$ l Biotinylated Detection Ab solüsyonu pipetlendi sonra 37<sup>0c</sup>'de 60 dk süreyle inkübe edildi. Yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Kuyucuklara 100  $\mu$ l HRP konjugatı pipetlendi. 37<sup>0c</sup>'de 30 dk süreyle inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. 90  $\mu$ L substrat solüsyon pipetlendi ve 37<sup>0c</sup>'de 15 dk süreyle inkübe edildi. 50  $\mu$ L stop solüsyonu pipetlendi. Oluşan renk 450 nm de ELISA okuyucu ile ölçüldü. Kit içerisinde bulunan standart ile seri dilüsyon yapıldı. Standartların absorbans değerleri ölçüldü ve kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.9) ve IL-6 sonuçları pg/mL olarak ifade edildi.

Çalışmamızdaki kontrol ve deney grubuna IL-6 konsantrasyon saptanması için şekil 3.9 kalibrasyon eğrisi dikkate alındı. Spektrofotometre cihazının hesapladığı x (absorbans) değeri formüle konularak y (konsantrasyon) değeri elde edildi.



Şekil 3.9 IL-6 kalibrasyon eğrisi

### 3.7.2.2 Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyinin ölçümü

Serum ALT düzeyleri Elabscience Rat ALT (E-EL-R1232) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü.

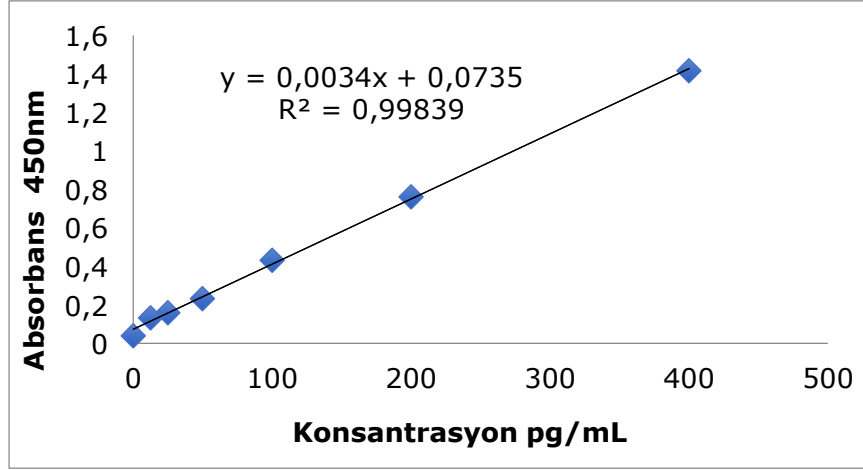
#### ALT Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensipleri

Elabscience ALT kiti solid faz sandviç Enzim Bağlı Immün Ölçüm (ELISA) prensibine dayanır. Rat ALT molekülüne spesifik monoklonal antikolar strip halindeki 8'li kuyucuklara kaplanmıştır.

#### Deney Prosedürü

Kitin içerisinde bulunan 96'lık plakadaki standart, kör ve serum kuyucuklarına 100 µl pipetlendi ve daha sonra 37°C'de 90 dk inkübe edildi. Kuyucukların içi boşaltıldı ve 100 µl Biotinylated Detection Ab solüsyonu pipetlendi sonra 37°C'de 60 dk inkübe edildi. Yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Kuyucuklara 100 µl HRP konjugatı pipetlendi. 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. 90 µL substrat solüsyon pipetlendi ve 37°C'de 15 dk inkübe edildi. 50 µL stop solüsyonu pipetlendi. Oluşan renk 450 nm de elisa okuyucu ile ölçüldü. Kit içerisindeki standart ile seri dilüsyon yapıldı. Standartların absorbans değerleri ölçüldü ve kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.10). ALT sonuçları pg/mL olarak ifade edildi.

Çalışmamızdaki kontrol ve deney grubuna ALT konsantrasyon saptanması için Şekil 3.10 daki kalibrasyon eğrisi dikkate alındı. Spektrofotometre cihazının hesapladığı x (absorbans) değeri formüle konularak y (konsantrasyon) değeri elde edildi.



Şekil 3.10 ALT kalibrasyon eğrisi

### 3.7.2.3 Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyinin ölçümü

Serum AST düzeyleri Elabscience Rat AST (E-EL-R0076) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü.

#### **AST Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi**

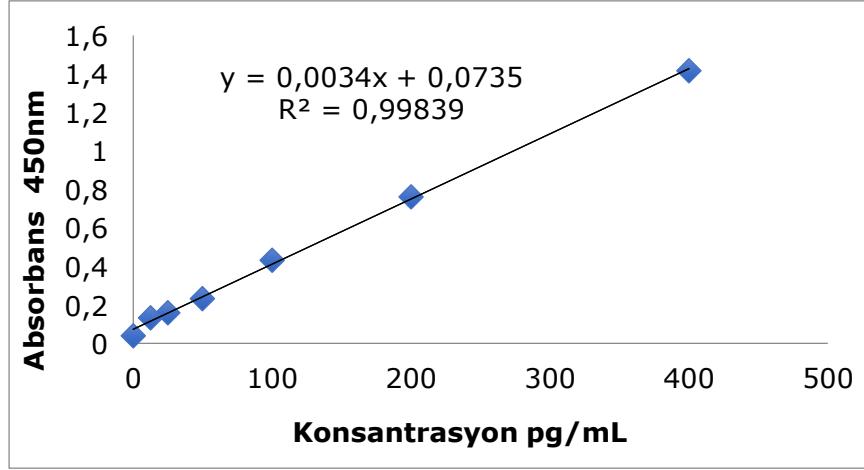
Elabscience AST kiti solid faz sandviç ELISA prensibine dayanır. Rat AST molekülüne spesifik monoklonal antikorlar strip halindeki 8'li kuyucuklara kaplandı.

#### **Deney Prosedürü**

Kitin içerisinden çıkan 96'lık plakadaki standart, kör ve serum kuyucuklarına 100 µl pipetlendi ve daha sonra 37°C'de 90 dk inkübe edildi. Kuyucukların içi boşaltıldı ve 100 µl Biotinylated Detection Ab solüsyonu pipetlendi sonra 37°C'de 60 dk inkübe edildi. Yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Kuyucuklara 100 µl HRP konjugatı pipetlendi. 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. 90 µL substrat solüsyon pipetlendi ve 37°C'de 15 dk inkübe edildi. 50 µL stop solüsyonu pipetlendi. Oluşan renk 450 nm de ELISA okuyucu ile ölçüldü.

Kitteki standart ile seri dilüsyon yapılarak, standartların absorbans değerleri ölçüldü ve kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.11). AST sonuçları pg/ml olarak ifade edildi.

Çalışmamızdaki kontrol ve deney grubuna AST konsantrasyon saptanması için şekil 3.11'deki kalibrasyon eğrisi dikkate alındı. Spektrofotometre cihazının hesapladığı x (absorbans) değeri formüle konularak y (konsantrasyon) değeri elde edildi.



Şekil 3.11 AST kalibrasyon eğrisi

#### 3.7.2.4 Kalpain Aktivitesi (CAPN1) düzeyleri ölçümü

Serum CAPN1 düzeyleri Elabscience Rat CAPN1 (E-EL-R2537) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü.

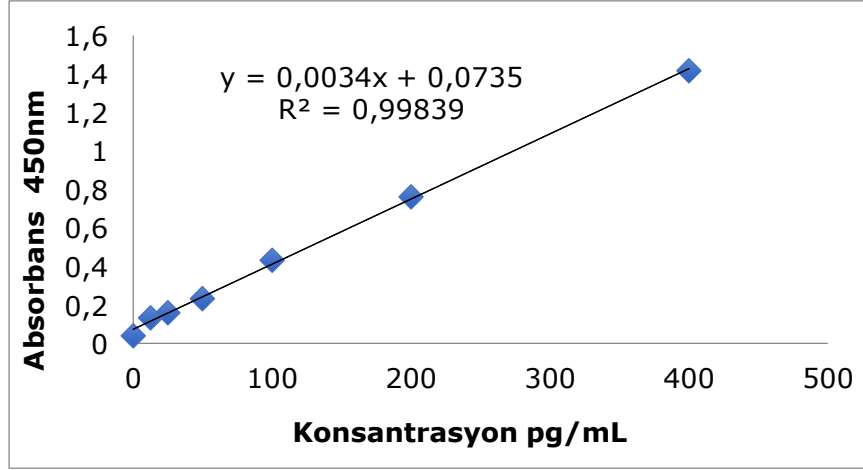
#### **Kalpain Aktivitesi Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi**

Elabscience CAPN1 kiti solid faz sandviç ELISA prensibine dayanır. Rat CAPN1 molekülüne spesifik monoklonal antikolar strip halindeki 8'li kuyucuklara kaplandı.

#### **Deney Prosedürü**

Kitin içerisinden çıkan 96'lık plakadaki standart, kör ve serum kuyucuklarına 100 µl pipetlendi ve daha sonra 37°C'de 90 dk inkübe edildi. Kuyucukların içi boşaltıldı ve 100 µl Biotinylated Detection Ab solüsyonu pipetlendi sonra 37°C'de 60 dk inkübe edildi. Yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Kuyucuklara 100 µl HRP konjugatı pipetlendi. 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. 90 µL substrat solüsyon pipetlendi ve 37°C'de 15 dk inkübe edildi. 50 µL stop solüsyonu pipetlendi. Oluşan renk 450 nm de elisa okuyucu ile ölçüldü. Kitin içerisinde yer alan standart ile seri dilüsyon yapıldı. Standartların absorbans değerleri ölçülerek; kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.12). CAPN1 sonuçları pg/ml olarak ifade edildi.

Çalışmamızdaki kontrol ve deney grubuna CAPN1 konsantrasyon saptanması için şekil 3.12'deki kalibrasyon eğrisi dikkate alındı. Spektrofotometre cihazının hesapladığı x (absorbans) değeri formüle konularak y (konsantrasyon) değeri elde edildi.



Şekil 3.12 CAPN1 kalibrasyon eğrisi

### 3.7.3 Doku örneklerinin hazırlanması

Biyokimyasal deneyler için ayrılan sıçanlardan kan alındıktan sonra karaciğer diseke edilip birkaç parçaya ayrılıp poşetlere ve daha sonra kuru buz üzerinde dondurulup, -80° derece buzdolabına kaldırıldı.

#### 3.7.3.1 Malondialdehit (MDA) düzeyinin ölçümü

##### Prensip

Yöntem, lipid peroksidasyonu son ürünlerinden olan malondialdehit (MDA)'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır (Ohkawa, Ohishi & Yagi, 1979).

##### Kullanılan çözeltiler

*%8,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS):* 8,1 gr SDS tartılıp, bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

*%20'lik Asetat Tamponu (pH:3,5):* 20 ml asetik asit alındı ve 100 mL'ye tamamlandı. NaOH ile pH, 3,5'e ayarlandı.

*%0,8'lik TBA:* 0,8 gr TBA tartılıp, bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

*N-butanol/pyridine karışımı:* 15/1 hacimleri karıştırılarak kullanılmadan hemen önce hazırlandı.

##### Doku homojenizasyonu

Çalışma anına kadar -80°C'de saklanmış olan karaciğer dokuları derin dondurucudan çıkarıldı, tartıldı ve çözdürüldü. Bu dokular 1/10 oranında 0,15 N KCl solüsyonundan eklenerek örnekler homojenize edildi.

Homojenatlar, +4°C'de 4000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatantlar alındı ve ölçüm için kullanıldı.

## Deney prosedürü

Kapaklı tüpler alınarak kör, standart ve örnek tüpleri hazırlandı. Kör tüpüne, 0,2 mL SDS, 1,5 mL asetat tamponu, 1,5 mL TBA ve 0,8 mL distile su, örnek tüplerine 0,4 mL süpernatant, 0,2 mL SDS, 1,5 mL asetat tamponu, 1,5 mL TBA ve 0,4 mL distile su eklendi. Tüpler 95 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda musluk suyu altında soğutuldu. Soğutulmuş tüplere n-butanol/pyridine karışımından 5'er mL eklenerek vortekslendi. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant alınarak ölçüm için kullanıldı. Örneklerin absorbanları 532 nm'de köre karşı okundu (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 MDA deney prosedürü

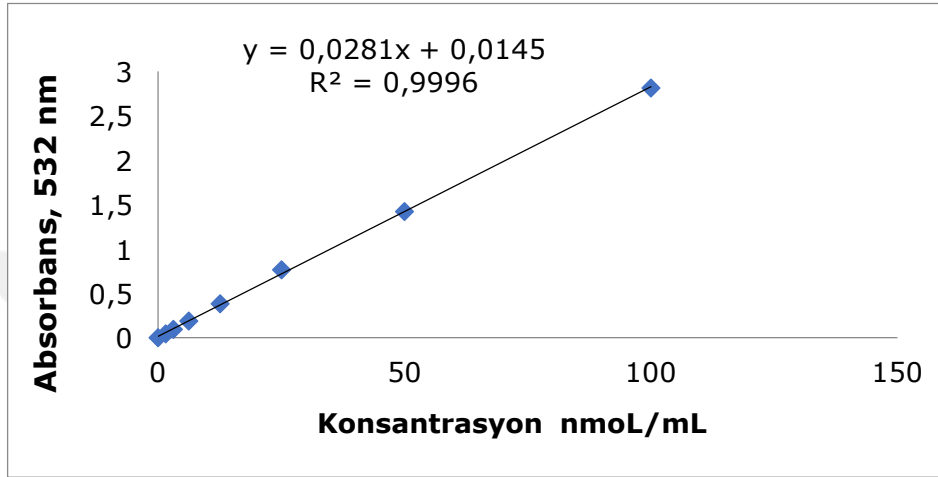
Doku homojenatları 400 rpm de 15 dakika santrifüj			
İşlem sırası	Numune	Kör	Standart
Süpernatant	100 $\mu$ L	-----	100 $\mu$ L
SDS (%8.1)	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L
Asetik asit (%20)	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L
TBA (%0.8)	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L
Distile su	80 $\mu$ L	160 $\mu$ L	80 $\mu$ L
60 dakika 95°C'de			
N-Bütanol/piridin	1mL	1mL	1mL
4000 rpm de 10 dakika santrifüj			

## Konsantrasyonların Hesaplanması

- Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için lipid peroksit standarttı (1.1.3.3. tetraetoksipropan) 10, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/ml konsantrasyonlarda hazırlandı.
- Standart tüplerine 0,2 mL SDS, 1,5 ml asetat tamponu ve 1,5 ml TBA konuldu ve farklı konsantrasyonlardaki standarttan 0,4 ml numaralandırılmış tüplere eklendi.
- Kör ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 532 nm'de absorbanları okundu.
- Microsoft Office Excel 2013 programı kullanılarak elde edilen absorbanların, konsantrasyon değerlerinin standart grafiği elde edildi (Şekil 3.13).
- Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

- Aynı homojenatların total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı. Doku MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

Çalışmamızdaki kontrol ve deney grubuna MDA konsantrasyon saptanması için şekil 3.13'deki kalibrasyon eğrisi dikkate alındı. Spektrofotometre cihazının hesapladığı x (absorbans) değeri formüle konularak y (konsantrasyon) değeri elde edildi.



Şekil 3.13 MDA kalibrasyon eğrisi

### 3.7.3.2 Doku Nitrik oksit (NO) düzeyinin ölçümü

#### Prensip

Nitrik oksit direkt ölçümü zor olduğu için biyolojik sıvılarda NO'nin stabil oksidasyon ürünleri olan nitrat ( $\text{NO}^{-3}$ ) ve nitrit ( $\text{NO}^{-2}$ ) düzeyleri in vivo ve in vitro NO markırı olarak ölçülmektedir. Çalışmamızda rat karaciğer nitrit miktarı Cortas ve Wakid'in yöntemine göre belirlenmiştir (Cortas & Wakid, 1990).

#### Kullanılan Çözeltiler

*Kadmiyum granüllerinin aktive edilmesi:* Kadmiyum granülleri 2,5 - 3 gr ağırlığında tartıldı.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içerisinde tutulan kadmiyum granülleri distile su içerisinde üç defa yıkandı.  $\text{CuSO}_4$  içerisinde iki dakika bekletildikten sonra glisin-NaOH tamponu ile üç defa yıkandı ve 10 dakika içerisinde kullanıldı.

*0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ :* 2.8 mL derişik  $\text{H}_2\text{SO}_4$  alınır ve içinde 250 mL distile su olan balon jojeye karıştırılarak aktarılır ve son hacim 500 mL' ye tamamlandı.

*0.2 mol/L Glisin-NaOH tamponu:* 15 gr glisin 100 mL distile suda çözüldü. 0.1 M'lık NaOH solüsyonu ile glisinin pH'sı 9.7'ye ayarlandı. Daha sonra çözelti 1000 mL'ye tamamlandı. Bu tampon çözelti +4-8 °C'de buzdolabında bir ay saklanabilir.

*58 mM'lık Sülfanilamid Çözeltisi:* 3M HCl'den 66.2 mL alınıp hacmi distile suyla 250 mL'ye tamamlanıp 2.5 gr sülfanilamid eklendi. Sülfanilamid sıcak HCl içinde iyice çözüldü. Bu çözelti oda sıcaklığında bir yıl stabildir.

*0.1 M'lık NaOH:* 3.2 gr NaOH tartılıp 40 mL suda çözüldü.

*55 mM'lık NaOH:* 1.1 gr NaOH alınıp bir miktar distile su ile çözümlenip son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

*0.77 M'lık N-Naftiletilediamin (NED) Çözeltisi:* 50 mg N-naftiletilediamin tartıldı ve 250 mL distile suda çözüldü. 0-8 °C'de iki ay stabil olarak kalır.

*5 mM CuSO<sub>4</sub> Çözeltisi:* 6.24 gr CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O bir miktar distile suda çözümlenip son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

*75 mM ZnSO<sub>4</sub> Çözeltisi:* 10.78 gr alınıp ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O alınıp distile suda çözüldü ve son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

*3 M HCl Çözeltisi:* 123.176 mL HCl alınıp son hacim distile suyla 500 mL'ye tamamlandı.

*Standart Sodyum Nitrit (NaNO<sub>2</sub>) Çözeltisi:* 0,1 mol/L NaNO<sub>2</sub> stok çözeltisi hazırlandı (0,069 gr tart 10 ml ye tamamlandı) (9 Ay stabil). Daha sonra Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O'dan 0,1906 gr tartılıp 50 ml ye tamamlanarak 0,01 mol/L Sodyum tetraborat çözeltisi hazırlandı. Daha sonra Sodyum nitrattan 10 µl alınıp 10 ml'ye (distile su ile) tamamlandığında günlük kullanım için 100 µmol/L'lik çözelti hazırlanmış olduk. 100 µmol/L'lik çözeltiyi seri dilüsyondan geçirip 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 ve 0 µmol/L konsantrasyonlarındaki standart çözeltiler hazırlanmış oldu.

### 3.7.3.3 Doku homojenizasyonunun hazırlanması

Karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.1 M Fosfat tamponu (pH:7.4) ile homojenize edildi. Doku homojenizatları 4000 x g'de ve +4 °C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

### Deney prosedürü

Deproteinizasyon işlemi için 50µL süpernatant, 200 µL NaOH, 250 µL mL ZnSO<sub>4</sub> ilave edilip 10 dakika beklendi. 3500 x g hızda 10 dakika santrifüj



yapıldı ve süpernatant numune olarak kullanıldı. Bakır kaplı kadmiyum granülleri üzerine 100  $\mu\text{L}$  glisin tamponu eklendi. Üzerine 100  $\mu\text{L}$  deproteinize numune konuldu ve üzerine 200  $\mu\text{L}$  distile su ilave edildi. Oda ısısında 90 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 200  $\mu\text{L}$  alınıp üzerine 250  $\mu\text{L}$  distile su, 100  $\mu\text{L}$  sülfanilamid ve 100  $\mu\text{L}$  N-naftiletilediamin ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra 545 nm'de köre karşı okundu (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Nitrik Oksit deney Protokolü

İŞLEM	DENEY	KÖR	STANDART
Süpernatant	500 $\mu\text{L}$	-	(std.)
NaOH	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
ZnSO <sub>4</sub>	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$
3500 g'de 10 dk santrifüj			
Süpernatant	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Distile su	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Glisin Tamponu	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Kadmiyum granülleri	Eklenir	Eklenir	Eklenmez
90 dk inkübasyon			
Süpernatant	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Sulfanilamide	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
N-Naftiletilediamin	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Distile su	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$
60 dk inkübasyon			

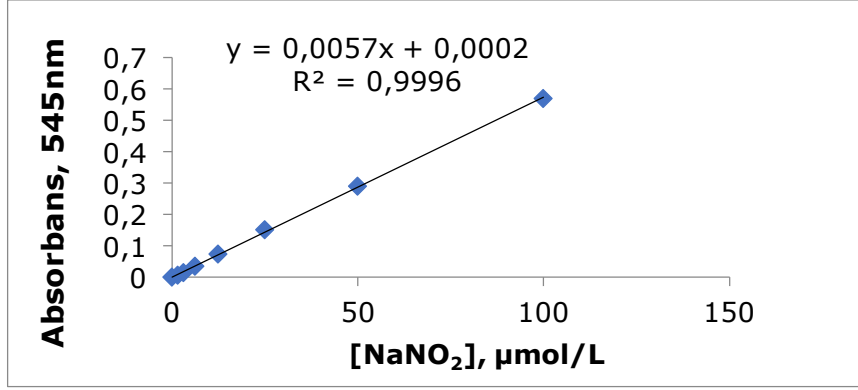
$$\lambda = 545 \text{ nm}$$

### Konsantrasyonların Hesaplanması

Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 ve 0  $\mu\text{mol/l}$  konsantrasyonlarındaki NaNO<sub>2</sub> standart çözeltileri kullanıldı. Standart tüplerine 200  $\mu\text{l}$  NaOH, 250  $\mu\text{l}$  mL ZnSO<sub>4</sub>, 100  $\mu\text{l}$  glisin tamponu eklendi. Kadmiyumsuz ortamda 100  $\mu\text{l}$  sülfanilamid ve 100  $\mu\text{l}$  N-naftiletilediamin ve farklı konsantrasyonlardaki standartlardan numaralandırılmış tüplere eklendi.

Kör ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 545 nm'de absorbanları okundu. Elde edilen absorbanlarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2013 programı kullanılarak standart grafiği elde edildi (Şekil 3.14). Doku örneklerinin NO konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı. Doku nitrik oksit düzeylerinin hesaplaması için, aynı doku homojenatlarının total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı. Doku NO sonuçları,  $\mu\text{mol/mg}$  protein olarak verildi.

Çalışmamızdaki kontrol ve deney grubuna ait örneklerin NO konsantrasyonlarının saptanması için Şekil 3.14'deki kalibrasyon eğrisi dikkate alındı. Spektrofotometre cihazının hesapladığı x ( absorban ) değeri formüle konularak y ( konsantrasyon ) değeri elde edildi.



Şekil 3.14 Nitrik Oksit kalibrasyon eğrisi

### 3.7.3.4 Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçümü

#### Prensip

CAT H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in yıkımını katalize eder. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in katalaz tarafından yıkım hızı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülür (Beutler, 1984) .



#### Kullanılan Çözeltiler

- 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 0.05 M Fosfat Tamponu (pH 7.4)
- *Tris Tamponu (pH 8.0)*: Tris-HCl 1M + 5mM EDTA biraz distile suda çözüldü ve PH 8.0 olduktan sonra 100 mL distile suya tamamlandı ve PH ayarlamak için 2M Hcl'den kullanıldı.

#### Doku homojenizasyonu

Karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.05 M Fosfat tamponu (pH:7.4) ile 0 °C'de homojenize edildi. Doku homojenatları 600 x g'de ve +4 °C'de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

#### Deney prosedürü

Reaktifler tüplere Tablo 3.3'de gösterildiği şekilde koyuldu. Kör ve örnek absorbansları 230 nm dalga boyunda 0., 1. ve 2. dakikada ölçüldü.

Tablo 3.3 Katalaz deney Protokolü

Çözeltiler	Kör	Örnek
Tris Tamponu	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		900 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	930 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
10 dk 37 °C'de inkübasyon		
Örnek	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$

### Katalaz Spesifik Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{Katalaz aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_t}{0.071 \times V_0}$$

$\Delta\text{OD}$  = Zamana göre absorbans değişimi

$V_t$  = Toplam hacim

$V_0$  = Örnek hacmi

0.071 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 230 nm'deki mM ekstinksiyon katsayısı

$$\text{Katalaz Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{Katalaz aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

#### 3.7.3.5 Karaciğer dokusunda protein ölçümü

### Prensip

Karaciğer dokusundan elde ettiğimiz homojenatların protein miktarı Bradford yöntemi ile ölçüldü (Bradford, 1976).

### Kullanılan çözeltiler

- Coomassie Brilliant Mavi G-250
  - Ethanol %95
  - Fosforik asit (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) %85
- 1 litre Bradford solüsyonu hazırlamak için; 1 litrelik kabda 100 mg G-250 Coomassie Mavisini boyası 50 ml %95'lik etanol kullanılarak çözüldü.
- Üzerine %85 lik fosforik asitten 100 ml eklendi.
- Distile su ile 1 litreye tamamlandı.
- Bu solüsyon derişik stok solüsyondur. Işıktan korunarak oda ısısında saklanabilir. Kullanımdan önce whatman filtre kağıdı ile süzüldü. 5 kez sulandırıldı.

### Deney prosedürü

- 5  $\mu\text{l}$  örnek 250  $\mu\text{l}$  solüsyon ile karıştırıldı.
- 5 dakika oda ısısında bekledikten sonra 595 nm ölçüldü.

- Sığır serum albümini (BSA) ile seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlandı.
- Kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.15).
- Protein sonuçları mg/ml olarak ifade edildi.

### Doku homojenatının hazırlanması

NO, CAT, CAPN, MDA ölçümlerinde kullanılan homojenatlar kullanıldı ve ölçümlerin yapıldığı fraksiyonlarda protein değerleri belirlendi.

### Konsantrasyonların Hesaplanması

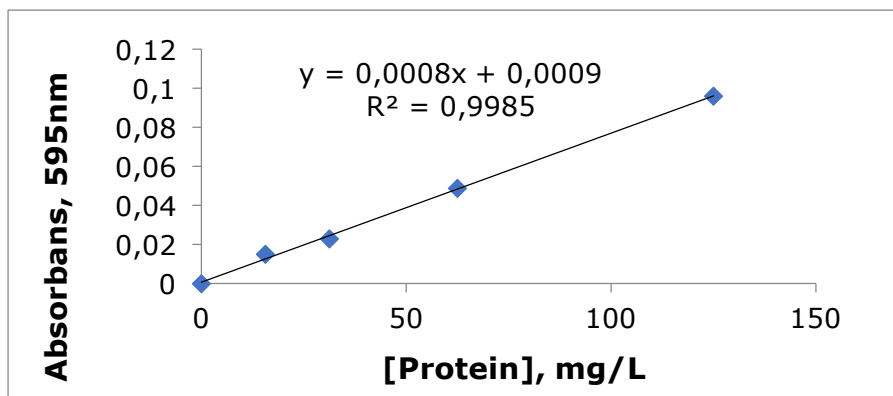
Örnek konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için protein standardı olarak bovine serum albumin (BSA) 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.2 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.

Belirteçten 5 mL ve farklı konsantrasyonlardaki standarttan 0,1 mL numaralandırılmış standart tüplerine eklendi.

Vortekslenen tüpler 5 dakika bekledikten sonra 595 nm'de absorbansları okundu.

Elde edilen absorbanslarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2013 programı kullanılarak grafiğe geçirilerek standart grafiği elde edildi (Şekil 3.15). Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

Çalışmamızdaki kontrol ve deney grubuna protein konsantrasyon saptanması için şekil 3.15'deki kalibrasyon eğrisi dikkate alındı. Spektrofotometre cihazının hesapladığı x (absorbans) değeri formüle konularak y (konsantrasyon) değeri elde edildi.



Şekil 3.15 Protein kalibrasyon eğrisi

### 3.8 İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Windows 22.0 paket programı kullanıldı. Gruplar arasında klinik ve metabolik değişken ölçümleri açısından fark olup olmadığını analiz etmek için öncelikle dağılımların normal dağılıma uygunlukları analiz edildi. Parametrik verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmaları Tek Yönlü Varyans Analiz (Oneway ANOVA) testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi kullanılmıştır. Tüm veriler ortalama  $\pm$  SD (standart sapma) ile birlikte verildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi kullanılmış ve veriler ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdilik değerler olarak ifade edilmiştir. Değişkenler arasındaki ilişkiyi gösterebilmek için normalite testleri sonucuna göre Pearson ve Spearman korelasyon testlerinden yararlanıldı.  $P < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4 BULGULAR

### 4.1 Ortalama vücut ağırlığı

Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların vücut ağırlıkları deneyin 1. günü gavaj verilmeden önce, deneyin 6. günü son doz gavajdan 24 saat sonra (sakrifikasyon öncesi) iki farklı günde hassas terazi ile tartıldı. Gruplara ait veriler sırasıyla Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Kontrol gurubu hayvanlarına ait ortalama vücut ağırlıkları (gr).

Hayvan no	1.Gün ağırlığı	5.Gün ağırlığı
1	297	290
2	207	215
3	300	300
4	279	300
5	270	275
6	360	370
7	270	360
8	360	390
9	400	280
10	300	280
11	320	345
12	348	350
13	337	405
14	330	330
15	400	320
16	288	380
17	330	360
18	362	295
19	365	336
20	360	380
Ortalama	328.5	335

Tablo 4.2 Deney grubu hayvanlarına ait ortalama vücut ağırlıkları (gr).

Hayvan no	1.Gün ağırlığı	5.Gün ağırlığı
1	323	312
2	305	320
3	265	250
4	380	390
5	290	288
6	358	333
7	300	300
8	335	305
9	334	329
10	335	335
11	318	360
12	347	338
13	300	315
14	315	348
15	298	305
16	342	300
17	350	378
18	440	438
19	370	350
20	340	320
Ortalama	331.5	316

Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların vücut ağırlıkları farklı dönemlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait ortalama vücut ağırlıklarının(gr) istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	n	Deney başında (1.gün) Ortalama±SD	Deney sonunda (5.gün) Ortalama±SD
Kontrol	20	280.00(277.00-341.75) <sup>a</sup>	290.14±21.16
CuO-NP	20	289.00(276.75-341.25) <sup>a</sup>	292.00±19.74

**n:** Kullanılan hayvan sayısı

<sup>a</sup> Kontrol grubu değerleri normal dağılım göstermedikleri için medyan (%25 - % 75) olarak gösterilmiştir. Diğer gruplarda normal dağılım gösterdikleri için ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Grup içinde farklı günlerdeki değerler tekrarlı ölçümler için tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir

Doku alımı öncesi; kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların ortalama vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4.3).

## 4.2 Ortalama karaciğer ağırlığı ve hacmi

Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra, karaciğer diseke edilerek çıkarıldı ve fascia'ları temizlendikten sonra hassas terazi ile tartıldı. İki gruba ilgili veriler Tablo 4.4 'de verilmiştir. Ortalama karaciğer ağırlığı kontrol grubunda 15.265 gr, NP grubunda 13.412 gr olarak bulundu (Şekil 4.1). Bu değerler arasında istatistiki olarak önemli fark bulundu ( $p < 0.05^*$ ) (Tablo 4.5). Kontrol ve deney gruplarındaki sıçanlara ait karaciğer hacimleri aşağıda verilmiştir (Tablo 4.4). Kontrol grubu hayvanlarda ortalama karaciğer hacmi 12.25 mL olarak hesaplanırken, bu değer, CuO-NP grubunda 12.88 mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.2). Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların ortalama karaciğer hacimleri arasında istatistiki bakımdan anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4.6).

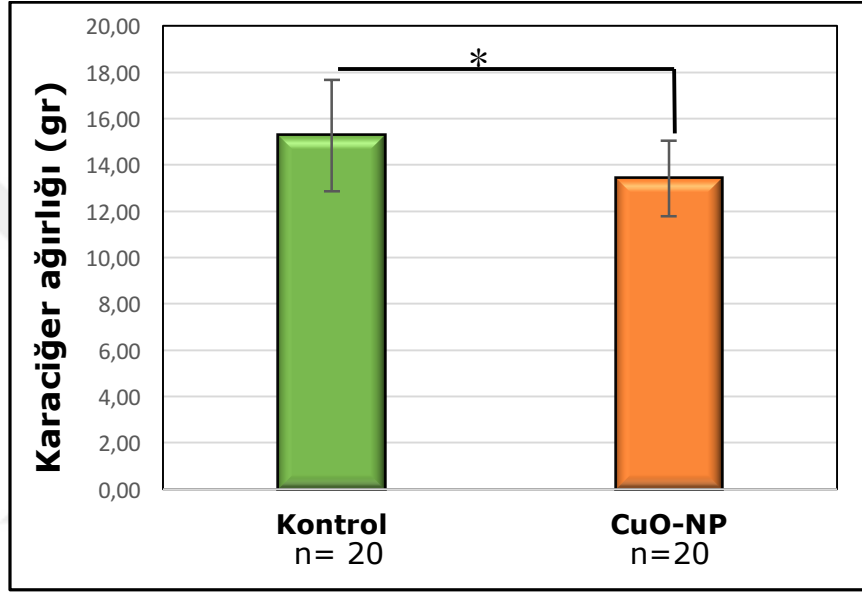
Tablo 4.4 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait karaciğer ağırlıkları (gr) ve hacimleri (ml) ile ortalama değerleri.

Gruplar		Karaciğer ağırlığı	Karaciğer hacmi
Kontrol	1.hayvan	12.75	10.00
	2.hayvan	15.37	12.00
	3.hayvan	18.28	16.00
	4.hayvan	16.24	12.00
	5.hayvan	12.01	10.00
	6.hayvan	15.22	17.00
	7.hayvan	13.63	10.00
	8.hayvan	18.62	11.00
	Ortalama	15.265	12.25
CuO-NP	1.hayvan	12.70	10.00
	2.hayvan	13.26	11.00
	3.hayvan	15.90	16.00
	4.hayvan	14.00	10.00
	5.hayvan	12.05	13.00
	6.hayvan	15.38	11.00
	7.hayvan	11.08	17.00
	8.hayvan	12.93	15.00
	Ortalama	13.412	12.875



Tablo 4.5 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarına ait karaciğer ağırlığının istatistiksel değerlendirmesi.

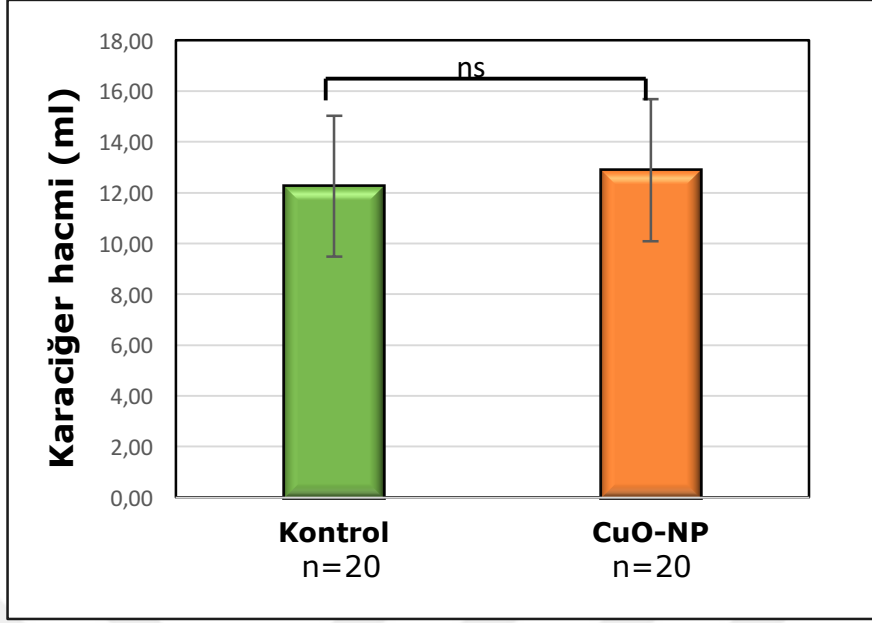
	n	Karaciğer ağırlığı(gr) Ortalama±SD	P değeri*
Kontrol	20	15.26 ± 2.42	p<0.05*
CuO-NP	20	13.41 ± 1.62	



Şekil 4.1 Kontrol ve CuO-NP gruplarının karaciğer ağırlığını gösteren grafik.

Tablo 4.6 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarına ait karaciğer hacminin istatistiksel değerlendirmesi.

	n	Karaciğer hacmi(ml) Ortalama±SD	P değeri
Kontrol	20	12.25 ± 2.76	p>0.05
CuO-NP	20	12.88 ± 2.80	

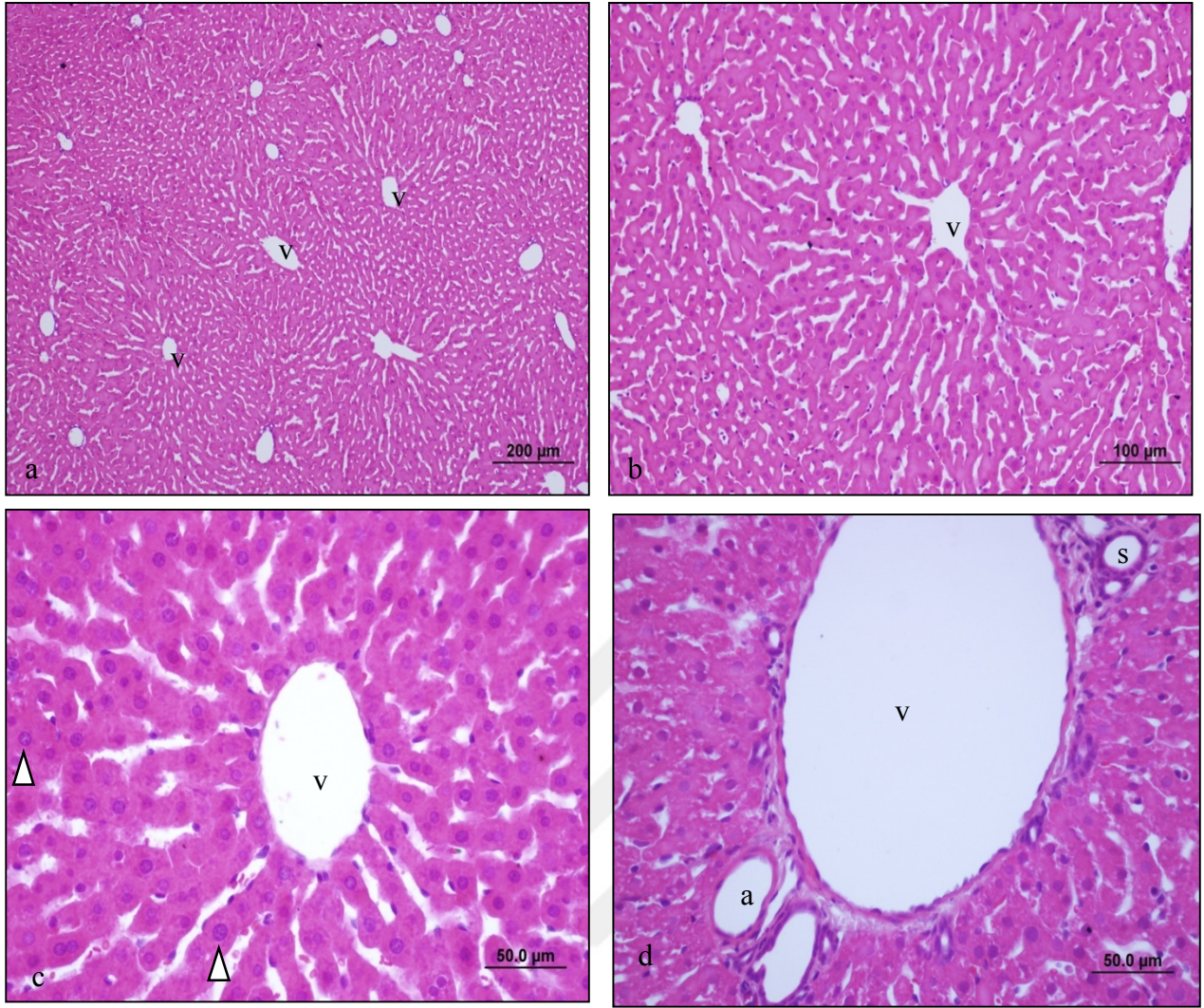


Şekil 4.2 Kontrol ve CuO-NP gruplarının karaciğer hacmini gösteren grafik.

### 4.3 Histolojik bulgular

#### 4.3.1 Işık mikroskopi bulguları

Kontrol grubuna ait hayvanlardan alınan karaciğer örneklerinin Hematoksilen Eozin boyama yapılmış preparatlarının yapılan histopatolojik incelemelerinde: kontrol grubunu oluşturan sıçanların karaciğerlerinin parankimal dokusunda hepatosit hücreleri, portal alan ve sinüzoidal yapılar normal olarak gözlemlendi (Şekil 4.3), (Tablo: 4.7).

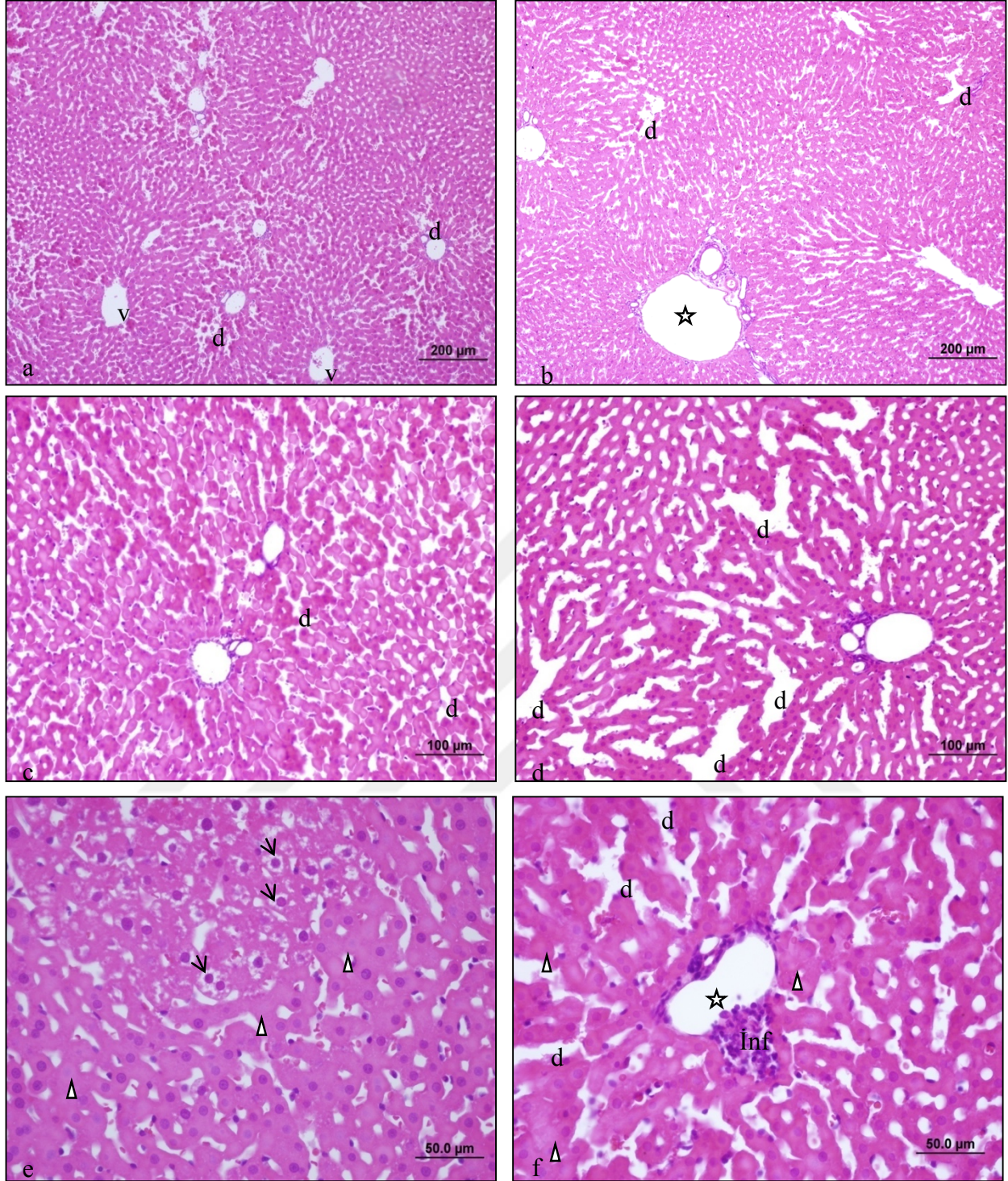


Şekil 4.3 Kontrol grubuna ait H&E kesit görüntüsü.

Normal yapıda hepatosit hücreleri (Δ), v: v. centralis, ve: venül, a: arteriol, s: safra kanalı)  
(a-d) (bar: 200µm, bar:100µm, bar: 50.0µm, (H&E )

CuO-NP grubuna ait deney hayvanlarından alınan karaciğer örneklerinin Hematoksilin Eozin boyama yapılmış preparatlarında, yapılan histopatolojik incelemelerde: CuO-NP grubunu oluşturan sıçanların karaciğerlerinde parankimal dokuda yoğun hasar gözlemlendi. Hepatosit hücrelerinde dejenerasyon, karyolizis ve bu hücrelerin ışınal dizilimlerinin tamamen bozulduğu görüldü. Ayrıca, sinüzoidal dilatasyon, portal alanda hücrel infiltrasyon ve dilate venül yapıları görüldü (Şekil 4.4) (Tablo 4.7).





Şekil 4.4 CuO-NP grubuna ait H&E kesit görüntüsü.

Hepatosit hücrelerinde dejenerasyon (→), karyolizis (Δ) ve ışınal dizilim bozukluğu. Ayrıca, sinüzoidal dilatasyon (d), portal alanda hücresel infiltrasyon (inf) ve dilate venül yapıları (☆) (v: v. centralis) (a-f). (bar: 200µm, bar:100µm, bar: 50.0µm, (H&E )

Tablo 4.7 Kontrol ve deney grubuna ait hayvanların karaciğer dokusunda gözlenen doku hasarı skorlaması (H&E).

KARACİĞER HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA	Hücrel hasar	Sinüzoidal dilatasyon	Hücrel infiltrasyon	Karyolizis	Asimetrik hücrel dizilim
K1	0	0	0	0	0
K2	0	0	1	0	0
K3	0	0	0	0	0
K4	0	1	0	0	0
K5	0	0	1	0	0
K6	0	1	0	0	0
K7	0	0	0	0	0
K8	0	0	1	0	0
CuO-NP 1	3	2	2	2	3
CuO-NP 2	2	3	3	2	3
CuO-NP 3	3	3	3	3	2
CuO-NP 4	3	3	3	2	3
CuO-NP 5	3	2	3	3	3
CuO-NP 6	2	2	3	2	2
CuO-NP 7	3	2	3	2	3
CuO-NP 8	2	3	2	2	3

Skorlamada;

Hasar yok 0

Az hasar 1

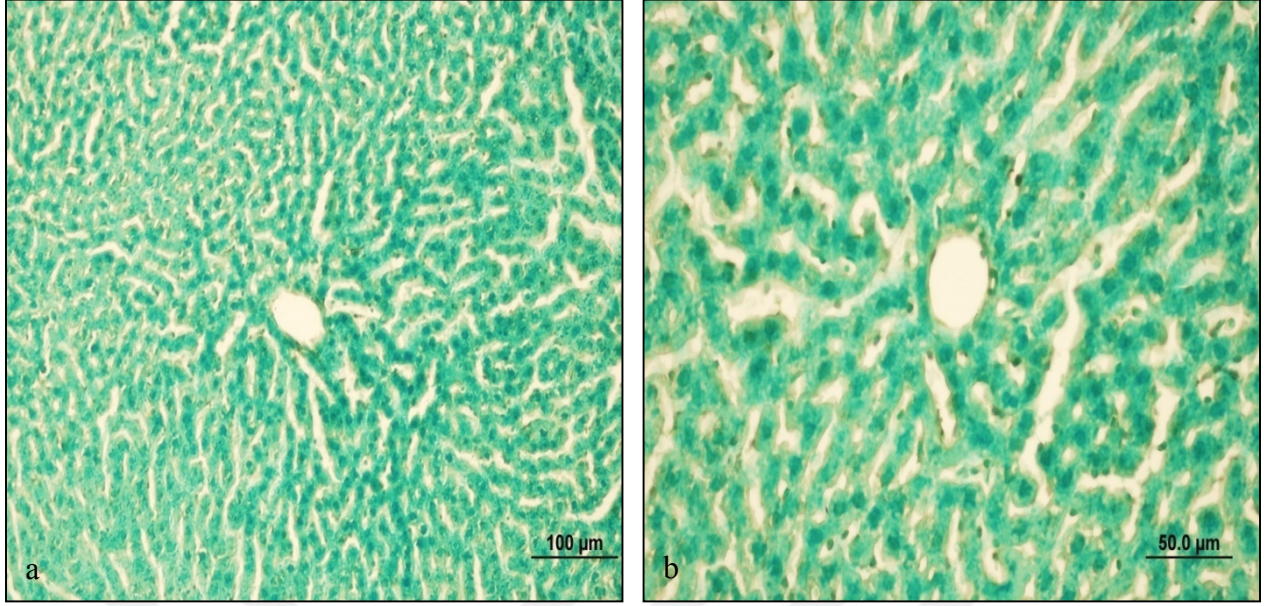
Orta hasar 2

Şiddetli hasar 3

olarak değerlendirilmiştir.

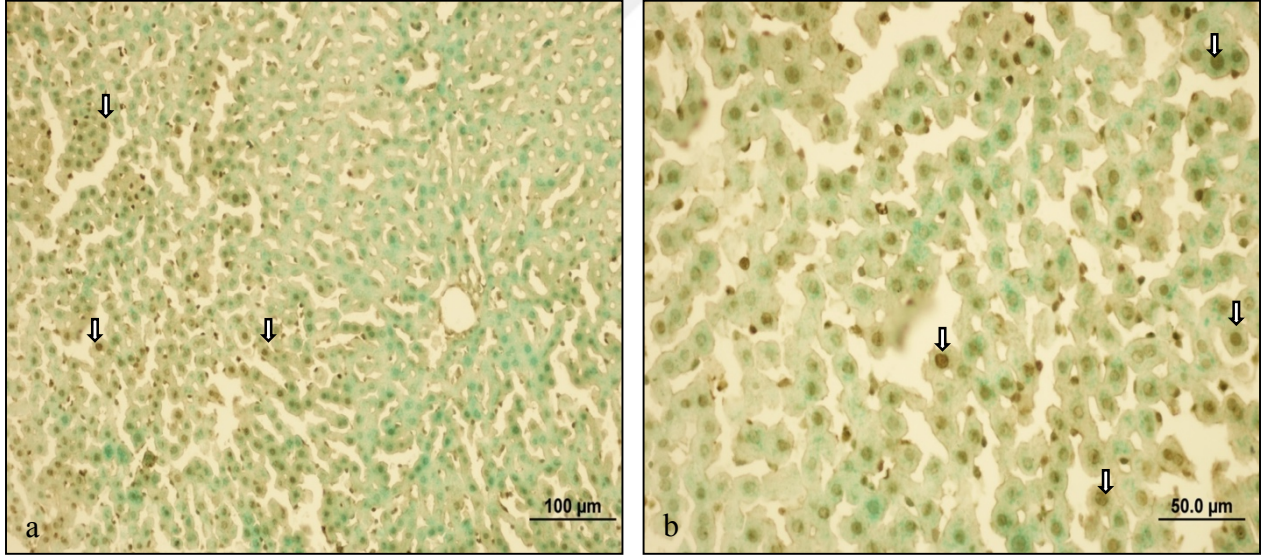
Diğer taraftan, kontrol grubuna ait hayvanlarından alınan karaciğer örneklerinin TUNEL boyama yapılmış preparatlarında yapılan ışık mikroskopik değerlendirmelerinde: kontrol grubunu oluşturan sıçan karaciğerlerinde negatif boyanma görüldü (Şekil 4.5).





Şekil 4.5 Kontrol grubu hayvanların karaciğerlerinde, TUNEL negatif boyanma. (bar:100µm, bar: 50.0µm, TUNEL,).

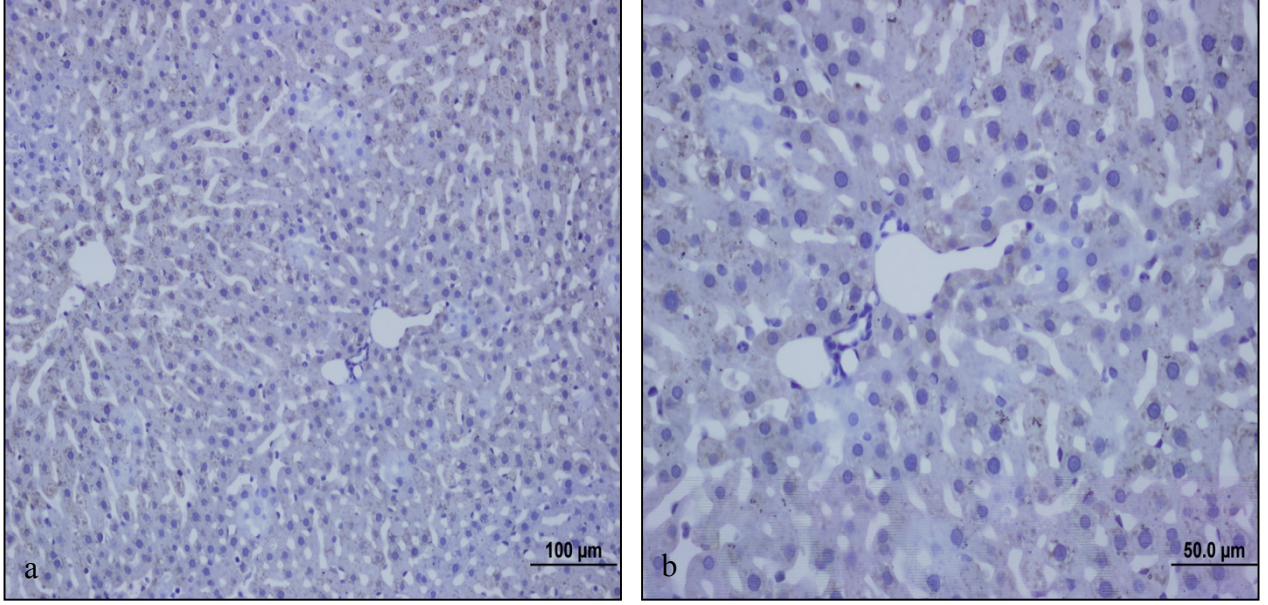
CuO-NP grubuna ait deney hayvanlarından alınan karaciğer örneklerinin TUNEL boyama yapılmış preparatlarında yapılan ışık mikroskopik değerlendirmelerinde: CuO-NP grubunu oluşturan sıçan karaciğerlerinde pozitif boyanma gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 CuO-NP grubu hayvanların karaciğerlerinde, TUNEL pozitif boyanma gösteren apoptotik hücreler (↓) (bar:100µm, bar:50.0µm, TUNEL).

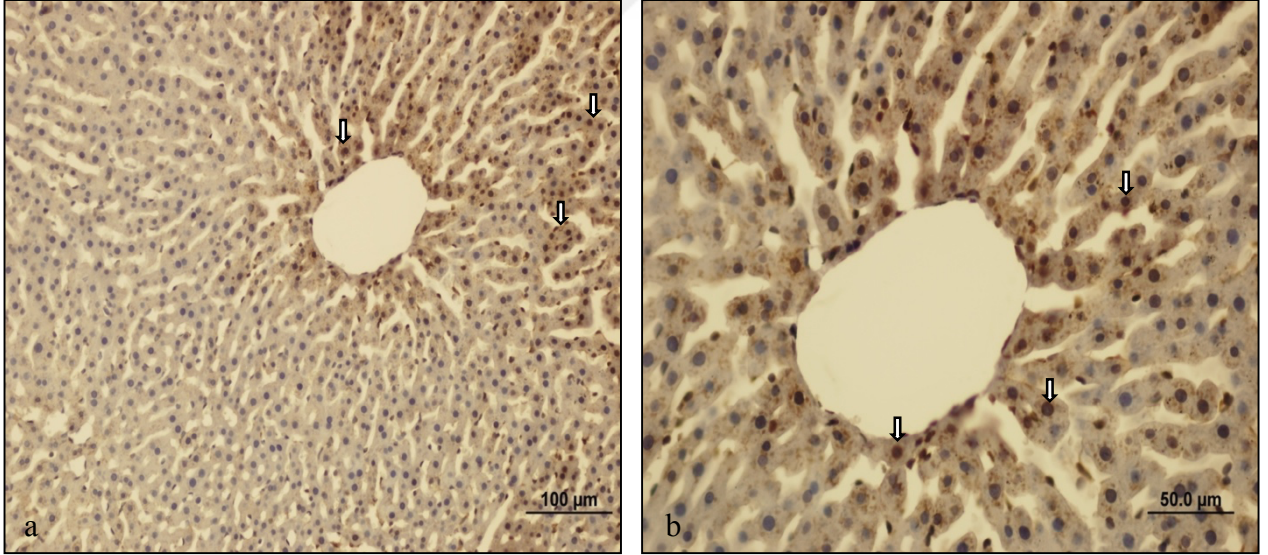
Kontrol grubuna ait hayvanlardan alınan karaciğer örneklerinin Kaspaz 3 boyama yapılmış preparatlarının yapılan ışık mikroskopik değerlendirmelerinde; kontrol grubunu oluşturan sıçanların karaciğerlerinde negatif boyanma gözlemlendi. Ayrıca bazı preparatlarda sınırlı da olsa soluk boyanma dikkat çekti (Şekil 4.7).





Şekil 4.7 Kontrol grubu hayvanların karaciğerlerinde Kaspaz-3 negatif boyanma.  
(bar:100µm, bar: 50.0µm, Kaspaz-3).

CuO-NP grubuna ait deney hayvanlarından alınan karaciğer örneklerinin Kaspaz-3 boyama yapılmış preparatların yapılan ışık mikroskopik değerlendirmelerinde: CNP grubunu oluşturan sıçan karaciğerlerinde pozitif boyanma gözlemlendi (Şekil 4.8).

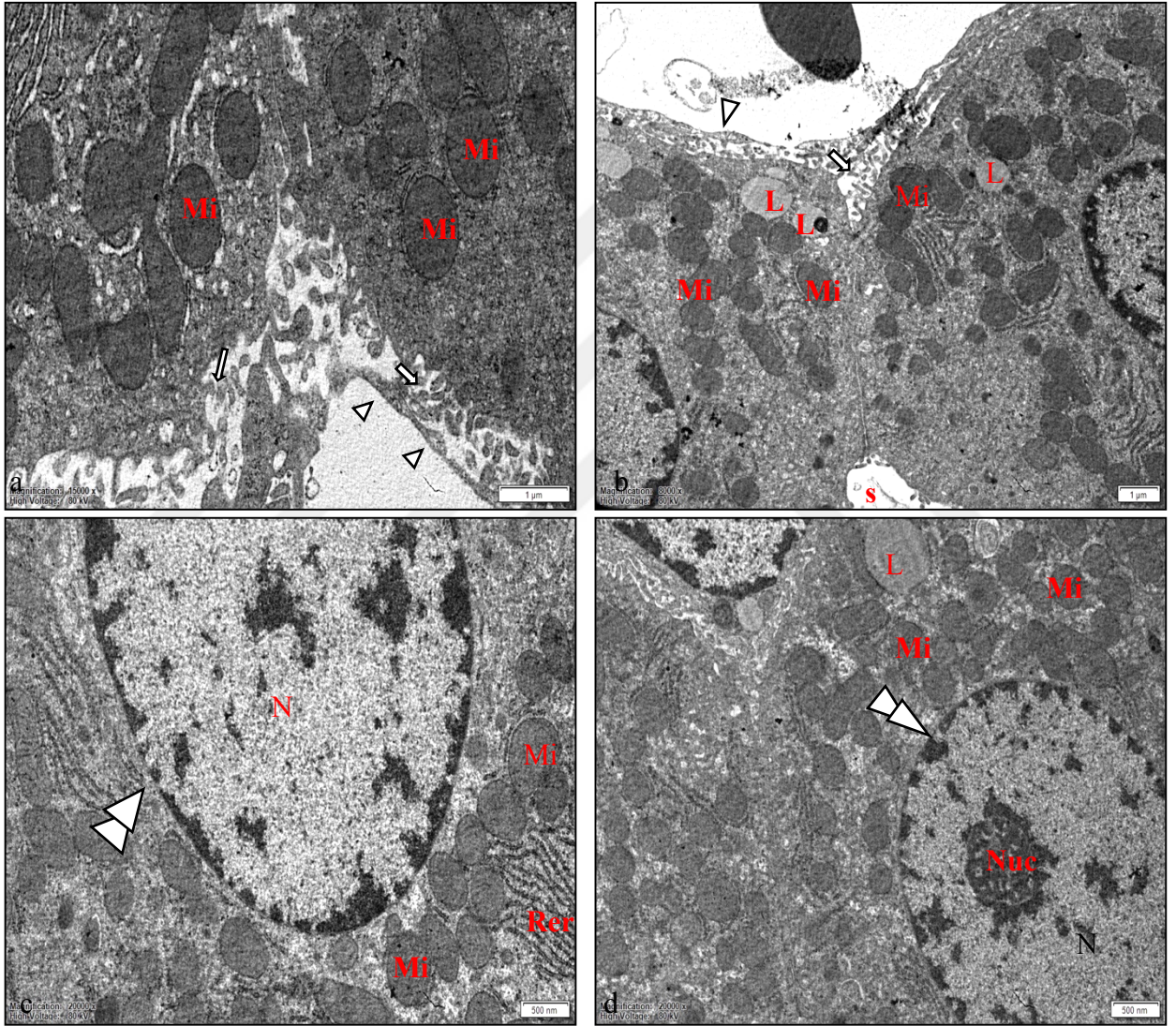


Şekil 4.8 CuO-NP grubu hayvanların karaciğerlerinde Kaspaz-3 pozitif boyanma (↓)  
(bar:100µm, bar:50.0µm, Kaspaz-3).



### 4.3.2 Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) incelemesi sonucu elde edilen bulguları

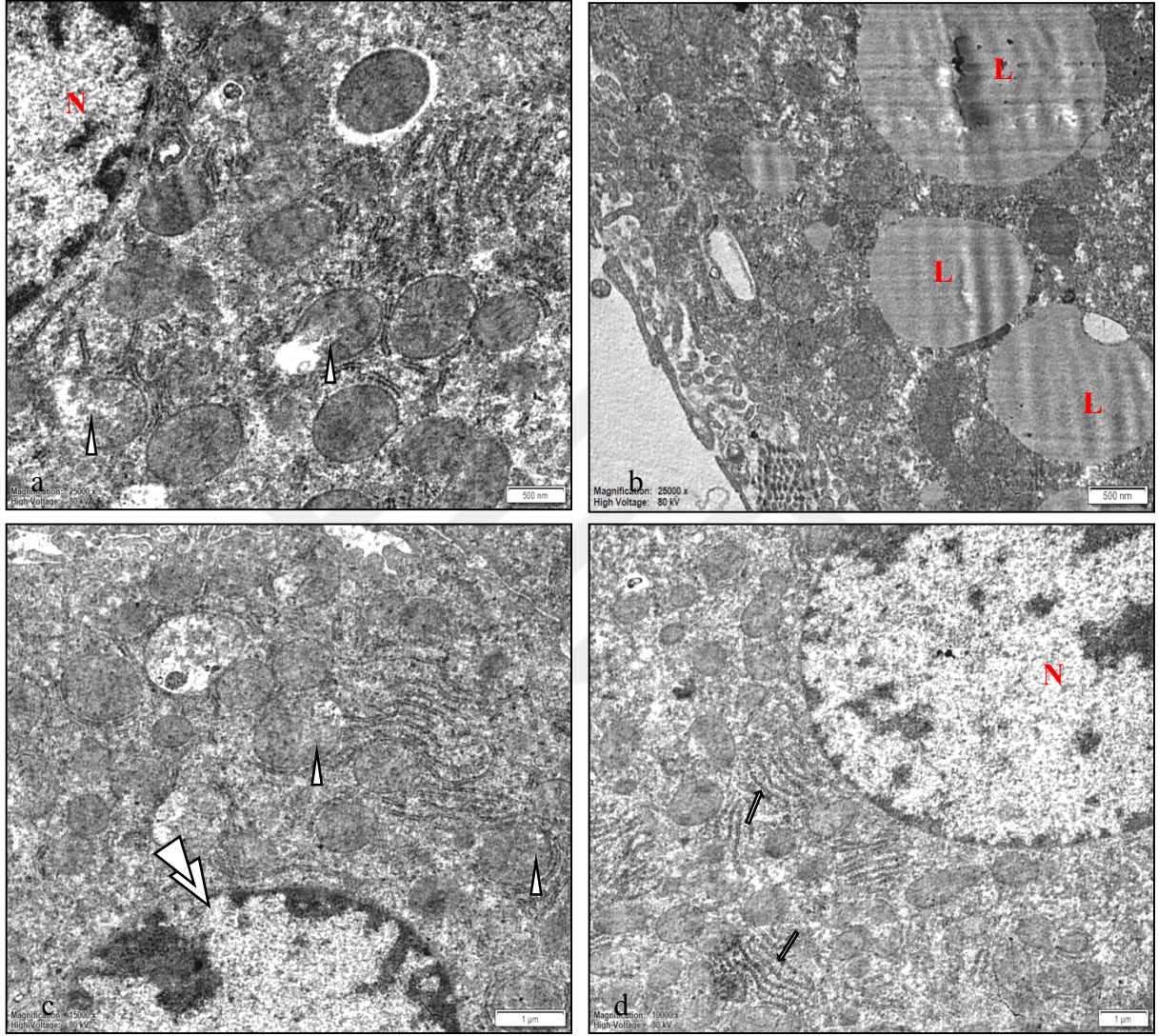
Kontrol grubu hayvanlara ait karaciğer doku örneklerinin incelemelerinde: Disse aralığında normal yapıda mikrovillus uzantıları (⇓) ve endotel hücreleri (▽), hepatositler arasındaki safra kanalikülleri (s) ile birlikte hepatositlerde normal yapıda mitokondriler (Mi), lipid damlaları (L), endoplazmik retikulum (Rer), ukromatik nükleus (N), nükleolus (Nuc) ve nükleer zar (çift okbaşı) gözlemlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Kontrol grubu: Karaciğerin transmisyon elektron mikroskobik görüntüsü. Disse aralığındaki mikrovillus uzantıları (⇓), iki hepatosit arasındaki safra kanalikülleri (s), endotel hücreleri (▽), mitokondri (Mi), lipid damlaları (L), endoplazmik retikulum (Rer), normal eukromatik yapılı nükleus (N) ve nükleolus yapısı (Nuc), düzgün nükleer zar (çift okbaşı) yapısı ile normal histolojik yapıda hepatosit hücresi gözlenmekte (kurşun sitrat, uranil asetat, bar: 500 nm, bar: 1 µm).



CuO-NP grubu hayvanlara ait karaciğer doku örneklerinin incelemelerinde: hepatositlerde, normal görünümünü yitirmiş ve kristalleri dejenere olmuş mitokondri yapıları ( $\Delta$ ), büyük lipid damlacıkları (L), dilate olmuş endoplazmik retikulum cisterna'ları ( $\Rightarrow$ ) ve bütünlüğünü kaybetmiş nükleus zarı (çift okbaşı) gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 CuO-NP grubu: Karaciğerin transmisyon elektron mikroskobik görüntüsü. Normal görünümünü yitirmiş kristalleri dejenere olmuş mitokondri yapıları ( $\Delta$ ), hepatosit hücresinde büyük lipid damlacıkları (L), dilate olmuş endoplazmik retikulum sisternaları ( $\Rightarrow$ ) ve bütünlüğünü kaybetmiş nükleer zar (çift okbaşı) yapıları dikkat çekmekte (kurşun sitrat, uranil asetat, bar: 500 nm, bar: 1  $\mu$ m).

## 4.4 Morfometrik bulgular

### 4.4.1 Karaciğer ortalama lobül alanı

Her iki gruptaki karaciğer lobül alanları çekilen fotoğraflar üzerinde Zen 2 software kullanılarak hesaplandı, gruplara ait karaciğer lobül alanları ve bunların ortalama değerleri Tablo 4.8'de verilmiştir. Bu değerler sütun grafiği olarak da Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Kontrol grubundaki ortalama karaciğer lobül alanı 373,145  $\mu\text{m}^2$  bulunurken, CuO-NP grubunda 266,85  $\mu\text{m}^2$  olarak hesaplandı. Kontrol ve CuO-NP gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı. ( $p>0.05$ ) (Tablo 4.9).

Kontrol grubundaki hayvanların ortalama lobül alanı ve CuO-NP grubundakilere göre istatistiki olarak farklı bulundu (Şekil 4.11).

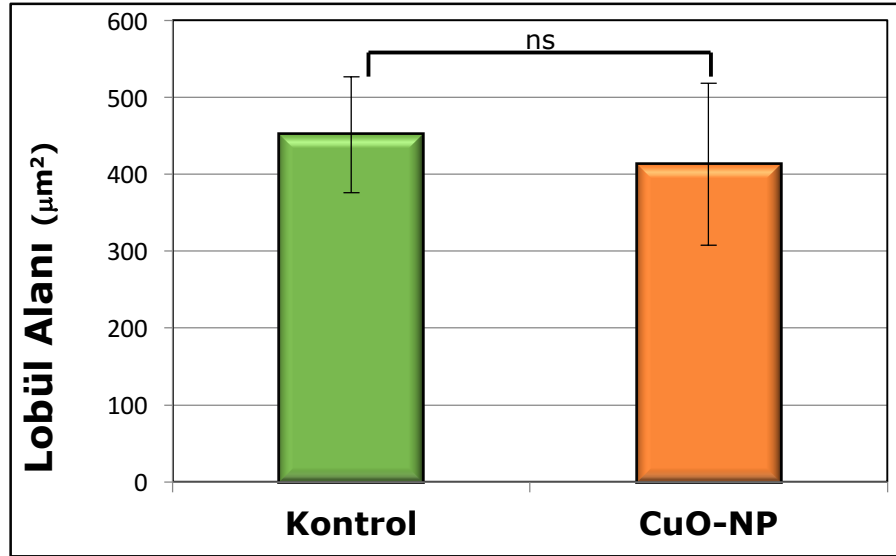
Tablo 4.8 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait ortalama karaciğer lobül alanları ve grup ortalamaları ( $\mu\text{m}^2$ ) değerler.

	<b>Kontrol</b>	<b>CuO-NP</b>
<b>1.hayvan</b>	417,09	247,55
<b>2.hayvan</b>	470,28	476,87
<b>3.hayvan</b>	563,28	478,71
<b>4.hayvan</b>	492,26	526,04
<b>5.hayvan</b>	484,85	418,43
<b>6.hayvan</b>	401,25	457,43
<b>7.hayvan</b>	329,20	286,15
<b>Grup ortalaması</b>	373,145	266,85

Tablo 4.9 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait ortalama karaciğer lobül alanının ( $\mu\text{m}^2$ ) istatistiksel değerlendirmesi.

	<b>Kontrol</b>	<b>CuO-NP</b>	<b>p değeri</b>
<b>Lobül Alanı</b>	451,17± 75,59	413,02± 105,39	p>0.05 ns

Gruplarda normal dağılım gözleendiği için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır ( $p>0.05$ ).



Şekil 4.11 Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ortalama karaciğer lobül alanlarının karşılaştırılması gösteren grafik. Grafikte verilen değerler ortalama± standart hatayı göstermektedir.

#### 4.4.2 Karaciğerde ortalama vena centralis çapı

Tüm sıçanlarda v. centralis çapları Zen 2 software programı kullanılarak ölçüldü. Buna göre kontrol ve CuO-NP grubuna ait hayvanların ortalama v. centralis çapları ve bunların grup ortalama değerleri sırasıyla Tablo 4.10 ve 4.11'de verilmiştir. Kontrol grubu sıçanlarının karaciğerlerinde ortalama v. centralis çapı 70,69 µm olarak bulunurken, CuO-NP grubunda bu değer 61,75 µm olarak hesaplandı. İstatistiksel bakımdan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ )(tablo 4.12 ,Şekil 4.12).

Tablo 4.10 Kontrol grubu hayvanlarına ait karaciğerdeki ortalama v. centralis çapları (µm).

	Vena centralis çapları
1.hayvan	95,08
2. hayvan	46,69
3. hayvan	61,95
4. hayvan	68.69
5. hayvan	96,55
6. hayvan	97,58
7.hayvan	94,67
Ortalama	70,69

Tablo 4.11 CuO-NP grubu hayvanlarına ait karaciğerdeki ortalama v. centralis çapları ( $\mu\text{m}$ ).

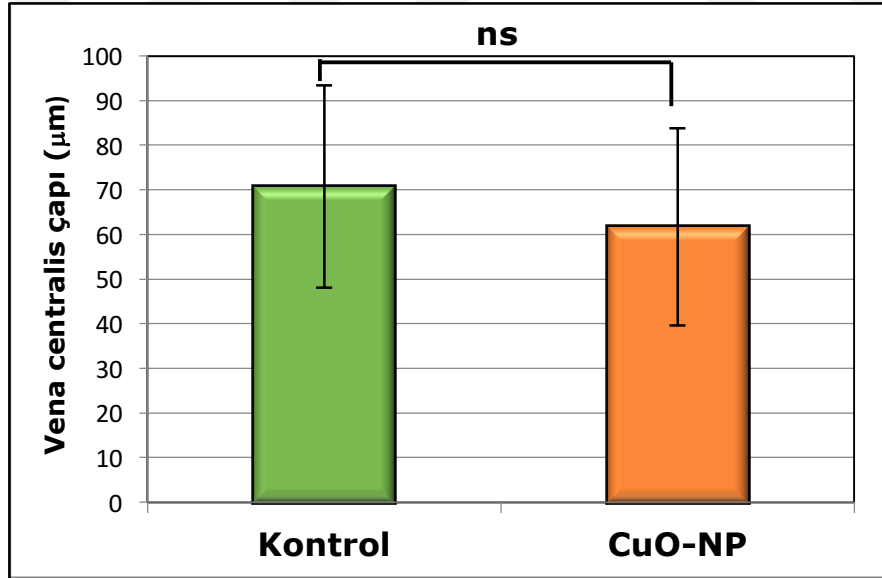
	Vena centralis çapları
1.hayvan	54,19
2. hayvan	67,19
3. hayvan	85,93
4. hayvan	81,67
5. hayvan	125,18
6. hayvan	63,17
7.hayvan	65,8
Ortalama	61,75

Tablo 4.12 Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait ortalama v. centralis çaplarının ( $\mu\text{m}$ ) istatistiksel değerlendirilmesi.

	Kontrol	CuO-NP	p değeri*
Ortalama v.centralis çapı	81.68 (50.50- 96.18)	68.25(63.83- 84.86)	$p > 0.05$ ns

Gruplardaki veriler normal dağılım göstermediğinden median (%25-%75) olarak verilmiştir.

\*Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır ( $p > 0.05$ ).



Şekil 4.12 Kontrol ve deney grubu hayvanlarının karaciğerlerinde, ortalama v. centralis çaplarının karşılaştırılması gösteren grafik. Grafikte verilen değerler ortalama  $\pm$  standart hatayı göstermektedir.

#### 4.4.3 Sinüzoid / karaciğer dokusu oranı ( $V_v$ )

Kontrol ve CuO-NP grubu sıçanlara ait sinüzoid / karaciğer parankimi oranları (Volume fraction) ( $V_v$ ) ve bunların ortalama değerleri sırasıyla Tablo 4.13 ve Tablo 4.14'de verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama sinüzoid/karaciğer parankimi oranı 0.23 olarak bulunurken, CuO-NP grubunda 0.37 olarak hesaplandı. İstatistiki bakımdan, grupların değerleri arasında ileri düzeyde fark bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo 4.15). CuO-NP grubunda kontrol grupla kıyaslandığında sinüzoidlerde bariz bir genişleme gözlemlenmiştir. Bu grupların ortalamaları arasındaki fark Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

Tablo 4.13 Kontrol grubundaki sinüzoid / karaciğer dokusu oranı.

Örnekleme alanı	1.Sıçan	2.Sıçan	3.Sıçan	4.Sıçan	5.Sıçan	6.Sıçan	7.Sıçan	
<b>1</b>	0,16	0,16	0,22	0,27	0,22	0,33	0,22	
<b>2</b>	0,14	0,31	0,24	0,24	0,24	0,27	0,20	
<b>3</b>	0,10	0,29	0,20	0,22	0,29	0,22	0,33	
<b>4</b>	0,12	0,18	0,18	0,20	0,18	0,24	0,16	
<b>5</b>	0,16	0,20	0,18	0,18	0,16	0,18	0,22	
<b>6</b>	0,14	0,18	0,16	0,22	0,20	0,20	0,24	
<b>7</b>	0,18	0,22	0,22	0,20	0,22	0,22	0,27	
<b>8</b>	0,24	0,24	0,29	0,29	0,27	0,20	0,20	
<b>9</b>	0,20	0,20	0,22	0,24	0,29	0,24	0,18	grup ORT
<b>10</b>	0,14	0,33	0,20	0,27	0,24	0,31	0,18	
<b>ORT</b>	<b>0,16</b>	<b>0,16</b>	<b>0,22</b>	<b>0,27</b>	<b>0,22</b>	<b>0,33</b>	<b>0,22</b>	<b>0.23</b>

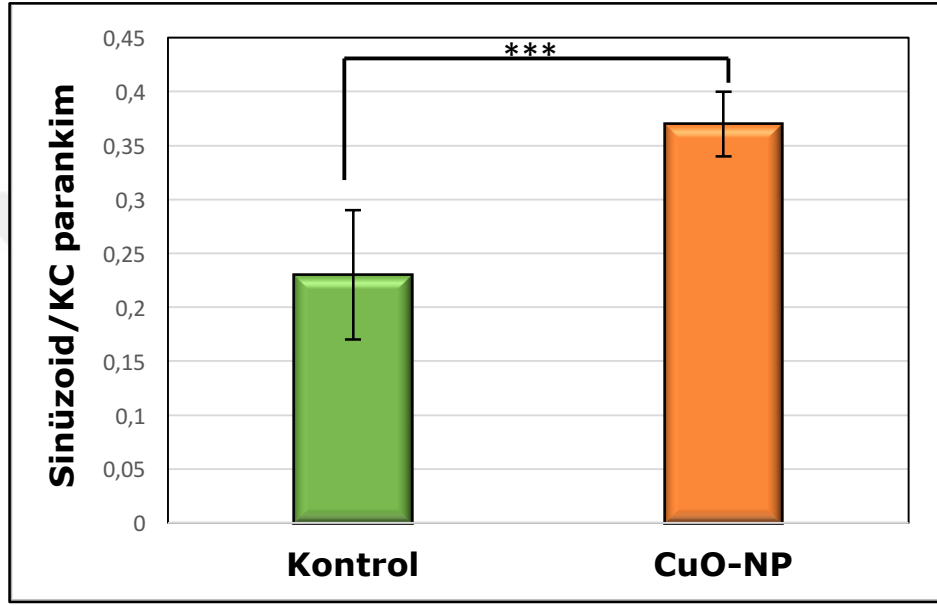
Tablo 4.14 CuO-NP grubundaki sinüzoid / karaciğer dokusu oranı.

Örnekleme alanı	1.Sıçan	2.Sıçan	3.Sıçan	4.Sıçan	5.Sıçan	6.Sıçan	7.Sıçan	
<b>1</b>	0,33	0,39	0,41	0,35	0,33	0,37	0,39	
<b>2</b>	0,31	0,33	0,39	0,47	0,41	0,33	0,41	
<b>3</b>	0,33	0,29	0,43	0,43	0,39	0,35	0,39	
<b>4</b>	0,29	0,39	0,37	0,41	0,51	0,43	0,39	
<b>5</b>	0,35	0,41	0,33	0,39	0,47	0,41	0,39	
<b>6</b>	0,37	0,37	0,51	0,37	0,49	0,47	0,37	
<b>7</b>	0,27	0,43	0,43	0,35	0,57	0,39	0,35	
<b>8</b>	0,33	0,39	0,39	0,43	0,33	0,53	0,39	
<b>9</b>	0,29	0,29	0,37	0,45	0,29	0,41	0,43	grup ORT
<b>10</b>	0,41	0,33	0,43	0,39	0,39	0,33	0,45	
<b>ORT</b>	<b>0,33</b>	<b>0,39</b>	<b>0,41</b>	<b>0,35</b>	<b>0,33</b>	<b>0,37</b>	<b>0,39</b>	<b>0.37</b>

Tablo 4.15 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarına ait sinüzoid / karaciğer dokusu oranının istatistiksel değerlendirmesi.

	<b>Kontrol</b>	<b>CuO-NP</b>	<b>p değeri</b>
<b>Sinüzoid / KC parankim</b>	0.23 ± 0.06	0.37 ± 0.03	p<0.001

Gruplarda normal dağılım gözlemlendiği için ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.  
\* Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.



Şekil 4.13 Kontrol ve CuO-NP gruplarının sinüzoid / karaciğer dokusu oranını gösteren grafik. Grafikte verilen değerler ortalama ± standart hatayı göstermektedir.

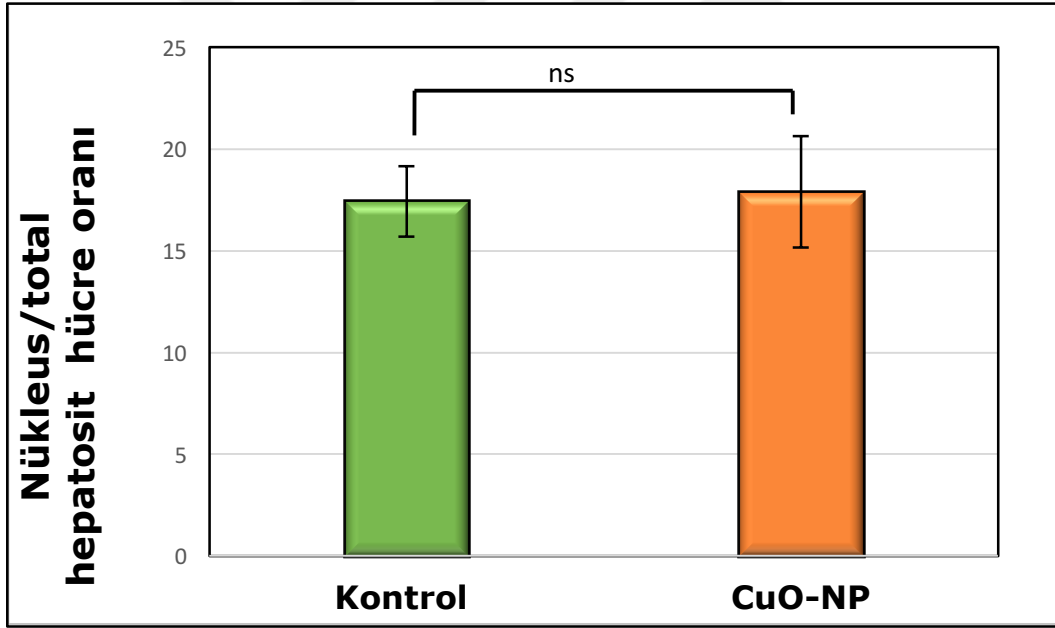
#### 4.4.4 Nükleus/hepatosit hücre gövdesi oranı ( $V_v$ )

Tüm sıçanlarda TEM 'de çekilen fotoğraflar üzerinde sistematik random sampling yoluyla nokta sayım metodu kullanarak nükleus/hepatosit hücre gövdesi oranı hesaplandı. Buna göre: kontrol ve CuO-NP gruplarına ait karaciğerlerde nükleus/hepatosit hücre gövdesi oranları sırasıyla Tablo 4.16'de verilmiştir. İstatistiksel bakımdan gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ )(Şekil 4.14).

Tablo 4.16 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanların karaciğerlerinde nükleus/ hepatosit hücre gövdesi oranlarının istatistiksel değerlendirmesi

	Kontrol	CuO-NP	p değeri
<b>Nükleus/total hepatosit hücre oranı</b>	17,43 ± 1,73	17,89 ± 2,73	$p>0.05$ ns

Gruplarda normal dağılım gözlemlendiği için ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.14 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarının karaciğerlerinde nükleus/ hepatosit hücre gövdesi oranını gösteren grafik.

#### 4.4.5 Mitokondri/Sitoplazma oranı (V<sub>v</sub>)

Kontrol ve CuO-NP grubu tüm sıçanların karaciğerlerinde hepatositler içerisinde; mitokondri/Sitoplazma oranları Buna göre kontrol, CuO-NP grubuna ait sıçanlarda mitokondri/Sitoplazma oranları ve bunların ortalama değerleri Tablo 4.17'de verilmiştir. Kontrol grubunda bu oran 0.30 olarak bulunurken, CuO-NP grubunda 0.22 olarak hesaplandı. Gruplar arasında istatistiksel bakımdan anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ) (Tablo 4.18). CuO-NP grubunda, hepatositler içerisinde, mitokondri/Sitoplazma oranlarının kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi.

Tablo 4.17 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarında hepatositlerdeki Mitokondri/Sitoplazma oranları.

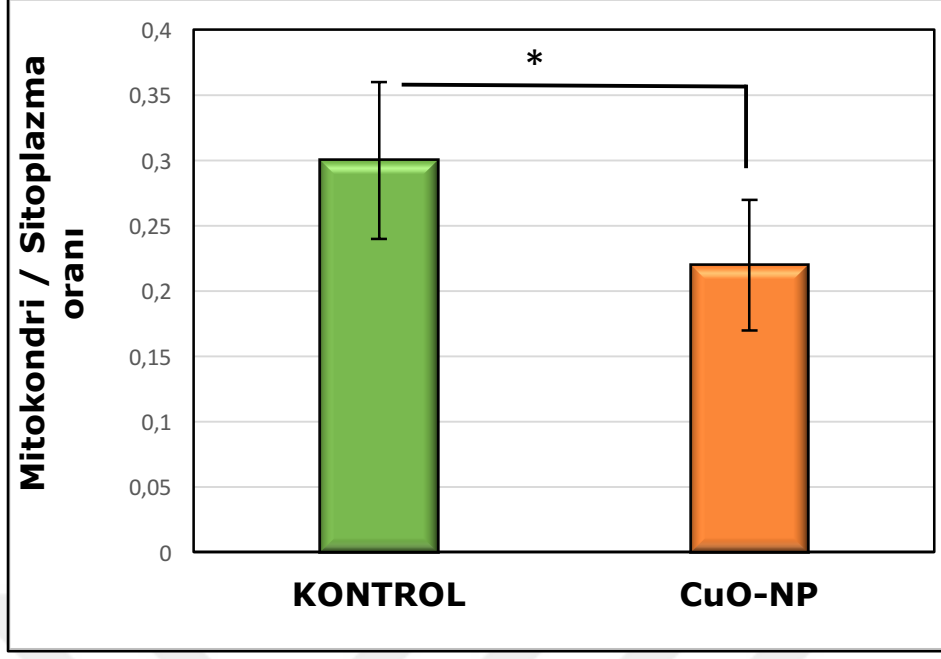
	<b>Kontrol</b>	<b>CuO-NP</b>
<b>1.hayvan</b>	0,28	0,2
<b>2.hayvan</b>	0,2	0,28
<b>3.hayvan</b>	0,32	0,16
<b>4.hayvan</b>	0,4	0,16
<b>5.hayvan</b>	0,28	0,22
<b>6.hayvan</b>	0,32	0,24
<b>7.hayvan</b>	0,3	0,28
<b>Grup ortalaması</b>	0,3	0,22

Tablo 4.18 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanlarında hepatositlerdeki Mitokondri/Sitoplazma oranlarının istatistiksel değerlendirmesi.

	<b>Kontrol</b>	<b>CuO-NP</b>	<b>p değeri</b>
<b>Mitokondri / Sitoplazma</b>	0.3 ± 0.06	0.22 ± 0.05	$p < 0.05$

Gruplarda normal dağılım gözlemlendiği için ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.  
\* Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.





Şekil 4.15 Kontrol ve CuO-NP gruplarının Mitokondri / Sitoplazma oranı gösteren grafik. Grafikte verilen değerler ortalama  $\pm$  standart hatayı göstermektedir ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.4.6 Birim alana düşen mitokondri sayısı ( $N_a$ )

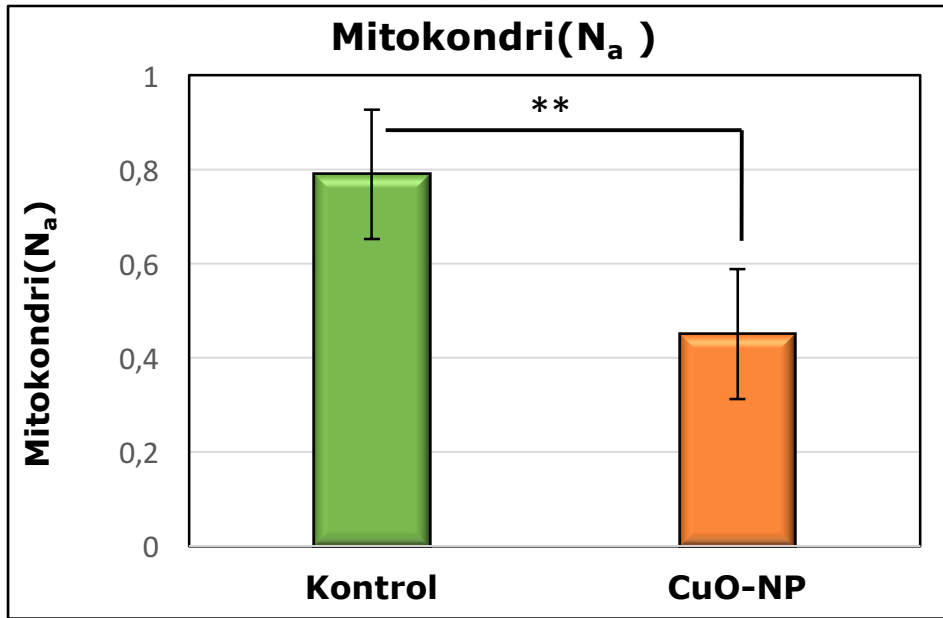
Tüm sıçanlarda birim alana düşen mitokondri sayısı, Number in area metoduna göre hesaplandı. Buna göre Kontrol, CuO-NP grubuna ait birim alandaki ( $\mu\text{m}^2$ ) mitokondri sayısı ve bunların ortalama değerleri hesaplandı. CuO-NP grubu sıçanlarının karaciğerlerinde birim alana düşen mitokondri sayısı ( $N_a$ ) kontrol grubu sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde önemli derecede azaldı ( $p < 0.01$ ). Kontrol grubunda bu değer 0,84 olarak bulunurken, CuO-NP grubunda 0,43 olarak hesaplandı (Tablo 4.19, Şekil 4.16).

Tablo 4.19 Kontrol ve CuO-NP grubu hayvanların hepatositlerinde birim alana düşen mitokondri sayılarının ( $N_a$ ) istatistiksel değerlendirilmesi.

	Kontrol	CuO-NP	p değeri
<b>Mitokondri (<math>N_a</math>)</b>	0,84 (0,66- 0,90)	0,43(0,36- 0,55)	$p < 0.01$

Gruplardaki veriler normal dağılım göstermediğinden median (%25-%75) olarak verilmiştir.

\*Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.



Şekil 4.16 Kontrol ve deney grubu hayvanlarının karaciğerlerinde birim alana düşen mitokondri sayısını ( $N_a$ ) gösteren grafik.

## 4.5 Biyokimyasal Analiz Bulgular

### 4.5.1 Sıçan serumundan ölçülen markerlerin bulguları

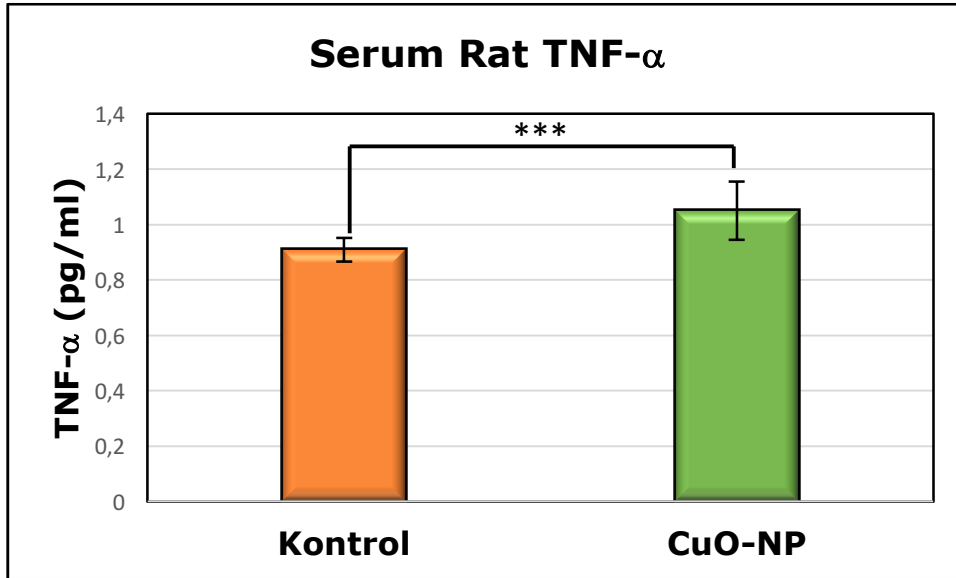
#### 4.5.1.1 Tümör nekroz faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) düzeyi bulguları

Çalışmamızdaki Serum TNF- $\alpha$  değerleri ve bunların istatistiksel analizleri Tablo 4.20’ de verilmiştir. CuO-NP grubu hayvanların serumlarında TNF- $\alpha$  düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olarak fazla bulundu ( $p < 0,001$ ), (Tablo 4.20 ve Şekil 4.17).

Tablo 4.20 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum TNF- $\alpha$  düzeyi

Gruplar	N	TNF- $\alpha$ (pg/ml) ortalama $\pm$ standart sapma	p değeri
Kontrol	9	0,91 $\pm$ 0,04	p<0,001
CuO-NP	9	1,05 $\pm$ 0,11	

Gruplarda normal dağılım gözleendiği için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  
\* Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.



Şekil 4.17 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum TNF- $\alpha$  düzeyleri

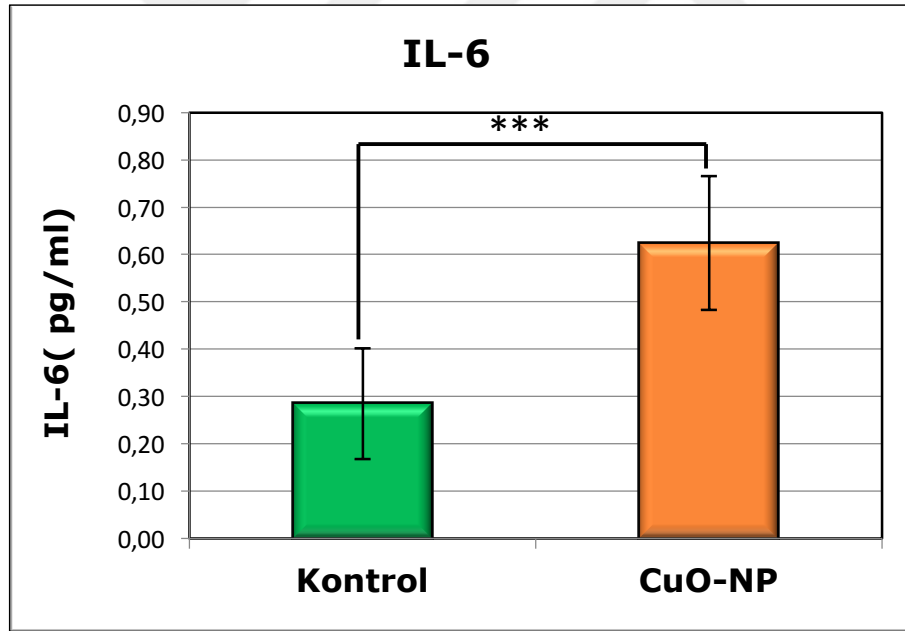
#### 4.5.1.2 İnterlökin-6 (IL-6) düzeyi bulguları

Çalışmamızda Serum IL-6 düzeyi ölçüldü ve bu değerlerin istatistiksel analizleri Tablo 4.21’ de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın Serumunda IL-6 düzeyi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; kontrol grupları ile CuO-NP grupları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde fark bulundu ( $p < 0,001^{***}$ ) (Tablo 4.21 ve Şekil 4.18).

Tablo 4.21 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum IL-6 düzeyi.

Gruplar	N	IL-6 (pg/mL) ortalama $\pm$ standart sapma	p değeri
Kontrol	9	0,28 $\pm$ 0,12	p<0,001
CuO-NP	9	0,61 $\pm$ 0,14	

Gruplarda normal dağılım gözleendiği için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  
\* Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.



Şekil 4.18 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum IL-6 düzeyi

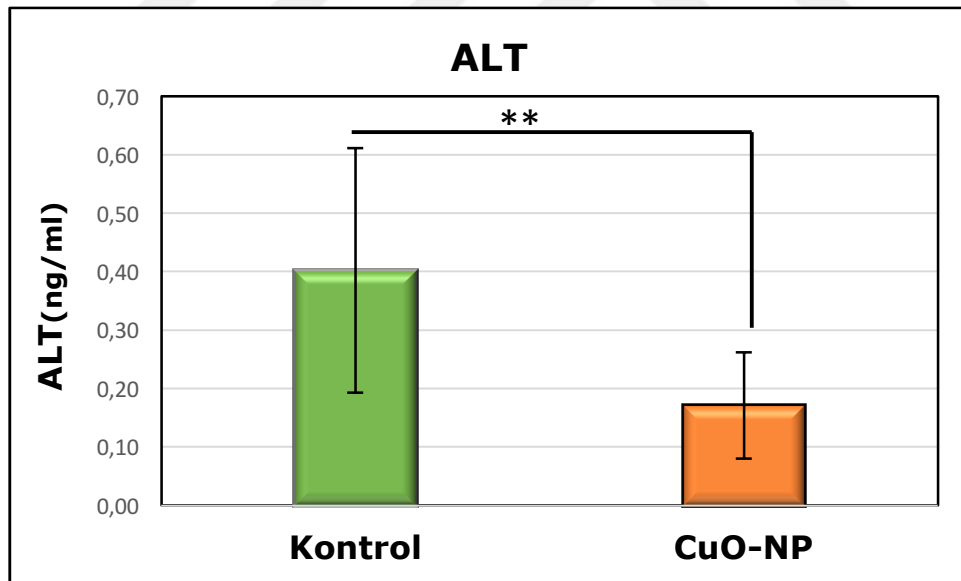
#### 4.5.1.3 Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyini bulguları

Çalışmamızdaki Serum ALT değerleri ve bunların istatistiksel analizleri Tablo 4.22' de verilmiştir. CuO-NP grubu hayvanların serumlarında ALT düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde az bulundu ( $p < 0,01$ ), (Tablo 4.22 ve Şekil 4.19).

Tablo 4.22 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum ALT düzeyi.

Gruplar	N	ALT (ng/ml) ortalama $\pm$ standart sapma	p değeri
Kontrol	9	0,40 $\pm$ 0,21	$p < 0,01$
CuO-NP	9	0,17 $\pm$ 0,09	

Gruplarda normal dağılım gözleendiği için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  
\* Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.



Şekil 4.19 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum ALT düzeyleri

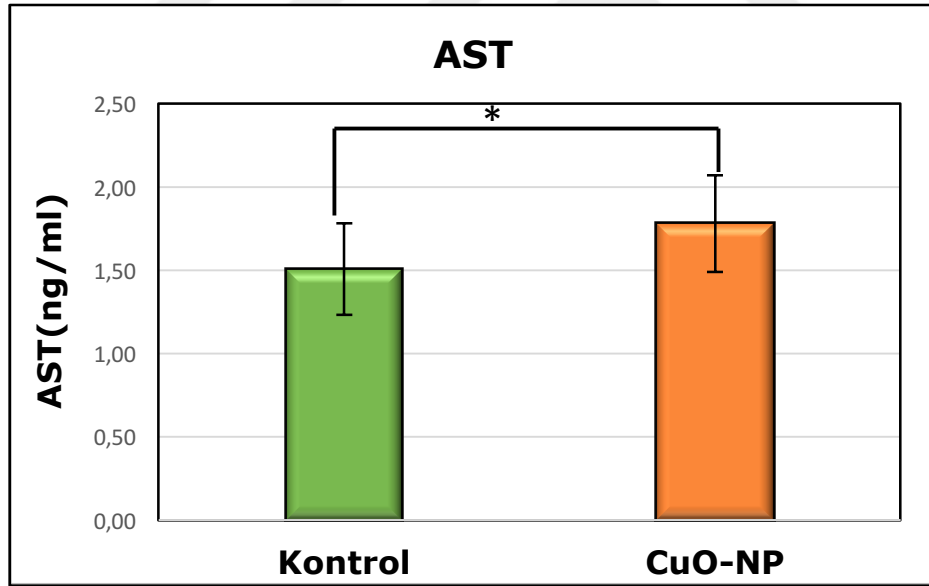
#### 4.5.1.4 Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyi bulguları

Çalışmamızdaki Serum AST değerleri ve bunların istatistiksel analizleri Tablo 4.23' de verilmiştir. CuO-NP grubu hayvanlarının serumlarında AST düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulundu ( $p < 0,05$ ). (Tablo 4.23 ve Şekil 4.20).

Tablo 4.23 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum AST düzeyi.

Gruplar	N	AST (ng/ml) ortalama $\pm$ standart sapma	p değeri
Kontrol	9	1,51 $\pm$ 0,27	$p < 0,05$
CuO-NP	9	1,78 $\pm$ 0,29	

Grumlarda normal dağılım gözleendiği için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  
\* Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.



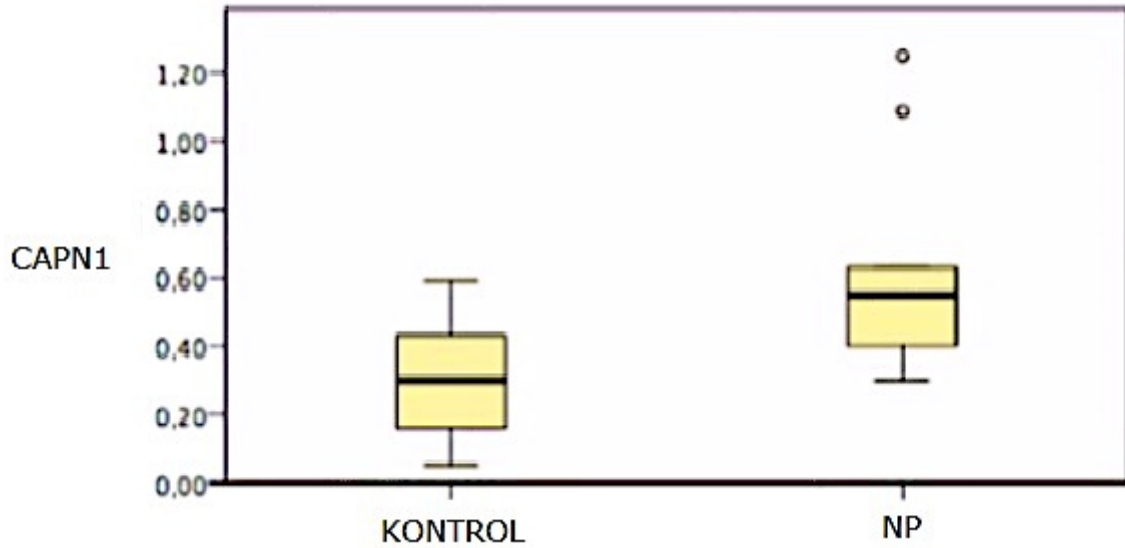
Şekil 4.20 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum AST düzeyleri

#### 4.5.1.5 Kalpain (CAPN1) aktivitesi düzeyi bulguları

Çalışmamızdaki Serum CAPN1 değerleri ve bunların istatistiksel analizleri Tablo 4.24' de verilmiştir. CuO-NP grubu hayvanlarının serumlarında CAPN1 düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ). (Tablo 4.24 ve Şekil 4.21).

Tablo 4.24 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum CAPN1 düzeyi.

Gruplar	N	CAPN1 (ng/mg protein) Ortanca (%25-%75)	p değeri
Kontrol	9	0,30 (0,13-0,46)	$p < 0,05$
CuO-NP	9	0,55 (0,36-0,86)	



Şekil 4.21 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki serum CAPN1 düzeyi

## 4.5.2 Doku homojenatin'dan ölçülen biyokimyasal markerlerin bulguları

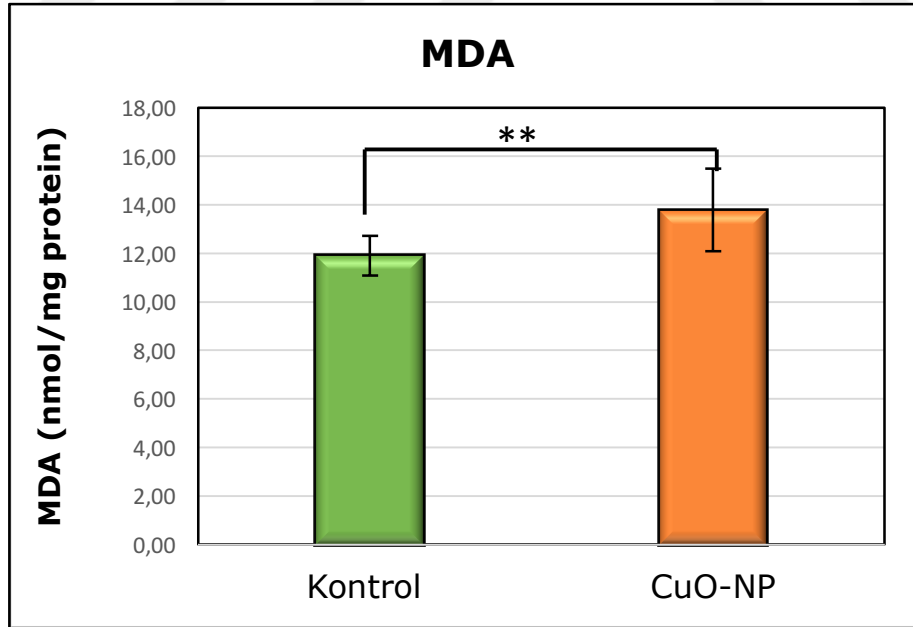
### 4.5.2.1 Malondialdehid (MDA) düzeyi bulguları

Çalışmamızdaki karaciğer dokusunda MDA değerleri ve bunların istatistiksel analizleri Tablo 4.25' de verilmiştir. CuO-NP grubu hayvanlarının karaciğer dokusunda MDA düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok anlamlı düzeyde fazla bulundu ( $p < 0,01$ ). (Tablo 4.25 ve Şekil 4.22).

Tablo 4.25 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda MDA düzeyleri.

Gruplar	N	MDA (nmol/mg protein) ortalama $\pm$ standart sapma	p değeri
Kontrol	9	11,90 $\pm$ 0,81	$p < 0,01$
CuO-NP	9	13,79 $\pm$ 1,71	

Gruplarda normal dağılım gözleendiği için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  
\* Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.



Şekil 4.22 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda MDA düzeyleri



#### 4.5.2.2 Nitrik oksit (NO) düzeyi bulguları

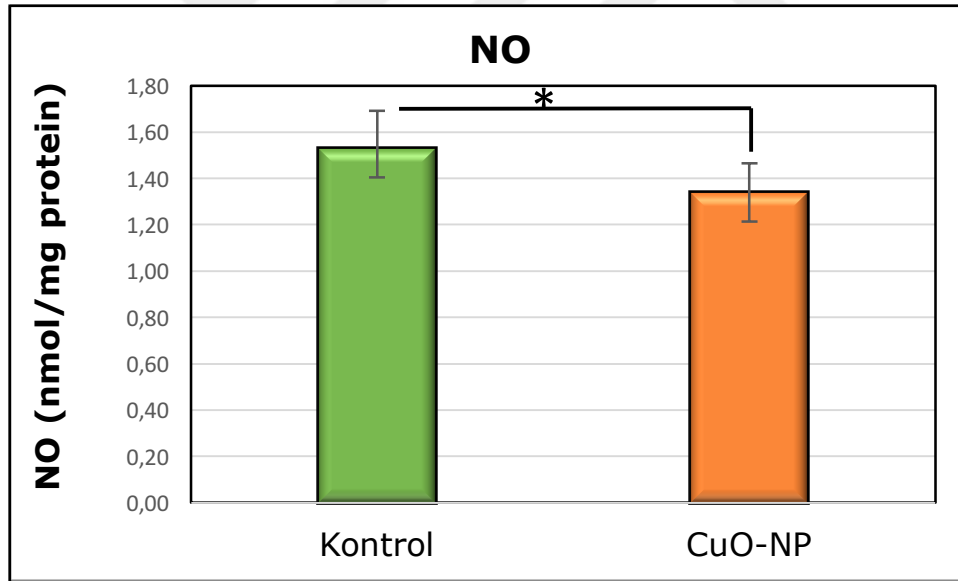
Çalışmamızdaki karaciğer dokusunda NO değerleri ve bunların istatistiksel analizleri Tablo 4.26' de verilmiştir. CuO-NP grubu hayvanlarının karaciğer dokusunda NO düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede az bulundu ( $p < 0,05$ ). (Tablo 4.26 ve Şekil 4.23).

Tablo 4.26 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda NO düzeyleri.

Gruplar	N	NO (nmol/mg protein) ortalama $\pm$ standart sapma	p değeri
Kontrol	9	1,53 $\pm$ 0,16	$p < 0,05$
CuO-NP	9	1,34 $\pm$ 0,13	

Gruplarda normal dağılım gözleendiği için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

\* Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.



Şekil 4.23 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda NO düzeyleri

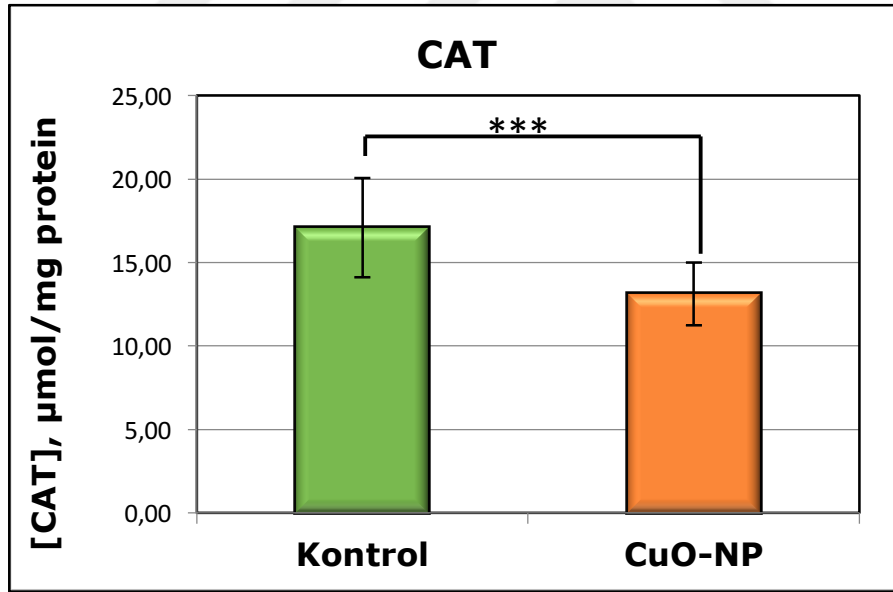
#### 4.5.2.3 Katalaz (CAT) düzeyi bulguları

Çalışmamızdaki karaciğer dokusunda CAT değerleri ve bunların istatistiksel analizleri Tablo 4.27’ de verilmiştir. CuO-NP grubu hayvanların karaciğer dokusunda CAT düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olarak az bulundu ( $p < 0,001$ ). (Tablo 4.27 ve Şekil 4.24)

Tablo 4.27 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda CAT düzeyleri.

Gruplar	N	CAT ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) ortalama $\pm$ standart sapma	p değeri
Kontrol	9	17,09 $\pm$ 2,98	$p < 0,001$
CuO-NP	9	13,12 $\pm$ 1,89	

Gruplarda normal dağılım gözleendiği için ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  
\* Grupları kıyaslamak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.



Şekil 4.24 Kontrol ve deney grubu hayvanlarındaki karaciğer dokusunda CAT düzeyleri

## 5 TARTIŞMA

Karaciğer vücutta yerleşen en büyük bez olup 500'den fazla hayati fonksiyonu yerine getirir (Naruse, Tang ve Makuuchi, 2007). Glikojenez, plazma proteinleri, pıhtılaşma faktörleri ve üre gibi kan akışında salınan ürünlerin sentezinde yer alır. Aminoasitlerin kan seviyelerini düzenler, Karaciğer parankimi, glikojen, yağ ve yağda çözünen vitaminler gibi birçok ürün için bir saklama organı olarak hizmet eder. Bağırsaklara atılan safra adı verilen bir maddenin üretiminde de yer alır (Singh, Bhat ve Sharma, 2011). Karaciğer gastrointestinal sistemdeki konumu nedeniyle birçok yabancı maddenin metabolizmasından sorumludur ve ilaç toksisitesi için hedef organdır (Eren, Temizel ve Koçak, 2004). Hepatotoksite, farklı maddelerin etkisinden sonra karaciğerin işlev bozukluğu veya karaciğer hasarını ifade eder (Navarro ve Senior, 2006). Karaciğer hasarına neden olan kimyasallara hepatotoksin adı verilir. Hepatotoksikler, klinik önemi olan eksojen bileşiklerdir ve bazı tıbbi ilaçların, endüstriyel kimyasalların, doğal kimyasalların, bitkisel ilaçların ve besin takviyelerinin aşırı dozlarını içerebilir (Singh vd., 2011). Hepatotoksinler karaciğerde biyokimyasal olaylar ile safra ve idrardan atılmalarını mümkün kılan hidrofilik yapıyı kazanırlar. Biyotransformasyondan sorumlu ana organ olması karaciğeri aynı zamanda ilaç toksisitesinin hedefi haline getirir. Enzim sisteminin genetik polimorfizmi, yaş, cinsiyet farklılıkları, enfeksiyonlar, bazı hastalıklara eşlik eden karaciğer hastalıkları ve birlikte kullanılan ilaçlar gibi nedenlerle aynı ilaca, eşit farmakolojik dozda verilmesine rağmen, kişiler farklı reaksiyon verebilirler (Eren vd., 2004).

Bakır oksit nanopartikülü gıda, kozmetik, elektrik pilleri ve birçok sektörde kullanılan elementlerden biridir. Nanopartiküllerin vücuda girişi solunum, ağız ve deri yüzeyinden emilim ile kolaylıkla gerçekleşmektedir. Küçük boyutları sayesinde vücut içerisinde kolaylıkla hareket edebilmekte ve hücre içerisine kolaylıkla girebilmektedirler. Bu yollarla iç organlara ulaşan nanopartiküller tehlikeli reaksiyonları başlatabilir. Bu hasarları ortaya koyabilmek adına birçok araştırmacı deney hayvanları üzerinde bu maddelerin farklı organlar (akciğer, karaciğer, kalp, beyin, böbrek, dalak ve deri) üzerinde bıraktıkları hasarı araştırmış ve hala da araştırmaktadırlar (Alarifi vd., 2013; Chen vd., 2006; Elsaesser ve Howard, 2012; Yokohira vd., 2009; Zhang vd., 2016).

Hussain ve arkadaşlarının sıçan karaciğerinden elde edilen BRL 3A hücre hattında hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, farklı metal nanopartiküller denemişler ve elde ettikleri sonuçlara göre metal oksit nanopartiküllerin diğer metal nanopartiküllerle kıyasla karaciğer hücresi üzerinde daha da çok toksik etki bıraktığını ortaya koymuşlardır (Hussain, Hess, Gearhart, Geiss ve Schlager, 2005). Studer ve arkadaşların göre, bir nanopartikülün sitotoksite etkisi, hücre içi çözünürlüğüne bağlıdır ve hücre kültüründe yaptıkları bu çalışmanın sonucuna göre, aynı hücre üzerinde karbon ile kaplanmış bakır nanopartikülü ve bakır oksit nanopartiküllerinin

hasarları karşılaştırıldığında, CuO-NP nanopartikülünün çok yüksek derecede sitotoksikite gösterdiği saptanmıştır (Studer vd., 2010).

Bakır oksit nanopartikülü ucuz olması ve üretimi diğer nanopartiküllere oranla daha kolay olması nedeni ile en çok kullanılan bir nanopartikülden birisidir (El-Trass, ElShamy, El-Mehasseb ve El-Kemary, 2012). Bu nedenle çalışmamızda, hasar mekanizması tam açıklanmamış olan bakıroksit nanopartiküllerinin kullanılması planlanmıştır.

Zhang ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yayınlanan derleme sonuçlarına göre; vücuda giren nanopartiküller hepatosit hücreleri ile reaksiyona girerler. Büyük boyutlu nanopartiküller farklı bariyerlere takılırken, küçük boyutlu olanları tüm bu bariyerleri aşır, en son safra sistemi ile sindirim kanalına geçerler ve defekasyon yoluyla dışarı atılırlar (Zhang vd., 2016). Bakır nanopartiküllerin etkileri üzerinde yapılan bir in vivo araştırma sonuçlarına göre, bu partiküller karaciğer dokusunda nekroza ve bazı yapısal değişikliklere neden olmaktadır (Doudi ve Setorki, 2014; Sizova vd., 2011).

Nanopartikül boyutu hasar verme derecesini belirlemek için önemli bir faktördür (Elsaesser ve Howard, 2012). Karlosan ve arkadaşlarının 2008'de yaptıkları çalışmaya göre, 100 nm den küçük boyuta sahip olan bakır oksit nanopartikülleri çok daha zararlıdır (Hanna L Karlsson vd., 2008; H. L. Karlsson, Gustafsson, Cronholm ve Moller, 2009; Magaye, Zhao, Bowman ve Ding, 2012). Bu sebeple, yaptığımız ön çalışmalarla; çalışmamızda kullanılacak olan nanopartiküllerin boyutları TEM mikroskop görüntüleri ile kontrol edilmiştir.

Değişik çalışmalarda CuO-NP'nin karaciğer, dalak ve böbrek dokularında toksik etkiler gösterdiği (Chen vd., 2006; Lei vd., 2008) ya da karaciğerde hepatositlerde nekroza ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Wang, Chen, Long, Liu ve Yan, 2016). Yine, CuO-NP nanopartiküllerinin insan derisinin keratinize hücrelerinde de sitotoksik ve genotoksik etkilere neden olduğu da ortaya konulmuştur (Alarifi vd., 2013).

Çalışmamızda CuO-NP verilen sıçanların vücut ağırlıkları ve karaciğer hacimlerinin, kontrol grubu hayvanlarına göre değişmediği belirlenmiş karaciğer ağırlıkları kontrol grubu hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ( $p < 0.05$ ). Bulgularımızın aksine, Lei ve arkadaşları sıçanlarda CuO-NP maruziyeti sonrası bariz bir kilo kaybı olduğunu buna karşın karaciğer ağırlıklarının kontrol grubuna göre değişmediğini rapor etmişlerdir (Lei vd., 2008). Diğer taraftan, Reddy ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, farklı dozajlarda demir oksit nanopartikülü uygulanan sıçanlarda, sadece 300 ve 1000 mg/kg nanopartikül uygulanan hayvanların, uygulamanın 3. ve 4. haftalarında kontrol hayvanlarına göre anlamlı derecede kilo kaybı yaşadıkları gözlenmiştir (Reddy, Prabhakar ve Mahboob, 2017). Çalışmamızda kullanılan sıçanlarda anlamlı kilo kaybının olmamasını, verilen CuO-NP

nanopartikülü dozajının azlığına (200 mg/kg) ve verilmiş süresinin kısa olmasına (5 gün) bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda sıçanlara uygulanan CuO-NP'nin akut dönemde, karaciğerde hepatosit hücrelerinde karyolizise, dejenerasyona ve bu hücrelerin ışınal tarzda olan dizilimlerinde bozulmalara neden olarak, sinüzoidlerde genişlemeye sebep olduğu görülmüştür. Nitekim, çalışmamızda CuO-NP verilen sıçanların karaciğerlerinde sinüzoidlerin karaciğer dokusu içerisindeki oranı %37 olarak hesaplanırken, bu oran kontrol grubu hayvanlarında %23 olarak gerçekleşmiştir. Bu durum bize karaciğer parankiminin dejenerasyona bağlı olarak azaldığını işaret etmektedir. Ultrastructural incelemelerde: hepatositlerde, normal görünümünü yitirmiş ve kristalleri dejenerasyon olmuş mitokondri yapılarının gözlenmesi, büyük lipid damlacıklarının bulunması, dilate olmuş endoplasmik retikulum cisterna'larının mevcudiyeti ve bütünlüğünü kaybetmiş nükleus zarı yapısı görülmesi, bir dejenerasyonun varlığına işaret etmektedir. Diğer taraftan, CuO-NP grubuna ait hayvanlardan alınan karaciğer örneklerinin TUNEL ve Kaspaz-3 boyamalarda pozitif tepkime vermesi de bu savunmamızı güçlendirmektedir. Bilindiği üzere pozitif TUNEL boyama, DNA fragmentasyonunun, pozitif kaspaz-3 tepkimesi de proapoptotik hücre varlığının bir göstergesidir.

Khalaf ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da CuO-NP kullanılan sıçanlarda, hepatositlerde nekrotik odakların varlığı ve sinüzoidlerin genişlemesinin yanısıra TUNEL boyamalarda pozitif reaksiyon görülmüştür (Khalaf vd., 2017).

Bu konu üzerinde yapılan değişik in vitro çalışmalarda CuO-NP maruziyetinin oksidatif strese neden olduğu ve bu durumun da DNA hasarına yol açtığı ortaya konulmuştur (Magaye vd., 2012; Petersen ve Nelson, 2010; M.-F. Song, Y.-S. Li, H. Kasai ve K. Kawai, 2012).

Gomes ve arkadaşları 7 günlük CuO-NP maruziyetinin, DNA hasarına yol açarak, kasların hemositlerinde genotoksik etkiye sahip olduğunu ileri sürmektedirler (Gomes vd., 2013). Oksidatif DNA hasarının en önemli marker'ı 8-Hidroksi-2'-deoksiganozin olup bu mutajen CuO-NP'ye maruz bırakılan farelerde hepatosit hücrelerinin DNA'sında doza bağlı bir şekilde artmıştır (M. F. Song vd., 2012)

Karaciğer hasarını belirleyen biyomarkerlar arasında aminotransferazlar (ALT ve AST) en sık kullanılanlardır (McGill, 2016). Alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi, hepatotoksisitenin en sık izlenen biyolojik belirteçidir. Aspartat aminotransferazlar (AST) ise protein üretiminde yardımcı olan bir başka karaciğer enzimidir (Singh vd., 2011).

Çalışmamızda, CuO-NP verilen sıçanların serumlarındaki AST enzimi seviyesi kontrol grubu hayvanlarına göre artarken, ALT seviyesi düşmüştür. Abdelhalim ve arkadaşlarının altın nanopartiküllerinin sıçanların

karaciğerlerindeki etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Abdelhalim ve Abdelmottaleb Moussa, 2013). Aynı dozajda ve sürede CuO-NP verilen bir başka çalışmada, sıçanların karaciğer dokularında AST enzimi seviyesi bizim bulgularımıza paralel olarak artmış, ancak ALT seviyesi bulgularımızın aksine artış göstermiştir (B. Yang vd., 2010). Yapılan çalışmalara göre karaciğer hasarına bağlı olarak Ast ve Alt nin herikisinde birden artış olması beklenmektedir. Ancak ALT nin Ast den bağımsız olarak tersine etki göstermesinin spesifik bir sebebi bulunmaktadır. ALT seviyesindeki azalma mitokondri zarı hasarının bir göstergesidir ve bu zar hasarını takiben elektron transfer zincirinin bozulması ile ATP üretilmez ve hücre aneirobik ortamda pirovattan enerji üretebilmesi için ALT enzimini kullanır. ALT miktarındaki düşmenin bu kullanım sonucu gerçekleşir. Bununla birlikte AST sitoplazma ve mitokondri içerisinde bulunan bir enzimdir ve mitokondrilerin parçalanması AST'deki artışa sebep olabilir.

ALT ve AST enzimleri, karaciğer dışında kalp, kas, beyin ve böbrek gibi diğer organlarda da bulunur. Bu dokulardan birinin hasar görmesi, bu enzimlerin kan düzeyinde yükselmesine neden olabilir (Nathwani, Pais, Reynolds ve Kaplowitz, 2005).

CuO-NP verilen sıçanların karaciğer dokularında, apoptozun başlangıcını gösteren proinflamasyon markerları olan IL-6 ve TNF- $\alpha$  seviyelerinin artmış olması da hücre dejenerasyonuna işaret etmektedir. Nitekim, Malaczewska ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, sıçan splenosit hücre kültürü numuneleri üzerinde CuO-NP kullandıklarında, benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada da TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri artmıştır (Małaczewska, 2014).

Kalpainler 15 farklı üyeden oluşan bir enzim ailesidir. Kalpainler hücre iskeleti ve sinyal iletiminde görev alan proteazler olup, ayrıca hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptoz, inflamasyon, iskemi, nekroz gibi diğer fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde yer alırlar (Akdemir vd., 2008; Kuralay ve Çavdar, 2006). Genellikle apoptoz sırasında hücre iskeleti bütünlüğü bozulur, bunun asıl nedeni, bu bütünlüğü koruyan proteinlerin yapısının bozulmasıdır. Bu olayları başlatan, stoplazmadaki proteazların aktive olmasıdır. Bu proteazların bir grubu da kalpainlerdir (Mani vd., 2008).

Mehendale ve arkadaşları, çalışmalarında kalpain'den, "ölüm proteini" olarak bahsetmişler ve bu enzimin karaciğerdeki hasarın ilerlemesine neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (Mehendale ve Limaye, 2005).

Nekrotik ve apoptotik hücre ölümü sırasında aktive olmuş kalpain'lerin lizozomal zarlara zarar verdiği belirlenmiştir. İskemik olaylardan sonra ilk olarak ortaya çıkan olay, kalpain'lerin aktive olarak lizozomların zarlarına yerleşmesidir ve sonrasında da katepsin'ler sitoplazmaya sızarlar. Bu gözlemler "kalpain-katepsin hipotezi"nin oluşumuna neden olmuştur.

Kalsiyum aracılı kalpain aktivasyonu; lizozomların yırtılması, öldürücü katepsinlerin sızması ve hücrenin parçalanması ile sonuçlanır (Syntichaki ve Tavernarakis, 2003).

Çalışmamızda CuO-NP grubu sıçanların serumlarında kalpain (CAPN1) aktivitesi kontrol grubu hayvanlara göre anlamlı derecede artış gösterdi. Benzer bulgular Horie ve arkadaşlarının cerium oksit ( $CeO_2$ ) nanopartiküllerinin kanserli hücre kültürleri üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında da saptanmıştır (Horie vd., 2014). Bu durum hiç şüphesiz hepatositlerde apoptozun varlığını göstermektedir. Limaye ve arkadaşları da apoptoza giden veya nekrotik hepatositlerden salınan kalpain'ın, hepatotoksisite modellerinde akut karaciğer hasarının ilerlemesini indüklediğini ileri sürmüşlerdir (Limaye vd., 2003).

Ray ve Banik'e göre: hücre içerisinde  $Ca^{2+}$  düzeyinin artışı kalpain'ın aktivasyonunu aşırı şekilde artırır. Bunun sonucunda, hücre iskeleti ve membran proteinlerinin parçalanma işlemi artar ve sinir hücrelerinin bütünlüğünün bozulması sonucu hücre ölümü gerçekleşir (Ray ve Banik, 2003).

Hepatosit apoptozunu ortaya koymada, oksidatif stres markerları büyük öneme sahiptir. Bu belirteçler nanopartiküller tarafından ortaya çıkarılan ve hücre hasarında etkili olan biyokimyasal yapılardır. Reaktif oksijen türleri (ROS) grubunda değerlendirilen bu belirteçler nanopartiküllerin toksik etkilerini açıklamak ve değerlendirmede önemlidir (S. Siddiqui, Goddard ve Bielmyer-Fraser, 2015; L. Sun vd., 2011).

Çalışmamızda oksidatif stres hasarını değerlendirmek için CuO-NP verilen sıçanların karaciğer dokusunda sadece malondialdehit (MDA), katalaz (CAT) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ölçüldü. Buna göre, deney grubu hayvanlarımızda MDA düzeyi artarken, katalaz (CAT) ve NO düzeyleri kontrol grubu hayvanlarına göre azaldı. Oksidatif stresin önemli bir parametresi olarak kabul edilen Malondialdehid (MDA) enzimi lipid peroksidasyonunun iyi bir göstergesidir. Çalışmamızda CuO-NP grubu sıçanların karaciğerlerinde Malondialdehid (MDA) enziminin kontrol grubu hayvanlara göre anlamlı derecede artış göstermiş olması, CuO-NP'nin sıçan karaciğerinde oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir.

Bizim bulgularımıza benzer bulgular Khalaf ve arkadaşları tarafından da saptanmıştır. Bu çalışmada da bakır nanopartikülü hepatotoksisitesinde reaktif oksijen türlerini (ROS)'un önemli rolünden ve bakır nanopartikülüne maruz bırakılan sıçanlarda kontrol sıçanlara göre MDA seviyesinde anlamlı bir artış, katalaz enzimi düzeyinde ise anlamlı bir azalma rapor edilmiştir (Khalaf vd., 2017).

Chinde ve arkadaşlarının 2017 de yaptıkları çalışmada, tungsten oksit nanopartikülüne maruz bırakılan sıçanların karaciğerinde de MDA

seviyesinde yükselme, katalaz seviyesinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir (Chinde vd., 2017).

Bakır nanopartikülünün verildiği bir çalışmada, sıçanların karaciğerinde MDA seviyesi bulgularımıza benzer şekilde yükselmiştir (Ebaid, Elhussainy, El-Shourbagy, Ali ve Abomohra, 2017).

Lei Ana ve arkadaşları CuO-NP maruz kalan sıçanların beyinlerinin hippocampus bölgesinde de MDA seviyesinin benzer şekilde artmış olduğunu saptamışlardır (An, Liu, Yang ve Zhang, 2012).

Reddey ve arkadaşları 28 gün süreyle sıçanlara demir oksit nanopartikülü uyguladıklarında, oksidatif stresin ortaya çıktığını ve bu grup hayvanlarda karaciğer dokusunda MDA seviyesinin doza bağlı bir şekilde arttığını, katalaz seviyesinin ise karaciğer dokusunda sadece yüksek dozlarda demir oksit nanopartikülü (300 ve 1000 mg/kg) uygulandığında anlamlı bir artışa neden olduğunu saptamışlardır (Reddy vd., 2017).

Bilindiği üzere oksijenli solunum yapan hemen hemen tüm canlılarda bulunan katalaz, hücre için zararlı olan hidrojen peroksiti su ile parçalayarak oksijene ayırma görevine sahip olup ayrıca, metilalkol ile etilalkolü okside eden önemli bir enzimdir (Gupta, Sengupta, Chakraborty ve Gupta, 2016).

Canlı ve arkadaşları CuO-NP maruziyeti sonrası sıçanların eritrositlerindeki katalaz enzimi seviyesinde kontrol grubu sıçanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğunu ortaya koymuşlardır (Canli, Atli ve Canli, 2017).

Katalazın hücre içerisindeki görevlerinden birisi de, hücre içerisinde bulunan serbest radikalleri ortadan kaldırma görevidir. Stabil olmayan bu radikallerin vücuttaki diğer molekülleri stabil olmayan duruma getirmeleri sonucu hücrede bulunan proteinler, hücre membranları ve DNA yapısı zarar görebilir (Lobo vd., 2010). Bu durumda, çalışmamızda CuO-NP verilen sıçanlarda katalazın azalması, hepatositlerde görülen yapısal bozuklukların ortaya çıkmasındaki, katalaz rolünü de açıkça ortaya koymaktadır.

Zehirli serbest radikal bir gaz olan Nitrik oksit (NO), hemen hemen her hücre tarafından üretilir ve her hücre üzerinde etkinliğe sahiptir. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda zararlı iken, NO'nun düşük konsantrasyonları önemli fizyolojik olayların düzenlenmesinde görev alır. Aşırı miktarda üretilmesi ise toksik etki yapar. Paramanyetik serbest bir radikal olan NO, nitrik oksit sentaz (NOS) denilen enziminin katalizlediği reaksiyonla L- argininden oluşur (Lechner, Lirk ve Rieder, 2005). Nitrik oksit sentaz, plazma membranı, sitoplazma, nükleus, endoplazmik retikulum ve mitokondri'de bulunabilir. Sistemik dolaşımı düzenleyen NO, kalp, karaciğer, beyin gibi organların lokal kan dolaşımının düzenlenmesinde rol alır (Loscalzo ve Welch, 1995).



Arginaz sitozolik bir enzimdir. L-argininden, L-ornitin ve üre sentezini katabolize eder. Arginaz aktivitesinin en yüksek olduğu organ karaciğerdir. Bizim çalışmamızda CuO-NP'nin karaciğer dokusunda ortaya çıkardığı NO azalması, aynı partiküllerin bir makrofaj hücre kültürü üzerinde de benzer etkiyi gösterdikleri saptanmıştır. Çalışmamızda gözlenen NO ve proinflammatör sitokin inhibisyonunun altında yatan mekanizmanın, artmış arginaz aktivitesi ile ilişki olduğu düşünülmektedir (Arancibia, Barrientos, Torrejón, Escobar ve Beltrán, 2016).

Nanopartikül hepatotoksitesinin oluşumunda en önemli mekanizmalardan biri serbest radikallerin artışına bağlı olarak gelişen oksidatif stresidir. Karaciğer hasarında artan arginaz aktiviteleri oksidatif stres ile ilişkili bulunmuş ve oksidatif radikallerin arginaz aktivitesindeki artışta anahtar rol oynadığı bildirilmiştir. Araştırmalarda, birçok hastalığın patogeneğinde artmış arginaz aktivitelerinin rol aldığı ve buna bağlı olarak azalmış NO düzeylerinin buna eşlik ettiği bildirilmiştir (Chandra vd., 2012). Biz de çalışmamızdaki NO seviyesindeki azalmanın, arginaz enzimi aktivitesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Ghosh ve arkadaşlarına göre, CuO-NP, karaciğerde hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) ve nitrik oksit (NO) üretimini artırarak mitokondriye bağımlı yolak aracılığıyla apoptotik hücre ölümünü uyarmaktadır (Manoranjan Ghosh, Sankhadeep Pal ve Parames C Sil, 2014).

Çalışmamızda CuO-NP grubu sıçanların karaciğerlerinin elektron mikroskopik değerlendirilmesinde, Nükleus/total hepatosit hücresi oranı bakımından kontrol grubuna göre anlamlı bir fark yokken aksine hepatositlerin sitoplazmalarında, birim alana düşen mitokondri sayısı kontrol sıçanlarına göre anlamlı derecede azaldı. Yine, mitokondri/hepatosit hücre oranı da benzer şekilde azaldı. Bu durum bize CuO-NP'nin, sıçanların karaciğer hepatositlerindeki mitokondrilerin dejenerasyonuna neden olduğunu açıkça göstermektedir. Nitekim bulgularımız arasında, CuO-NP verilen gruptaki hayvanların hepatositlerinde, mitokondri dejenerasyonu dikkat çekiciydi.

Yapılan literatür taramasında, bakır oksit nanopartikülünün karaciğerde, mitokondriler üzerindeki etkilerini tam olarak ortaya koyan bir çalışma bulunmamakla birlikte, Yang ve arkadaşları bakır nanopartiküllerinin ovarium dokusunda da bizim bulgularımıza benzer şekilde, mitokondrilerde şişme ve kristalarda kırılma, nükleer zarda ise yapısal düzensizlikler gözlemlenmişlerdir (J. Yang vd., 2017).

Diğer taraftan, Siddiqui ve arkadaşlarının yaptıkları bir insan hepatokarsinoma (Hep G2) hücre kültürü çalışmasında, CuO-NP maruziyetinin mitokondri aracılığı ile oluşan apoptozu indüklediği ortaya konmuştur (M. A. Siddiqui vd., 2013). Benzer bulgular Shafag ve arkadaşlarının yapmış oldukları kronik bir myeloid lökemia (CML) K562

hücre kültürü çalışmasında da saptanmıştır (Shafagh, Rahmani ve Delirezh, 2015).

Çalışmamızda CuO-NP verilen sıçanların karaciğerlerinde, ortalama lobül alanı ve ortalama v. centralis çapında kontrol grubu sıçanlara göre anlamlı bir farkın bulunmaması, portal dolaşımında bir basınç artışının olmadığını göstermektedir.



## 6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda deney grubu sıçanlarına 5 gün süreyle verilen 200 mg/kg CuO-NP sıçanların vücut ağırlıkları ve karaciğer hacimleri değişmezken, karaciğer ağırlıkları kontrol grubu hayvanlarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.

Çalışmamızda sıçanlara uygulanan CuO-NP akut dönemde, sinüzoid / karaciğer parankimi oranını artırmıştır. Bu da hiç şüphesiz sinüzoidlerde görülen genişlemeyi bize açıkça göstermektedir. Diğer taraftan, deney grubu sıçanların karaciğerlerinde, hepatositlerde: ortalama lobül alanı ve ortalama v. centralis çapında kontrol grubu sıçanlara göre anlamlı bir farkın bulunmaması; portal dolaşımda bir basınç artışının olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda deney grubu sıçanların karaciğerlerinde gözlenen sinüzoidlerde görülen genişlemenin hepatosit hücrelerinde ortaya çıkan karyolizis ve dejenerasyondan kaynaklandığını, bunun sonucunda da hepatosit hücrelerinin ışınal tarzda olan dizilimlerinde bozulmaların gözlemlendiğini düşünülmektedir.

Çalışmamızda sıçanlara uygulanan CuO-NP'nin karaciğerin strüktürel incelemelerinde; hepatositlerde normal görünümünü yitirmiş ve kristalleri dejenerasyon olmuş mitokondri yapılarının gözlenmesi, büyük lipid damlacıklarının bulunması, dilate olmuş endoplasmik retikulum cisterna'larının mevcudiyeti ve bütünlüğünü kaybetmiş nükleus zarı yapısı hepatosit dejenerasyonunun varlığına işaret etmektedir. Yine, bu gruptaki hayvanların hepatositlerinin sitoplazmalarında, birim alana düşen mitokondri sayısının ve mitokondri/sitoplazma oranının kontrol sıçanlarına göre anlamlı derecede azalması, hepatositlerdeki apoptozun mitokondri dejenerasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer taraftan, CuO-NP grubuna ait hayvanlardan alınan karaciğer örneklerinin TUNEL ve Kaspaz-3 boyamalarda pozitif tepkime vermesi; hepatositlerdeki DNA fragmentasyonunu ve apoptotik hücre varlığına işaret etmektedir. Yine, CuO-NP verilen sıçanların karaciğer dokularında, IL-6 ve TNF- $\alpha$  seviyelerinin artması da hepatositlerdeki proapoptozun varlığını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda CuO-NP grubu sıçanların serumlarında, kalpain (CAPN1) aktivitesinin kontrol grubu hayvanlara göre anlamlı derecede artış göstermesi, hepatositlerdeki hücre iskeleti yapılarının bozulmasına bağlı olarak apoptoz varlığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda, CuO-NP verilen sıçanların serumlarında, AST enzimi seviyesi kontrol grubu hayvanlara göre artarken, ALT enzimi seviyesinin

azalmıştır. AST artışı karaciğer hasarının varlığını desteklemektedir. ALT enzim seviyesinin düşmesi ise mitokondrilerin yapısal bozukluklarının göstermektedir.

Çalışmamızda CuO-NP verilen sıçanların karaciğer dokusunda, Malondialdehid (MDA) düzeyinin artarken, katalaz (CAT) ve nitrik oksit (NO) düzeylerinin kontrol grubu hayvanlara göre azalmış olması, hepatosit hasarının oksidatif strese bağlı olarak geliştiği fikrini desteklemektedir.

Bakır oksit nanopartikülü, serbest oksijen radikallerini stimüle ederek arginaz enziminin up-regülasyonuna sebep olmaktadır. Arginaz enzim aktivitesinin artması, NOS enzimini baskılayarak üretimi ornitin lehine çevirir. Bu durum poliamin sentezini arttırırken, NO üretiminin azaltır. NO düzeyinin azalması, hepatoselüler hasar sürecini hızlandırmaktadır.

Akut CuO-NP toksisite modeli uyguladığımız bu çalışmadan elde edilen histopatolojik ve biyokimyasal veriler, bize karaciğer hasarının oluştuğunu ve bu hasarın hepatositlerdeki mitokondriyal dejenerasyona bağlı olarak ortaya çıktığını açıkça göstermektedir. Dolayısıyla, insanlarda CuO-NP zehirlenmesine bağlı olarak gelişebilecek farklı dokusal hasarların önlenmesine yönelik üretilecek ilaçların bu durumu göz önünde bulundurmasının gerekli olduğuna inanmaktayız.

Sonuç olarak, akut CuO-NP'lünün bir birleşen olarak farklı sektörlerde yüksek dozda kullanılmasının tehlikeli olabileceği ve bu konuda dikkat edilmesi gerektiğinin önemi açıkça görülmekte olup mitokondriyal yolak yoluyla indüklediği karaciğer hasarının mekanizmasının ileride yapılacak farklı *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarla da desteklenmesinin yararlı olacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelhalim, M. A., & Abdelmottaleb Moussa, S. A. (2013). The gold nanoparticle size and exposure duration effect on the liver and kidney function of rats: In vivo. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(2), 177-181. doi:10.1016/j.sjbs.2013.01.007
- Akdemir, O., Uçankale, M., Karaoglan, A., Barut, S., Sagmanligil, A., Bilguvar, K., Cirakoglu, B., Sahan, E., & Colak, A. (2008). Therapeutic efficacy of SJA6017, a calpain inhibitor, in rat spinal cord injury. *Journal of Clinical Neuroscience*, 15(10), 1130-1136. doi:10.1016/j.jocn.2007.08.011
- Alarifi, S., Ali, D., Verma, A., Alakhtani, S., & Ali, B. A. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. *International journal of toxicology*, 32(4), 296-307.
- An, L., Liu, S., Yang, Z., & Zhang, T. (2012). Cognitive impairment in rats induced by nano-CuO and its possible mechanisms. *Toxicology Letters*, 213(2), 220-227.
- Arancibia, S., Barrientos, A., Torrejón, J., Escobar, A., & Beltrán, C. J. (2016). Copper oxide nanoparticles recruit macrophages and modulate nitric oxide, proinflammatory cytokines and PGE2 production through arginase activation. *Nanomedicine*, 11(10), 1237-1251.
- ARICI, S. (2008). TOKSİK HEPATİT. *Pamukkale Tıp Dergisi*.
- Arıncı, K. v. E., A. (1997). *Anatomi*: Güneş Kitapevi.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
- Banfield, J. F., & Zhang, H. (2001). Nanoparticles in the environment. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 44(1), 1-58.
- Bioulac-Sage, P., Kuiper, J., Van Berkel, T., & Balabaud, C. (1996). Lymphocyte and macrophage populations in the liver. *Hepato-gastroenterology*, 43(7), 4.
- Bioulac-Sage, P., Le Bail, B., & Balabaud, C. (2007). Liver and biliary tract histology. *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice, Third Edition*, 9-19.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Braet, F., & Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative hepatology*, 1(1), 1.
- Canli, E. G., Atli, G., & Canli, M. (2017). Response of the antioxidant enzymes of the erythrocyte and alterations in the serum biomarkers in rats following oral administration of nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 50, 145-150.
- Carmona, E. R., Inostroza-Blancheteau, C., Obando, V., Rubio, L., & Marcos, R. (2015). Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 791, 1-11.
- Chandra, S., Romero, M., Shatanawi, A., Alkilany, A., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2012). Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *British Journal of Pharmacology*, 165(2), 506-519.
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., & Zhao, F. (2006). Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters*, 163(2), 109-120.
- Chinde, S., Dumala, N., Rahman, M. F., Kamal, S. S. K., Kumari, S. I., Mahboob, M., & Grover, P. (2017). Toxicological assessment of tungsten oxide nanoparticles in rats after acute oral exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13576-13593.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 15(4), 316-328.
- Doudi, M., & Setorki, M. (2014). Acute effect of nano-copper on liver tissue and function in rat. *Nanomedicine Journal*, 1(5).
- Dowling, A. P. (2004). Development of nanotechnologies. *Materials Today*, 7(12, Supplement), 30-35. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00628-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00628-5)
- Ebaid, R., Elhussainy, E., El-Shourbagy, S., Ali, S., & Abomohra, A. E.-F. (2017). Protective effect of *Arthrospira platensis* against liver injury induced by copper nanoparticles. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 17(3), 203-210.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- El-Trass, A., ElShamy, H., El-Mehasseb, I., & El-Kemary, M. (2012). CuO nanoparticles: synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Applied Surface Science*, 258(7), 2997-3001.
- Elsaesser, A., & Howard, C. V. (2012). Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2), 129-137.
- Eren, M., Temizel, İ., & Koçak, N. (2004). İlaça bağlı hepatotoksisite. *Çocuk sağlığı ve hastalıkları dergisi*, 47, 222-227.
- Eroschenko, V. P. (2008,). *Histoloji atlası fonksiyonel ilişkileriyle*. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Eşrefoğlu, M. (2009). Özel Histoloji. In *Özel Histoloji* (pp. 106-120). Malatya: Medipres Matbaacılık Yayıncılık.
- Garcia, T., Lafuente, D., Blanco, J., Sánchez, D. J., Sirvent, J. J., Domingo, J. L., & Gómez, M. (2016). Oral subchronic exposure to silver nanoparticles in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 92, 177-187.
- Ghosh, M., Pal, S., & Sil, P. C. (2014). Taurine attenuates nano-copper-induced oxidative hepatic damage via mitochondria-dependent and NF-kappa B/TNF-alpha-mediated pathway. *Toxicology Research*, 3(6), 474-486. doi:10.1039/c4tx00030g
- Ghosh, M., Pal, S., & Sil, P. C. (2014). Taurine attenuates nano-copper-induced oxidative hepatic damage via mitochondria-dependent and NF-κB/TNF-α-mediated pathway. *Toxicology Research*, 3(6), 474-486.
- Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A. C., Cravo, A., & Bebianno, M. J. (2013). Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 84, 51-59.
- Gupta, K., Sengupta, A., Chakraborty, M., & Gupta, B. (2016). Hydrogen peroxide and polyamines act as double edged swords in plant abiotic stress responses. *Frontiers in plant science*, 7, 1343.
- Handy, R. D., Owen, R., & Valsami-Jones, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17(5), 315-325.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Serge, H., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical journal*, *374*(1), 1-20.
- Hekimi, S., Lapointe, J., & Wen, Y. (2011). Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in cell biology*, *21*(10), 569-576.
- Horie, M., Nishio, K., Kato, H., Endoh, S., Fujita, K., Nakamura, A., Kinugasa, S., Hagihara, Y., Yoshida, Y., & Iwahashi, H. (2014). Evaluation of cellular influences caused by calcium carbonate nanoparticles. *Chemico-Biological Interactions*, *210*, 64-76.
- Horie, M., Nishio, K., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., Nakamura, A., Miyauchi, A., Kinugasa, S., Yamamoto, K., & Niki, E. (2011). Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. *Journal of biochemistry*, *150*(4), 461-471.
- Hussain, S., Hess, K., Gearhart, J., Geiss, K., & Schlager, J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, *19*(7), 975-983.
- Jeng, H. A., & Swanson, J. (2006). Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, *41*(12), 2699-2711.
- Junatas, K. L., Tonar, Z., Kubíková, T., Liška, V., Pálek, R., Mik, P., Králíčková, M., & Witter, K. (2016). Stereological analysis of size and density of hepatocytes in the porcine liver. *Journal of Anatomy*.
- Junqueira LC, & J., C. (2006). Temel Histoloji. In Aytekin Y & S. S (Eds.), *Temel Histoloji* (11. baskı ed., pp. 332-344). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Moller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical research in toxicology*, *21*(9), 1726-1732.
- Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., & Moller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*, *188*(2), 112-118. doi:10.1016/j.toxlet.2009.03.014



## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Khalaf, A. A., Zaki, A. R., Galal, M. K., Ogaly, H. A., Ibrahim, M. A., & Hassan, A. (2017). The potential protective effect of alpha-lipoic acid against nanocopper particle-induced hepatotoxicity in male rats. *Hum Exp Toxicol*, 36(9), 881-891. doi:10.1177/0960327116674526
- Kierszenbaum, A. L. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. In D. R (Ed.), *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş* (pp. 459-472). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Knust, J., Ochs, M., Gundersen, H. J. G., & Nyengaard, J. R. (2009). Stereological estimates of alveolar number and size and capillary length and surface area in mice lungs. *The anatomical record*, 292(1), 113-122.
- Kolios, G., Valatas, V., & Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 113(4), 427.
- Kruk, T., Szczepanowicz, K., Stefańska, J., Socha, R. P., & Warszyński, P. (2015). Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 17-22.
- Kuralay, F., & Çavdar, Z. (2006). İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg*, 16, 143-152.
- Lanone, S., & Boczkowski, J. (2006). Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. *Current Molecular Medicine*, 6(6), 651-663.
- Lechner, M., Lirk, P., & Rieder, J. (2005). *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Lei, R., Wu, C., Yang, B., Ma, H., Shi, C., Wang, Q., Wang, Q., Yuan, Y., & Liao, M. (2008). Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: A rapid invivo screening method for nanotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(2), 292-301.
- Limaye, P. B., Apte, U. M., Shankar, K., Bucci, T. J., Warbritton, A., & Mehendale, H. M. (2003). Calpain released from dying hepatocytes mediates progression of acute liver injury induced by model hepatotoxicants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191(3), 211-226.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- Loscalzo, J., & Welch, G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Progress in cardiovascular diseases*, 38(2), 87-104.
- Magaye, R., Zhao, J., Bowman, L., & Ding, M. (2012). Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(4), 551-561.
- Małaczewska, J. (2014). The in vitro effect of commercially available noble metal nanocolloids on the splenocyte proliferative response and cytokine production in mice. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(1), 37-45.
- Mani, S. K., Shiraishi, H., Balasubramanian, S., Yamane, K., Chellaiah, M., Cooper, G., Banik, N., Zile, M. R., & Kuppaswamy, D. (2008). In vivo administration of calpeptin attenuates calpain activation and cardiomyocyte loss in pressure-overloaded feline myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 295(1), H314-H326.
- Marcos, R., Monteiro, R. A., & Rocha, E. (2006). Design-based stereological estimation of hepatocyte number, by combining the smooth optical fractionator and immunocytochemistry with anti-carcinoembryonic antigen polyclonal antibodies. *Liver International*, 26(1), 116-124.
- Marcos, R., Monteiro, R. A., & Rocha, E. (2012). The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *Journal of Anatomy*, 220(4), 303-317.
- McGill, M. R. (2016). The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI journal*, 15, 817.
- Mehendale, H. M., & Limaye, P. B. (2005). Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(5), 232-236.
- Moore K.L. , D. A. F. (2007). *Clinically Oriented Anatomy*. Baltimore USA: Bobel Lippincott Williams & Wilkins.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Moore KL, & TVN, P. (2009a). Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri/ BEFORE WE ARE BORN In Müftüoğlu S, Kaymaz F, & A. P (Eds.), *Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri/ BEFORE WE ARE BORN* (pp. 142): Güneş Tıp Kitap Evleri
- Moore KL, & TVN, P. (2009b). Klinik yönleriyle İNSAN EMBRİYOLOJİSİ. In D. H & Y. M (Eds.), *Klinik yönleriyle İNSAN EMBRİYOLOJİSİ* (pp. 218-221): NOBEL TIP KİTABEVLERİ.
- Mut-Salud, N., Álvarez, P. J., Garrido, J. M., Carrasco, E., Aránega, A., & Rodríguez-Serrano, F. (2015). Antioxidant intake and antitumor therapy: toward nutritional recommendations for optimal results. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Mühlfeld, C., Papadakis, T., Krasteva, G., Nyengaard, J. R., Hahn, U., & Kummer, W. (2010). An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations. *Journal of Applied Physiology*, 108(5), 1402-1409.
- Naruse, K., Tang, W., & Makuuchi, M. (2007). Artificial and bioartificial liver support: a review of perfusion treatment for hepatic failure patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(10), 1516.
- Nathwani, R. A., Pais, S., Reynolds, T. B., & Kaplowitz, N. (2005). Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*, 41(2), 380-382.
- Navarro, V. J., & Senior, J. R. (2006). Drug-related hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*, 354(7), 731-739.
- Oda, M., Yokomori, H., & Han, J. Y. (2003). Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 29(3, 4), 167-182.
- Petersen, E. J., & Nelson, B. C. (2010). Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 613-650.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- Prado, J., Vidal, A., & Durán, T. (2012). Application of copper bactericidal properties in medical practice. *Revista medica de Chile*, 140(10), 1325-1332.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ramadori, G., Moriconi, F., Malik, I., & Dudas, J. (2008). Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(Suppl 1), 107-117.
- Ramadori, G., & Saile, B. (2004). Portal tract fibrogenesis in the liver. *Laboratory Investigation*, 84(2), 153-159.
- Ray, S., & Banik, N. (2003). Calpain and its involvement in the pathophysiology of CNS injuries and diseases: therapeutic potential of calpain inhibitors for prevention of neurodegeneration. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, 2(3), 173-189.
- Reddy, U. A., Prabhakar, P., & Mahboob, M. (2017). Biomarkers of oxidative stress for in vivo assessment of toxicological effects of iron oxide nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1172-1180.
- Roos, M. H., & Pawlina, W. (2011). *Histology ATEXT AND ATLAS*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sadler, T. W. (1990). Langman's medical embriyoloji. In *Langman's medical embriyoloji* (pp. 411). Maryland: Williams and Wilkins.
- Saile, B., & Ramadori, G. (2007). Inflammation, damage repair and liver fibrosis-role of cytokines and different cell types. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 45(01), 77-86.
- Sánchez-Sanhueza, G., Fuentes-Rodríguez, D., & Bello-Toledo, H. (2016). Nanopartículas de Cobre como Potencial Agente Antimicrobiano en la Desinfección de Canales Radiculares: Revisión Sistemática. *International journal of odontostomatology*, 10(3), 547-554.
- Scialo, F., Fernández-Ayala, D. J., & Sanz, A. (2017). Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Frontiers in Physiology*, 8.
- Semisch, A., Ohle, J., Witt, B., & Hartwig, A. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of nano-and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), 10.
- Senior, J. R. (2012). Alanine aminotransferase: a clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clin Pharmacol Ther*, 92(3), 332-339. doi:10.1038/clpt.2012.108

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Shafagh, M., Rahmani, F., & Delirez, N. (2015). CuO nanoparticles induce cytotoxicity and apoptosis in human K562 cancer cell line via mitochondrial pathway, through reactive oxygen species and P53. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18(10), 993.
- Siddiqui, M. A., Alhadlaq, H. A., Ahmad, J., Al-Khedhairi, A. A., Musarrat, J., & Ahamed, M. (2013). Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Plos One*, 8(8), e69534.
- Siddiqui, S., Goddard, R. H., & Bielmyer-Fraser, G. K. (2015). Comparative effects of dissolved copper and copper oxide nanoparticle exposure to the sea anemone, *Exaiptasia pallida*. *Aquatic Toxicology*, 160, 205-213.
- Singh, A., Bhat, T. K., & Sharma, O. P. (2011). Clinical biochemistry of hepatotoxicity. *J Clin Toxicol*, 4, 001.
- Sizova, E., Miroshnikov, S., Polyakova, V., Gluschenko, N., & Skalny, A. (2011). Copper nanoparticles as modulators of apoptosis and structural changes in tissues.
- Song, M.-F., Li, Y.-S., Kasai, H., & Kawai, K. (2012). Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 50(3), 211-216.
- Song, M. F., Li, Y. S., Kasai, H., & Kawai, K. (2012). Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 50(3), 211-216. doi:10.3164/jcbrn.11-70
- Standring, S., Anand, N., Birch, R., Collins, P., Crossman, A.R., Gleeson, M., Jawaheer, G., Smith, A.L., Spratt, J.D., Stringer, M.D., Tubbs, R.S., Tunstall, R., Wein, A.J., Wigley, B.C. (2016). Gray's Anatomy - The Anatomical Basis of Clinical Practice. In S. Standring (Ed.), *Gray's Anatomy - The Anatomical Basis of Clinical Practice* (pp. 1160-1172): Elsevier.
- Standring, S., Borley, N.R., Collins, P., Crossman, A.R., Gatzoulis, M.A., Healy, J.C., Johnson, D., Mahadevan, V., Newell, R.L., Wigley, B.C. (2016). *Gray's anatomy the anatomical basis of clinical practice*: Elsevier.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Studer, A. M., Limbach, L. K., Van Duc, L., Krumeich, F., Athanassiou, E. K., Gerber, L. C., Moch, H., & Stark, W. J. (2010). Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 197(3), 169-174.
- Sun, L., Li, Y., Liu, X., Jin, M., Zhang, L., Du, Z., Guo, C., Huang, P., & Sun, Z. (2011). Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology in vitro*, 25(8), 1619-1629.
- Sun, Y., Zhang, G., He, Z., Wang, Y., Cui, J., & Li, Y. (2016). Effects of copper oxide nanoparticles on developing zebrafish embryos and larvae. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 905.
- Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2003). The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nature Reviews Neuroscience*, 4(8), 672-684.
- Şeftalioğlu, A. (1998). *GENEL&ÖZEL İNSAN EMBRİYOLOJİSİ: Tıp ve Teknik Yayıncılık*
- Usman, M. S., El Zowalaty, M. E., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., & Ibrahim, N. A. (2013). Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4467.
- Vanderkerken, K., Bouwens, L., Van Rooijen, N., Van Den Berg, K., Baekeland, M., & Wisse, E. (1995). The role of Kupffer cells in the differentiation process of hepatic natural killer cells. *Hepatology*, 22(1), 283-290.
- Velmahos, G. C., Toutouzas, K., Radin, R., Chan, L., Rhee, P., Tillou, A., & Demetriades, D. (2003). High success with nonoperative management of blunt hepatic trauma: the liver is a sturdy organ. *Archives of surgery*, 138(5), 475-481.
- Wang, T., Chen, X., Long, X., Liu, Z., & Yan, S. (2016). Copper Nanoparticles and Copper Sulphate Induced Cytotoxicity in Hepatocyte Primary Cultures of *Epinephelus coioides*. *PLoS One*, 11(2), e0149484.
- Wisse, E., Luo, D., Vermijlen, D., Kanellopoulou, C., de Zanger, R., & Braet, F. (1997). *On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells*. Paper presented at the Seminars in liver disease.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., & Nel, A. E. (2006). Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm.
- Xu, J. J., Jiang, H. Z., Li, J. Q., Cheng, K. K., Dong, J. Y., & Chen, Z. (2015). H-1 NMR-Based Metabolomics Investigation of Copper-Laden Rat: A Model of Wilson's Disease. *Plos One*, *10*(4), 15. doi:10.1371/journal.pone.0119654
- Yang, B., Wang, Q., Lei, R., Wu, C., Shi, C., Wang, Q., Yuan, Y., Wang, Y., Luo, Y., & Hu, Z. (2010). Systems toxicology used in nanotoxicology: mechanistic insights into the hepatotoxicity of nano-copper particles from toxicogenomics. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *10*(12), 8527-8537.
- Yang, J., Hu, S., Rao, M., Hu, L., Lei, H., Wu, Y., Wang, Y., Ke, D., Xia, W., & Zhu, C.-h. (2017). Copper nanoparticle-induced ovarian injury, follicular atresia, apoptosis, and gene expression alterations in female rats. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 5959.
- Yokohira, M., Hashimoto, N., Yamakawa, K., Suzuki, S., Saoo, K., Kuno, T., & Imaida, K. (2009). Lung carcinogenic bioassay of CuO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles with intratracheal instillation using F344 male rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, *22*(1), 71-78.
- Zhang, Y.-N., Poon, W., Tavares, A. J., McGilvray, I. D., & Chan, W. C. (2016). Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of Controlled Release*.
- Zhao, R., & Duncan, S. A. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology*, *41*(5), 956-967.

# ÖZGEÇMİŞ

## Bireysel Bilgiler

**Adı-Soyadı :** Paria- SHOJAOLSADATI

**Doğum tarihi ve yeri :** 23.03.1984 – Tebriz – IRAN

**Uyruğu :** İranlı

**Medeni durumu :** Evli

**İletişim adresleri :** Tıp fakültesi Temel Bilimler Binası Anatomi (ABD)  
ESOGÜ Meşelik Yerleşkesi 26480 ESKİŞEHİR

## Eğitim Durumu

1990-1995 ilk öğretim  
1995-1998 orta okul  
1998-2002 lise  
2002-2006 lisans ebelik  
2011-2013 yüksek lisans anatomi

Yabancı diller: İngilizce, Türkçe, Farsça

## Mesleki Deneyim:

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİNDE 2014 senesinden çalışmaktayım. ilk seneyi araştırma görevlisi olarak son üç seneyi de öğretim görevlisi olarak.

## Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

2015 Türk Anatomi ve Klinik Anatomi Derneği

2015 Nanotechnology initiative council İran

## Yayınlar :

1. ACAR MUSTAFA, BAYAR MULUK NURAY, SHOJAOLSADATI PARIA, KARIMKHAN HADI, Ada S, CİNGİ CEMAL (2016). Can curcumin modulate allergic rhinitis in rats?. The Journal of Laryngology Otology, 130(12), 1103-1109., Doi: 10.1017/S0022215116008999 (Yayın No: 3864931)



2. KAYMAKÇI MUSTAFA, ACAR MUSTAFA, BURUKOĞLU DÖNMEZ DİLEK, KUTLU HATİCE MEHTAP, SHOJAOLSADATI PARIA, CİNGİ CEMAL, BAYAR MULUK NURAY (2015). The Potential Protective Effects of 2-aminoethyl Diphenylborinate against Inner Ear Acoustic Trauma: Experimental Study Using Transmission and Scanning Electron Microscopy. The Journal of International Advanced Otology, 11(1), 1-5., Doi: 10.5152/iao.2015.752 (Yayın No: 3864725)

## **Poster Bildiri**

### **Uluslar arası bilimsel toplantılarda**

1. SHOJAOLSADATI PARIA, KARIMKHAN HADI, YÜCEL FERRUH, ŞAKUL BAYRAM UFUK (2017). Investigation of the effects of acute copper-oxide nanoparticule (CuO-NP) consumption in the rat heart: Biochemical and Histopatolhological assesment. 28. Ulusal Biyokimya Kongresi (Uluslararası biyokimya kongresi) (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3865181)
2. SHOJAOLSADATI PARIA, YÜCEL FERRUH, ÖZ SEMİH, BURUKOĞLU DÖNMEZ DİLEK, ÖZDEN HİLMİ (2016). The protective effect of vitamin E (alpha- tocopherol) on ischemia-reperfusion injury in rat liver. 41th Febs Cogrees (283), 391-392. (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3865024)

### **Ulusal bilimsel toplantılarda**

1. KARIMKHANI HADI, ÖZKOÇ METE, SHOJAOLSADATI PARIA, UZUNER KUBİLAY, BURUKOĞLU DÖNMEZ DİLEK, KANBAK GÜNGÖR (2017). Researching of the preventive effectiveness of Boric acid and Fish oil from menhaden (Omega-3) in model of heart attack changes in ECG rats.18. Ulusal Anatomi Kongresi, 11(2), 137-137., Doi: 10.2399/ana.17. S2Sv (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3679071)
2. SHOJAOLSADATI PARIA, KARIMKHAN HADI, YÜCEL FERRUH, ŞAKUL BAYRAM UFUK (2017). Sıçan böbreğinde akut bakır oksit nanopartikül (CuO-NP) tüketiminin etkilerinin araştırılması: Stereolojik ve Biyokimyasal değerlendirme. 18. Ulusal anatomi kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3865221)
3. SHOJAOLSADATI PARIA, YÜZBAŞIOĞLU NESLİHAN, NALBANT ASRIN, ÖRMECİ TUĞRUL, ALBAY SONER, ŞAKUL BAYRAM UFUK (2016). A Pilot Knee Mri Research In Turkish Population: Evalution Of Normal Morphometric Values For Planing Prosthesis. 17th National Anatomy Congress With International Participation (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3865117)

4. YÜZBAŞIOĞLU NESLİHAN, SHOJAOLSADATI PARIA, YÜZBAŞIOĞLU HÜSEYİN EMİR, EKİZ YASEMİN, ŞAKUL BAYRAM UFUK (2016). Linear And Angular Photographic-anthropometric Analysis Of Turkish Young Adult's Facial Soft Tissue: A Preliminary Report. 17th National Anatomy Congress With International Participation (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3865097)
5. EKİZ YASEMİN, YÜZBAŞIOĞLU NESLİHAN, SHOJAOLSADATI PARIA, ŞAKUL BAYRAM UFUK (2014). The Importance Of Fetal Ultrasonographic Parameters For Anatomical Study. 16th National Congress Of Anatomy (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3865070)

### **Bilimsel Etkinlikler**

#### **Burslar :**

TÜBİTAK Araştırmacı Bursiyeri

#### **Projeler :**

1. Akut bakır-oksit nanopartikül (CuO NP) uygulamasının sıçan karaciğer dokusundaki histopatolojik etkilerinin araştırılması, ESOĞÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (A2 Proje NO:2016-1355)- Araştırmacı
2. Bakır Oksid Nanopartikülü İndüklenen Sıçanlarda, Beyin İskemi Reperfüzyonun Modelinde Oluşabilecek Apoptotik Hücre Hasarı Ve Serum Biomarker Düzeylerindeki Değişimler Ve Kalpain İNhibitör-1 (ALLN) 'in tedavi edici etkisinin araştırılması, TÜBİTAK PROJESİ (3001 Proje NO: 2016S985)- Bursiyer

#### **Kurslar ve Eğitim Programları:**

1. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, Deneysel Hayvanlarıyla Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Temel Doku hazırlama ve Sayım-Ölçüm Teknikleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kurs, 05.09.2016 - 09.09.2016 (Ulusal)
2. Akademik Gelişim, Bilimsel Makale Yazımı İçin İleri Teknikler Eğitimi, OMÜ Tıp Fakültesi ve Samsun Tabip Odası, Kurs, 16.03.2013 - 16.03.2013 (Ulusal)
3. Stereology Course, OMÜ Tıp Fakültesi ve Samsun, 09.11.2012-10.11.2012 (Uluslararası)
4. DENEY HAYVANLARI KULLANIMI İLE İLGİLİ EĞİTİM PROGRAMI, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu (hadyek) ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi tıbbi cerrahi deneysel araştırma merkezi (ticam), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kurs, 07.05.2012-18.05.2012 (Ulusal)