

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ZOOLOJİ BİLİM DALI**

**NO İnhibisyonunun Gelişen Piliç Embriyosu
Karaciğer Dokusu Üzerine Etkisinin
Histolojik, Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal
Açıdan İncelenmesi**

Fatih ÇÖLLÜ

**Danışman
Doç. Dr. Beyhan GÜRCÜ**



MANİSA-2016

**Fatih
ÇÖLLÜ**

**NO İNHİBİSYONUNUN GELİŞEN PİLİÇ EMBRİYOSU KARACİĞER DOKUSU
ÜZERİNE ETKİSİNİN HISTOLOJİK, HISTOKİMYASAL VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL AÇIDAN İNCELENMESİ**

2016

TEZ ONAYI

Fatih ÇÖLLÜ tarafından hazırlanan "**NO İnhibisyonunun Gelişen Piliç Embriyosu Karaciğer Dokusu Üzerine Etkisinin Histolojik, Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Açından İncelenmesi**" adlı tez çalışması 15/08/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS** olarak savunulmuş ve **oyçokluğu / oybirliği** ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç. Dr. Beyhan GÜRCÜ
Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU
Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Yücel BAŞIMOĞLU KOCA
Adnan Menderes Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Fatih ÇÖLLÜ



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	III
TABLO DİZİNİ	V
ÖZET	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğer Gelişimi.....	3
2.2. Nitrik Oksit (NO)	5
2.3. AMAÇ	10
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Yöntem	12
3.2.1. L-NAME hazırlanması.....	12
3.2.2. Deney grupları ve uygulamalar	12
3.3. Histolojik Boyama.....	13
3.4. İmmunohistokimyasal Boyama	14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	16
4.1. Kontrol ve Sham Grubu Bulgular.....	16
4.2. Uygulama Grubu Bulguları (15-30 mg/kg).....	21
4.3. İmmunohistokimya Bulguları.....	31
4.3.1. Kontrol Grubu eNOS, iNOS Dağılımı	31
4.3.2. Uygulama Grubu eNOS, iNOS Dağılımları	32
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

#	Artış gösteren hepatik kümelenme
★	Nekrotik alanlar
*	Vakuolleşme
+	Dendriform biçimli hepatosit kordonları
>	Eozinofilik hücreler
Δ	Deforme olmuş nükleus
□	Mitoz
→	Endotel hücresi
➤	Kübik ve alçak prizmatik hepatositler
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Embriyonik gün
e	Eritrositler
eNOS	Endoteliyal nitrik oksit sentaz
H	Hepatosit kümeleri
H&E	Hematoksilen & Eozin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İHC	İmmünohistokimya
K	Kalp
KC	Karaciğer
L1	Lob 1
L2	Lob 2
L-NAME	L-Nitro-Arjinin-Metil-Ester
nNOS	Nöral nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
O	Piknotik nükleus
P	Perifer bölgesi
S	Sinüzoidler
SOD	Süperoksit dismutaz
VC	Vena centralis

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1. Karaciğer tomurcuğunun gelişimi.....	3
Şekil 2.1.2. Piliçte karaciğer gelişim evreleri. Embriyonik gün (E).....	4
Şekil 2.2.1. NO sinyali mekanizması.....	6
Şekil 2.2.2. NO'nun kök hücre düzenlenmesine katılımı.....	7
Şekil 2.2.3. L-NAME' nin açık formülü.....	8
Şekil 2.2.4. NO ve etkileri.....	9
Şekil 3.1.1. “Brinsea Octagon 40” marka otomatik kuluçka sistemi ile kültüre bırakılmış dömlü tavuk yumurtaları.....	11
Şekil 4.1.1. 5 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. Karaciğer (KC), kalp (K). H&E.....	16
Şekil 4.1.2. 5 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. Hepatosit kümeleri (H), endotel hücresi (→), sinüzoidler (S), mitoz (□), H&E.....	17
Şekil 4.1.3. 5 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. Kübik ve alçak prizmatik hepatositler (►). Hepatosit kümeleri (H), Sinüzoid (S), Endotel (→), Mitoz (□), H&E.....	17
Şekil 4.1.4. Embriyonik gelişimin 6. gününde lob oluşumu. 1. Lob (L1), 2. lob (L2), H&E.....	18
Şekil 4.1.5. Embriyonik gelişimin 6. gününde hepatositler sıkı bir biçimde organize olmuş ve sinüzoidlerin (S) sayısı artmıştır. Hepatosit kümeleri (H), endotel (→), H&E.....	19
Şekil 4.1.6. 7 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. (A) Dendriform biçimli hepatosit kordonları (+), sinüzoidler (S), Endotel hücreleri (→), eritrositler (e). (B) vena centralis (VC). H&E.....	20
Şekil 4.1.7. 8 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. Sinüzoidler (S), eritrositler (e), hepatosit kordonları (+). H&E.....	21
Şekil 4.2.1. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Hepatosit kümelerinde (H) ve hepatosit kordonlaşmada (+) bozulma. Sinüzoid (S), eritrosit (e). H&E.....	22
Şekil 4.2.2. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Düzeni bozulmuş hepatosit kordonları (B) ve hücrelerde vakuolleşme (*) (A). Sinüzoidler (S), eritrositler (e), mitoz (□), H&E.....	22
Şekil 4.2.3. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Mitoz (□), sitoplazmik vakuolizasyon (*), sinüzoidler (S), hepatosit kordonlarında (+) bozulma. H&E.....	23
Şekil 4.2.4. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Hepatosit kordonlaşmasında (+) ve sitoplazmik vakuolizasyonda (*) artış. Sinüzoidler (S). H&E.....	23
Şekil 4.2.5. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Sitoplazmik vakuoller (*) ve şekilleri deforme olmuş nükleuslar (Δ), sinüzoid (S). H&E.....	24
Şekil 4.2.6. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Eozinofilik hücreler (>). H&E.....	24
Şekil 4.2.7. 15 mg/kg (B) ve 30 mg/kg (A) L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E6). Kümeler halinde hepatosit birikimi (H). Sinüzoidler (S), eritrosit (e), H&E.....	25
Şekil 4.2.8. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E6). Nekrotik alanlar (★) ve morfolojisi bozulmuş nükleuslar (Δ), sinüzoidler (S), periferik alan (P). H&E.....	26
Şekil 4.2.9. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E7). Mitoz (□), eritrositler (e), sinüzoidler (S). H&E.....	27

Şekil 4.2.10. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E7). Mitoz (□) ve piknotik nükleus (O), sinüzoid (S), hepatosit kordonları (+). H&E.	27
Şekil 4.2.11. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). Periferik alanda hepatik kümelenmeler (#) ve merkeze doğru hepatik kordonlar (+). Sinüzoidler (S). H&E.	28
Şekil 4.2.12. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). Sinüzoidler (S) içerisinde yığılma gösteren eritrosit kümeleri (e). Hepatik kordlar (+). H&E.....	29
Şekil 4.2.13. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). Mitoz (□). H&E.	29
Şekil 4.2.14. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). Mitoz (□). H&E.	30
Şekil 4.2.15. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). sinüzoid (S) içerisinde kümelenen eritrositler (e). Hepatik kordonlar (+). H&E.	30
Şekil 4.3.1.1. Kontrol grubu eNOS ve iNOS dağılımları	31
Şekil 4.3.2.1. 5. gün karaciğer kesiti immünohistokimya boyamaları.....	33
Şekil 4.3.2.2. 6. gün karaciğer kesiti immünohistokimya boyamaları.....	34
Şekil 4.3.2.3. 7. gün karaciğer kesiti immünohistokimya boyamaları.....	35
Şekil 4.3.2.4. 8. gün karaciğer kesiti immünohistokimya boyamaları.....	36

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.2.2.1: Deney grupları, uygulama günleri ve yumurta sayıları.	12
Tablo 3.3.1: Rutin Heamtoksilen-Eozin boyama prosedürü.....	14
Tablo 3.4.1: eNOS ve iNOS immünohistokimya protokolü.....	15



TEŐEKKÜR

Elmas değerlidir, ancak onu iŐlemesi de bir o kadar da zordur. Her Őeye rağmen yılmayıp beni sadece bir öğrenci olarak değil, bir akademisyen olarak ta yetiŐtirmek için bigi ve deneyimleri ile benim için yorulmadan çok çaba sarf eden sayın hocam Doç. Dr. Beyhan GÜRCÜ'ye,

Beni kendi ailesinden ayırmayıp beni kendi bölümlerinin bir elemanıymıŐ gibi kabul eden Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD.'den Sayın Hocalarım Prof. Dr. M. İbrahim TUğLU ve ablam Dr. IŐıl AYDEMİR ve Oya KORKMAZ başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Biyolojiyi bana sevdiren, bu alanda yönelmemde belki de en büyük katkısı olan, her zaman beni kollayan ve bir gün biliminsanı olacağıma yürekten inanan ilköğretim fen ve lise biyoloji hocam Sayın Günay AYRANCI'ya,

Meraklı bir çocuğu yetiŐtirmek belki de en zordur. Her zorluğa rağmen içimdeki merakı öldürmeden beni bu günlere getirebilen, belki de en büyük kahramanlar olan aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Fatih ÇÖLLÜ
Manisa, 2016

ÖZET

Yüksek Lisans

NO İnhibisyonunun Gelişen Piliç Embriyosu Karaciğer Dokusu Üzerine Etkisinin Histolojik, Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Açıdan İncelenmesi

Fatih ÇÖLLÜ

Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Beyhan GÜRCÜ

Karaciğer gelişimi, 4. günde (HH evre 24) karaciğer tomurcuğunun oluşumu ile başlar hızlı bir gelişim dönemi geçirerek 7. gününde (HH evre 29) ikinci lobun ventralinde, üçüncü lobun oluşumu ile tamamlanır. 8. günden itibaren büyüme evresi ile kısmen gelişimine devam eder.

Nitrik oksit (NO), mikroorganizmalara karşı savunma dahil olmak üzere önemli fizyolojik rolleri olan, başta epitelial hücreler olmak üzere pek çok hücre tarafından salınan inorganik serbest bir radikaldir. L-Nitro-Arjinin-Metil-Ester (L-NAME), NOS substratı bir ajan olarak görev yapabilen, endotelial NO ve indüklenebilir NO sentezinin her ikisini de inhibe etmek için kullanılan (in vivo ve in vitro) non-selektif bir inhibitördür.

Çalışmamızın amacı, piliç embriyosu karaciğer gelişimi üzerine anlık nitrik oksit sentezinin durdurulması veya azaltılmasına bağlı gerçekleşebilecek yapısal değişikliklerin belirlenmesidir.

Çalışmamızda, Leghorn cinsi embriyolu tavuk yumurtaları kullanıldı. Yumurtalar (sham ve uygulama grubu) $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ve % 60 ± 0.5 nem içeren ortamda inkübe edildi. Uygulama grubu embriyolara, L-NAME (SCBT- sc-200333A) iki farklı dozda (15-30 mg/ kg) 4, 5, 6, ve 7. günlerde yumurta besin maddesine enjekte edildi. Uygulamadan 24 saat sonra embriyolar fikse edilerek karaciğer dokularına rutin histolojik yöntemler uygulandı. Hazırlanan preparatlar histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilip elde edilen bulgular fotoğraflandı.

Karaciğer dokusunda histolojik olarak; mitotik hücrelerde artış, hepatositlerin kordon oluşturma yeteneğinde bozukluklar, sinüzoidlerde genişleme, endotel hücre kayıpları, sinüzoidlerde yığılma gösteren eritrosit kümeleri ve nekrotik alanlar gözlemlendi.

Sham grubu eNOS, iNOS immunoreaktivitesinin gelişmekte olan karaciğer dokusunda epitel-mezenşim etkileşmesinin gerçekleştiği periferik bölgede var olduğu, immunoreaktivitenin 5. günde az, gelişim ilerledikçe arttığı ve 7. günde en

yüksek düzeyde olduğu belirlendi. Ayrıca, eNOS boyanmasının iNOS boyanmasına göre daha güçlü olduğu izlendi.

L-NAME uygulamasına bağlı olarak tüm gruplarda eNOS, iNOS immunoreaktivitesi belirgin şekilde azaldı. 6 günlük 15 mg/kg uygulanmış grupta eNOS' un iNOS' a göre fazla olduğu, diğer uygulama günlerinde ise iNOS' un fazla olduğu belirlendi.

Embriyonik gelişim sürecinde NO varlığının olumlu etkisinin olduğu, NO inhibe eden ajanların varlığında, azalan NO' in karaciğerde histopatolojik değişikliklere neden olduğu belirlendi. Bu durumun, embriyonik gelişimde yaşam süresini ve kalitesini olumsuz etkileyebileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer gelişimi, L-NAME, Nitrik oksit, Piliç Embriyosu

2016, 64 sayfa



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigating The Role of Nitric Oxide Inhibition on Developing Chick Embryo Liver Development by Histological, Histochemical and Immunohistochemical Methods

Fatih ÇÖLLÜ

**Celal Bayar University
Faculty of Science and Letters
Department of Biology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Beyhan GÜRCÜ

The liver development starts at 4th day (HH stage 24) with the development of the liver bud and together with the very fast developmental stage, and at the 7th day (HH stage 29) third lobe develops from the ventral of the second lobe and development of the liver completes. It will partly continue developing after the 8th day with the growth phase.

Nitric oxide (NO) is an inorganic free radical that secreted primarily from the epithelial cells and has roles on physiology events like defense against the microorganisms. **L-Nitro-Arginine-Methyl-Ester (L-NAME)** can act as a NOS substrate agent, and therefore, is a non-selective inhibitory for using the inhibition of both endothelial NO and inducible NO synthesis both in vivo and in vitro with non-specific matter.

The purpose of our study is detecting structural anomalies on chick embryo and liver development in correlation with completely inhibiting or diminishing of NO synthesis simultaneously.

In our study, Leghorn type embryonic chick eggs has been used. Eggs of both sham and experiment group has been incubated in a condition that have $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ heat and $60\% \pm 0.5$ moisture level. At experiment group embryos, L-NAME (SCBT-sc-200333A) at two different doses (15-30 mg/ kg) in egg yolk at 4th, 5th, 6th and 7th days. 24 hours after the application, embryos were fixated and livers were used for routine histology.

At the liver tissue, histologically; increasing of mitotic cells, malfunction at the cordon forming capabilities of hepatocytes, expansion at the sinusoids, endothelial cell loss, and stacking of erythrocyte clusters at sinusoids and necrotic areas has been observed.

At the sham group, the immunoreactivity of eNOS and iNOS has been detected at the ppherical part where ephielial-mesenchymal transtition occurs at the developing liver tissue, showed weak immunoreactivity at 5th days and increase with the development and shows maximum staining at the day 7. Also it has been showed that eNOS reactivity is more powerful than iNOS reactivity

Together with the L-NAME treatment, eNOS and iNOS immunoreactivity has been dropped at the all groups. At the 6 days 15 mg/kg group, eNOS is more powerful from the iNOS staining, and at the other application groups, iNOS is more present from the eNOS.

At the embryonic development process, NO has positive effects on embryos, and in case of NO inhibitor agent presence, decreased NO has general effects on embryonic morphology and can induce histopathologic changes especially on liver. With this status, it is concluded that NO inhibition might affect lifespan and life quality in embryo development negatively.

Keywords: Liver development, L-NAME, Nitric oxide, Chick development

2016, 64 pages



1. GİRİŞ

Karaciğer, vücudun hemen hemen bütün sistemleriyle ilişkili, karbohidrat, protein ve yağ metabolizması, depolama (karbohidrat, vitamin, demir), zararlı maddelerin detoksifikasyonu, salgılama, pıhtılaşma faktörlerinin üretimi gibi fonksiyonları olan büyük bir bezdir. Ayrıca, rejeneratif kapasiteye sahip ender organlardan biridir. Karaciğerin büyük bir kısmı çıkarılsa bile, geriye kalan kısmı tekrar kendini onarabilir.

Piliçte karaciğer gelişimi, embriyo gelişiminin 33. saatinde ventral gut endoderminin kardiyak mezoderm tarafından salınan büyüme faktörleri tarafından uyarılması ile başlar. Bu uyarılmayı 4. günde (HH evre 24) karaciğer tomurcuğunun oluşumu takip eder (Şekil 2.1.1). 5. günde (HH evre 26) ise ikinci karaciğer lobunun oluşumu başlar. Bu aşamada hepatositleri oluşturacak olan hücreler gevşek bir biçimde organize edilir. Sinüzoidler oluşmaya başlar. Gelişimin 6. gününde (HH evre 28) ikinci lobun oluşumu tamamlanır ve hepatositler sıkı bir biçimde organize hale gelir. Karaciğerde sinüzoidal boşluklar artmaya başlar. Gelişimin 7. gününde (HH evre 29) büyüme hızlanır ve ikinci lobun ventralinde, üçüncü lobun oluşumu tamamlanır (Şekil 2.1.2). Bu aşamada hepatosit sayısı artmıştır. 8. günden itibaren organ oluşumu tamamlanır ve büyüme evresi başlar [1].

Nitrik oksit (NO) birçok biyolojik fonksiyonu etkileyebilen suda çözünebilir ve kolay difüze olabilen gaz halinde serbest radikaldir. Hücreler tarafından doğal olarak sentez edilmekte olup hücre içi ve hücre dışı bir sinyal molekülü olarak birçok fizyolojik ve patofizyolojik olayda rol oynar. NO' nun hücre içindeki üretimi L-arjinin' in nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin katalizasyonu yardımıyla olup, NOS enziminin endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) ve nöral NOS (nNOS) olmak üzere üç adet izoformu bulunmaktadır [2].

NO; enfeksiyon, anjiyogenez, inflamasyon, vazodilatasyon, tromboz, hücre çoğalması ve göçü, yara iyileşmesi, kardiyovasküler hastalıklar, nöral sistem hastalıkları, hücre büyümesi ve tümör oluşumu gibi bir çok fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda rol oynayan önemli bir moleküldür [2]. Biyolojik

mekanizmalarda birçok görevi bilinmesine rağmen NO' nun embriyo gelişimi ve organogenez sırasındaki rolleri henüz tam bilinmemektedir [3].

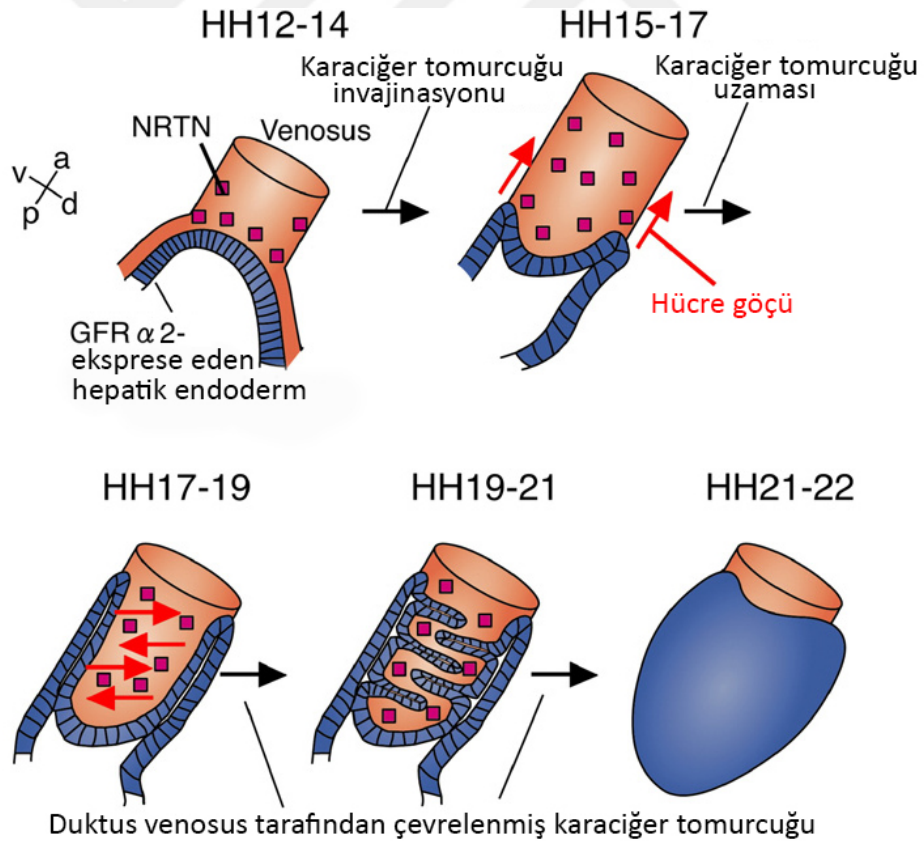
Yukarıda bahsedilen tüm bu bilgiler ışığında L-NAME uygulanmış ve kontrol piliç embriyolarında, karaciğer gelişiminde NO dağılımı (eNOS ve iNOS immunohistokimyası) değerlendirilerek uygulamaya bağlı oluşabilecek hasarın boyutunu histolojik (Hematoksilen-Eosin boyaması) ve immünohistokimyasal olarak belirlemektir.



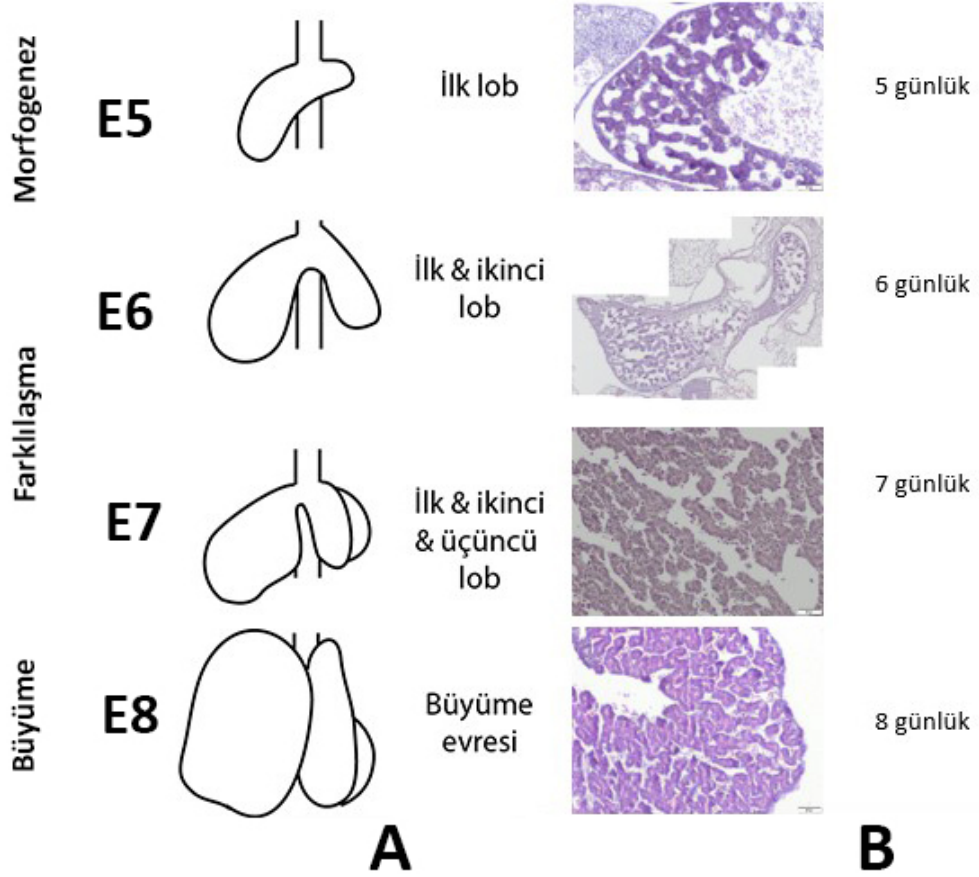
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Gelişimi

Piliçte karaciğer gelişimi, embriyo gelişiminin 33. saatinde ventral gut endoderminin kardiyak mezoderm tarafından salınan büyüme faktörleri tarafından uyarılması ile başlar. Bu uyarılmayı 4. günde (HH evre 24) karaciğer tomurcuğunun oluşumu takip eder (Şekil 2.1.1). 5. günde (HH evre 26) ise ikinci karaciğer lobunun oluşumu başlar. Bu aşamada hepatositleri oluşturacak olan hücreler gevşek bir biçimde organize edilir. Sinüzoidler oluşmaya başlar. Gelişimin 6. gününde (HH evre 28) ikinci lobun oluşumu tamamlanır ve hepatositler sıkı bir biçimde organize hale gelir. Karaciğerde sinüsoidal boşluklar artmaya başlar. Embriyo gelişiminin 7. gününde (HH evre 29) büyüme hızlanır ve ikinci lobun ventralinde, üçüncü lobun oluşumu tamamlanır (Şekil 2.1.2). Bu aşamada hepatosit sayısı artmıştır. Sekizinci günden itibaren organ oluşumu tamamlanır ve büyüme evresi başlar [1].



Şekil 2.1.1. Karaciğer tomurcuğunun gelişimi [4]' ten modifiye edilmiştir



Şekil 2.1.2. Piliçte karaciğer gelişim evreleri. Embriyonik gün (E). (Sugsewang [1]' dan modifiye edilmiştir (A), H&E boyamaları (B))

Karaciğer, embriyonal yaşamdan itibaren, besin sağlayan venlerle ana dolaşım arasında bir süzgeç ve metabolik bir organ olarak yer almaktadır [5]. Diğer önemli görevlerinden biri de hemopoietik organ olmasıdır. Yapılan bir çalışmada [6] hematopoiezin piliç embriyosu gelişiminin yaklaşık 7. gününde başladığını ve 14. günde pik yaptığını, granülopoiezin ise 8-9. günden itibaren gözlenmeye başladığı bulunmuştur. Farklı bir çalışmada ise karaciğerde hematopoiezin embriyo gelişiminin 15. gününden itibaren başladığı belirtilmektedir [7]. Piliç fetal karaciğeri ilk olarak bir non-hematopoietik organ olarak düşünülmesine karşın yapılan bu çalışmalar ile intra- ve/veya ekstravasküler hematopoiezde görev aldığı gösterilmiştir.

Nitrik Oksit (NO)' nun gelişim basamaklarında, erken gövde ve organ morfogenezinde, hayat boyu devam eden nörogenez ve nöral plastisite basamaklarında rol oynadığı bildirilmiştir. Gelişim basamaklarında NO' nun asıl görevinin hücre çoğalmasının düzenlenmesi olduğu, NO sentezinin inhibe edilmesi

veya tamamen yok edilmesi gibi durumlarda hücre farklılaşmasını arttırdığı öne sürülmüştür [8]. Ayrıca fare embriyoları üzerine yapılan endotelial nitrik oksit (eNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit (iNOS) knockout çalışmalarında NO yokluğunun özellikle kardiyovasküler ve solunum sistemlerini etkilediği bildirilmiştir [9].

2.2. Nitrik Oksit (NO)

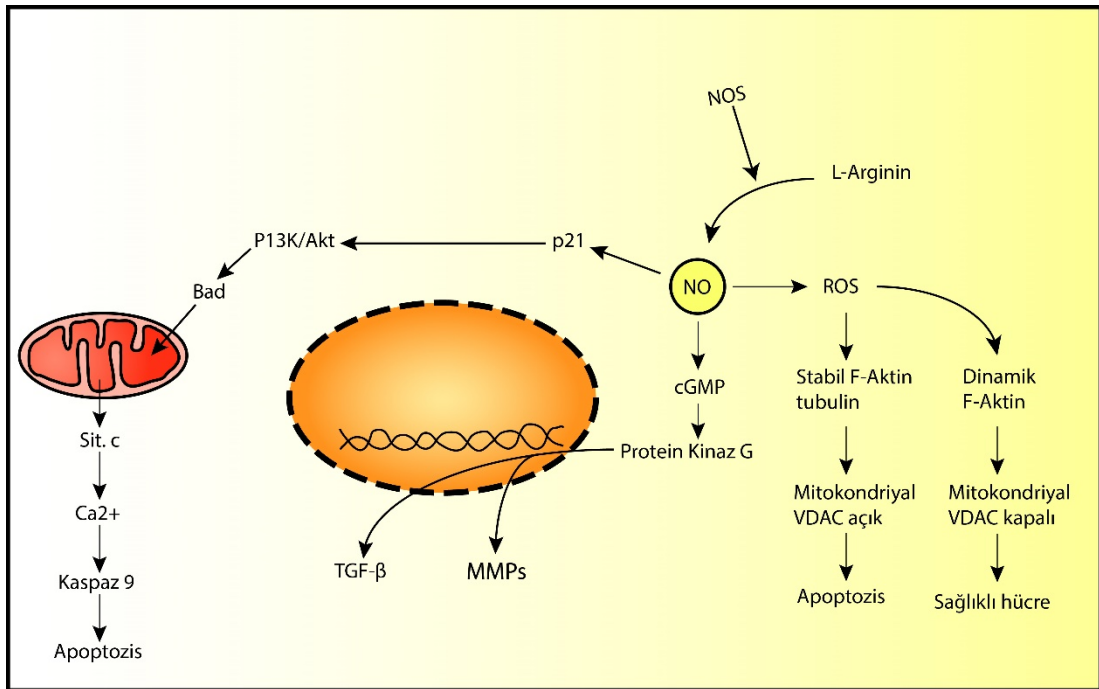
NO, L-arjinin'den Nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin katalize ettiği bir reaksiyon sonucu sentezlenmektedir [10, 11]. NO üzerinde yük taşımaması, çiftlenmemiş elektron bulundurması, lipofilik olması ile kolayca yayılabilen, düşük konsantrasyonlarda dahi etkili, bilinen en düşük molekül ağırlıklı biyoaktif üründür [12]. Mikroorganizmalara karşı savunma dahil olmak üzere önemli fizyolojik rolleri olan, başta epitelial hücreler olmak üzere pek çok hücre tarafından salınan inorganik serbest bir radikaldir [13]. Nitrik oksit ve nitrik oksit sentaz enziminin çeşitli fonksiyonları tanımlanmış ve farklı hücrelerdeki türevleri bulunmuştur. Nitrik oksit sentaz enziminin üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlar; nöral nitrik oksit sentaz (nNOS, NOS 1), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS, NOS 2), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS, NOS 3)'dür [13-15]. iNOS (NOS-2) yüksek miktarda nitrik oksit üretimi yapabilen fonksiyonel olarak Ca^{2+} dan bağımsız bir enzimdir. Endotel hücrelerinden başka, özellikle düz kas hücreleri ve makrofajlarda bulunmaktadır. Ca^{2+} /kalmodülin bağımlı bir enzim olan eNOS (NOS 3) ise çeşitli uyarımlarla geçici olarak hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun fizyolojik sınırlar içinde yükselmesi sonucu aktive olur ve endotel kökenli nitrik oksit sentezlenmesine yol açar [16, 17].

Diatomik serbest radikal bir gaz olarak NO, hücrelerarası mesaj molekülü, parakrin materyal, transmitter veya hormon olarak uzak mesafelere taşınarak siklik guanozin monofosfat (cGMP) bağımlı veya bağımsız bir şekilde birtakım etkilere sebep olarak hücre düzenlenmesi ve fonksiyonundaki birçok biyokimyasal ve fizyolojik olayları düzenleyebilmekte ve bu şekilde onlara etki edebilmektedir [18].

NO hücre zarından geçebilen ve etkisini herhangi bir reseptör kullanmadan gerçekleştirebilen, bu nedenle hücrelerarası iletişim için bir yolak görevi olan kokusuz ve tatsız bir gazdır. NO'nun gaz olmasından dolayı vücut içerisinde konumunun ve nerede üretildiğinin belirlenmesinde zorlanılmış, ancak nitrik oksit sentaz'ın (NOS) keşfedilmesi ile araştırılması kolaylaşmıştır [19]. Hücre dışı NO,

kök hücreler üzerinde tipine, dozuna ve kaynağına göre çeşitli etkiler göstermektedir. Embriyonik kök hücreler düşük NO seviyesi varlığında (2–20 μM) kendini apoptozisten korumaktadır. Yüksek derişimlerde ise NO kök hücre metabolizmasını baskılamakta, ancak farklılaşmalarını teşvik etmektedir. Fare modellerinde NO donörlerine maruz bırakılan kök hücrelerde kök hücre markerları olan Nanog ve Oct4 genlerinin baskılandığı gözlenmiştir [20].

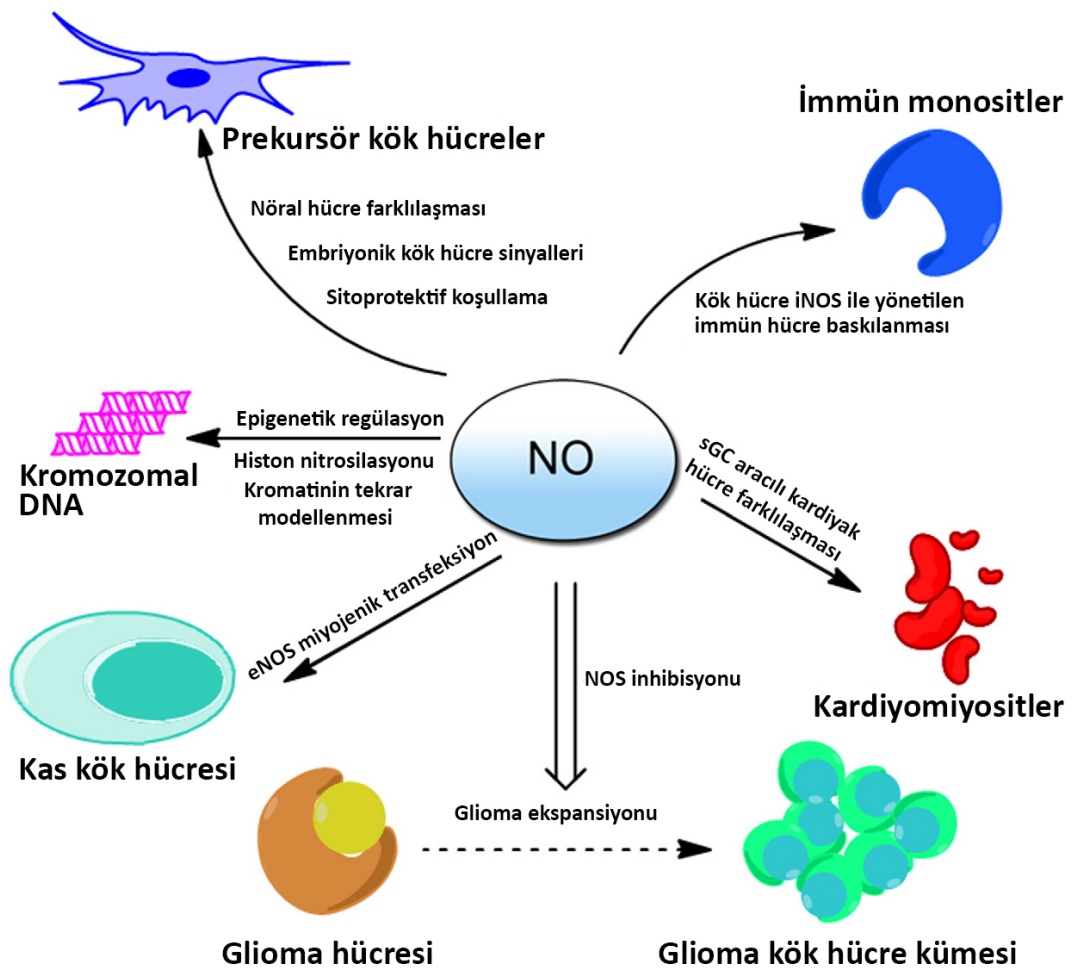
Artmış veya azalmış NO; Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) artmasına veya azalmasına neden olarak [21], aktin ve tubulin gibi sitoskelet elemanları üzerinden mitokondriyal voltaj bağımlı anyon kanallarında (VDAC) değişikliğe sebep olabilmekte ve bu şekilde hücreyi sağlıklı bir şekilde yaşamaya veya apoptozise yönlendirebilmektedir [22]. Ayrıca, NO derişimindeki değişiklikler cGMP üzerinden cGMP bağımlı protein kinazları etkileyerek TGF- β ve Matris Metalloproteinaz (MMP) ekspresyonlarını değiştirebilmektedir [23, 24]. MMP ve TGF- β üzerinde meydana gelen bu değişiklikler HAM' nin yeniden düzenlenmesine ve hücre davranışlarının değişmesine sebep olmaktadır [23]. Değişen NO derişimi ayrıca p53 genini aktive edip p21 yolağı üzerinden mitokondriyi etkileyerek kaspazları indüklemekte ve hücreyi apoptozis sokabilmektedir (Şekil 2.2.1) [25].



Şekil 2.2.1. NO sinyal mekanizması (Gürcü B. ve Çöllü F., 2016)

NO; enfeksiyon, anjiyogenez, inflamasyon, vazodilatasyon, trombozis, hücre proliferasyonu ve migrasyonu, yara iyileşmesi, kardiyovasküler hastalıklar, nöral sistem hastalıkları, hücre büyümesi ve tümör oluşumu gibi bir çok biyolojik fonksiyonun önemli basamaklarında görev almakta, bu özelliği de NO'yu çok önemli bir hedef molekül haline getirmektedir [2].

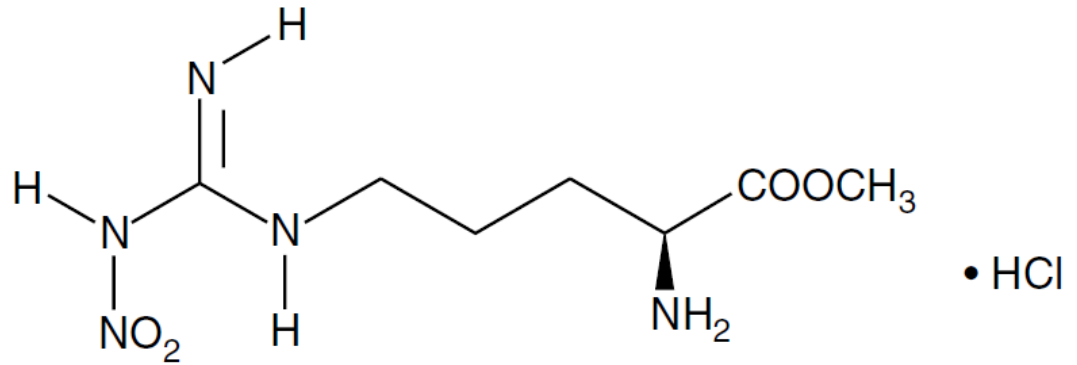
NO ayrıca kök hücre farklılaşmasında da rol oynamaktadır. NO donörü uygulanan adipoz kökenli kök hücreleri farklılaşma evresine daha hızlı bir şekilde girebilmektedir. NO bunun dışında kök hücrelerde daha birçok faaliyete sahiptir (Şekil 2.2.2) [20].



Şekil 2.2.2. NO'nun kök hücre düzenlenmesine katılımı. [20]' den modifiye edilmiştir

NO karaciğer fizyolojisi ve patofizyolojisinde önemli rolleri olan moleküllerden birisidir. eNOS karaciğerde genel olarak karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinde ve hepatik arterin endotelial hücrelerinde, portal vende, sentral vende ve lenfatik dokularda eksprese olmaktadır. eNOS sürekli olarak eksprese edilmekte ve bazı uyaranlara karşı küçük miktarlarda NO üreterek tepki vermektedir. eNOS tarafından sentezlenen NO karaciğer homeostazisini korumakta ve karaciğerde meydana gelen patolojik durumlara engel olmaktadır. Bunun tersine iNOS, karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri, hepatositler, Kupffer hücreleri, hepatik stellat hücreleri, düz kas hücreleri, kolangiyosit ve diğer immün hücre tipleri gibi çok çeşitli hücre tiplerinde indüklenmektedir. Birçok patolojik koşulda, iNOS büyük miktarlarda NO sentezi yaparak reaktif nitrojen türleri için önemli bir kaynak sağlamaktadır. Özellikle peroksinitrit (ONOO⁻); DNA, lipid ve proteinler gibi önemli hücrel moleküllere zarar vermekte ve protein nitrasyonunu arttırarak birçok hedef proteinin yapısını ve fonksiyonunu etkilemektedir [26].

L-Nitro-Arjinin-Metil-Ester (L-NAME), NOS substratı bir ajan olarak görev yapabilen, endotelial NO ve indüklenbilir NO sentezinin her ikisini de inhibe etmek için kullanılan, (in vivo ve in vitro) NO sentezini non-selektif bir şekilde inhibe eden farmakolojik bir araçtır (Şekil 2.2.3) [16, 17, 27-30].

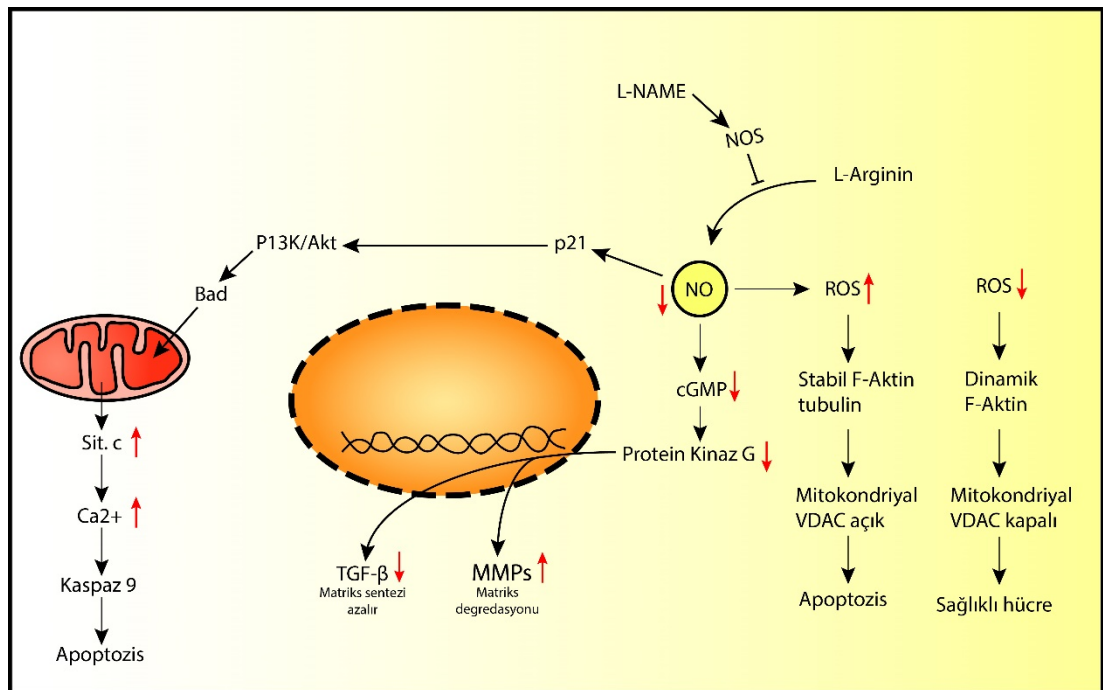


Şekil 2.2.3. L-NAME' nin açık formülü

L-NAME ile yapılan çalışmalarda, nitrik oksit sentez inhibisyonunun; kan basıncında doza bağlı bir artışa neden olarak, arter duvarının cGMP içeriğinin azalmasına neden olduğu [31], anjiyotensin II gibi vazodilatör ajanlar nedeniyle hücre

içi sinyali (protein kinaz C aktivitesini içeren) güçlendirdiği, perivasküler alanlarda ve arteriyel intimada (damarın en iç tabakası) makrofaj birikimini arttırdığı ve spesifik adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarması ile oksidatif stresi arttırdığı bildirilmektedir [32].

Taneli ve Vatansever [33] yaptığı çalışmada spermatik damarların bağlanması 30 dakika önce bir grup sıçana L-NAME, bir grup sıçana da serum fizyolojisi intraperitoneal olarak vermiş, sonrasında L-NAME verilen grupta NO düzeyinin azaldığını ve apoptozisin baskılandığını bildirmişlerdir. Diğer bir inhibisyon çalışmasında da abdominal aortanın bağlanması 30 dakika önce uygulama grubu sıçanlara L-NAME intraperitoneal olarak verilerek mesane kasılması değerlendirilmiştir. L-NAME verilen sıçanların mesane kasımın kasılmasının verilmeyenlere göre önemli oranda arttığı ve bu sıçanların mesanesinde apoptozisin baskılandığı gösterilmiştir [34]. Chen ve ark. [35] da sodyum nitroprusid uygulanan sıçan modelinde, NO ve kaspaz-12 düzeyinde bir korelasyonun olduğunu, NO arttığında apoptozisin arttığını, L-NAME uygulamasına bağlı olarak kaspaz 12 seviyesinin azaldığı ve apoptozisin baskılandığını bildirmişlerdir. Sandau ve ark. [36] yaptığı çalışmada ise siklosporin uygulanarak NOS aktivitesi artırılan hücre kültür ortamına L-NAME eklendiğinde apoptozisin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir.



Şekil 2.2.4. NO ve etkileri (Gürcü B. ve Çöllü F., 2016)

2.3. AMAÇ

Bu çalışmanın amacı; farklı gelişim dönemlerindeki karaciğer dokusu üzerine düşük ve yüksek dozda L-NAME uygulaması yapılarak; hasarın boyutunu histopatolojik olarak incelemek ve eNOS, iNOS dağılımlarındaki değişiklikleri belirlemektir. Böylece, anlık nitrik oksit sentezinin durdurulması veya azaltılmasına bağlı olarak meydana gelebilecek yapısal değişiklikler araştırılacaktır.



3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Çalışmamız Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (77.637.435-21 No' lu) tarafından onaylanmış olup çalışma sırasında Helsinki Deklarasyonu Laboratuvar Hayvanları Komitesi tarafından yayınlanan "Laboratuvar Hayvanlarının Kullanım ve Bakım İlkeleri" bildirisine uyulmuştur.

Bu çalışmada, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Bornova/İZMİR Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen Legorn cinsi embriyolu tavuk yumurtaları (SPF: Specific Pathogen-Free) kullanılmıştır.

Kuluçka süresi yirmi bir gün olan tavuklarda embriyoların gelişim evreleri Hamburger ve Hamilton [37] evrelerine (HH evresi ölçeği) göre belirlenip, organların oluşumu bu skalaya göre değerlendirilmiş, ölçek dışında kalan veya gelişim bozukluğu gösteren embriyolar deneye dahil edilmemiştir.

Çalışma için kullanılacak olan dömlü tavuk yumurtaları, 37 ± 0.5 °C, % 65 ± 0.5 nisbi neme (Brinsea Octagon 40 marka otomatik inkübatör) (Şekil 3.1.1) sahip ortamda, inkübasyona bırakılmıştır. Bu çalışmada olası tekrarlarla birlikte yaklaşık olarak 240 adet dömlü tavuk yumurtası kullanılmıştır.



Şekil 3.1.1. "Brinsea Octagon 40" marka otomatik kuluçka sistemi ile kültüre bırakılmış dömlü tavuk yumurtaları

3.2. Yöntem

3.2.1. L-NAME hazırlanması

L-NAME moleküler formülü C₇H₁₅N₅O₄-HCl, molekül ağırlığı 269,7 kDa olan biyoaktif bir moleküldür. Yüksek sıcaklıklara, asidik ve bazik pH'a dayanıklı olan bu inhibitörün suda çözünürlüğü 50 mg/kg. dır [38]. L- NAME (SCBT- sc-200333A) kristal bir katı olarak temin edilip, -20° C' de saklanarak, uygulama yapılacağı zaman 15 mg/kg ve 30 mg/kg olacak şekilde serum fizyolojik içinde çözdürülerek [39], her deneme için taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti uygulamaya kadar olan süre içerisinde -20° C'de tutulmaya devam edilmiş, uygulama sırasında eritilerek yumurtaya hemen enjekte edilmiştir.

3.2.2. Deney grupları ve uygulamalar

Deney gruplarımız;

- **Kontrol grubu** (hiçbir uygulama yapılmamıştır),
- **Sham grubu** (0,15 ml serum fizyolojik uygulanmıştır),
- **Düşük doz uygulama grubu** (15 mg/kg L-NAME uygulanmıştır),
- **Yüksek doz uygulama grubu** (30 mg/kg L-NAME uygulanmıştır) olarak belirlendi.

Tablo 3.2.2.1. Deney grupları, uygulama günleri ve yumurta sayıları

Uygulamanın yapılacağı günler	Gruplar				
	Kontrol Grubu	Deney Grubu			Her grup için olası tekrar sayısı
		Sham	L-NAME		
			15 mg/kg	30 mg/kg	
4. Gün	10	10	10	10	+5
5. Gün	10	10	10	10	+5
6. Gün	10	10	10	10	+5
7. Gün	10	10	10	10	+5

Hedeflenen güne ait deney grubu yumurtaları, ışığa tutularak embriyo varlığı ve gelişimi doğrulandıktan sonra %70'lik alkolle dezenfekte edilip, yumurtanın hava boşluğuna yakın bölgesinde bir pencere açılarak insülin iğnesi (30G) ile 150 µl' lik çözeltiler (Serum fizyolojik, L-NAME) yumurta besin maddesine enjekte edilmiştir. Kontrol ve deney gruplarına ait yumurtaların aynı anda aynı ortam şartlarında olması ve kendi içinde karşılaştırmanın daha kolay yapılabilmesi için uygulamaların gün bazında yapılması planlanmıştır. Her bir uygulamadan 24 saat sonra embriyolar çıkarılarak elde edilen dokular serum fizyolojik (% 0,9' luk NaCl₂) ile temizlenmiş ve %10' luk formalin solüsyonunda tespit edilmiştir.

Fiksasyonu takiben 5. ve 6. güne ait embriyolar total, 7. ve 8. güne ait embriyolardan karaciğer dokusu disseksiyonu yapılarak artan alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildi, ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 µm' lik kesitler alınarak normal ve lizinli lamlara yayıldı. Normal ve histopatolojik bulguları belirlemek için; Hematoksilen-Eozin (SCBT, sc-24973) ile tüm gruplara ait eNOS-iNOS dağılımını belirlemek için immunohistokimya boyamaları yapıldı.

3.3. Histolojik Boyama

Kesitler ksilol ile deparafinize edilip, azalan alkol serilerinden geçirilerek hematoksilen ile boyandı. Ardından akarsuda yıkanıp eozin ile boyanarak, artan alkol serisinden geçirilip ksilol ile şeffaflaştırılarak entellan ile kapatıldı (Tablo 3.3.1).

Tablo 3.3.1. Rutin Heamtoksilen-Eozin boyama prosedürü

Madde	Süre
Etüv (60°C)	1 gece
Ksilen I	30 dk.
Ksilen II	30 dk.
% 95 alkol	2 dk.
% 80 alkol	2 dk.
% 70 alkol	2 dk.
% 60 alkol	2 dk.
Akar su	5 dk.
Hematoksilen	5 dk.
Akar su	5 dk.
Asit alkol	2-3 sn.
Eosin	1 dk.
Akar su	5 dk.
% 80 alkol	1 dk.
% 96 alkol	1 dk.
Ksilen çıkış	1 sa.
Entellan	Kapatma

3.4. İmmunohistokimyasal Boyama

İmmunohistokimyasal olarak, eNOS (SCBT, sc-654), iNOS (SCBT, sc-651), immunohistokimyası uygulandı [40-42].

Tablo 3.4.1. eNOS ve iNOS immünohistokimya protokolü

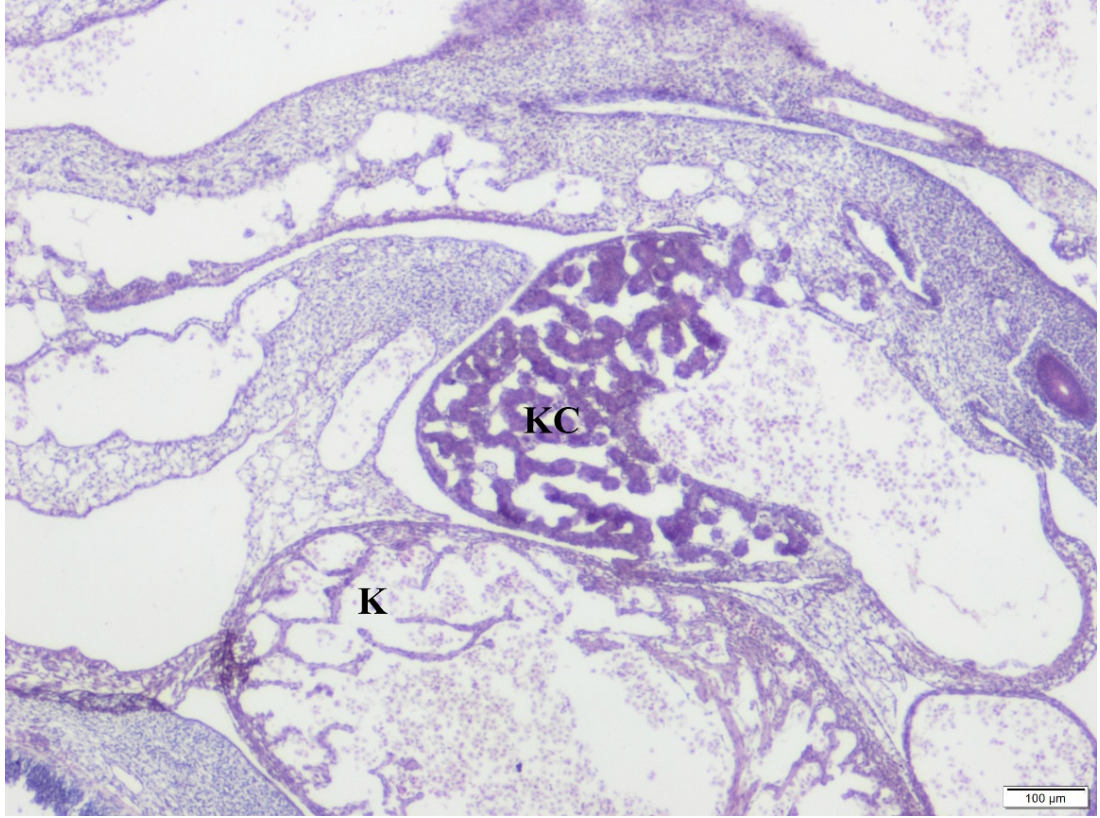
Madde	Süre
Etüv (60°C)	1 gece
Ksilen	30 dk.
Ksilen	30 dk.
% 95 alkol	2 dk.
% 80 alkol	2 dk.
% 70 alkol	2 dk.
% 60 alkol	2 dk.
Distile su	10 dk.
Dakopen	
PBS	3 x 5 dk.
%3'lük hidrojen peroksit	5 dk.
PBS	3 x 5 dk.
Blok solusyonu	1 sa.
iNOS, eNOS	1 gece, +4°de
PBS	3 x 5 dk.
İkincil antikor	30 dk.
Avidin-biotin kompleksi	30 dk.
PBS	3 x 5 dk.
DAB	5 dk
Distile su	10 dk.
Mayer hematoksilen	5 dk.
%80- %90'luk alkol serileri	2 dk.
Ksilen	30 dk.
Entellan	

Hazırlanan preparatlarda karaciğer doku örnekleri Olympus (BX 53) aydınlık alan mikroskopunda incelenerek Olympus (SC50) kamera ile fotoğrafları çekildi ve değerlendirildi.

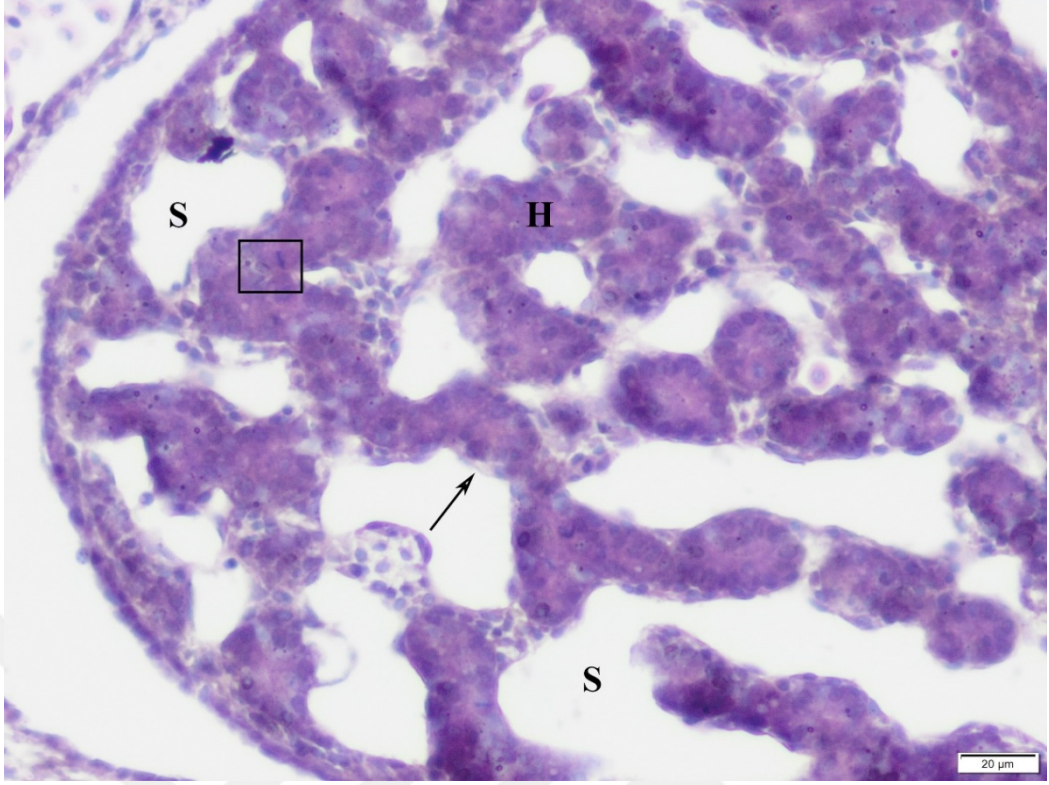
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kontrol ve Sham Grubu Bulgular

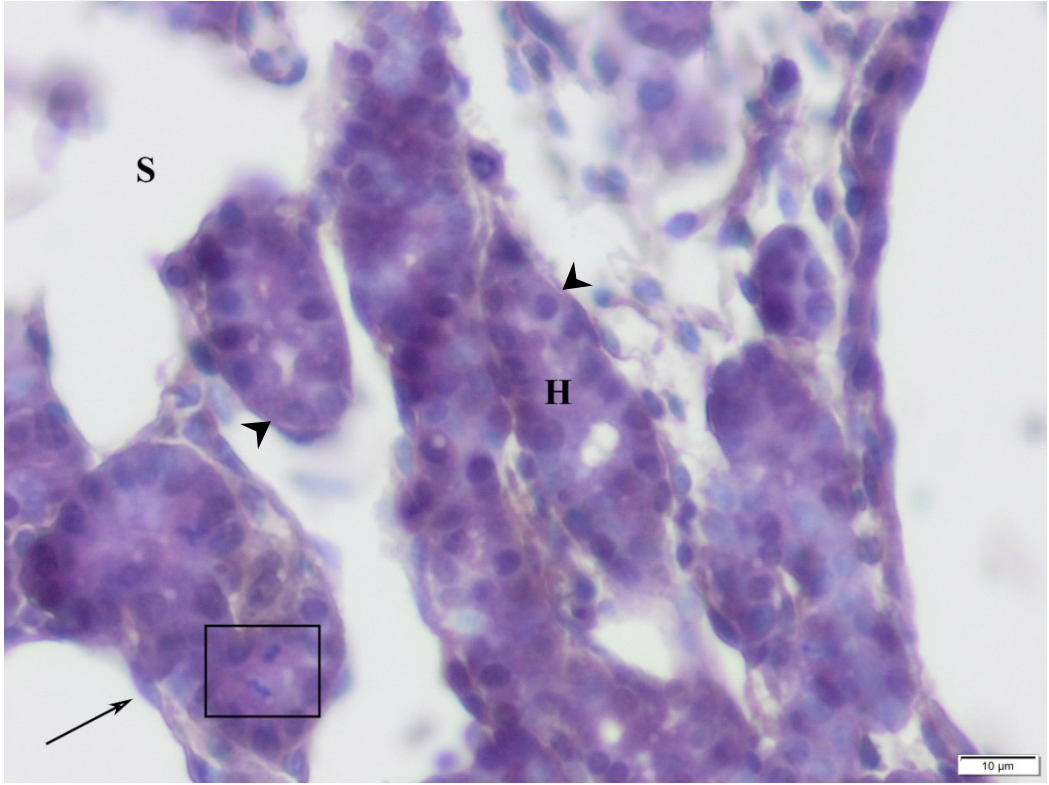
Tavuk gelişiminin 5. Gününde (HH evre 26) karaciğerin orta barsağın ventralinde, kardio-hepatik bölgede kalp ile yakın ilişkili olarak şekillendiği gözlenmiştir (Şekil 4.1.1). Hepatositleri oluşturacak olan hücreler gevşek bir biçimde organize edilmiştir. Sinüzoidlerin oluşmaya başladığı gözlenmiştir. Sinüzoidlerin lümeninde kan hücreleri, duvarlarında ise endotel hücreleri izlenmektedir (Şekil 4.1.2). Hepatositler kübik veya alçak prizmatik şeklinde olduğu dikkati çekmiştir. Sinüzoidler arasında kümelenen hepatositler dendriform şeklinde yayılarak karaciğer parankimasını oluşturmuştur. Ayrıca mitoz geçiren hepatositlere rastlanmıştır (Şekil 4.1.3).



Şekil 4.1.1. 5 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. Karaciğer (KC), kalp (K). H&E

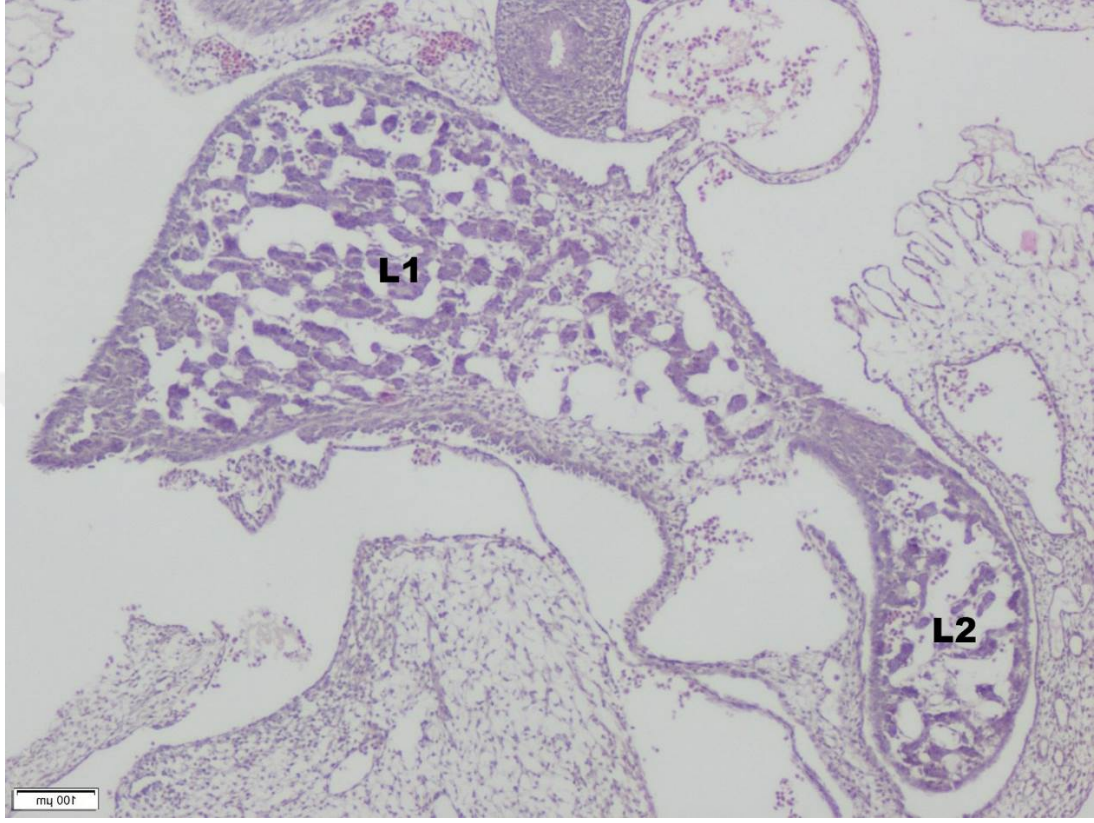


Şekil 4.1.2. 5 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. Hepatosit kümeleri (H), endotel hücresi (→), sinüzoidler (S), mitoz (□), H&E

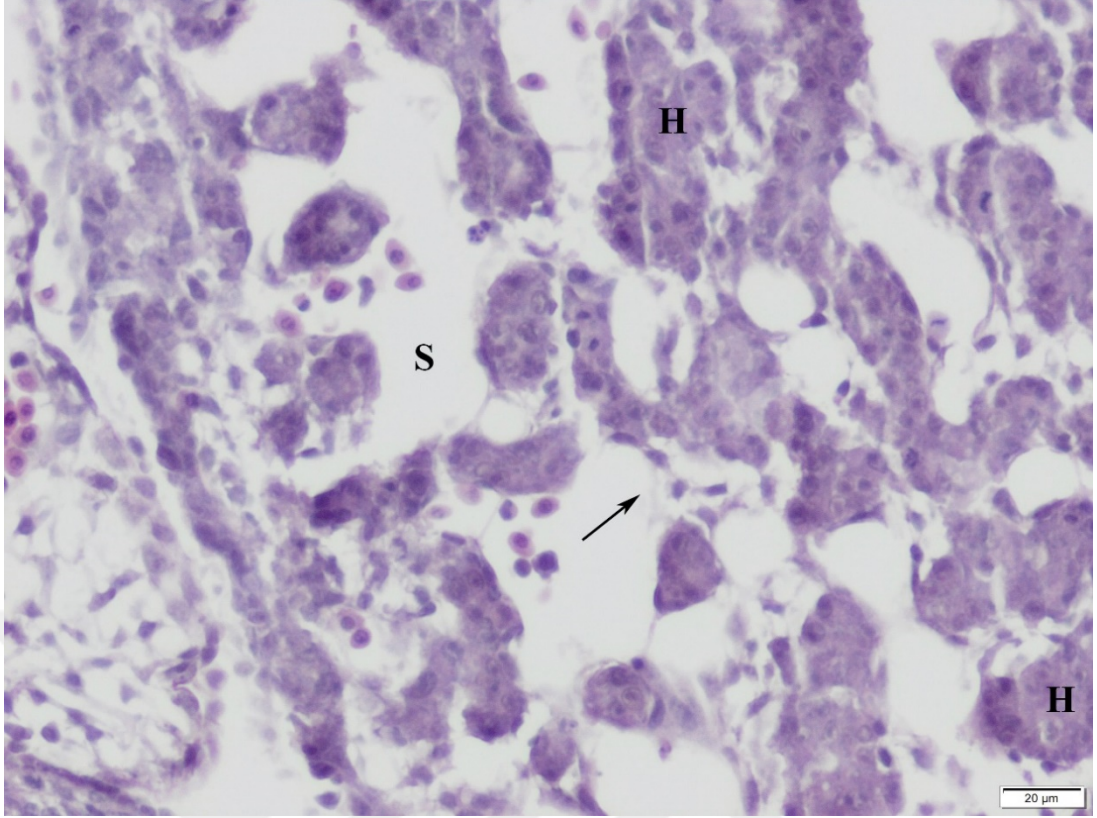


Şekil 4.1.3. 5 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. Kübik ve alçak prizmatik hepatositler (▷). Hepatosit kümeleri (H), Sinüzoid (S), Endotel (→), Mitoz (□), H&E

Tavuk gelişiminin 6. gününde (HH evre 28) 2. lobun oluştuğu (Şekil 4.1.4) ve hepatositlerin sıkı bir biçimde organize hale geldiği gözlemlendi. Bu duruma kan hücreleri ve sinüzoidal boşluklardaki artışın eşlik ettiği belirlendi. Sinüzoidal boşlukları döşeyen endotel hücreleri de belirgin bir şekilde dikkati çekmektedir (Şekil 4.1.5).

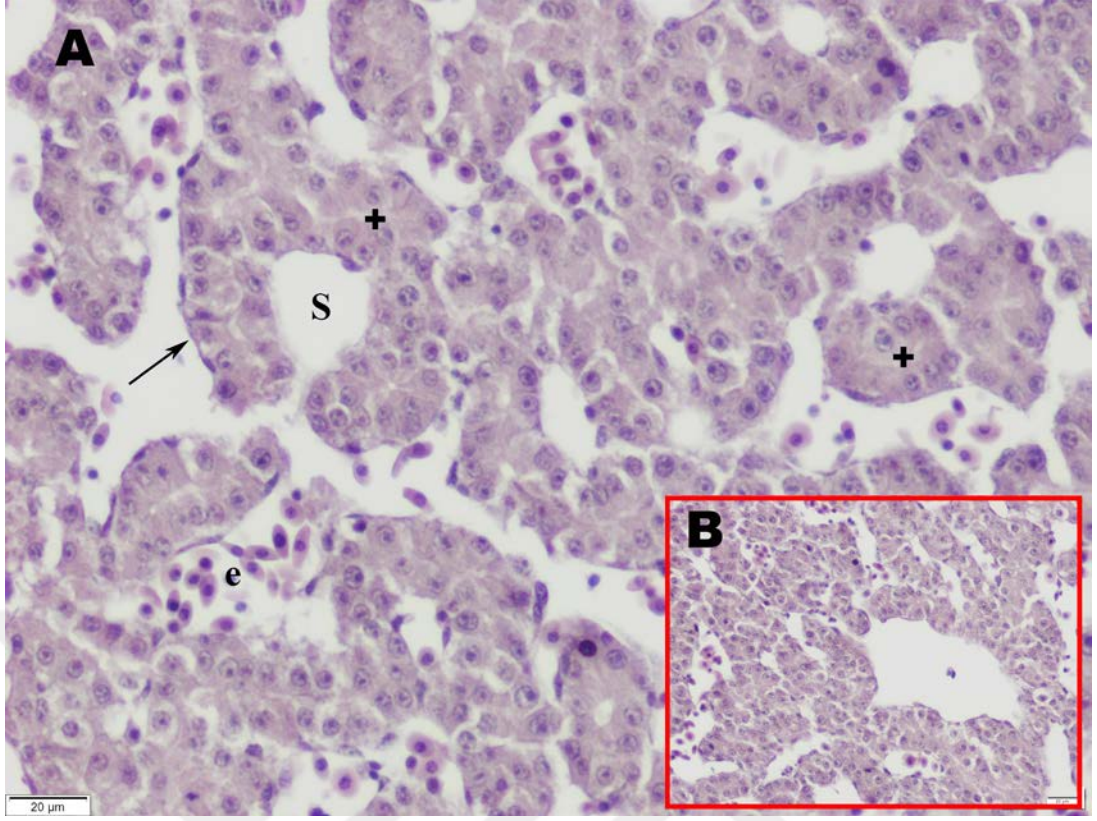


Şekil 4.1.4. Embriyonik gelişimin 6. gününde lob oluşumu. 1. Lob (L1), 2. lob (L2), H&E



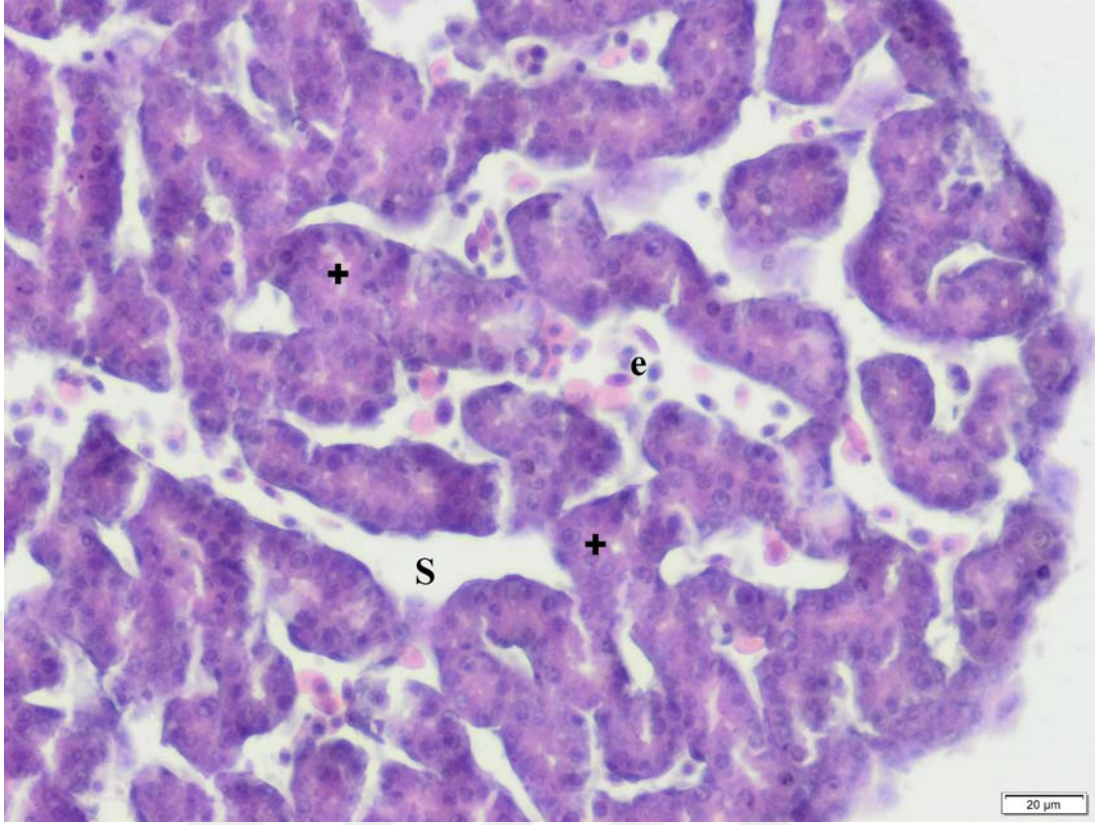
Şekil 4.1.5. Embriyonik gelişimin 6. gününde hepatositler sıkı bir biçimde organize olmuş ve sinüzoidlerin (S) sayısı artmıştır. Hepatosit kümeleri (H), endotel (→), H&E

Gelişimin 7. gününde hepatositlerin sayıca arttığı, sinüzoidlerin lümeninde şekillenmiş kan hücrelerinin, duvarlarında ise endotel hücrelerinin belirgin bir şekilde yer aldığı izlenmiştir (Şekil 4.1.6 A). Hepatositlerin dendriform biçimde yayılarak karaciğer parankimasını oluşturduğu, sinüzoidlerin vena centralis bölgesinden ışınım şeklinde düzenlenim göstermeye başladığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.1.6 B). Bu dönemde hepatositlerin kübik veya alçak prizmatik biçim kazandıkları belirlendi.



Şekil 4.1.6. 7 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. (A) Dendriform biçimli hepatosit kordonları (+), sinüzoidler (S), Endotel hücreleri (→), eritrositler (e). (B) vena centralis (VC). H&E

Gelişimin 8. günü gelişimin 7. gününe benzerdir (Şekil 4.1.7). Bu günden itibaren organogenez tamamlanır ve büyüme evresi başlar.



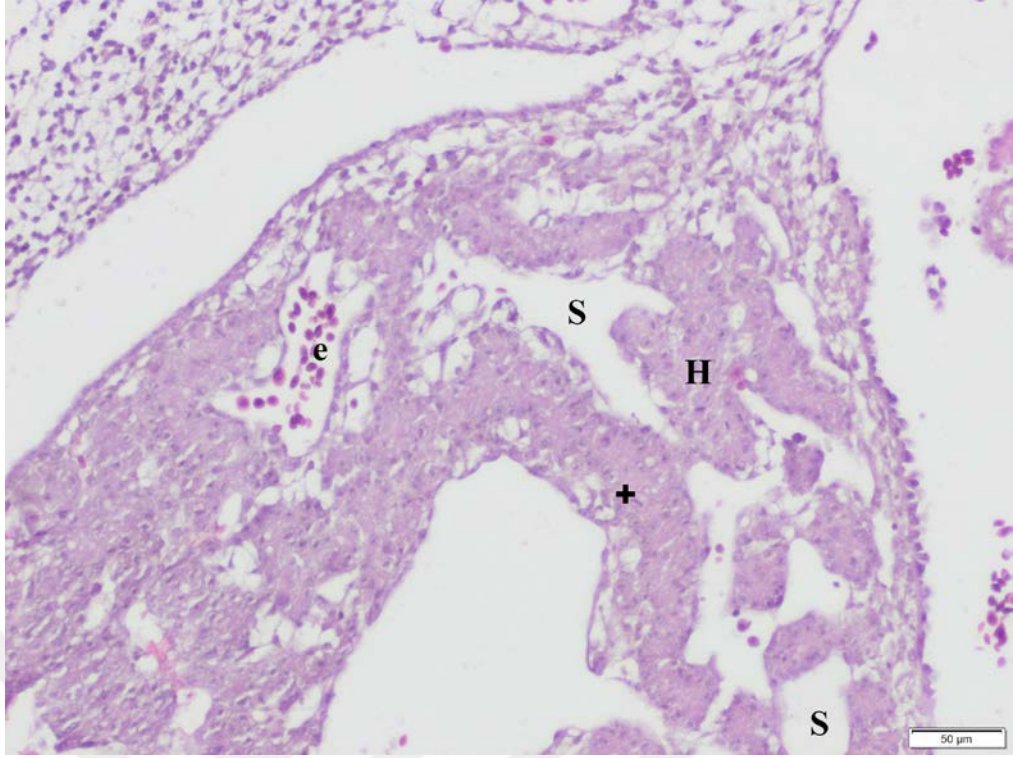
Şekil 4.1.7. 8 günlük tavuk embriyosu karaciğer dokusu. Sinüzoidler (S), eritrositler (e), hepatosit kordonları (+). H&E

4.2. Uygulama Grubu Bulguları (15-30 mg/kg)

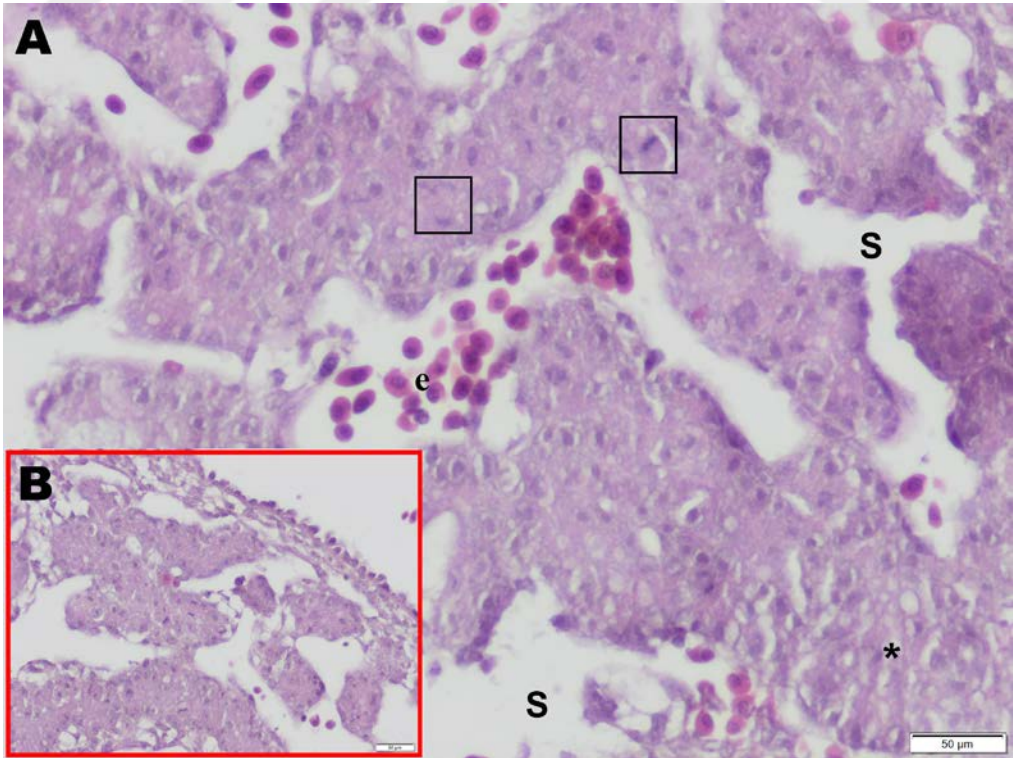
Tüm uygulama gruplarında embriyonik karaciğerin hepatik kavite içerisinde normal pozisyonunda geliştiği gözlemlendi.

15 mg/kg L-NAME uygulanmış, embriyonik gelişimin 5. gününde karaciğer dokusunda; sinüzoidlerde genişleme, hücresel düzende ve hepatosit dizilimlerinde (Şekil 4.2.1) bozulmalara rastlandı. Hücrelerde vakuolizasyon (Şekil 4.2.2), hücre bölünmesinde artış (Şekil 4.2.3) ve nekrotik alanların varlığı izlendi (Şekil 4.2.1). Karaciğer dokusunun periferinde hepatositlerin, kordonları oluşturmak için birkaç hücre topluluğu şeklinde yerleştiği, lobun merkezine doğru ise yoğun hücre kümeleri şeklinde düzenlendiği belirlendi (Şekil 4.2.1).

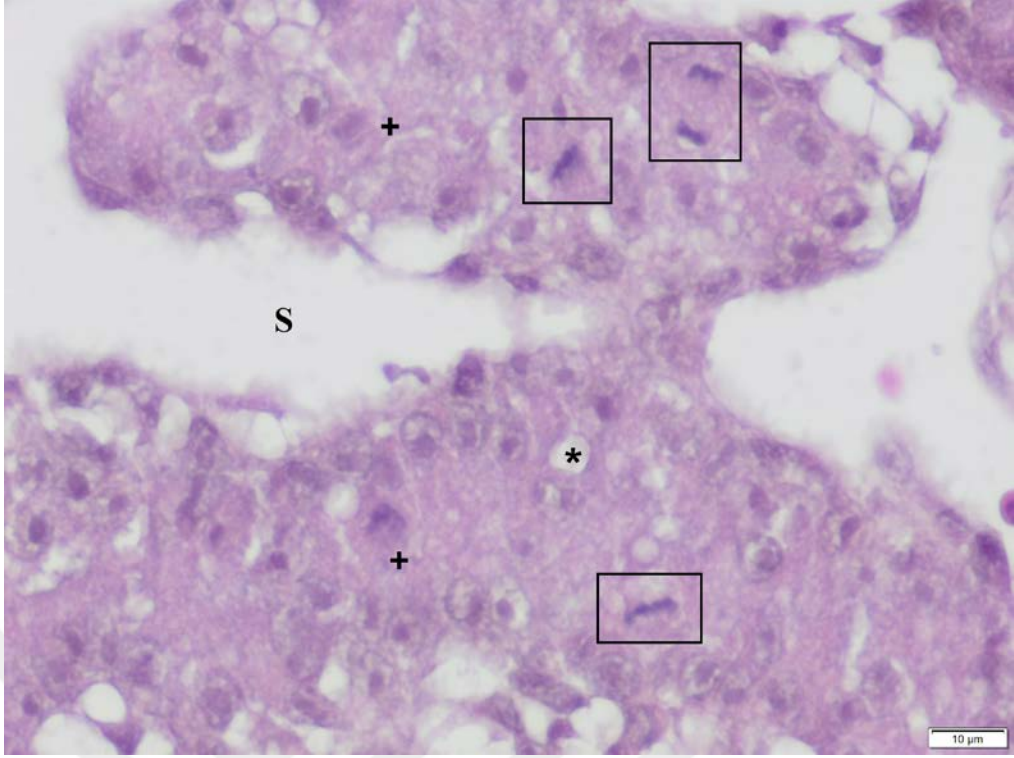
30 mg/kg L-NAME uygulanmış, embriyonik gelişimin 5. gününde karaciğer dokusunda; hepatositlerin arttığı, kordonları oluşturmak üzere düzenlendiği, fakat hücre kümeleri şeklinde yığıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.2.4). Hepatositlerde ileri derece vakuolleşme ve deforme olmuş nükleuslar dikkat çekmektedir (Şekil 4.2.5). Sinüzoidlerin kan hücreleri yönünden yoksun olduğu, az da olsa sitoplazmik uzantılara sahip eozinofilik hücrelerin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.6).



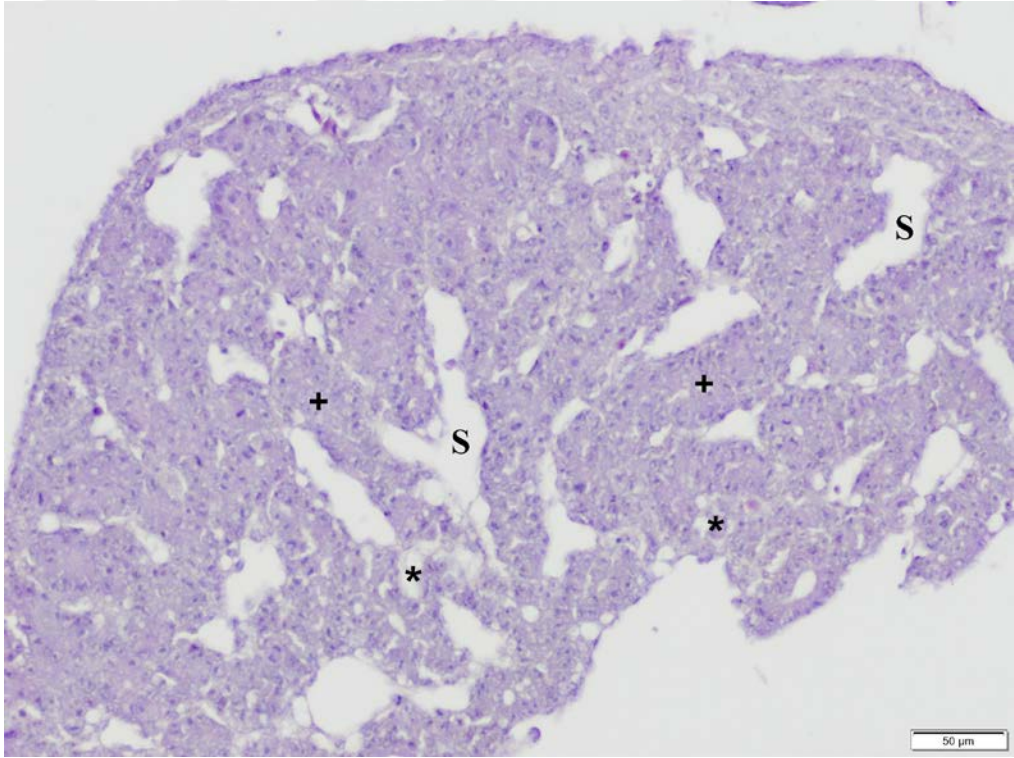
Şekil 4.2.1. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Hepatosit kümelerinde (H) ve hepatosit kordonlaşmada (+) bozulma. Sinüzoid (S), eritrosit (e). H&E



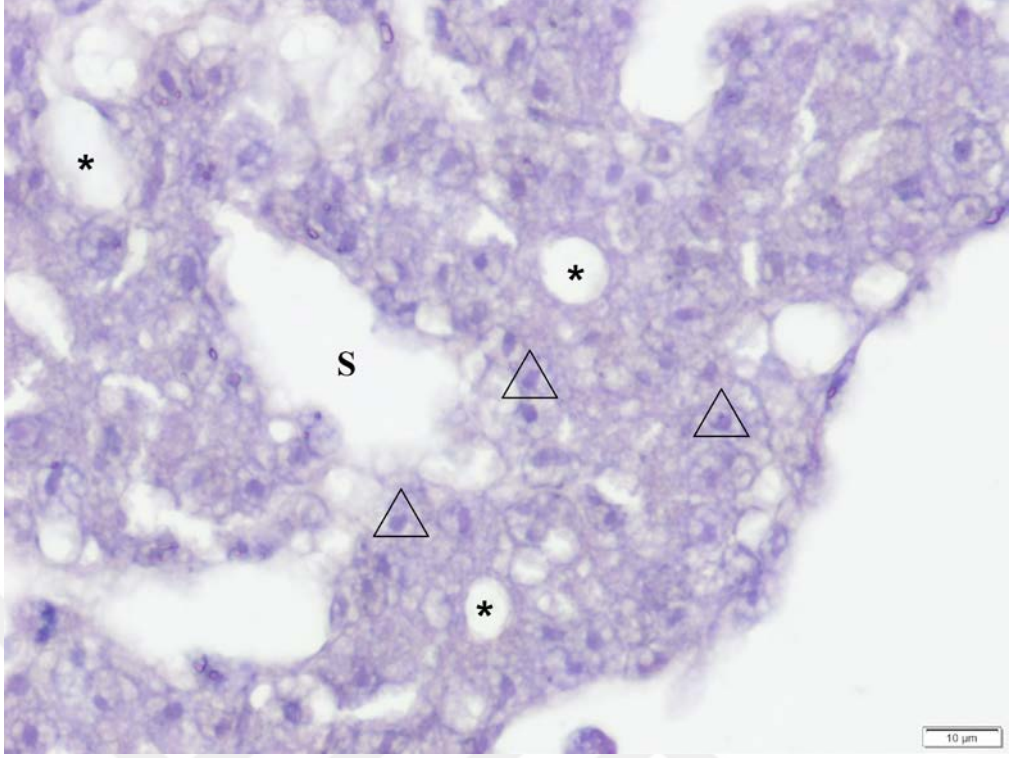
Şekil 4.2.2. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Düzeni bozulmuş hepatosit kordonları (B) ve hücrelerde vakuolleşme (*) (A). Sinüzoidler (S), eritrositler (e), mitoz (□), H&E



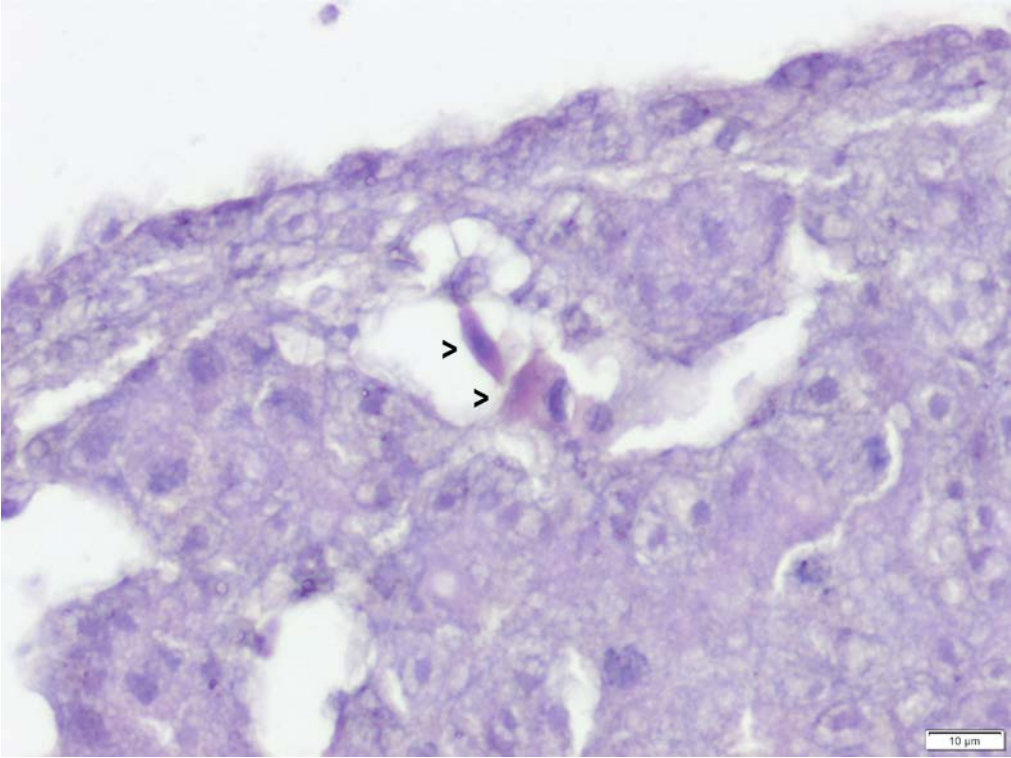
Şekil 4.2.3. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Mitoz (□), sitoplazmik vakuolizasyon (*), sinüzoidler (S), hepatosit kordonlarında (+) bozulma. H&E.



Şekil 4.2.4. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Hepatosit kordonlaşmasında (+) ve sitoplazmik vakuolizasyonda (*) artış. Sinüzoidler (S). H&E.

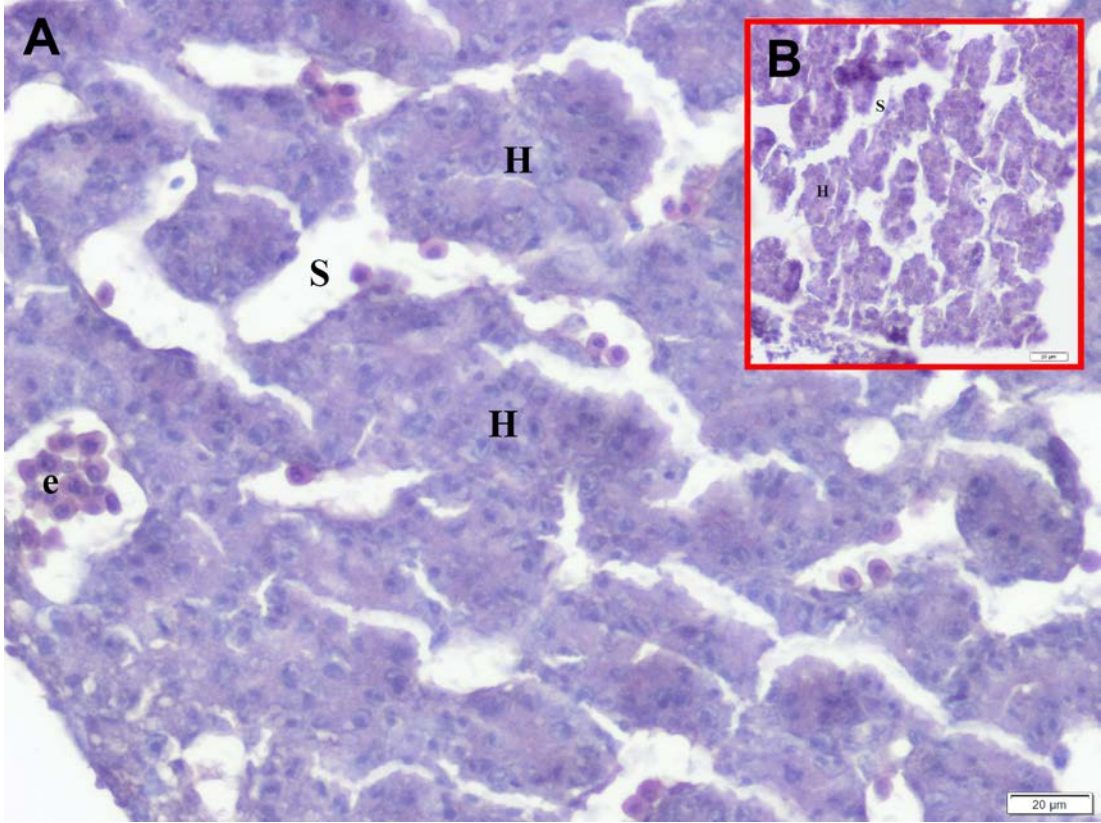


Şekil 4.2.5. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Sitoplazmik vakuoller (*) ve şekilleri deforme olmuş nükleuslar (Δ), sinüzoid (S). H&E.

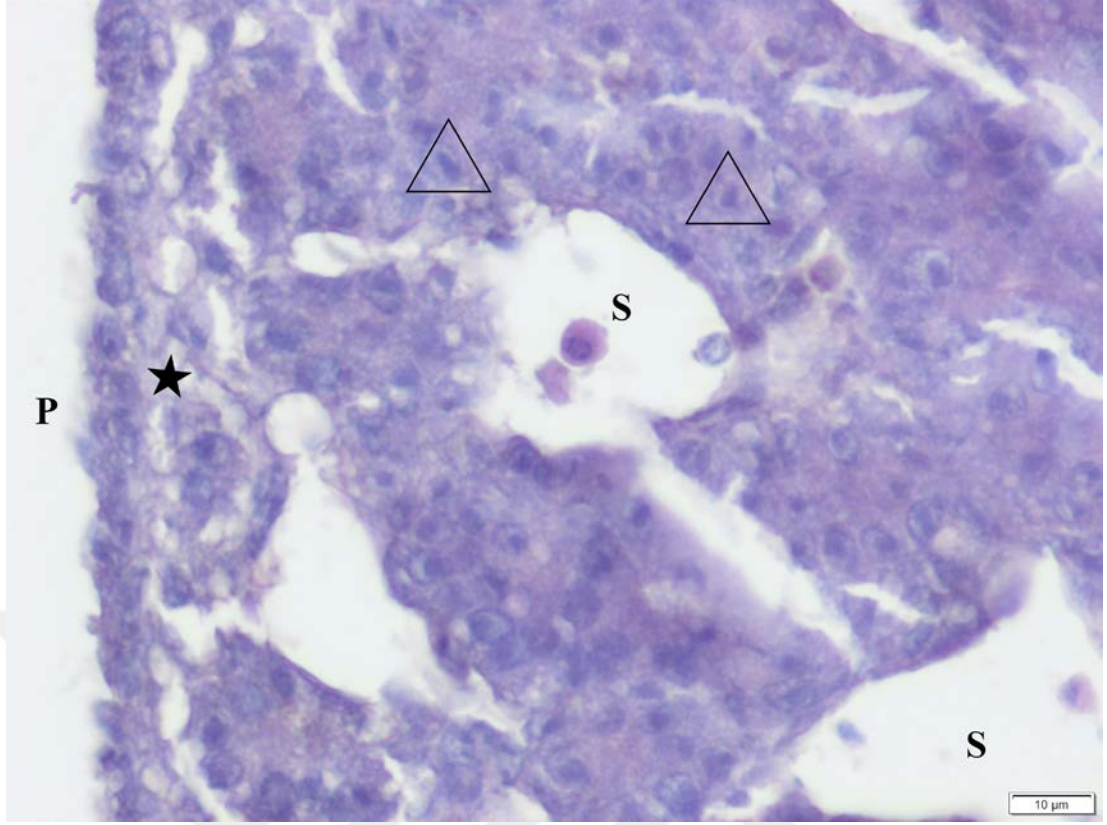


Şekil 4.2.6. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E5). Eozinofilik hücreler (>). H&E.

15 (Şekil 4.2.7 B) ve 30 mg/kg (Şekil 4.2.7 A) L-NAME uygulanmış, embriyonik gelişimin 6. günündeki karaciğer dokusunda; hepatositlerin kordonları oluşturmak üzere düzenlenim gösterdiği, fakat hücre kümeleri şeklinde yığıldığı gözlenmiştir. Uygulamaya bağlı olarak hücre ve nükleus morfolojisinde bozukluklar dikkati çekmektedir. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış grupta karaciğer periferinde bazı bölgelerde nekrotik alanlar gözlenmektedir (Şekil 4.2.8).

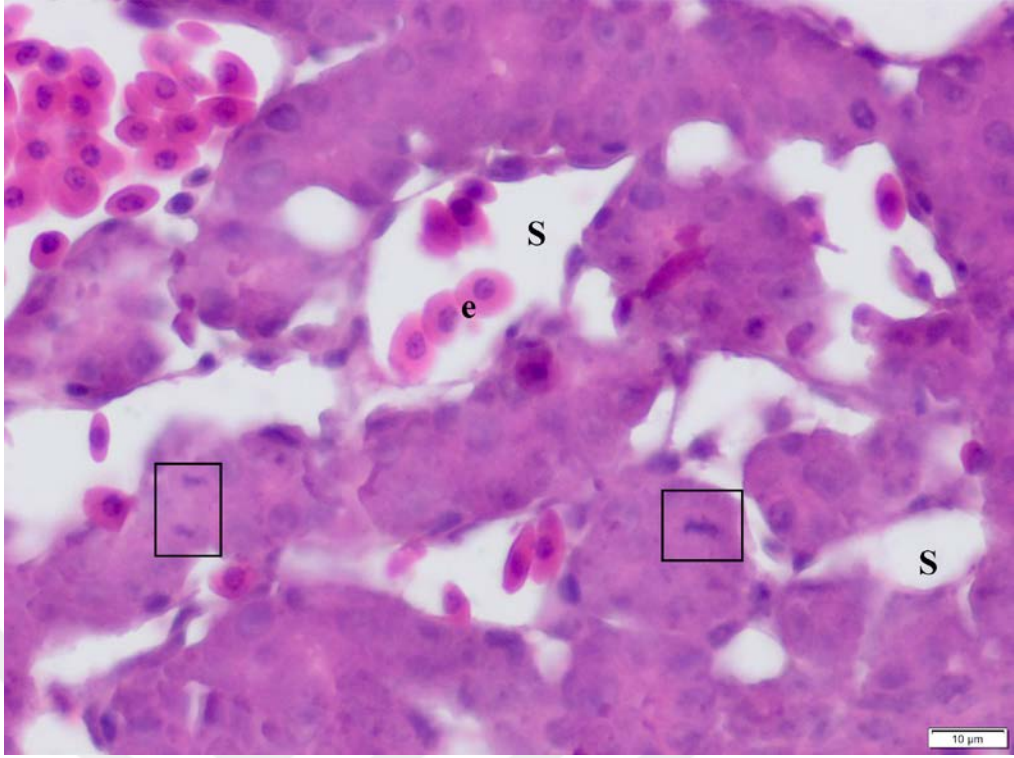


Şekil 4.2.7. 15 mg/kg (B) ve 30 mg/kg (A) L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E6). Kümeler halinde hepatosit birikimi (H). Sinüzoidler (S), eritrosit (e), H&E.

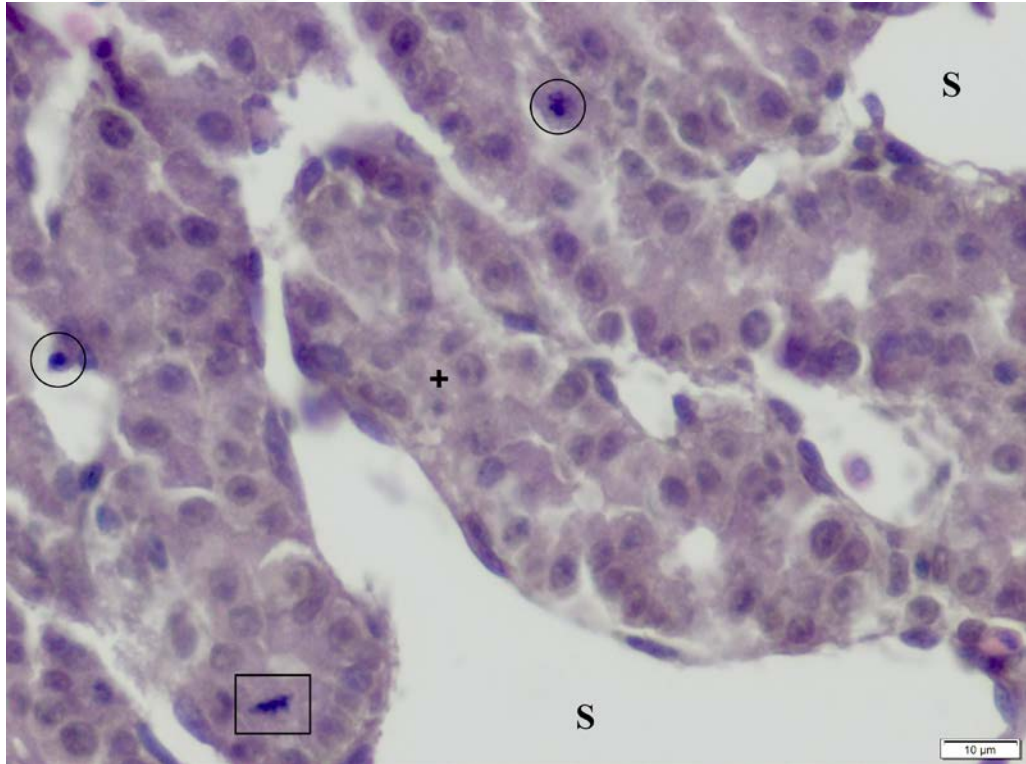


Şekil 4.2.8. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E6). Nekrotik alanlar (★) ve morfolojisi bozulmuş nükleuslar (Δ),sSinüzoidler (S), periferik alan (P). H&E.

7. gün 15 ve 30 mg/kg L-NAME uygulanmış gruplar kontrol ile karşılaştırıldığında çok fazla histolojik değişikliğe rastlanmamıştır. Hepatositler dendriform biçimli kordonlar oluşturmuştur. Ancak artan hücre bölünmesi (Şekil 4.2.9) ve piknotik nükleuslar (Şekil 4.2.10) dikkati çekmektedir.

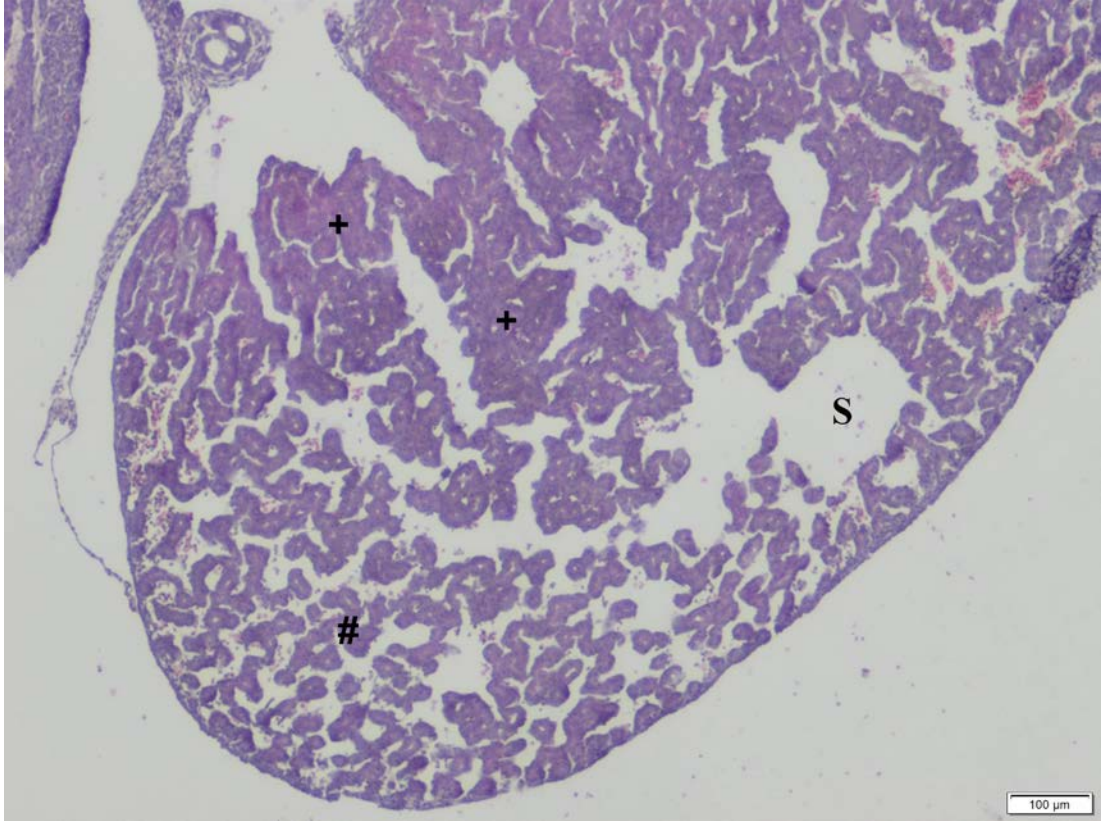


Şekil 4.2.9. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E7). Mitoz (□), eritrositler (e), sinüzoidler (S). H&E.

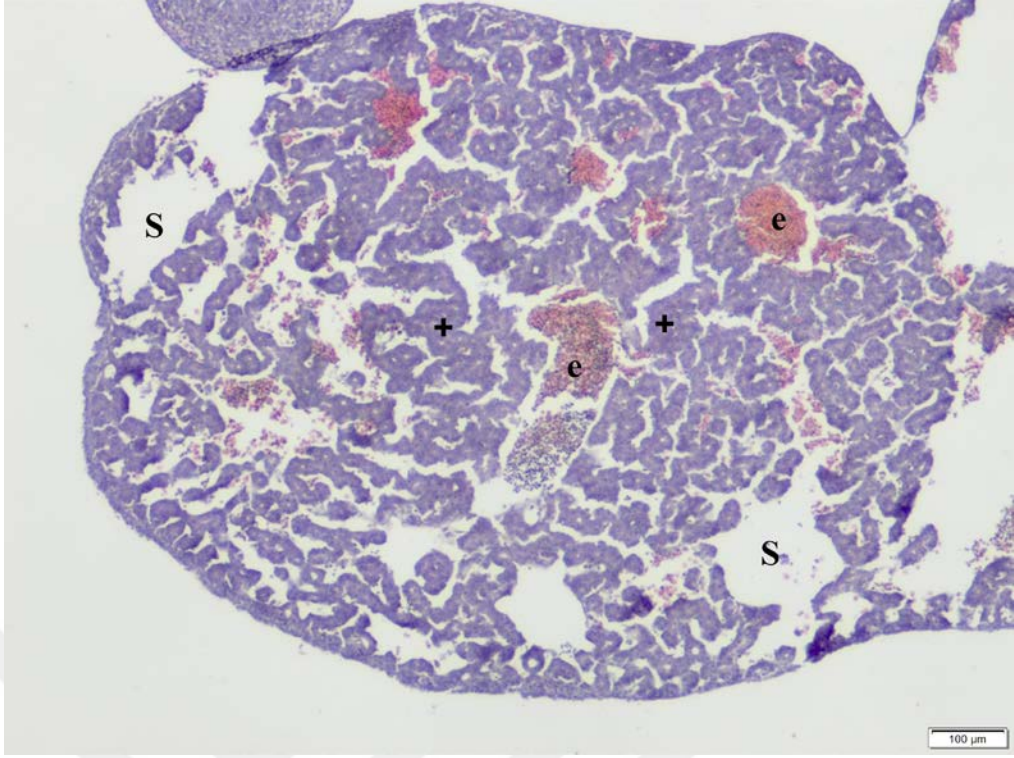


Şekil 4.2.10. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E7). Mitoz (□) ve piknotik nükleus (O), sinüzoid (S), hepatosit kordonları (+). H&E.

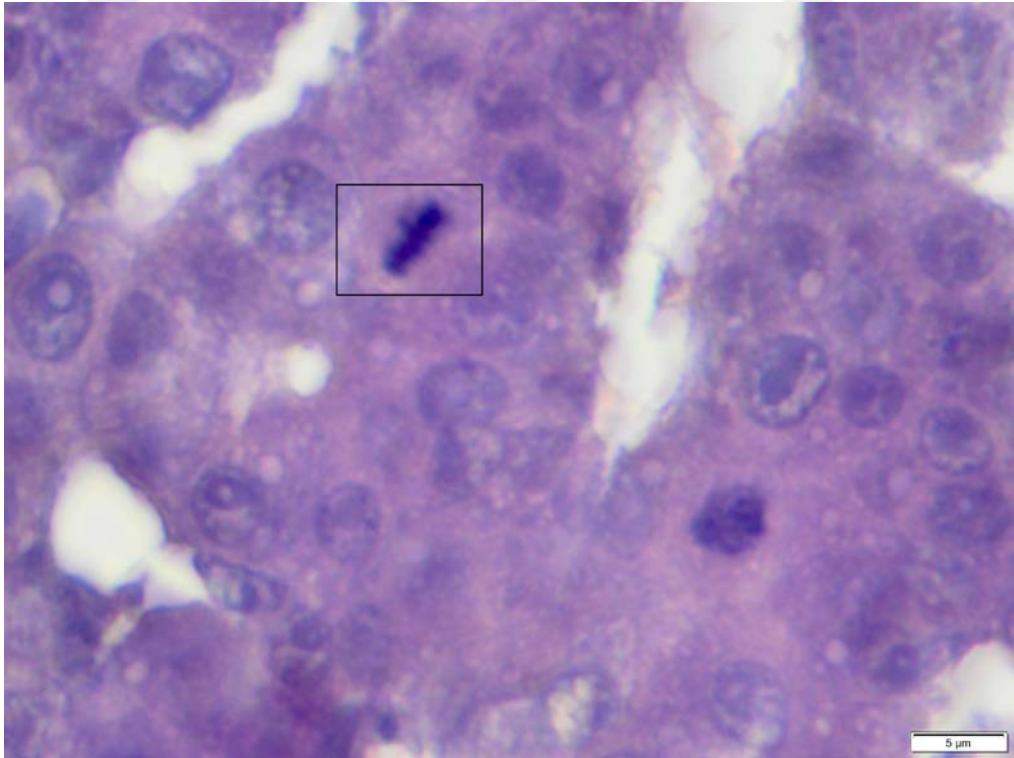
8. gün 15 ve 30 mg/kg L-NAME uygulanmış dokularda periferik bölgedeki sinüzoidlerde genişleme meydana gelmiş ve hepatosit kordonları birbirinden uzaklaşmıştır. İç bölgelerde ise bunun tam tersi bir şekilde hepatosit kordonları içe doğru çökerek birbirleri içine toparlanmışlardır (Şekil 4.2.11). 30 mg/kg uygulama grubunda mitotik hücre sayısında artış, sinüzoidlerde eritrositlerin kümelenmesi görülmüştür (Şekil 4.2.15).



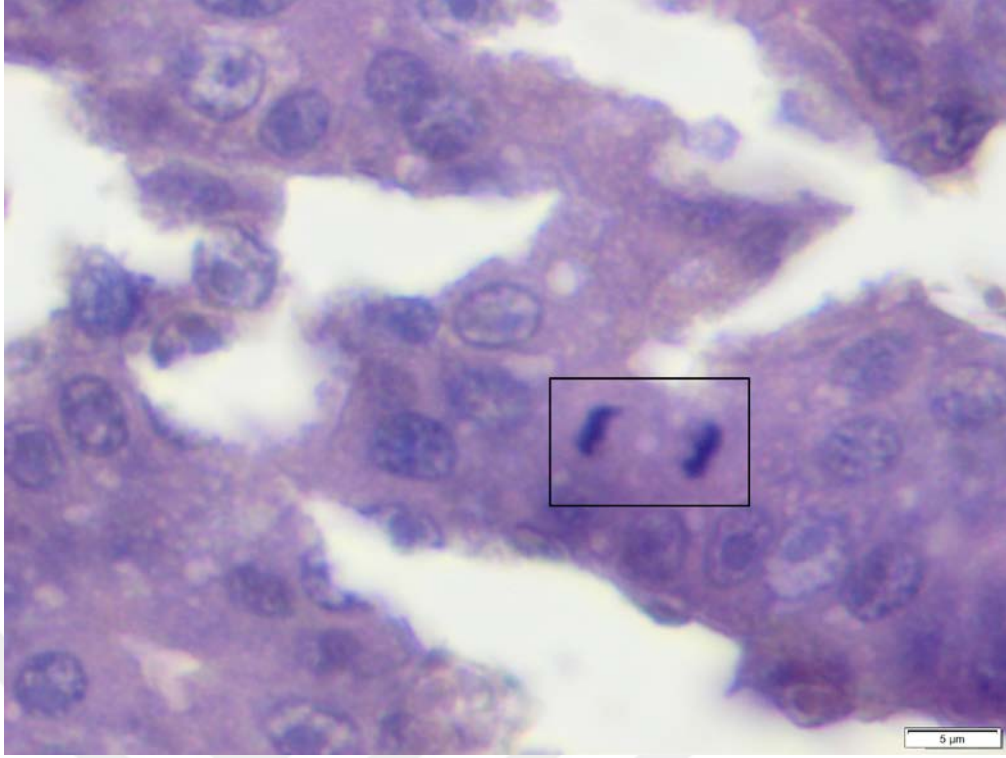
Şekil 4.2.11. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). Periferik alanda hepatik kümelenmeler (#) ve merkeze doğru hepatik kordonlar (+). Sinüzoidler (S). H&E.



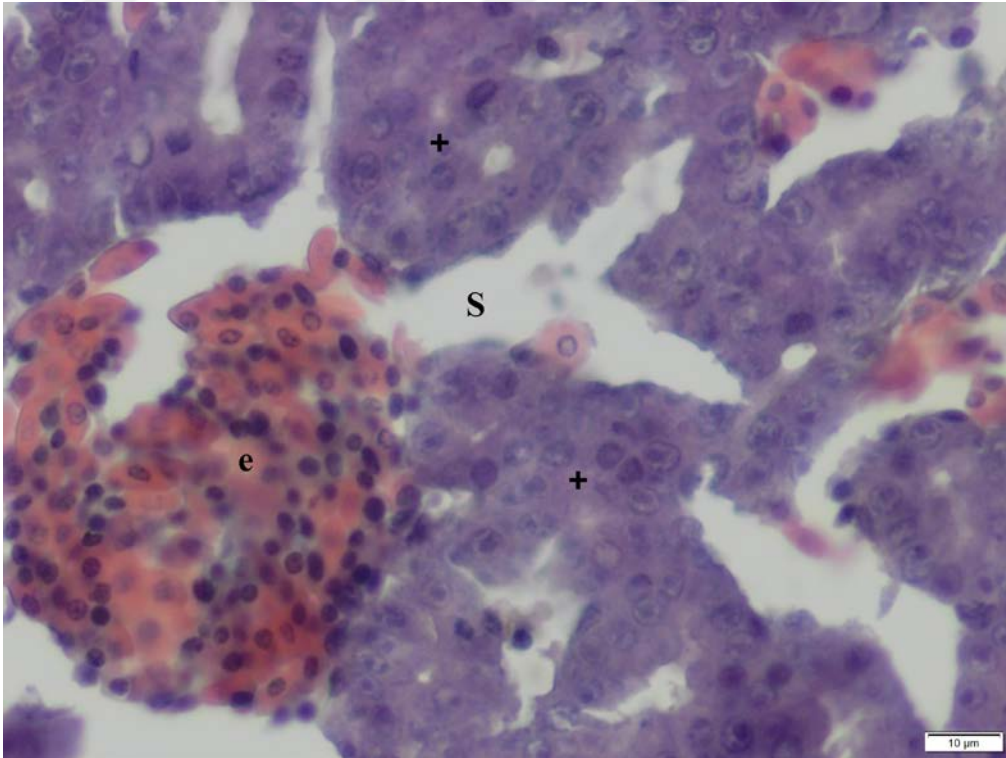
Şekil 4.2.12. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). Sinüzoidler (S) içerisinde yığılma gösteren eritrosit kümeleri (e). Hepatik kordlar (+). H&E.



Şekil 4.2.13. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). Mitoz (□). H&E.



Şekil 4.2.14. 15 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). Mitoz (□). H&E.

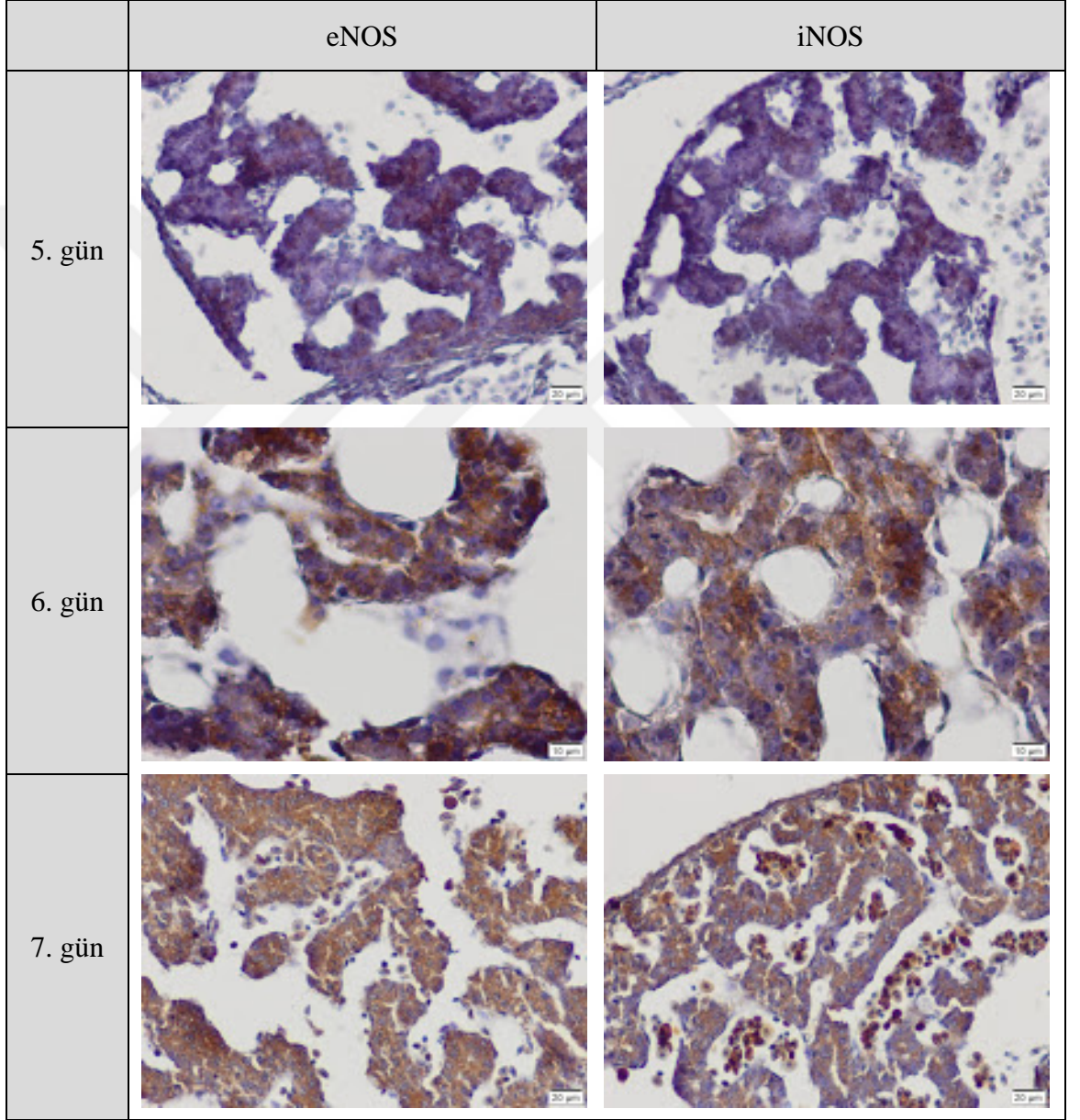


Şekil 4.2.15. 30 mg/kg L-NAME uygulanmış karaciğer dokusu (E8). sinüzoid (S) içerisinde kümelenen eritrositler (e). Hepatik kordonlar (+). H&E.

4.3. İmmünohistokimya Bulguları

4.3.1. Kontrol Grubu eNOS, iNOS Dağılımı

5. günde eNOS ve iNOS immunoreaktivitesinin az da olsa var olduğu ve karaciğer dokusu periferindeki hücrelerde boyandığı gözlemlendi. 6. günden itibaren boyanmanın arttığı, 7. gün de dahil olmak üzere eNOS' un iNOS' a göre daha fazla olduğu dikkat çekti.

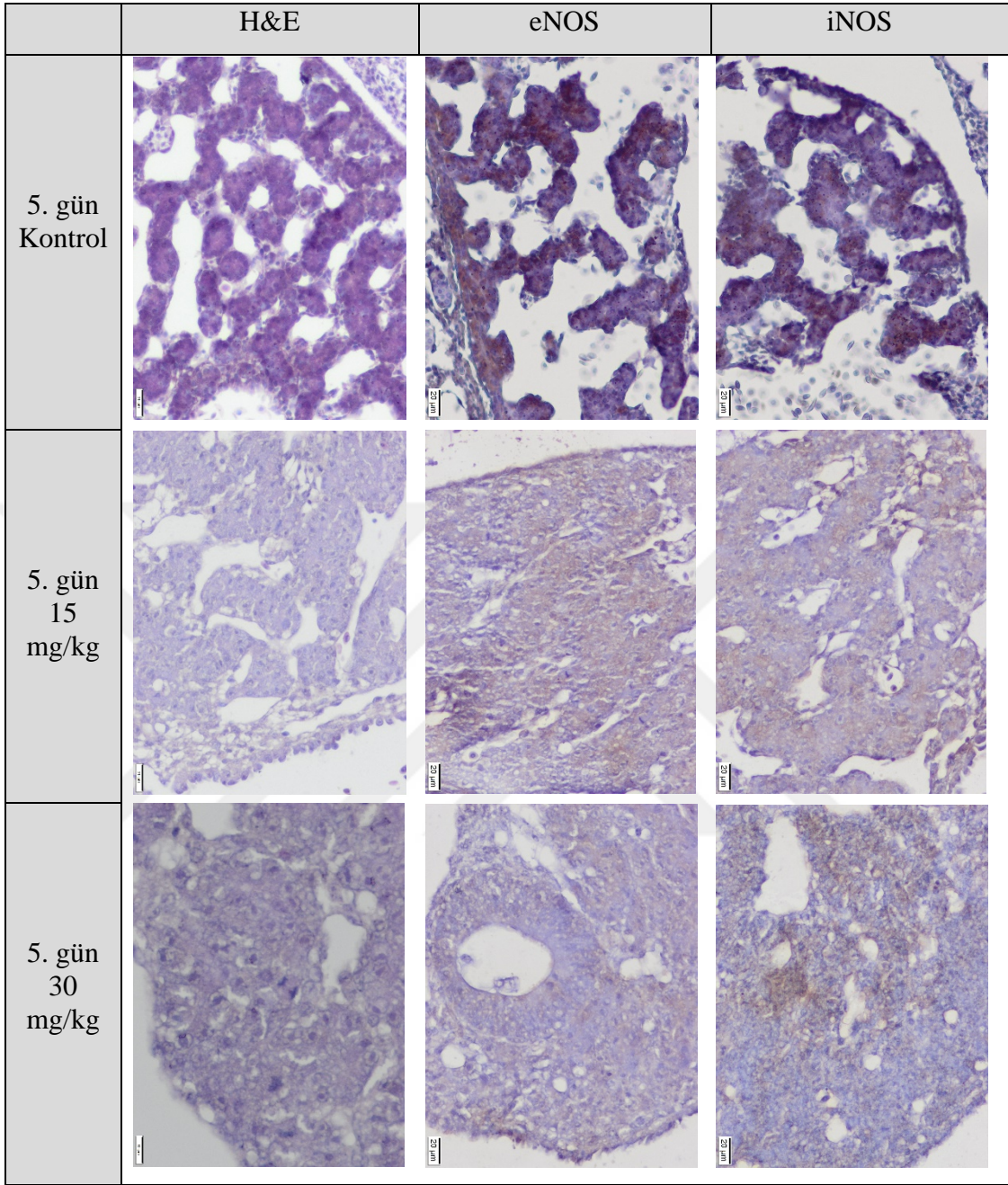


Şekil 4.3.1.1. Kontrol grubu eNOS ve iNOS dağılımları

4.3.2. Uygulama Grubu eNOS, iNOS Dağılımları

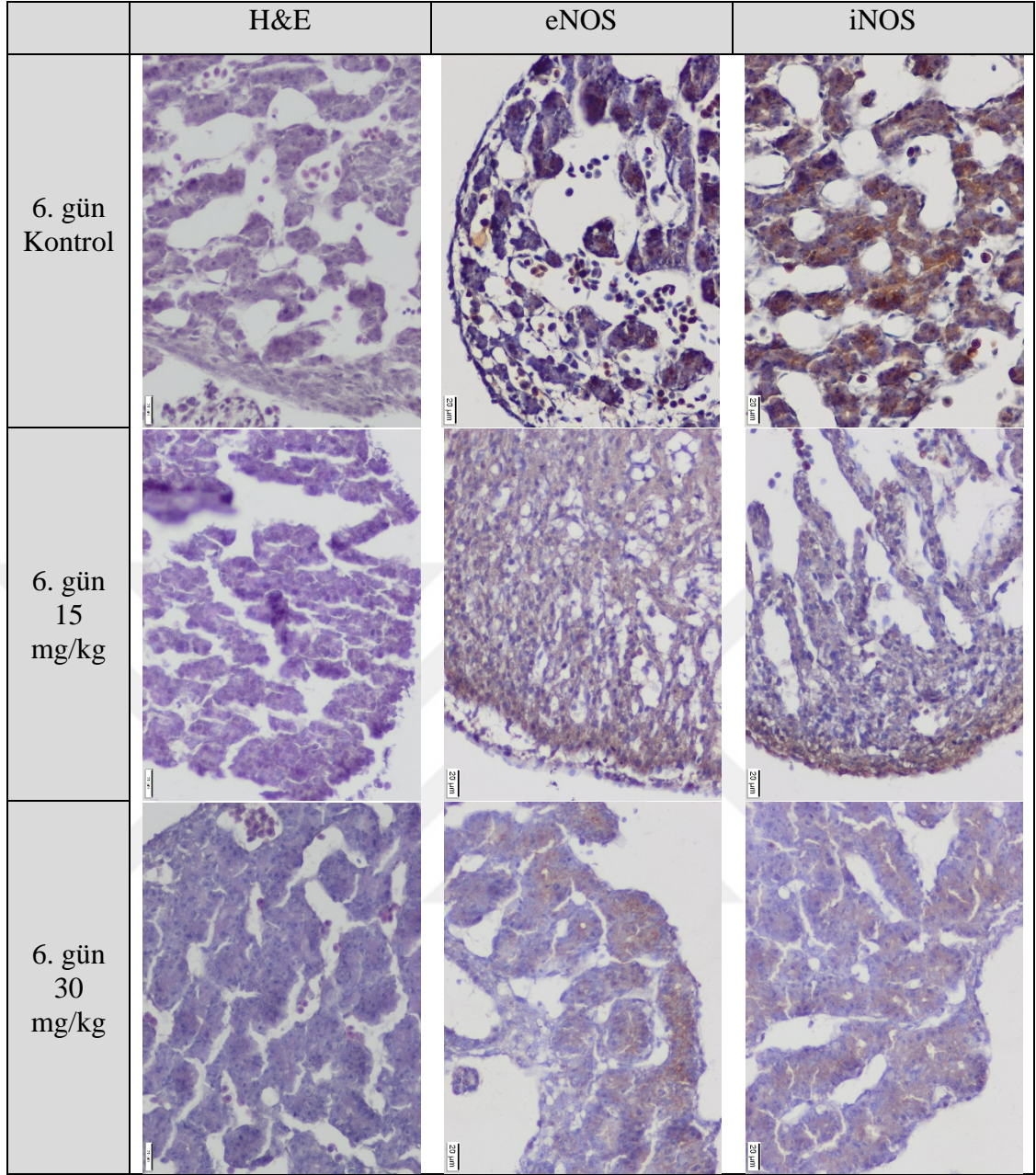
Farklı günlerde 15 mg/kg ve 30 mg/kg L-NAME uygulanmış embriyoların karaciğer dokuları kontrol grubu ile immünokimyasal olarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak:

5. gün 15 mg/kg uygulama grubu İHC bulguları karşılaştırıldığında eNOS ve iNOS ekspresyonlarının kontrole göre azalma gösterdiği, iNOS boyamasının ise eNOS'a göre daha yoğun olduğu görülmüştür. 5. gün 30 mg/kg grubunda ise iNOS boyamasının hepatik kordlar çevresinde yoğun boyama gösterdiği ve eNOS'tan daha yoğun boyandığı bulunmuştur. 5. gün 15 mg/kg grubu 30 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında eNOS boyamasının azalma gösterdiği, iNOS boyamasının 30 mg/kg grubunda belirgin artış gösterdiği görülmüştür.



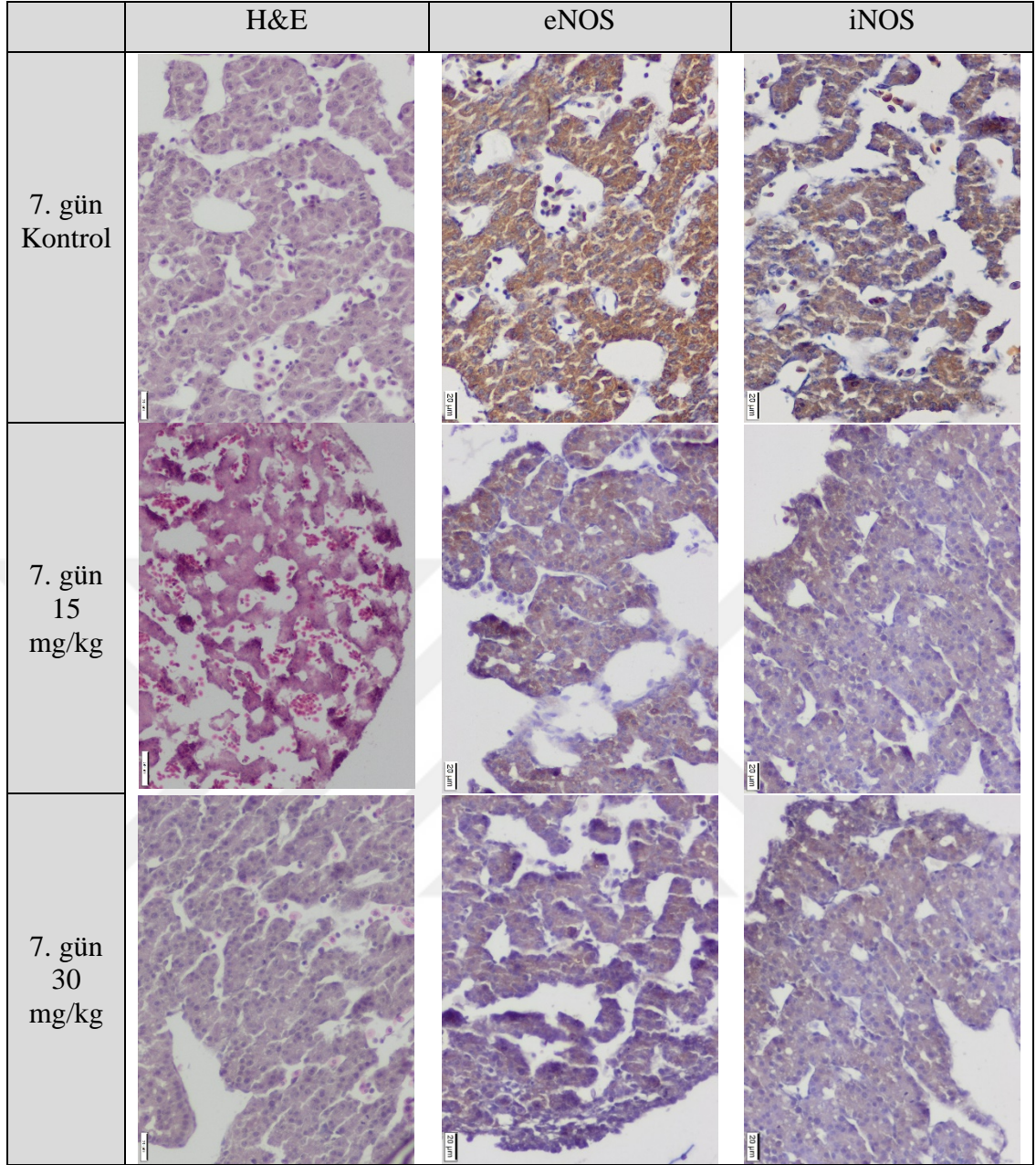
Şekil 4.3.2.2. 5. gün karaciğer kesiti immünohistokimya boyamaları.

6. gün gruplarına bakıldığında 15 mg/kg'da eNOS immünoaktivitesinin genel olarak karaciğerin iç bölgelerinde gerçekleştiği ve bir miktar periferde yoğunlaştığı, iNOS'un ise özellikle perifer kısmında yoğun boyanma gösterdiği bulunmuştur. Aynı günün 30 mg/kg grubu incelendiğinde ise eNOS ve iNOS immünoaktiviteleri 15 mg/kg grubuna göre daha azaldığı ve boyanmanın periferde yoğun olduğu gözlenmiştir.



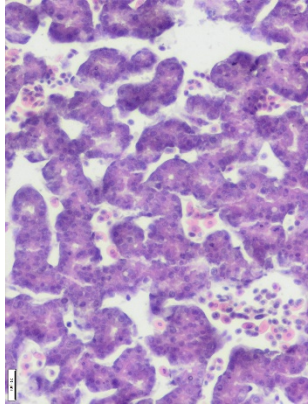
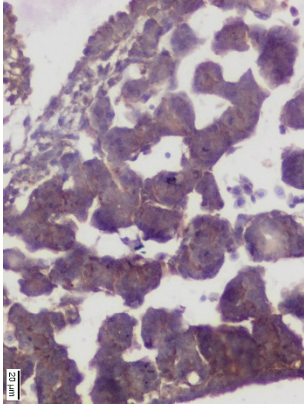
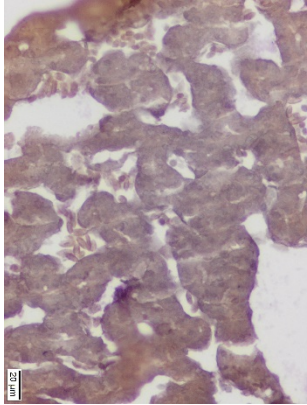
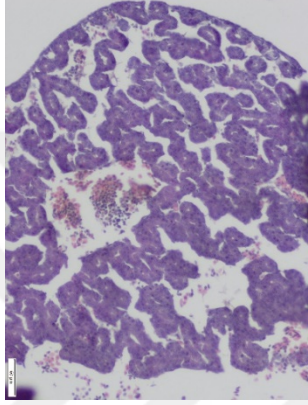
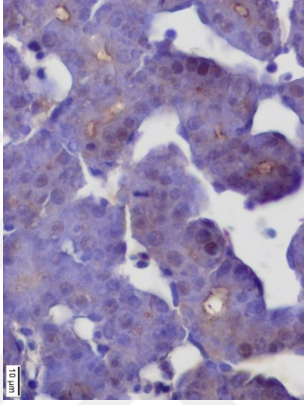
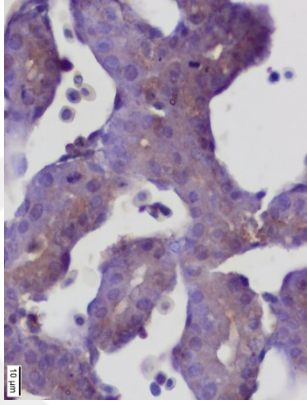
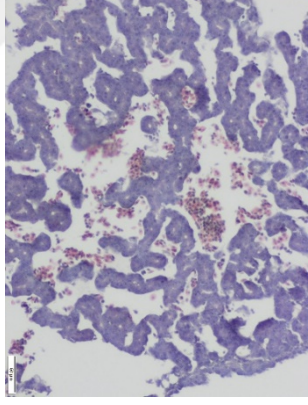
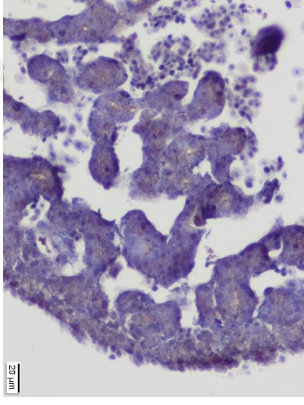
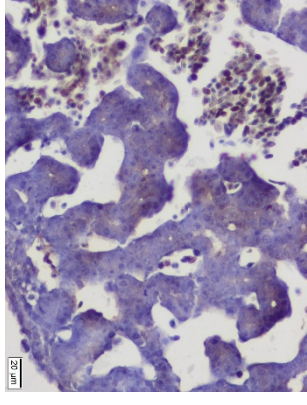
Şekil 4.3.2.3. 6. gün karaciğer kesiti immünohistokimya boyamaları.

7. gün gruplarında immünoreaktivite karaciğerin tüm kısımlarında homojen olarak gözlenmektedir. Hem 15 hem de 30 mg/kg uygulama grubunda eNOS ve iNOS boyamaları kontrole oranla oldukça azalmıştır. iNOS immünoreaktivitesinin 30 mg/kg grubunda karaciğerin tüm bölgelerinde homojen bir şekilde yayılım gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.3.2.4. 7. gün karaciğer kesiti immünohistokimya boyamaları.

8. gün gruplarında ise immünoreaktivite karaciğerin tüm kısımlarında homojen olarak gözlenmektedir. Hem 15 hem de 30 mg/kg uygulama grubunda eNOS ve iNOS boyamaları kontrole oranla oldukça azalmıştır. 30 mg/kg grubunda eNOS immünoreaktivitesinin iNOS' a göre biraz daha fazla olduğu saptandı.

	H&E	eNOS	iNOS
8. gün Kontrol			
8. gün 15 mg/kg			
8. gün 30 mg/kg			

Şekil 4.3.2.5. 8. gün karaciğer kesiti immünohistokimya boyamaları

5. TARTIŞMA

Karaciğer, vücudun hemen hemen bütün sistemleriyle ilişkili, karbohidrat, protein ve yağ metabolizması, depolama (karbohidrat, vitamin, demir), zararlı maddelerin detoksifikasyonu, salgılama, pıhtılaşma faktörlerinin üretimi gibi fonksiyonları olan büyük bir bezdir. Ayrıca, rejeneratif kapasiteye sahip ender organlardan biridir. Karaciğerin büyük bir kısmı çıkarılsa bile, geriye kalan kısmı tekrar kendini onarabilir.

Piliç karaciğeri organogenezinde hepatik özelleşme HH ölçeği evre 8-9 embriyolarında ventral önbağırsak endoderminde başlar [37]. 2. günde (HH evre 12), özelleşmiş hepatik endoderm (hepatoblastlar) gelişimin 3. gününde duktus venosus'u saran tek hücre tabakalı hepatik divertikulumu oluşturur [43]. Özelleşen bu hepatik endoderm hücre bölünmesi ile çoğalır ve karaciğerin yapı birimleri olan hepatik kordları oluşturur. İndüksiyon sonrası gerçekleşen bu morfogenez türe özgüdür [4]. Piliçte indüksiyon sırasında kullanılan uyarıcı sinyaller fare karaciğer oluşumuyla kullanılan sinyallerle benzerdir [43]. Karaciğer oluşumunun önemli basamaklarından biri ise lobların oluşumudur. Oluşan bu lobların büyüklüğü gelişim sırasında ve ergin dönemde sıkıca kontrol edilir. Piliçte ilk lob 5. günde gelişir, 6. günde 2. lobun gelişimi başlar ve tamamlanır. 7. günde ise 3. lob, 2. lobun ventralinde tomurcuk halinde oluşur ve 7. günden itibaren piliç karaciğeri morfogenezi sona erer ve karaciğer büyüme evresine girer [1]. Yaptığımız çalışmada günlere bağlı lob oluşumları Suksaweang ve ark. 'larının [1] yaptığı deneylerde elde edilen bilgilerle birebir örtüşmektedir.

Piliç embriyoları ile yapılan çalışmalarda madde uygulaması, yumurtanın hava kamarasına, embriyonun kuyruk bölgesine, embriyo diskinin altına ve yumurta albüminine enjeksiyon şeklinde yapılmaktadır [44, 45]. Bizim çalışmamızda ise uygulama embriyo diskinin altına enjeksiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda uyguladığımız madde, Nitrik Oksit (NO) inhibitörü olan L-NAME' dir ve NO inhibisyonunun karaciğer gelişimine etkisi araştırılmıştır.

L-Nitro-Arjinin-Metil-Ester (L-NAME), Nitrik Oksit Sentaz (NOS) substratı bir ajan olarak görev yapabilen, endotelial NO (eNOS) ve indüklenebilir NO (iNOS) sentezinin her ikisini de inhibe etmek için kullanılan (in vivo ve in vitro) non-selektif farmakolojik bir araçtır [27-30]. L-NAME ile yapılan çalışmalarda, nitrik oksit sentez inhibisyonunun; cGMP içeriğinin azalmasına neden olduğu [31], anjiyotensin II gibi vazoaaktif ajanlar nedeniyle hücre içi sinyali (protein kinaz C aktivitesini içeren) güçlendirdiği ve spesifik adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarması ile oksidatif stresi arttırdığı bildirilmektedir [32].

Birçok hücrel mekanizma ve biyolojik fonksiyonlardaki merkezi görevlerine rağmen NO hakkındaki çoğu moleküler ve fonksiyonel analiz çalışmaları, yetişkin memeli araştırmaları ile sınırlı kalmıştır [8]. Karaciğer dokusunda yapılan histolojik ve immünokimyasal çalışmalar, genel olarak karaciğer toksisitesi üzerine olup, bu çalışmalarda ise çoğunlukla fare [46, 47], sıçan [48-51], ördek [52] ve zebra balığı [53] gibi deney hayvanları kullanılmıştır.

Daha önce yapılmış çalışmalara dayanarak, L-NAME' nin dozu ve uygulanma süresi ile ilgili kesin bir yargıya varmak mümkün değildir. Örneğin, tavşanlara 11 gün süreyle 100 mg/kg ve sıçanlara 30 gün boyunca 0,1 gr/lt olacak şekilde L-NAME [54] uygulanmış, sonuçta böbrek dokusunda önemli bir değişiklik meydana gelmediği, L-NAME' nin etkisinin süre ve doza bağlı olarak değişebileceği ifade edilmiştir. Çalışmalarda, L-NAME' nin deney hayvanlarına sıklıkla 30 mg/kg [55-58] olarak uygulandığı belirlenmiş, bazı çalışmalarda ise 15 mg/kg L-NAME uygulamasının da NOS inhibisyonu için yeterli olabileceği gösterilmiştir [59, 60]. Ayrıca, Uçar [39] çalışmasında piliç embriyolarına hem 15 mg/kg hem de 30 mg/kg L-NAME uygulamış ve akciğer gelişimine etkisini araştırmıştır. Sonuçta her iki dozunda etkili olduğunu bulmuştur. Bu veriler doğrultusunda çalışmamızda her iki doz uygulaması kullanılmıştır.

Karaciğer üzerine yapılan çeşitli histotoksite çalışmalarında CCl₄, D-galaktozamin gibi kimyasallar ile kadmiyum ve molybdenum gibi ağır metaller uygulanmış ve hepatik kordonlarda daralma, sinüzoidlerde genişleme, hepatositlerde vakuolizasyon gibi histopatolojik bulgular gözlenmiştir [46, 50-52]. Ayrıca, Sakr ve ark. kadmiyumun karaciğer ince yapısı üzerine etkisini incelemişler, mitokondrielerde

şişme ve deformasyonlara ilaveten piknotik nükleuslara da rastlamışlardır [51]. L-NAME uyguladığımız farklı gelişim safhalarındaki karaciğer dokusunda elde ettiğimiz veriler bu çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Cox [53] zebra balığı embriyolarına, karaciğer gelişiminin 24. ve 72. saatleri arasında L-NAME uygulaması yapmışlar ve karaciğer oluşumunda bozukluklara neden olduğunu saptamışlardır. Daha sonra NO' nun karaciğer gelişiminin hangi evresine daha çok etki ettiğini belirlemek amacıyla hepatik tomurcuk oluşumunun gerçekleştiği 24 ve 48. saatler arası ve hepatosit farklılaşmasının olduğu 48. ve 72. saatler arasında bir uygulama yapılmış ve NO inhibisyonunun 48. ve 72. saatlerde karaciğer boyutunu daha çok etkilediği gözlenmiştir [53]. Cox ve ark.' larının yaptığı bu çalışma karaciğer gelişiminin NO ile ilgisinin literatürde bahsedildiği tek çalışmadır ve yayında sadece L-NAME' nin karaciğer boyutlarını küçülttüğü gösterilmiş, L-NAME' nin karaciğer gelişiminde sebep olduğu yapısal ve histolojik değişikliklere dair hiçbir veri ortaya konmamıştır. Yine zebra balıkları ile yapılan çalışmada, karaciğer gelişim sürecinde karaciğere uygulanan hasar sonrası rejenerasyon sırasında NO seviyesinde meydana gelen değişikliklerin rejenerasyon sürecini etkilediği belirlenmiştir [3].

Peonova ve ark., Xenopus embriyosu beyin ventrikülüne çözünebilir polimer içerisine emdirilmiş L-NAME çözeltisi uygulamışlar ve NO inhibisyonunun beyindeki çoğalan hücre sayısını 3 günlük uygulamada kontrol grubuna oranla % 261 oranında arttırdığı ve bu şekilde beyin morfogenezinde bozulmaya neden olduğunu bulmuşlardır [61]. Çalışmamızda da buna benzer bir şekilde mitotik hücrelerde artış ve buna bağlı karaciğer dokusunun düzenlenmesinde bozukluklar saptanmıştır.

Hamile farelere gestasyonun 12., 13., 14., 15. veya 16. günlerinde L-NAME 50 ve 90 mg/kg olarak uygulanmış ve yavruların doğması beklenmiştir. Gestasyonun erken safhalarında (12, 13 ve 14) L-NAME uygulanan annelerden doğan yavruların kontrol grubuna oranla; embriyonik veya fetal kayıplarda artış ve embriyo ağırlığında azalma tespit edilmiş, artan dozlarda bu fark daha da artış göstermiştir. Bunun yanında morfolojik incelemelerde uzuvlarda defekt oluşumu ve osteogenez aşamalarında bozukluklar da göze çarpmıştır [62].

Neerhof ve ark. [63], sıçanlara gebeliğin 14-18. günleri arasında L-NAME uygulamışlar ve gebeliğin 21. gününde embriyonun normal fetal ve plasental büyüklükte olduğunu bulmuşlar, L-NAME uygulamasının dokudaki etkisinin gelişim ile birlikte ortadan kalktığını kanıtlamıştır. Bizim çalışmamızda karaciğer gelişiminin uyarılma, morfogenez ve farklılaşma evrelerine ait dönemlerde L-NAME uygulaması yapıldı ve özellikle erken embriyonik dönemde mezenşim-epitel geçişleri ile hücrelerin koordineli çalışması üzerine etkinin daha fazla olduğu geç embriyonik dönemde ise kontrole yakın olduğu gözlemlendi. Bu durum, hücre çoğalması ve farklılaşmasının hızlı olduğu erken gelişim evrelerinde, embriyonun içsel ve dışsal kaynaklı uyarılara karşı son derece duyarlı olmasıyla açıklanabilir.

Kabil ve ark. [49] tioasetamid ile karaciğer de hasar oluşturarak eNOS sentezini arttırıcı özelliği olan ghrelin adlı maddeyi sıçanlarda denemiş ve L-NAME uygulamasının eNOS miktarını azaltarak ghrelin'in eNOS'a bağımlı hepatoprotektif etkisini ortadan kaldırmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç, bu çalışmada L-NAME' nin karaciğer dokusunda eNOS miktarlarını azaltması sonucuyla uyum göstermektedir.

Moslemi ve ark.' larının [64] yaptığı çalışmada, NOS immunoreaktivitesinin, L-NAME uygulanmış gruplarda kontrol gruplarına göre oldukça azaldığı belirlenmiştir. L-NAME' nin NO' in sentezinden sorumlu olan NOS' u inhibe ederek NO sentezini engellediği ve dolayısıyla NO aktivitesinde azalmalara yol açtığı düşünülmektedir.

Uçar [39] yapmış olduğu çalışmada, piliç embriyosu akciğer gelişim evrelerini belirlemiş ve bu evrelere iki farklı dozda L-NAME uygulayarak etkisini incelemiştir. Sonuçta, anlık NO inhibisyonunun akciğer gelişimini olumsuz etkilediğini bulmuştur. Ayrıca, erken embriyonik dönemde eNOS, iNOS ve laminin $\alpha 1$ immunoreaktivitesinde azalma, geç embriyonik dönemlerde ise artış gözlemlenmiştir. Bizim bulgularımızda da erken dönem eNOS, iNOS immunoreaktivitesi benzerlik göstermektedir.

Dokularda süperoksit, süperoksitdismutaz (SOD) ve NO yardımıyla düşük seviyede tutulmaktadır [65, 66]. NO ve süperoksit arasında gerçekleşen reaksiyonun

süperoksitdismutaz ve süperoksit arasında gerçekleşen reaksiyondan 6 kat daha büyük olduğu bildirilmektedir. NO azlığında denge süper oksit artışı yönünde kaymaktadır. Guzik ve ark' larının [67] yaptığı çalışma bu bilgiyi desteklemektedir. Bir diğer görüş ise normalde NO' in, süperoksit üretiminde rol oynayan enzimlerin sentezini engellediği fakat NO azlığında enzimlerin normalden fazla aktive olduğu yönündedir [68-70].

NO, azlığında veya çokluğunda süperoksit ile reaksiyona girerek sitotoksik bir oksidan olan peroksinitrit oluşumuna neden olur [69, 71]. Bu sitotoksik etkiler mitokondrial solunumun inhibisyonu, DNA ve protein hasarı sonucu oluşan gen mutasyonu, protein fonksiyonunun kaybı, nekroz ve hücre ölümü şeklindedir [72].

Piliç Karaciğer gelişimi 5 ile 8 günlük dönemlerde başlayıp sonlanmakta ve bu aşamada uygulanan NOS inhibitörü L-NAME uygulandığında gelişim önemli derecede etkilenmekte olduğu H-E incelemelerinde saptandı. Buna eşlik eden artmış bir oksidatif stres eNOS ve iNOS boyamaları ile gösterildi. Bu sonuçlar ile NO mekanizmasının gelişim sürecinde önemli bir faktör olduğu düşünüldü.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Piliç embriyosu karaciğer gelişimi üzerine anlık nitrik oksit sentezinin durdurulması veya azaltılmasına bağlı gerçekleşen yapısal değişiklikler;

- Hepatositlerin kordon oluşturma yeteneğinde bozukluklar,
- Sinüzoidlerde genişleme,
- Endotel hücre kayıpları,
- Sinüzoidlerde yığılma gösteren eritrosit kümeleri,
- Özellikle erken embriyonik dönemde hepatositlerde sitoplazmik vakuoller,
- Nekrotik alanlar,
- Hepatosit nukleuslarında deformasyonlar,
- Mitotik hücrelerde artış şeklindedir.

İmmünohistokimyasal olarak da;

- eNOS ve iNOS immünoaktivitesinin 5. günde az da olsa var olduğu ve ilerleyen günlerde artış gösterdiği gözlemlendi. Tüm günlerde eNOS'un iNOS'a oranla daha fazla boyandığı,
- Uygulama grubu immünohistokimya bulguları karşılaştırıldığında eNOS ve iNOS boyamalarının uygulama dozuna bağlı olarak azalma,
- Gün grupları birbirileri ile karşılaştırıldığında erken embriyonik dönemdeki karaciğerlerde eNOS ve iNOS immünoaktivitelerin geç embriyonik dönemdeki karaciğerlere oranla daha fazla etkilenecek şekilde azaldığı,
- 6. gün 15 mg/kg uygulanmış grupta eNOS' un iNOS' a göre fazla olduğu belirlendi.

Günümüzde embriyo gelişimini ve organogenezini kontrol eden sinyal yolları henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Bu sinyal yollarında meydana gelen herhangi bir bozukluk bebek gelişimi sırasında kongenital anomalilere sebep olabilmektedir. Gaz halinde ve çok küçük bir sinyal molekülü olan NO, hücrelerarası bir sinyal molekülü olarak işlev gördüğü ve birçok hücre içi ve hücreler arası haberleşmede görev aldığı kısmen bilinmektedir. NO'nun embriyo ve organ gelişimi sırasında rol oynadığı işlevler hakkında ise neredeyse çok az çalışma bulunmaktadır. NO'nun embriyonik gelişim aşamalarındaki rolünün belirlenmesi, bu sinyal

molekölünün fonksiyonu hakkında bilgi toplamamıza ve NO kaynaklı olabilecek kongenital anomalilere karşı yeni bir yaklaşım ve tedavi getirilmesine olanak sağlayabilecektir.



KAYNAKLAR

1. Suksaweang, S., et al., Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of β -catenin/Wnt in size regulation. *Developmental biology*, 2004. 266(1): p. 109-122.
2. Pant, J., et al., 14 - Nitric oxide-releasing polyurethanes, in *Advances in Polyurethane Biomaterials*. 2016, Woodhead Publishing. p. 417-449.
3. Cox, A.G. and W. Goessling, The lure of zebrafish in liver research: regulation of hepatic growth in development and regeneration. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2015. 32: p. 153-161.
4. Tatsumi, N., et al., Neurturin-GFR α 2 signaling controls liver bud migration along the ductus venosus in the chick embryo. *Developmental Biology*, 2007. 307(1): p. 14-28.
5. Drews, U., *Color Atlas of Embryology*. 1995: Thieme. 383.
6. Wong, G.K. and M.J. Cavey, Development of the liver in the chicken embryo. II. Erythropoietic and granulopoietic cells. *The Anatomical Record*, 1993. 235(1): p. 131-143.
7. Guedes, P.T., et al., Histological analyses demonstrate the temporary contribution of yolk sac, liver, and bone marrow to hematopoiesis during chicken development. *PLoS One*, 2014. 9(3): p. e90975.
8. Holmqvist, B., L. Ebbesson, and P. Alm, Nitric oxide and the zebrafish (*Danio rerio*): Developmental neurobiology and brain neurogenesis, in *Advances in Experimental Biology*, T. Bruno and T. Barry, Editors. 2007, Elsevier. p. 229-465.
9. Nath, A.K. and J.A. Madri, The roles of nitric oxide in murine cardiovascular development. *Developmental Biology*, 2006. 292(1): p. 25-33.
10. Manser, R.C., H.J. Leese, and F.D. Houghton, Effect of inhibiting nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. *Biol Reprod*, 2004. 71(2): p. 528-33.
11. Ribeiro, M.O., et al., Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*, 1992. 20(3): p. 298-303.
12. Moncada, S. and A. Higgs, The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 1993. 329(27): p. 2002-12.
13. Bruckdorfer, R., The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med*, 2005. 26(1-2): p. 3-31.
14. Duncan, A.J. and S.J. Heales, Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med*, 2005. 26(1-2): p. 67-96.
15. Naseem, K.M., The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*, 2005. 26(1-2): p. 33-65.
16. Fabbri, E., A. Capuzzo, and T.W. Moon, The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: an overview. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1998. 120(2): p. 177-92.
17. Zancheta, D., et al., The PI3K-Akt-eNOS pathway is involved in aortic hyporeactivity to Phenylephrine associated with late pregnancy in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, 2015. 122: p. 78-86.
18. Yang, Y., et al., Nitric oxide based strategies for applications of biomedical devices. *Biosurface and Biotribology*, 2015. 1(3): p. 177-201.
19. Ambe, K., et al., Production and physiological role of NO in the oral cavity. *Japanese Dental Science Review*, 2016. 52(1): p. 14-21.

20. Wang, W., Y. Lee, and C.H. Lee, Effects of nitric oxide on stem cell therapy. *Biotechnology Advances*, 2015. 33(8): p. 1685-1696.
21. Lepetsos, P. and A.G. Papavassiliou, ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2016. 1862(4): p. 576-591.
22. Leadsham, J.E. and C.W. Gourlay, Cytoskeletal induced apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2008. 1783(7): p. 1406-1412.
23. Cheng, H., et al., Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Letters*, 2014. 353(1): p. 1-7.
24. Hsu, Y.-C., et al., Exogenous nitric oxide stimulated collagen type I expression and TGF- β 1 production in keloid fibroblasts by a cGMP-dependent manner. *Nitric Oxide*, 2007. 16(2): p. 258-265.
25. Brennan, P.A., et al., Expression of type 2 nitric oxide synthase and p21 in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2002. 31(2): p. 200-205.
26. Iwakiri, Y. and M.Y. Kim, Nitric oxide in liver diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2015. 36(8): p. 524-536.
27. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, 1994. 63: p. 175-95.
28. Harrison, D.G., Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 1997. 100(9): p. 2153-2157.
29. Miller, M.J.S., et al., Failure of L-NAME to cause inhibition of nitric oxide synthesis: Role of inducible nitric oxide synthase. *Inflammation Research*, 1996. 45(6): p. 272-276.
30. T.F., L. and V. P.M., *The Endothelium: Modulator of Cardiovascular Function*. 1990, Boca Raton, Fla: CRC Press.
31. Henrion, D., et al., In vitro alteration of aortic vascular reactivity in hypertension induced by chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension*, 1996. 28(3): p. 361-6.
32. Luvara, G., et al., Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. 18(9): p. 1408-16.
33. Taneli, F., et al., Pre-ischemic administration of nitric oxide synthase inhibitors reduced germ cell apoptosis after spermatic vessel ligation in the rat testis. *Urol Int*, 2005. 75(1): p. 70-4.
34. Saito, M. and I. Miyagawa, Direct detection of nitric oxide in rat urinary bladder during ischemia-reperfusion. *J Urol*, 1999. 162(4): p. 1490-5.
35. Chen, J., et al., Nitric oxide-mediated neuronal apoptosis in rats with recurrent febrile seizures through endoplasmic reticulum stress pathway. *Neurosci Lett*, 2008. 443(3): p. 134-9.
36. Sandau, K., J. Pfeilschifter, and B. Brune, Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int*, 1997. 52(2): p. 378-86.
37. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 1951. 88(1): p. 49-92.
38. Vitecek, J., et al., Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. *Mediators Inflamm*, 2012. 2012: p. 318087.

39. Uçar, E., Nitrik Oksit İnhibisyonunun Piliç Embriyosu Akciğer Gelişimi Üzerine Etkisi, in Fen Bilimleri Enstitüsü, Zooloji Anabilim Dalı. 2014, Celal Bayar Üniversitesi: Manisa.
40. Mikuz, G., Testicular torsion: simple grading for histological evaluation of tissue damage. *Appl Pathol*, 1985. 3(3): p. 134-9.
41. Nguyen, C.Q., et al., Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* male tail tip. *Dev Biol*, 1999. 207(1): p. 86-106.
42. Stadelmann, C. and H. Lassmann, Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res*, 2000. 301(1): p. 19-31.
43. Nakayama, M., et al., Id3 is important for proliferation and differentiation of the hepatoblasts during the chick liver development. *Mech Dev*, 2006. 123(7): p. 580-90.
44. Prelusky, D.B., et al., Tissue distribution and excretion of radioactivity following administration of ¹⁴C-labeled deoxynivalenol to White Leghorn hens. *Fundam Appl Toxicol*, 1986. 7(4): p. 635-45.
45. Celik, I., et al., Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Br Poult Sci*, 2000. 41(4): p. 401-9.
46. Wu, P., et al., Protective effects of curcumin against liver fibrosis through modulating DNA methylation. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2016. 14(4): p. 255-264.
47. Yang, Q.L., et al., Pathological Lesions and Inducible Nitric Oxide Synthase Expressions in the Liver of Mice Experimentally Infected with *Clonorchis sinensis*. *Korean J Parasitol*, 2015. 53(6): p. 777-83.
48. Bektas, S., et al., The effects of tadalafil and pentoxifylline on apoptosis and nitric oxide synthase in liver ischemia/reperfusion injury. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*.
49. Kabil, N.N., et al., Effect of ghrelin on chronic liver injury and fibrogenesis in male rats: Possible role of nitric oxide. *Peptides*, 2014. 52: p. 90-97.
50. Luo, J.-X., et al., Aqueous extract from *Aconitum carmichaelii* Debeaux reduces liver injury in rats via regulation of HMGB1/TLR4/NF-KB/caspase-3 and PCNA signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016. 183: p. 187-192.
51. Sakr, S.A., M.F. Bayomy, and A.M. El-Morsy, Rosemary extract ameliorates cadmium-induced histological changes and oxidative damage in the liver of albino rat. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 2015. 71: p. 1-9.
52. Cao, H., et al., Alterations in trace element levels and mRNA expression of Hsps and inflammatory cytokines in livers of duck exposed to molybdenum or/and cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016. 125: p. 93-101.
53. Cox, A.G., et al., S-nitrosothiol signaling regulates liver development and improves outcome following toxic liver injury. *Cell Rep*, 2014. 6(1): p. 56-69.
54. Atakişi, O.A., E. Atabay, T. Uzun M., L-arjinin ve N ω -nitro-L-arjinin metil esteri uygulamasının beyin, karaciğer, böbrek dokusu nitrik oksit ve malondialdehit düzeylerine etkisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 2009. 15: p. 71-75.
55. Matthew, G.D., et al., Rapid Toll-Like Receptor (TLR) 7- And TLR8-Mediated Inhibition Of Bronchoconstriction In Humans And Guinea Pigs, in B36. AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS. 2012, American Thoracic Society. p. A2838-A2838.

56. Boe, A.E., et al., Plasminogen activator inhibitor-1 antagonist TM5441 attenuates Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension and vascular senescence. *Circulation*, 2013. 128(21): p. 2318-24.
57. Pudiak, C.M. and M.A. Bozarth, Effect of post-trial L-NAME administration on cocaine sensitization. *Int J Neurosci*, 2013. 123(9): p. 663-9.
58. Quiñones, M., et al., Involvement of nitric oxide and prostacyclin in the antihypertensive effect of low-molecular-weight procyanidin rich grape seed extract in male spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 2014. 6: p. 419-427.
59. Tolins, J.P. and P.J. Shultz, Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Int*, 1994. 46(1): p. 230-6.
60. Scrogin, K.E., et al., Chronic nitric oxide inhibition with L-NAME: effects on autonomic control of the cardiovascular system. *Am J Physiol*, 1998. 274(2 Pt 2): p. R367-74.
61. Peunova, N., et al., Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain. *J Neurosci*, 2001. 21(22): p. 8809-18.
62. Tiboni, G.M., F. Marotta, and L. Barbacane, Production of axial skeletal malformations with the nitric oxide synthesis inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in the mouse. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 2007. 80(1): p. 28-33.
63. Neerhof, M.G., et al., Pathophysiology of chronic nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction in the rat. *Hypertens Pregnancy*, 2011. 30(1): p. 28-36.
64. Moslemi, F., et al., Inhibition of Nitric Oxide Synthase by L-NAME Promotes Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Male Rats. *ISRN Toxicology*, 2013. 2013: p. 6.
65. Wilcox, C.S., Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. 289(4): p. R913-35.
66. Yorek, M.A., Oxidative Stress and Diabetes-Induced Vascular Dysfunction: Role in Diabetic Neuropathy, in *Studies in Diabetes*, I. Obrosova, J.M. Stevens, and A.M. Yorek, Editors. 2014, Springer New York: New York, NY. p. 1-12.
67. Guzik, T.J., et al., Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension*, 2002. 39(6): p. 1088-94.
68. Husain, K. and S.R. Hazelrigg, Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1587(1): p. 75-82.
69. Majid, D.S. and L. Kopkan, Nitric oxide and superoxide interactions in the kidney and their implication in the development of salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007. 34(9): p. 946-52.
70. L Gupta, K. and N. Sahni, Dietary antioxidants and oxidative stress in predialysis chronic kidney disease patients. *Journal of Nephropathology*, 2012. 1(3): p. 134-142.
71. Grisham, M.B., D. Jourdain, and D.A. Wink, Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol*, 1999. 276(2 Pt 1): p. G315-21.
72. Fukumura, D., S. Kashiwagi, and R.K. Jain, The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(7): p. 521-34.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : **Fatih ÇÖLLÜ**
Doğum Yeri ve Yılı: :İzmir, 1990
Medeni Hali :Bekar
Yabancı Dil :İngilizce/Almanca
E-Posta : fatih.collu@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise İzmir Eşrefpaşa Lisesi
Fen Bilimleri, 2009
Lisans Celal Bayar Üniversitesi - (*Örgün Öğretim*)
Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
(2009 - 27.01.2014)
Yüksek Lisans Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü- Zooloji ABD.
(03.02.2014 – 15.08.1990)

Mesleki Deneyim

Staj Bilgileri **Ege Üniversitesi – İzmir**
Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloj A.D.

Yayınlar:

Mete, M., Gurcu, B., Collu, F., Unsal, U. U., Duransoy, Y. K., Tuglu, M. I., & Selcuki, M. Effects of lacosamide “a novel antiepileptic drug” in the early stages of chicken embryo development. Child's Nervous System, 2016. 1-5. doi: 10.1007/s00381-016-3181-4.

Sözlü bildiriler:

Piliç Karaciğer Gelişiminde eNOS, iNOS ve Laminin α 1 Dağılımının Belirlenmesi
Fatih Çöllü, Beyhan Gürcü
Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
I. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi
12-14 Mayıs 2016, Manisa

Katıldığı Kongreler ve
Serfitika bilgileri:

**Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Çalıştayı:
Klinik Kullanımlar İçin Kök Hücre**
10-12 Eylül 2014, Manisa

**FEBS Advanced Lecture Course, 360° Lysosome; From
Structure To Genomics, From Function To Disease**
(TÜBİTAK Burslu)
23-28 Ekim 2014, Kuşadası

Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Çalıştayı 28-29 Kasım
2014, Manisa

Temel Kök Hücre Eğitim Semineri 2
27 Aralık 2014, İzmir

**Tıbbi Bilimlerde Genç Araştırmacı Adaylarına Yönelik
Proje Hazırlama Ve Yürütme Çalıştayı**
22-23 Ocak 2015, Manisa

**7. Geleneksel Bilişim ve Teknoloji Sempozyumu: Kişiyeye
Özgü İlaç Tedavisi**
28 Mart 2015, İzmir

1. Onkolojide Araştırma Uygulamaları Kursu- Hazırlık
1 Nisan 2015, İzmir

**TÜRKKÖK Kök Hücre Günleri EGEKÖK Kök Hücre
Öğrenci Sempozyumu**
2 Mayıs 2015, İzmir

Elektriğin Öncüleri- 1, Nikola TESLA Sempozyumu
14 Mayıs 2015, İzmir

**Kanser Kök Hücre, TEMD 2014-2015 8. Bilimsel
Toplantısı**
15 Mayıs 2015, Manisa

**SPU30x: Super-Earths and Life, HarvardX, an online
learning initiative of Harvard University through edX.**
December 5, 2015

**Valid Certificate ID:
998e72786fb54ea2bb8111218dc66b28**

**Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, I.
Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi**
12-14 Mayıs 2016, Manisa

TÜBA 3. Uluslararası Kök Hücre Kursu: “Hematolojik Onkolojide İnovatif Hücresel Tedaviler”.

(TÜBA burslu)

19-22 Mayıs 2016, Antalya

Diğer Faaliyetler

**The Stardust Project Participation Certificate
Contributing the search for interstellar dust particles
brought to earth by the spacecraft Stardust (On line
help Project)**

**Send your name to Moon Project by The Lunar
Reconnaissance Orbiter” Certificate of Participation
(Haziran, 2008)**

**Send your name To Mars by the NASA’s Mars Science
Laboratory Rover. Certificate of Participation
(Temmuz, 2009)**

**The Planetary Society Messages from Earth, Lightsail
Participation Certificate (Ocak, 2012)**

**National Aeronautics and Space Administration (NASA),
Send Your Name with Orion Flight Test to Space
Boarding Pass. Cert NO: J2M100000007817 (Aralık,
2014)**

**National Aeronautics and Space Administration (NASA),
Send Your Name With Insight Mission to Mars
Boarding Pass. Cert. NO: J2M2264165650109 (Nisan,
2016)**