

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KADMİYUMUN HEPATOTOKSİK ETKİLERİNE YÖNELİK
URSODEOKSİKOLİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Özlem SARIHAN

YÜKSEK LİSANS

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Mehmet Burak ATEŞ

KONYA-2024

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KADMIYUMUN HEPATOTOKSİK ETKİLERİNE YÖNELİK
URSODEOKSİKOLİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Özlem SARIHAN

YÜKSEK LİSANS

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Mehmet Burak ATEŞ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 23202018 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2024

ÖNSÖZ

Ursodeoksikolik asitin (UDCA) hidrofobik özelliğiyle hepatotoksisite etkisi olduğu gösterilmiştir. UDCA'nın ayrıca hepatositlerin membranlarındaki kolesterol ve fosfolipidlerin çözünürlüğünü azaltması, hidrofobik safra tuzlarının yerine geçerek safranin kompozisyonunu değiştirmesi, immun modülasyon gibi etkileri ile kolestatik karaciğer hastalıklarında prognozu değiştirebileceği düşünülmektedir. UDCA'nın oral kullanımında ilacın sistemik dolaşıma çok az miktarda geçişi ve büyük kısmının direk karaciğere gelişi, karaciğerde ilk hepatositlerin içine alınması, biyoyararlanımının yüksek olması gibi avantajlarının bulunması karaciğer hastalıklarında kullanımını cazip hale getirmektedir.

Canlıların kentleşme ve modernleşmeyle birlikte günlük hayatta toksik maddelere olan maruziyeti artmıştır. Canlılar için olumsuz etkileri olan ağır metallerin içinde Kadmiyum ön plandadır. Kadmiyum maruziyetinin artışıyla birlikte bu durumun sonuçlarının ve buna karşı alınması gereken önlemlerin araştırılması önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, deneysel olarak ratlarda oluşturulan kadmiyum toksikasyonunda UDCA'nın oral kullanımının karaciğer üzerine koruyucu etkilerini araştırıldı.

Yüksek lisans eğitim sürecimde, bu tez konusunun belirlenmesinde ve tezin yürütülmesinde bana her zaman yön ve destek veren ve çalışma sürecimde yardımlarını esirgemeyen danışman hocam, Doç. Dr. Mehmet Burak ATEŞ'e, yüksek lisans eğitim sürecimde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI, Prof. Dr. Ertan ORUÇ, Prof. Dr. Mehmet TUZCU ve Prof. Dr. Özgür ÖZDEMİR'e çalışmalarım esnasında yardımcı olan ve destekleyen Arş. Gör. Dr. Zeynep ÇELİK KENAR, Ayşegül BULUT ve Fatih Mehmet ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Özlem SARIHAN

07/2024

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1.GİRİŞ	1
1.1. Karaciğer	1
1.1.1. Karaciğer 'in Yapısı ve Fonksiyonları	1
1.1.2. Karaciğer hasarının mekanizması	2
1.1.3. Karaciğerde Görülen Dejeneratif Bozukluklar	3
1.1.4. Karaciğerde Nekroz ve Apoptozis	3
1.2. Ağır Metaller	4
1.2.1. Kadmiyum.....	5
1.3. Ursodeoksikolik Asit (UDCA)	11
1.3.1. UDCA'nın emilimi ve metabolizması	12
1.3.2. Ursodeoksikolik asidin farmakolojik aktiviteleri.....	13
1.3.3. UDCA'nın Etki mekanizması	13
1.3.4. UDCA' nın Kullanım Alanları.....	17
2.GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Gereç.....	20
2.1.1. Hayvan Materyali ve Etik Kurul İzini	20
2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	20
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Kitler	20
2.2. Yöntem	21
2.2.1. Hayvanların Gruplandırılması, Barındırılması ve Deneme tasarımı	21
2.2.2. Denemenin sonlandırılması ve Nekropsi	22
2.2.3. Serum Biyokimyasal Parametrelerin Belirlenmesi	23
2.2.4. Doku örneklerinin alınması ve muhafaza edilmesi.....	23
2.2.5. Histopatolojik inceleme	23

2.2.6. Moleküler Analizler	24
2.2.7. İstatistiksel Analizler	27
3.BULGULAR.....	28
3.1 Serum Biyokimyasal Parametreler	28
3.2.Patolojik Bulgular.....	28
3.2.1 Canlı Ağırlık, Relatif Organ Ağırlıkları ve Makroskopik Bulgular	28
3.2.2 Histopatolojik Bulgular.....	33
3.3. qPCR Bulguları	40
4.TARTIŞMA.....	42
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51
6. KAYNAKLAR.....	53
7.EKLER.....	61
EK-A Etik Kurul Kararı	
EK-B Turnitin Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ALT: Alanin aminotransferaz

ALP: Alkalın Fosfat

Akt: A serin treonin protein kinaz

AST: Aspartat aminotransferaz

BSEP: Bile Salt Export Pump (Safra tuzu ihraç pompası)

CA: Kolik asit

Cd: Kadmiyum

CDCA: Kenodeoksikolik asit

Cu: Bakır

DCA: Deoksikolik asit

DNA: Deoksiriboz Nükleik Asit

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörünün

ERK: Hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz

Fe: Demir

FDA: U.S. Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)

GCDCA: Glikokenodeoksikolik asit sodyum tuzu 7

GGT: Gama Glutamin Transferaz

GR: Glukokortikoid reseptör

GSH: Glutasyon

HCO: Bikarbonat

HDL: High Density Lipoprotein

Hg: Cıva

LCA: Litokolik asit

LDL: Light density lipoprotein

MAPK: Mitojenle aktifleştirilen Protein Kinaz

MHC: Majör histokompatibilite kompleksi

MPO: Miyeloperoksidaz

MT: Metalloprotein

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

Ni: Nikel

NF: Nükleer Faktör

NOS: Nitrik oksit sentaz

Pb: Kurşun

PBS: Primer biliyer siroz

PI3K: Fosfatidilinositol-3 kinaz

PSC: Primer sklerozan kolanjit

PTP: Geçirgenlik geçiş gözenekleri

ROS: Reaktif oksijen türleri

RNS: Reaktif nitrojen türleri

Se: Selenyum

TUDCA: Tauroursodeoksikolik asit

UDCA: Ursodeoksikolik asit

Zn: Çinko

XO: Ksantin oksidaz

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Kadmiyumun Hepatotoksik
Etkilerine Yönelik Ursodeoksikolik
Asitin Koruyucu Etkisinin
Araştırılması**

Özlem SARIHAN

Veterinerlik Patoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2024

Teratojenik ve karsinojenik etkileri olan toksik çevresel kirleticilerden Kadmiyum (Cd), vücuda alındıktan sonra çeşitli sistem ve dokulardaki hücreleri ve kemikleri etkileyerek toksisiteye sebep olur. Ursodeoksikolik asit (UDCA), genellikle karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir safra asitidir ve sistemik sirkülasyonda ve karaciğerde biriken güçlü toksik bileşenlerin mobilizasyonunu sağlar. Çalışmamızda 28 erkek Wistar Albino rat (180-220 gr) dört gruba ayrıldı: (1. Kontrol (K, n:6) grubu; 2.Kadmiyum (Cd, n:8) grubu; 3.Ursodeoksikolik asit (UDCA, n:6) grubu; 4. Kadmiyum ve ursodeoksikolik asit grubu (Cd+UDCA, n:8). 16 gün süren çalışmada tüm ratlara *ad-libitum* standart yem ve içme suyu; Cd grubuna denemenin 8-15. günlerinde 3 mg/kg CdCl₂ intraperitonel (IP); UDCA grubuna 1- 15.günlerinde 60mg/kg UDCA intragastrik (IG); Cd+UDCA grubuna ise 3mg/kg CdCl₂ ve 60 mg UDCA uygulandı. Deneme süresi sonunda, alınan kan örneklerinde ALT, AST, ALP ve GGT düzeylerinin Cd grubunda artış sergilediği gözlenirken, Cd+UDCA grubunda tüm parametrelerde rakamsal olarak azalma gözlenmesine karşın bu durum ALT ve GGT’de istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05). Cd grubunda canlı ağırlık ve relatif karaciğer ağırlığı önemli oranda azalırken (p<0.001), Cd+UDCA grubunda bu durumun önüne geçildiği saptandı (p>0.05). Histopatolojik olarak Cd grubunda, kontrol gruplarına kıyasla dejenerasyon, nekroz, safra kanalı proliferasyonu, disintegrasyon, konjesyon, Kupffer aktivasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu artışıyla karakterize hepatoselüler hasar belirlendi. Ayrıca, karaciğer dokusunda Nrf2 ve Kaspaz-3 mRNA ekspresyonunun CdCl₂ ile önemli oranda arttığı ortaya konuldu (p<0.001). Sonuç olarak, CdCl₂ tarafından oluşturulan karaciğer toksisitesine karşı UDCA’nın belirgin bir hepatoprotektif etki sergilediği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Sözcükler: Toksik; Histopatoloji; Kadmiyum; Karaciğer; Ursodeoksikolik asit

SUMMARY

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Investigation Of The Protective Effect Of Ursodeoxycholic Acid For Cadmium-Induced Hepatotoxicity

Özlem SARIHAN

Department of Veterinary Pathology

MASTER THESIS / KONYA-2024

Cadmium (Cd), a toxic environmental pollutant with teratogenic and carcinogenic effects, causes toxicity by affecting cells and bones in various systems and tissues after ingestion. Ursodeoxycholic acid (UDCA) is a bile acid generally used in the treatment of liver diseases and provides mobilisation of strong toxic components accumulated in the systemic circulation and liver. In our study, 28 male Wistar Albino rats (180-220 g) were divided into four groups (1. Control (C, n:6) group; Cadmium (Cd, n:8) group; 3. Ursodeoxycholic acid (UDCA, n:6) group; 4. Cadmium and ursodeoxycholic acid group (Cd+UDCA, n:8). In the 16-day study, ad-libitum standard feed and drinking water were administered to the control group; 3 mg/kg CdCl₂ intraperitoneally (IP) to the Cd group on the 8th-15th days of the experiment; 60 mg/kg UDCA intragastric (IG) to the UDCA group on the 1st-15th days; 3 mg/kg CdCl₂ and 60 mg UDCA to the Cd+UDCA group. At the end of the experimental period, ALT, AST, ALP and GGT levels in the blood samples were found to increase in the Cd group, whereas a numerical decrease was observed in the Cd+UDCA group, but this was statistically significant in ALT and GGT ($p < 0.05$). Relative liver weight decreased significantly in the Cd group ($p < 0.001$), whereas this was prevented in the Cd+UDCA group ($p > 0.05$). A histopathological examination revealed that the Cd group exhibited hepatocellular damage, characterised by degeneration, necrosis, bile duct proliferation, disintegration, congestion, Kupffer cell activation, and increased mononuclear cell infiltration, in comparison to the control groups. Furthermore, the Nrf2 and Caspase-3 mRNA expression levels in the liver tissue were found to be significantly elevated in the CdCl₂ group ($p < 0.001$). The results indicated that UDCA exhibited a significant hepatoprotective effect against CdCl₂-induced liver toxicity.

Key Words: Cadmium; Toxic; Histopathology; Liver; Ursodeoxycholic Acid

1.GİRİŞ

1.1. Karaciğer

1.1.1. Karaciğer 'in Yapısı ve Fonksiyonları

Vücudumuzun en büyük bezi olan karaciğer abdominal boşluğun sağ dorsal bölümünde, diyaframın ventralinde yer alır (Çiftçi ve ark 2015). Karaciğerde üretilen salgılar kana verildiği için endokrin bezi, safra kanalları ile duodenuma verildiği için ekzokrin bezi olarak kabul görür (Kalaycı 1986). Karaciğer ortada vena sentralis etrafında radyal dizilişi ile altıgen şeklindeki lopçukları oluşturan hepatositlerden meydana gelir (Çiftçi ve ark 2015). Hepatositler, serbestçe anastomozlaşırlar ve endotel hücrelerinin oluşturduğu düzensiz lümenli kapillerler hepatosit kümeleri arasındaki karaciğer sinüzoidleri denilen boşlukları oluşturur (Junqueira ve ark 2009). Sinüzoidler retikuloendotelyal sisteme ait özellikle Kupffer hücreleri olmak üzere makrofajları barındırır (Jungueria ve ark 1998). Hepatosit kordonları ile sinüzoid endotelleri arasındaki aralığa ‘‘Disse Aralığı’’ denir. Safra kapillerleri bu aralıkta ductus biliferi olarak bulunur (Çiftçi ve ark 2015). Karaciğerin poligonal lobülleri arasında portal alan, Kiernan aralığı veya Glisson üçgeni adı verilen üçgen şekilli alanlar vardır (Karaliotas ve ark 2006). Glisson üçgeninde; ductus hepaticus, A. Hepatica ve V. porta seyrederek (Çiftçi ve ark 2015). Ductus hepaticus safra kesesine gelir, oradan ductus koledokus olarak duodenuma geçer. V. porta lobcuğa giren fonksiyonel damardır. A. hepatica ise nutrisyonel damardır. Bu iki damardan karaciğere gelen kan sinüzoid içinden V. sentralise gelir, karaciğerden V. hepatica olarak ayrılır ve V. cava caudalis olarak sağ kalbe girer (Çiftçi ve ark 2015).

Yağ ve A vitamini depolayan hücreler veya lipositler olarak da bilinen ITO hücreleri Disse aralığında bulunur. Hepatositler içerisinde bol miktarda endoplazmik retikulum vardır. Bunlar granüllü ve granülsüz olarak gruplandırılır. Granüllü endoplazmik retikulum birkaç çeşit protein ve albümin sentezlerken, konjugasyon, oksidasyon ve metilasyonu granülsüz endoplazmik retikulumlar yapar. Hepatositlerde ayrıca çokça mitokondri ve lipid damlacıkları görülür. Hücre içi yıkım lizozom ve peroksizomlarda olur (Junqueira ve ark 1998).

Karaciğerin fonksiyonları kısaca şu şekilde özetlenebilir;

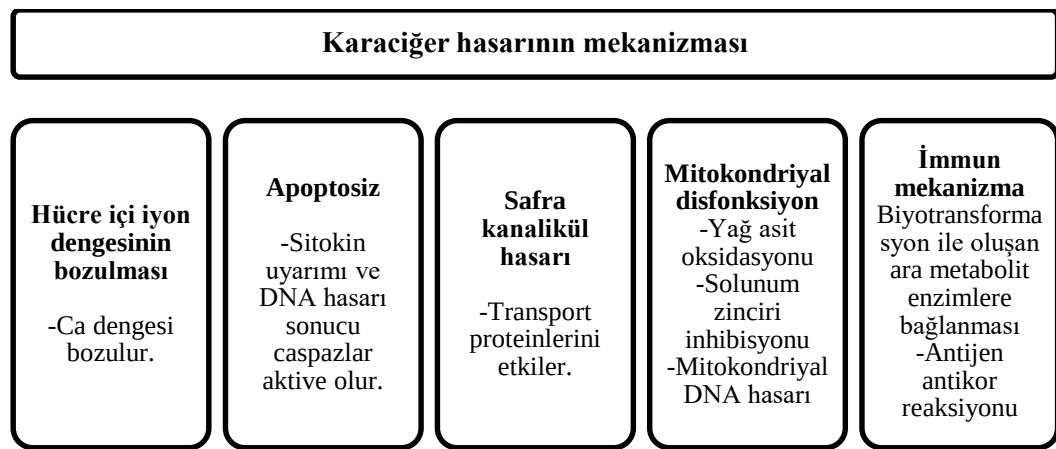
-Safra üretimi: Günde 700-1200 ml safra üretilip duodenuma boşaltılır.

-Metabolik fonksiyonlar: Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının yanı sıra Fe ve vitaminlerin depolanmasını, bazı ilaç ve hormon gibi maddelerin atılımını sağlar.

-Kanın filtrasyonu: Karaciğerden dakikada 1500 ml kan geçer. Geçen kandaki bakteri ve diğer yabancı cisimler fagositler tarafından emilerek dolaşım sisteminden uzaklaştırılır (Moore 2006).

1.1.2. Karaciğer hasarının mekanizması

Karaciğer toksikasyonları direkt veya indirekt mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşebilir. Kimyasal maddeler veya metabolitlerin hücrelerde ve organellerde sebep olduğu hasarlar direkt etki ile olurken, bazı metabolik araçlarla ilişki oluşturarak veya bağışıklık mekanizmaları ile indirekt etkiler oluşur (Arıcı 2008). Toksikasyon kaynaklı karaciğer hasarları hepatositleri, safra kanallarını, damar sistemini, sinüzoidal hücreleri ve Kupffer hücrelerini etkileyerek karaciğerde birçok morfolojik değişikliklere neden olur (Lee 1994). Hepatositlerde bulanık şişkinlik/hidropik dejenerasyon, hatta nekrotik/apoptotik değişimler gözlenebilir. Ayrıca yoğunluk değişmekle birlikte genellikle inflamatuvar hücreler, hipertrofik Kupffer hücreleri ve steroid yüklü makrofajlar da gözlenir. Portal alanda ve çevresinde safra kanalı proliferasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu belirgin olabilir (Şekil 1.1)(Arıcı 2008).



Şekil 1.1. Karaciğerin Hasar Mekanizması (Kalaycı 1986).

1.1.3. Karaciğerde Görülen Dejeneratif Bozukluklar

1. Karaciğerde Parankim Dejenerasyonu (Bulanık şişkinlik-Hidropik dejenerasyon): Hepatositlerin hasar sonucu su alarak şişmesidir. Bu granüler haldeki koagüle proteinlerin sitoplazmada bulanık bir görüntü oluşturduğu hafif hücre şişkinliği (bulanık şişkinlik) ve daha şiddetli formu olan hidropik dejenerasyon şeklinde gözlenebilir. Farklı hasar veya hastalık türlerinde spesifik olmayan bir bulgudur ve iskemik, toksik, enfeksiyöz ve diğer tür etkilerle ortaya çıkar. Lizozomlarda ve mitokondride vakuolasyona neden olur. (Şennazlı 2016). Makroskopik olarak, karaciğerin renginde solgunlaşma, kıvamında gevrekleşme, kenarlarında kütleleşme ve ağırlığında artış gözlenir (Arıcı 2008).
2. Karaciğerde amiloid dejenerasyonu: Amiloidin sinüzoidler ile hepatositler arasındaki boşluklarda (Disse aralığı) birikmesidir.
3. Karaciğerde yağ dejenerasyonu: Hepatositlerde keskin kenarlı, irili-ufaklı vakuoller bulunur ve hücre çekirdeği kenara itilmiştir. Hepatositlerdeki küçük damlalı yağlanma, genellikle akut metabolik hastalıklarda görülür ve daima akut bir hücre şişkinliği ile birliktedir. Büyük damlalı yağlanma ise, çok yavaş gelişen toksik ve bazı viral hastalıklarda görülür (Erer ve ark 2009).

1.1.4. Karaciğerde Nekroz ve Apoptozis

Karaciğer hücreleri mikrobiyal, kimyasal toksin, metabolik ve dolaşım bozuklukları gibi çeşitli nedenlerden dolayı nekroza karşı hassastır. Yaygın olarak meydana gelen nekroz türü koagülasyon nekrozudur. Bazı toksikasyonlarda likefaksiyon nekrozu da meydana gelebilir. Karaciğer parankimal hücrelerinde meydana gelen nekroz, doku içindeki morfolojik konumuna göre sınıflandırılır;

1. Diffuz nekroz: Nekroz, karaciğer boyunca tek hücre nekrozları (apoptoz) veya çok sayıda nekrotik hücrelerin toplanması şeklinde ortaya çıkar. Bu alanlar karaciğerin her yerine belirli bir konum olmaksızın rastgele dağılmıştır (Şennazlı 2016).
2. Bant (Zonal) nekroz: Karaciğer lobüllerinin belirli bölgeleriyle sınırlı hücresel nekrozdur. Nekroz lobülün üç alanıyla sınırlıdır (Şennazlı 2016). Toksik karaciğer hasarında nekroz esas olarak sentrilobüler bölgede görülür.

Endojen toksinler genellikle bant nekrozuna neden olur (Arıcı 2008). Üç alt grupta incelenir;

- a) Sentrilobuler (Periasiner) nekroz: Nekroz santral vene yakın hepatositlerde meydana gelir.
- b) Midzonal (İntermedier) nekroz: Karaciğer lobülünün merkezi ile çevresi arasında yer alan parankimal hücrelerin nekrozudur.
- c) Periportal nekroz: Karaciğer lobülünün periferik kesimlerinde bulunan hepatositlerde meydana gelen nekrozdur. Bu bölgede, *A.hepatica*'nın getirdiği toksik maddelerle ilk karşılaşan ve çokça etkilenen hepatositler bulunur.

3- Panlobüler (Masif) Nekroz: Bir veya bir arada bulunan daha fazla sayıdaki lobulusların içindeki hücrelerin hemen hepsinin nekroza uğramasıyla oluşur (Şennazlı 2016).

Apoptoz, genetik faktörler tarafından aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanan, dış ortamdan kaynaklanan çeşitli travmatik lezyonlar veya hücre içi mekanizmalar tarafından tetiklenen bir mekanizma aracılığıyla hücre ölümünü kontrol eden ve 'hücre intiharı' olarak tanımlanabilecek aktif bir süreçtir (Thompson 1994). Apoptotik uyarı alan hücrelerde bazı morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelir. Öncelikle hücreler etraflarındaki hücrelerle etkileşimi azaltırken bağ dokusuyla olan bağlarını da zayıflatırlar. Apoptotik hücrelerin kendilerini çevreden izole etmeleri sonucunda bu hücreler daha yuvarlak hale gelir. Nükleer membrana yakın bölgelerde kromatin yoğunlaşması meydana gelir, hücre zarında çıkıntılar oluşur ve apoptotik hücreler şekillenir. Tüm bu olaylar sırasında hücre sitoplazması ortama sızmaz ve membranda kesecikler halinde kalır (Walker ve ark 1988).

1.2. Ağır Metaller

Yoğunluğuna, atomik ağırlığına, kimyasal özelliklerine ya da toksisitesine göre bir çok tanımı bulunan ağır metaller düşük konsantrasyonlar da bile toksik etkisi olan yüksek atom ağırlığına ve yoğunluğuna sahip doğal elementler olarak tanımlanır (Seth 2020). Tıbbi olarak ise elementlerin atomik ağırlıklarından ziyade toksik özellik taşıyan tüm metaller ağır metal olarak ifade edilir (Haki 2016). Arsenik, kurşun, cıva,

kadmiyum, krom, talyum bunlara örnek verilebilir (Özbolat ve Abdullah 2016). Günümüzde toksik ağır metallere maruziyet her geçen gün artmakta ve buna bağlı olarak canlılarda çeşitli organ ve dokularda toksikasyona bağlı fonksiyon kayıpları oluşmaktadır. Organizmada bulunan bakır, selenyum, çinko gibi iz elementler de ağır metal olarak sınıflandırılıp düşük dozlarda hücrel faaliyetler için gerekliyken, yüksek miktarları toksik etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Canbar ve Tufan 2021). Genellikle kofaktör olarak enzimatik bir tepkimede görevli olan, organizma yapısında belirli bir miktarda bulunması zaruri olan vitamin ve hormonların yapısında bulunanlar hayati olarak gruplandırılır. Bunlar (Fe, Cu, Zn, Ni ve Se), belirli bir konsantrasyonun üzerine çıktıklarında (1-10 ppm: milyonda bir) toksik etki gösterirler. Hg, Cd ve Pb gibi hayati olmayan ağır metaller, başlangıç konsantrasyonlarından itibaren toksik etki göstermeye başlar ve çok düşük seviyelerde (0,001-0,1 ppm) bile fizyolojik yapıyı bozarak sağlık sorunlarına yol açar (Özbolat ve Abdullah 2016).

1.2.1. Kadmiyum

Kadmiyum (Cd), atom numarası 48, yoğunluğu 8,64 g/mL, erime noktası 320,9 °C, kaynama noktası 765°C olan gümüş-beyaz renkte bir metaldir (Haki 2016). Endüstriyel faaliyetler, özellikle madenlerin eritilmesi ve işlenmesi sırasında kadmiyum, atmosfere kadmiyum oksit, klorit veya sülfid olarak yayılır. Havadaki kadmiyum miktarının yaklaşık 0.04 µg/m³ ve içme suyundaki miktarının 1 µg/L ve daha düşük seviyelerde olması tehlike oluşturmaz. Bir insan, yiyecekler aracılığıyla günlük ortalama 1 µg, sigara içiyorsa 1-3 µg kadmiyum alır (Çolakoğlu ve ark 2011). Suda kolayca çözünebilen ağır metallerden olan kadmiyumun, doğada yayılma hızı oldukça yüksektir. Kadmiyum teratojenik ve karsinojenik etkileri olan en toksik çevresel kirleticilerden birisi olduğu ifade edilmektedir (Gülçen ve ark 2011, Canbar ve Tufan 2021). Cd endüstride çelik, demir, pirinç ve diğer alaşımlar için korozyon önleyici madde olarak ve boyalar, pigmentler, nikel-Cd piller ve plastikler için stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Sigara en önemli Cd kaynağıdır (Kaplan ve ark 2009). Cd'nin fosfatlı gübreler, deterjanlar ve rafine petrol türevlerinde empürite olarak bulunması da yaygın Cd kirliliğine katkıda bulunmaktadır (Turgut Coşan ve ark 2017). Kadmiyum, solunum, üriner, kardiyovasküler, gastrointestinal ve sinir sistemi gibi çeşitli sistem ve dokulardaki hücreler ve kemikler üzerinde toksik etki oluşturabilir. Aynı şekilde hayvanlarda da karaciğer, böbrek, akciğer, testis, kalp,

iskelet sistemi, sinir sistemi ve bağışıklık sistemi üzerine olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Sarkar ve ark 2013).

1.2.1.1. Kadmiyum toksikasyon mekanizması

Toz ve aerosol formlarda bulunan kadmiyum bileşiklerinin kronik inhalasyonu bir takım toksik etkilere neden olabilir. Özellikle akciğerler ve böbrekler (tübüler disfonksiyon, nefrolitiazis ve hiperkalsüri) olmak üzere D vitamini düzeyleri ve kemik mineralizasyonu üzerinde olumsuz etkiler rapor edilmiştir. Bu metale deneysel ve çevresel maruz kalma, testis atrofisi, böbrek fonksiyon kaybı, karaciğer hasarı, solunum ve sindirim bozuklukları ve anemi gibi ciddi bozukluklara neden olmaktadır. Kadmiyumun çeşitli hücreler üzerindeki toksik etkileri arasında nükleer membran hasarı, kromatin yoğunlaşması, mitokondriyal hasar ve sonuçta hücre ölümü yer alır (Bulan ve ark 2004). Kadmiyumun, lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif bozulmasına neden olan ve insanlarda ve hayvanlarda çeşitli patolojik durumları başlatan serbest radikal üretimini uyardığı gösterilmiştir (Kaplan ve ark 2009).

Primer Hasar mekanizmaları

Hepatositler

Oral, pulmoner ya da paranteral maruziyetten hemen sonra en fazla Cd^{+2} birikimi karaciğerde gözlenmektedir. Bağırsaktan emilen kadmiyumun büyük bir kısmı portal dolaşım yoluyla ilk önce karaciğere ulaşır ve hepatik sinüzoidal kılcal damarlardan hepatositler tarafından emilir. Ardından, metal bağlayan bir protein olan metallothiyonin (MT) üretimini uyararak Cd^{+2} , dolaşıma Cd^{+2} -MT kompleksi şeklinde sentezlenir (Baran 2018). Akut, hepatotoksik bir kadmiyum dozundan sonra (örneğin, 4 mg Cd/kg, intravenöz olarak) hepatoselüler hasar maruziyetten 10-12 saat sonra belirgin hale gelir. Hepatik metallothiyonin ve glutatyon (GSH) konsantrasyonlarının, akut kadmiyum kaynaklı hepatotoksitenin ciddiyetini büyük ölçüde etkilediği kabul edilmektedir; ancak kadmiyumun neden olduğu hasardan sorumlu olan kesin mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (Rikans ve Yamano 2000).

Vasküler endotel hipotezi

Cd maruziyetinin akut toksisitesinin, metalin vasküler endotel ile ilk etkileşiminden kaynaklandığını ve diğer nekrotik değişikliklere endotel hasarın sebep olduğunu savunan hipotezdir (Nolan ve ark. 1986). Bu hipoteze göre karaciğer hasarı, hepatik endotelin kadmiyum kaynaklı bozulması, hasarlı hücrelerin kılcal lümene ekstrüzyonu ile sonuçlanmasına ve çevredeki hepatositlere zarar veren lokal bir iskemi nedeniyle oluştuğu yönündedir (Rikans ve Yamano 2000).

Sülfidril Grup İnaktivasyonu

Fizyolojik koşullar altında, Cd^{+2} , fosfat, klorür, karboksil veya amino gruplarına kıyasla çok daha büyük bir afiniteyle sülfidril gruplarına bağlanır (Rikans ve Yamano 2000). Kadmiyum bağırsaklardan emildikten sonra albumine bağlanarak karaciğere ulaşır. Karaciğerde MT'nin (sistein açısından zengin bir ağır metal bağlayıcı protein) üretimini uyarır. Kadmiyum ve MT kompleksleri karaciğerden kana geçer ve idrar ile atılır (Çolakoğlu ve ark 2011). Metalloitiyonin esansiyel metallerden özellikle çinko ve bakıra, esansiyel olmayan metallerden de kadmiyum ve civaya çok fazla afinitesi vardır (Bulan ve ark 2004). Metalloitiyonin esas olarak karaciğer sitozolünde lokalizedir. Cd^{+2} 'yi inert bir komplekse hapsederek ve hedef moleküllerle reaksiyonunu önleyerek kadmiyumu detoksifiye eder (Rikans ve Yamano 2000). Hücre içi GSH ayrıca kadmiyum toksisitesine karşı koruma sağlar. Bu nedenle, MT ve GSH, kadmiyumun hepatotoksik etkilerine karşı savunmada önemli, tamamlayıcı rol oynamaktadır (Rikans ve Yamano 2000). Kadmiyum bağlanmasının kritik hedeflerinin proteinlerin tiyol grupları olduğunu önerilmiştir. Protein ve protein olmayan tiyollerin inaktivasyonu, hücre içi redoks durumunu bozarak toksisite üretebilir ve bu da DNA sentezi, hücre döngüsü düzenlemesi, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve apoptoz dahil olmak üzere bir dizi önemli biyolojik olayı etkilemektedir. Son kanıtlar apoptozun akut kadmiyum hepatotoksitesinde önemli bir olay olduğunu göstermektedir (Habeebu ve ark 1998). Apoptozun zamana ve doza bağlı tutarlı düzenlerde meydana geldiği ve kadmiyumla uygulanan farelerin karaciğerlerinde nekrozdan önce geldiği gösterilmiştir (Habeebu ve ark 1998).

Kadmiyumun apoptotik etkileri arasında çinko iyonları ve magnezyum iyonlarının fizyolojik fonksiyonlarının rekabetçi bir şekilde yok edilmesi, hem

sentezinin hemoglobin yapısına girmesinin engellenmesi, programlanmış hücre ölümüne yol açan mitokondri fonksiyon bozukluğu yer alır (Haki 2016). Kadmiyumun karaciğer ve böbrek dahil çeşitli organlarda apoptozu indüklediği bulunmuştur. Ancak hangi sinyal yolları aracılığıyla apoptozu tetiklediği henüz belirsizdir (Bayındır ve ark 2016). Apoptozisi neden olan sebepler; büyüme faktörlerinin azalması, sitokinler aracılığıyla hücre içi Ca artışı, tümör nekroz edici faktör, transforming growth factor β , Fas/FasL yolları ve p53 gen aktivasyonu, enfeksiyonlar (viral-bakteriyel) ve glukokortikoidler olarak sıralanabilir (Erboğa 2013). Apoptoz yoluyla hücre ölümü, membran yüzeyinde bulunan reseptörlerden ölüm sinyalleri alındığında (ekstrinsik yolak) veya DNA hasarı ya da oksidatif stres gibi nedenlere bağlı olarak kaspazların aktive edilmesi (intrinsik yolak) sonucu oluşmaktadır (Çetinbaş 2019). Reaktif oksijen ve azot türleri (ROS ve RNS), ksantin oksidaz (XO), nitrik oksit sentaz (NOS) miyeloperoksidaz (MPO) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) içeren enzimler tarafından üretilir (Baran 2018). Bu radikaller, DNA, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar gibi biyomoleküllerle doğrudan veya dolaylı olarak hızlı bir şekilde etkileşime girerek hasara neden olur (Baran 2018). Clara ve tip II hücrelerin kadmiyum aracılı apoptozu duyarlı olduğu ve bu apoptotik etkinin p53 ve Bax genlerindeki artışla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Çetinbaş 2019). Lipid peroksidasyonunun, toksisite sırasında hücre yapısında oksidatif hasara ve hücre ölümüne yol açan ana moleküler mekanizma olduğu düşünülmektedir (Baran 2018).

Lipid Peroksidasyon ve Oksidatif Stres

Normal metabolik süreçler sırasında hücrelerde serbest radikaller adı verilen reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir. Bu serbest radikaller, temelde hücreler tarafından antioksidan savunma sistemleri tarafından temizlenir. Ancak, hücrelerdeki serbest radikal üretimi artarsa veya antioksidan savunma mekanizmaları zayıflarsa, oksidatif stres meydana gelir (Park ve ark. 2023). Bu serbest radikaller, normalde hücreler tarafından antioksidan savunma sistemleri tarafından temizlenir. Ancak, hücrelerdeki serbest radikal üretimi artarsa veya antioksidan savunma mekanizmaları zayıflarsa, oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stresin başlıca nedenleri arasında metabolizma, çevresel faktörler ve hastalıklar yer alır (Lobo ve ark 2010). Oksidatif stresin hücreler üzerinde çeşitli etkileri vardır. Bunlar arasında DNA hasarı, protein hasarı, lipid hasarı ve hücreler arası iletişimin olumsuz etkilenmesi bulunur. Özellikle

DNA hasarı, mutasyonlara ve kansere yol açabilirken, protein hasarı hücre içi işlevlerin bozulmasına neden olabilir. Lipid hasarı ise hücre zarlarının ve diğer lipid yapıların hasar görmesine yol açabilir (Liguori ve ark 2018). Lipit peroksidasyonu, hidrojen ayrılması veya bir oksijen radikalının eklenmesiyle başlatılan bir zincir reaksiyonudur ve bu da doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasarıyla sonuçlanır (Baran 2018).

Kadmiyumun oksidatif stresi indüklediği ve GSH'ı tüketerek veya antioksidan enzimleri inhibe ederek lipid peroksidasyonuna neden olduğu öne sürülmüştür (Bagchi ve ark 1996). Lipid peroksidasyonunun akut kadmiyum uygulamasıyla üretilen karaciğer hasarına katkıda bulunabileceğini, ancak toksik mekanizma için gerekli olmadığı gösterilmiştir (Rikans ve Yamano 2000).

Kadmiyum-metallotiyonin kompleksinin (Cd^{+2} -MT) böbreklerde renal proksimal tübüller tarafından reabsorbe edilerek yeniden metabolize edildiği gösterilmiştir. Bu durumun, glutatyon ve proteinlerin SH-gruplarının azalmasına neden olduğu ve artan hidrojen peroksit, hidroksit ve süperoksit bileşiklerinden kaynaklanan oksidatif strese sebep olduğu ifade edilmiştir (Haki 2016). Akut kadmiyum toksisitesinin ana mekanizmalarından biri oksidatif strestir (Rikans ve Yamano 2000). Kadmiyum, hücresel düzeyde reaktif oksijen radikallerini artırarak, DNA'da hasara yol açar, DNA tamir süreçlerini bozar, hücre siklusunu etkiler, apoptozu tetikler, hücre çoğalmasını değiştirir ve epigenetik modifikasyonlara neden olabilir (Rikans ve Yamano 2000). Kadmiyumun apoptojenik aktivitesinin, mitokondriyal elektron transport zincirini bozarak, ardından oksidatif stresin artmasıyla mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına / mitokondriyal disfonksiyona neden olarak meydana getirdiği belirtilmektedir (Rikans ve Yamano 2000). Kadmiyum kaynaklı akut toksikasyonda mitokondriyal disfonksiyona bağlı organ hasarları oluşabileceği, kronik toksikasyonda onkogenlerin artmasıyla kanserogeneze neden olabileceği belirtilmektedir (Rikans ve Yamano 2000). Ayrıca, Cd kaynaklı artan oksidatif stres, membran hasarına neden olarak, DNA onarımının mekanizmalarının inhibisyonuna ve neticede apoptotik hücre ölümüne yol açabileceği bildirilmiştir (Baran 2018).

Nrf2, yüksek ROS seviyelerinden kaynaklanan oksidatif strese karşı hücrel savunmada önemli bir rol oynayan kritik bir transkripsiyon faktörüdür (Ngo ve Duennwald 2022). Nrf2, detoksifikasyon ve hücre metabolizmasının düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli hücrel işlevlerde rol oynar (He ve ark 2020). Antioksidan yanıt elementine (ARE) bağlanarak heme-oksijenaz-1 (HO-1), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) çekirdek dahil olmak üzere çeşitli antioksidan ve sitoprotektif genlerin transkripsiyonunu uyarır (Huang ve ark 2015). Kupffer hücrelerinde Nrf2 ve Nf-κB, inflamasyonun düzenlenmesinde zıt roller oynayan iki önemli transkripsiyon faktörünü temsil eder. Nrf2, sinyal yolunu engelleyerek Nf-κB'nin inflamatuvar etkilerini azaltır (Wang ve ark 2020). Nrf2, hücrel homeostazın korunmasında çok önemli bir faktördür. Aktivasyonu, mitokondriyal kalite kontrolünün sürdürülmesinde önemli süreçler olan mitofaji ve mitokondriyal dönüşümde artışlara yol açabilir (Fang ve ark 2021). Nrf2'nin sitoproteksiyon, ara metabolizma ve mitokondri fonksiyonu ile ilgili çok sayıda geni düzenlediği belirtilmektedir (Elciyar 2020). Birçok detoksifikasyon ve antioksidan genin ekspresyonunu düzenleyen Nrf2, bunlara ilave olarak, immün ve yangısal cevap, onkogeneze ve metastaz, bilişsel fonksiyon bozukluğu ve bağımlılık gibi durumları da kontrol eden genleri kontrol etmektedir (Roon-Mom 2008). Nrf2, oksidatif stresin sitotoksik etkilerine yönelik birincil hücrel savunma mekanizması gibi işlev görür. Nrf2/Keap1 yolağı, neoplazi, hepatotoksisite ve inflamasyon gibi çeşitli süreçlere karşı korunmada rol oynar (Carmona- Aparicio 2015).

Sekonder Hasar Mekanizmaları

Kupffer hücrelerin aktivasyonu

Ratlara kadmiyum verildikten sonra aktive edilmiş mononükleer fagositlerin morfolojik bir özelliği olan Kupffer hücrelerinin artan sitoplazmik vakuolizasyonu ve aktive edilmiş fagositlerin fonksiyonel bir özelliği olan karbon klirensi oranı artış gözlenmiştir (Sauer ve ark 1997, Cook ve ark 1975). Bir başka çalışmada sıçanların Kupffer hücre fonksiyonunun bir inhibitörü olan gadolinyum klorür ile ön muamelesi, hepatik kadmiyum birikimini veya metallerin ve GSH içeriğini önemli ölçüde etkilemeden *in-vivo* akut kadmiyum hepatotoksisitesini önemli ölçüde hafiflettiği bildirilmiştir (Rikans ve Yamano 2000).

Nötrofil İnfiltrasyonu

Nötrofil infiltrasyonunun kadmiyuma bağlı karaciğer hasarına önemi, sıçanların beyaz kan hücrelerini azaltmak için siklofosfamid ile ön muamelesinin hepatotoksisiteyi zayıflattığını gösteren bir çalışmada gösterilmiştir (Yamano ve ark 1998). *In-vivo* veya *in-vitro* kadmiyuma maruz kalmanın, nötrofillerin göçü ve aktivasyonu için gerekli sitokin, kemokin ve adezyon moleküllerinin hepatositler ve Kupffer hücreleri tarafından üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Kayama ve ark 1995, Dong ve ark 1998).

İnflamatuar Süreç

Karaciğerdeki birincil hasar, başlangıçta kadmiyumun doğrudan etkilerinden kaynaklansa da ikincil hasar, Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile başlatılan inflamatuvar süreçlerden kaynaklanır. Aktive edilmiş Kupffer hücreleri, sitokinler, adezyon molekülleri, kemokinler ve sitotoksik moleküller veya radikaller gibi bir dizi inflamatuvar mediyatör salar. Erken yanıt proinflamatuvar sitokinler diğerlerini aktive eder (Rikans ve Yamano 2000). Oksidatif stresin, kadmiyum maruziyetinden kaynaklanan sekonder hasara yol açan inflamasyonda önemli bir rol oynadığını bildirilmektedir (Rikans ve Yamano 2000). Kadmiyum, hücrel redoks durumunda Nf-kB ve AP-1 aracılığıyla proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu indüklediği düşünülmektedir (Rikans ve Yamano 2000).

1.3. Ursodeoksikolik Asit (UDCA)

İnsanlarda birincil safra asitleri kolik asit (CA) ve kenodeoksikolik asit (CDCA) ve ikincil safra asitleri deoksikolik asit (DCA) ve litokolik asit (LCA) ile bunların glisin ve taurin konjugatları ana safra asitleridir (Mitchell ve ark 2001). Ursodeoksikolik asit (UDCA), en başta kolesterol safra taşlarını eritmek için ve son zamanlarda primer biliyer sirozu (PBS) tedavi etmek için kullanılan, kenodeoksikolik asidin hidrofilik bir stereo izomeridir (Omata ve ark 2007). İnsan safrasında doğal olarak %5'ten az miktarlarda bulunan UDCA çoğu kolestatik durumun tedavisinde kullanılmaktadır (Mitchell ve ark 2001).

Yüzyıllar önce Çin ilacı olarak bilinen ve yetişkin ayıların safrasından elde edilen bir ilaç olarak kullanılırken İsveçli bir araştırma görevlisi bu safra asidine ursokolenik asit olarak isimlendirdi. Fakat tanımladığı bu asit aslında Kenodeoksikolik asit (CDCA)'ıdır. 20 yıl sonra Okayama Üniversitesi'nden Shoda, UDCA'yı ayı safrasından izole edip kristalleştirmeyi başardı ve ardından Urso-deoksikolik yani ‘urso’, latince ayı anlamını taşıyacak şekilde adlandırdı (Guarino ve ark 2013).

UDCA günümüzde kolesterol safra taşlarının çözülmesinde kullanılan bir ilaç olduğu belirtilene kadar Japonya'da küçük dozlarda uygulanan karaciğer toniği olarak kullanılıyordu. Daha sonra kullanımı dünya çapında yayıldı. UDCA şu anda primer biliyer sirozu tedavi etmek için FDA tarafından resmi olarak onaylanan tek tıbbi tedavi olarak kabul edilen kolestatik karaciğer hastalıklarında ve hatta hepatobilier olmayan hastalıklar için de terapötik bir ilaç olarak kabul edilmiştir (Guarino ve ark 2013).

UDCA'nın ilk prospektif çalışması safra taşı yüzeyindeki kolestrolü çözerek safra taşlarını çözdüğünü göstermiştir (Ikegami ve Matsuzaki 2008). Ayrıca UDCA fosfolipitlerin ve kolestrolün sıvı kristal mezofazının oluşumunu tetikleme gibi nadir bir özelliğe sahiptir (Bachrach ve Hofmann 1982). UDCA'nın aşırı doymuş safranin varlığında safra taşlarını çözebilmesi bu tür sıvı kristallerin, kolestrolle aşırı doymuş safra asidi varlığında bile oluşabilmesiyle açıklanabilir (Ikegami ve Matsuzaki 2008). Kolestatik bozukluklarda serum karaciğer testleri üzerindeki yararlı etkilerine ilişkili batıdaki ilk raporlar 1980'lerde ortaya çıkmıştır (Leuschner ve ark 1985). Fakat benzer gözlemler daha önce Japonya'da yapılmıştır (Mijayi ve ark 1976).

1.3.1. UDCA'nın emilimi ve metabolizması

Oral olarak uygulanan UDCA ince bağırsakta pasif iyonik olmayan difüzyonla emilir. UDCA'nın proksimal jejunumda çözülmesi endojen safra asitlerinin karışık misellerinde çözünmesiyle meydana gelir. UDCA karaciğere ulaştıktan sonra esas olarak glisinle ve daha az oranda taurin ile konjuge edilir ve enterohepatik dolaşıma giren safraya aktif olarak salgılanır. UDCA konjugatları aktif taşıma için endojen safra asitleri ile rekabet ettikleri distal ileumdan emilir. Emilmeyen UDCA kolona geçer ve bağırsak bakterileri tarafından litokolik asite dönüştürülür. Litokolik asit kolon içeriğinde çözünmez ve dışkıyla elimine edilir (Paumgartner ve Beuers 2004).

1.3.2. Ursodeoksikolik asidin farmakolojik aktiviteleri

Kolesterol ve safra asidi metabolizması

Deneyssel olarak UDCA rat karaciğerinde daha fazla hidrofilik safra asidi ile artışı ile kolestazi önler (Sözen ve Türkay 2011). UDCA biliyer kolesterolün % 40-60 oranında azaltır. Safra asidi metabolizması üzerindeki etkisi ile ilgili olarak, çalışmalar UDCA'nın sağlıklı bireylerde, hiperlipidemi hastalarında ve kolestatik karaciğer hastalıklarında kolesterolün safra asitlerine metabolik dönüşümünü arttırdığını göstermiştir (Lazaridis ve ark 2001). UDCA tedavisinin kolestatik hastalıklardaki faydalı etkileri, sistemik dolaşımda ve karaciğerde biriken toksik bileşenlerin uzaklaştırılması ve hepatobiliyer sekresyon faaliyetlerinin eski haline getirilmesinden kaynaklanmaktadır (Sözen ve Türkay 2011).

Fosfolipit metabolizması

UDCA'nın biliyer fosfolipit çıkışı ve konsantrasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi yoktur (Lazaridis ve ark 2001).

Serum lipitleri

Taş çözünmesi için UDCA alan safra kesesi taşı olan hastalarda, serum LDL ve HDL düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmaksızın serum kolesterolünde bir değişiklik göstermemektedir (Lazaridis ve ark 2001).

1.3.3. UDCA'nın Etki mekanizması

UDCA'nın hasarlı kolanjiyositlerin safra asitlerinin toksik etkilerine karşı korunması ve kolaretik etkisi

Hidrofobik safra asitleri hücre zarlarına hasar verir ve safrada mevcut konsantrasyonlarda hücre dışı sitotoksositeye neden olurlar. UDCA, safranin safra asit bileşimini daha az hidrofobik ve daha hidrofilik hale getirir ve herhangi bir birincil hastalığa özgü kanal lezyonunu ağırlaştırabilecek safranin toksik potansiyelini azaltır. Bu mekanizma ile UDCA'nın kolanjiyoselüler hasar, portal inflamasyon ve duktüler proliferasyonun derecesini azalttığı bildirilmiştir (Paumgartner ve Beuers 2004). UDCA, ayrıca safra asitlerinin kolanjiyositlerden apikal alımını azaltarak ve/veya

bazolateral akışını uyararak ve hidrofobik safra asitlerinin intraselüler konsantrasyonunu azaltarak kolanjiyositleri koruyarak hücre içi toksisiteyi azaltabileceği ifade edilmiştir (Paumgartner ve Beuers 2004). UDCA, hepatobiliyer sekresyon fonksiyonunu eski haline getirerek, veziküler ekzositozu transport gen ekspresyonunun ve duktuler bikarbonat sekresyonunun stimülasyonu, kolehepatik şant ve diğer mekanizmalar gibi çeşitli yollarla kolestaza karşı koruma sağladığı belirtilmektedir (Sözen ve Türkay 2011).

Karaciğerde, hidrofobik (yani toksik) safra asitlerinin hücre içi birikimi, artan hücre zarı akışkanlığı ve geçirgenliğinden programlanmış hücre ölümüne (yani apoptoz) ve nekroza kadar değişen bir dizi hücreye zarar veren olaya yol açar. Kolestatik karaciğer hastalıklarında UDCA'nın ana terapötik mekanizmalarından birinin, hidrofilik safra asidi havuzunun genişlemesi (yani UDCA ile zenginleştirilmesi) ile endojen hepatotoksik safranın yer değiştirmesi ile ilişkili olduğu varsayılmıştır (Lazaridis ve ark 2001). Böylece dolaşımdaki primer safra asidi konsantrasyonunu düşürürken sekonder safra asitlerine etkisiz olabilir, artırabilir ya da azaltabilir (Sözen ve Türkay 2011). UDCA'nın bu koruyucu işlevi, endojen (yani toksik) safra asitlerinin ileal absorpsiyon seviyesinde veya hepatosit seviyesinde (yani hücre-plazma zarı, hücre içi organeller, vb.) rekabetçi yer değiştirmesi ile ilişkili olabilir (Lazaridis ve ark 2001).

Kolestazın tüm formları, safra sekresyonunda veya akışında bir bozukluk ile karakterize edilir (Paumgartner ve Beuers 2004). Bireysel safra asitleri hidrofobiklik açısından farklılık gösterir. LCA başlıca insan safra asitlerinden en hidrofobik olanken, UDCA en hidrofilik olandır (Ikegami ve Matsuzaki 2008). Safra asitlerinin amfipatikliği lipid çözünürlüğüne katkıda bulunur, ancak fizyolojik seviyenin ötesinde safra asitlerinin daha yüksek konsantrasyonu sıklıkla plazma membranı fosfolipit çift katmanının bozulmasına neden olur. Kolestatik hastalıklarda safra asitlerinin hepatositler ve safra epitel hücreleri üzerindeki güçlü sitotoksik etkileri tartışılmıştır (Ikegami ve Matsuzaki 2008). Kolestatlı hastalarda hidrofobik safra asitleri ve diğer potansiyel toksik safra bileşenleri hepatositlerde birikerek hepatosit hasarına, apoptoza ve nekroza neden olabilir (Paumgartner ve Beuers 2004, Ikegami ve Matsuzaki 2008). Yapılan çalışmalarda kemirgenlerin karaciğerinde UDCA, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası mekanizmalar yoluyla hidrofobik safra asitlerinin neden olduğu

kolestazı önlediği bildirilmiştir (Trauner ve Boyer 2003). UDCA safra asitlerinin ve diğer organik anyonların safra salgısını uyarır ve kemirgen karaciğerindeki hidrofobik bilirubin asitlerinin sebep olduğu kolestazı azaltır (Paumgartner ve Beuers 2004). UDCA safra vizkozitesini azaltabilir, böylece safra kanallarının anormal sekresyonlar tarafından tıkanmasını önleyebilir (Colombo ve ark 1996). UDCA kullanımının toksik endojen safra asitlerinin enterohepatik dolaşımdan uzaklaştırılmasıyla etkinlik potansiyeli olduğu öne sürülmüştür (Colombo ve ark 1996). PBS'li ve primer PSC'li (Primer sklerozan kolanjit) hastalarda UDCA, safra asitlerinin salgısını safra salgısını uyarır ve endojen hidrofobik safra asidi ve uzun süreli tedavide bilirubin ve CDCA'nın (kenodeoksikolik asit) yüksek serum seviyelerini azaltır (Paumgartner ve Beuers 2004).

UDCA'nın sitoprotektif ve anti-apoptotik etkisi

Safra asitleri doğası gereği toksik bileşikler olmasına rağmen, hücre içi moleküler yolları modüle eden güçlü sinyal ajanlarıdır. İlginç bir şekilde, bu moleküller hayatta kalma sinyallerini tetikleyerek kendi sitotoksitesilerini inhibe edebilirler (Amaral ve ark 2009). Apoptoz, kolestatik karaciğer hastalıklarında hücre ölümünün en önemli mekanizmasıdır. Bunun en önemli sebebi kolestatik hepatositlerde hidrofobik safra asitlerinin birikmesine bağlanılır. UDCA'nın anti-apoptotik aktivitesi esas olarak *in-vitro* deneylerden ileri sürülmüştür (Ikegami ve Matsuzaki 2008). Deneysel konjugatların, UDCA'nın taurin konjugatının (TUDCA), karmaşık bir sinyal ağı yoluyla, hepatobiliyer veziküler ekzositozunu ve taşıyıcı proteinlerinin hepatositin apikal membranına yerleştirilmesini uyardığını göstermektedir (Kurz ve ark 2001, Kubitz ve ark 2004). Heuman ve ark., safra asitlerinin hepatotoksitesine karşı koymada UDCA'nın koruyucu etkisinin karaciğer düzeyinde elde edildiğini öne sürmüşlerdir (Lazaridis ve ark 2001). Yakın zamanda kolestatik sıçan karaciğerinde TUDCA, hepatositin kanaliküler membranlarındaki çoklu ilaç direnciyle ilişkili protein 2 (MRP2) yoğunluğunu önemli ölçüde artırdığı ve böylece potansiyel olarak toksik bileşiklerin safra yoluyla salgılanmasını uyardığı gösterildi (Kurz ve ark 2001, Kubitz ve ark 2004, Schoemaker ve ark 2004). Ayrıca, TUDCA'nın, Bax'ın mitokondriye bağlanmasını önleyerek apoptozu engellediğini de öne sürülmüştür (Rodrigues ve ark 2003).

Hepatositler birçok pro-apoptotik bileşiğe maruz kalır. Bu nedenle anti-apoptotik sinyal yolları programlanmış hücre ölümünü sınırlamak için önemlidir. UDCA'nın anti-apoptotik etkisi kısmen bu anti-apoptotik yolların aktivasyonunu sağlar. Hepatositlerde önemli bir hayatta kalma yolu, transkripsiyon faktörü nükleer faktör (NF)-kB'nin aktivasyonudur. NF-kB tarafından düzenlenen hayatta kalma genlerinin aktivasyonu apoptozun inhibisyonuna neden olur (Schoemaker ve ark 2004, (Schoemaker ve ark.2002). Ayrıca, mitojenle aktive edilen protein kinazların (MAPK) aktivasyonu gibi diğer hücre hayatta kalma yollarının da aktivasyonu söz konusudur. Bu kinazlar en az üç farklı yoldan oluşur: hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz (ERK), p38 ve c-Jun amino terminal kinaz (Johnson ve Lapadat 2002). Başka bir hayatta kalma yolu fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) yoludur. Bu kinaz kademesi, bir dizi hücre hayatta kalma ürününün aktivasyonu ile sonuçlanır; bunlardan A serin treonin protein kinaz (Akt), en önemli hayatta kalma faktörlerinden biridir (Datta ve ark 1999). UDCA'nın, CAMP, Akt, NF-kB, MAPK ve PI3K gibi hayatta kalma yollarını aktive ederek hücrelerin apoptozise sürüklenmesini engellediği bildirilmiştir (Ikegami ve Matsuzaki 2008, Amaral ve ark 2009).

Sıçan hepatositlerinde, glikokenodeoksikolik asit veya glikodeoksikolik asit, Fas ölüm reseptörünün ligandan bağımsız aktivasyonu ile apoptozu indükler (Faubion ve ark 1999), ardından kaspaz 8 ve proapoptotik molekül Bid'in aktivasyonu gelir. Aynı şekilde Bax'ın mitokondriyal membranda aktivasyonu artar (Paumgartner ve Beuers 2004). UDCA ve konjugatlarının sitoprotektif etkisinin, mitokondriyal depolarizasyonu önleyerek ve reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltarak hepatik hücrelerde apoptoz inhibisyonunu sağlayarak gerçekleştirdiği yönünde güçlü kanıtlar vardır (Rodrigues ve ark 1998). Hidrofobik safra asitleri hepatosit membranındaki pro-apoptotik Fas reseptörü ve ardından katepsin B'nin nükleer translokasyonu ve kaspazların aktivasyonu ile apoptozu başlatır (Sözen ve Türkay 2011). UDCA, hepatositlerde Fas ligandının neden olduğu apoptozu muhtemelen mitokondriyal membran üzerindeki doğrudan etkilerle azaltır (Zhang ve ark 1998). UDCA, safra asidinin neden olduğu , c-Jun N*terminal kinaza bağımlı CD95 (Fas)'ın plazma membranına geçişini önleyerek sıçan hepatositlerini safra asidi kaynaklı apoptozu karşı koruduğu bildirilmiştir (Kurtz ve ark 1988). UDCA, apoptozu sadece pro-apoptotik yolları bloke ederek değil mitokondriyal membran pertürbasyonunu,

geçirgenlik geçiş gözeneklerinin (PTP) açılmasını, Bax translokasyonunu, sitokrom c salınımını ve ardından kaspaz aktivasyonunu ve polipolimeraz (ADP-riboz) bölünmesini modüle ederek de sağladığı yönünde görüşler mevcuttur (Kurtz ve ark 1988). UDCA konjugatları kalsiyum, PKCa ve farklı MAP kinazları içeren karmaşık hücre içi sinyalleşme basamaklarını modüle ederek kolestatik karaciğerin bozulmuş salgılama kapasitesini geliştirebilir (Paumgartner ve Beuers 2004).

UDCA'nın apoptozu inhibe ettiği diğer bir mekanizma, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) aktivasyonudur. EGFR hayatta kalma sinyalini indükleyen ve apoptozu inhibe eden MAPK'yı uyarır (Rodrigues ve ark 1998).

Karaciğer hastalıklarında UDCA'nın faydalı terapötik etkileri için hangi mekanizmanın birincil önemli olduğu açık değildir. Bu durum hastalığın tipi ve seyri ile doğrudan ilişkili olabilir. Akut toksik durumlarda kolanjiyositlerin safra asitlerinin toksik etkilerine karşı korunması, safra yolların uyarılmasından daha etkili olabilir. İleri durumlarda hidrofobik safra asitlerinin ve toksik maddelerin hepatositlerde tutulmasını önlemek için safra sekresyonunun uyarılması daha etkili görülebilir. Safra asitlerinin hepatosit içinde tutulmasında ise safra asidinin indüklediği hepatosit apoptozun inhibisyonunu önemli hale getirir (Paumgartner ve Beuers 2004).

1.3.4. UDCA' nın Kullanım Alanları

UDCA esas olarak safra yolu hastalıklarının, özellikle de safra tahribatı ve ilerleyici intrahepatik kolestaz ile karakterize edilen otoimmün kronik kolestatik karaciğer hastalığı olan PBC ve kolesistolitiazis tedavisinde kullanılır. Safra taşlarının yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalar *in-vitro* veya insanda UDCA'nın oral uygulamalarında kronik kolestatik karaciğerin klinik ve biyokimyasal bulgularını iyileştirdiğini bildirmiştir (Jacquemin ve ark 1997). UDCA'nın safra taşının eritmesi (Makino ve ark 1975), safra ağrısının önlenmesi (Tomida ve ark 1999), erişkin kolestatik karaciğer hastalıklarından; primer bilier siroz (Poupon ve ark 1991), primer sklerozan kolanjit (Mitchell ve ark 2001), gebelikte intrahepatik kolestaz (Glantz ve ark 2005); pediatrik kolestatik karaciğer hastalıklarından kistik fibrözis (Colombo ve ark 1996), progresif ailesel intrahepatik kolestaz (Jacquemin ve ark 1997); ilaca bağlı kolestaz, kronik viral hepatitis (Omata ve ark 2007) gibi hastalık ve/veya sendromlarda kullanım alanları vardır (Ikegami ve Matsuzaki 2008).

UDCA, hepatit C virüsü enfeksiyonu olan hastalarda yüksek alanin aminotransferaz seviyelerini iyileştirmek için kullanılabilir (Ikegami ve Matsuzaki 2008). UDCA'nın ayrıca kronik kalp yetmezliği olan hastalarda periferik kan akışını iyileştirdiği ve kalbi reperfüzyon hasarına karşı koruduğu da bilinmektedir (Hanafi ve ark 2018). Ek olarak, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları (Vang ve ark 2014, Hanafi ve ark 2018) gibi nörolojik bozukluklar da dahil olmak üzere düzensiz apoptoz seviyelerine sahip patolojik durumların tedavisinde UDCA'nın (ve Tauro-UDCA'nın) potansiyel kullanımı önerilmiştir. Son zamanlarda UDCA'nın obezite için yeni bir terapötik ajan olarak önerildiği görülmektedir (Chen ve ark 2019). Non-alkolik karaciğer yağlanması tedavisinde UDCA kullanımı ile yapılan bir çalışmada serum transaminaz değerlerinde düşüş ve fibrozis dışındaki karaciğerin histopatolojik bulgularında gerileme bildirilmiştir (Bektaş ve ark 2020). Progresif familial intrahepatik kolestazlı hastaların başlangıç tedavisinde UDCA önerilmiştir (Uçar ve ark 2009).

UDCA ile tedavinin safra asidi kompozisyonunu değiştirerek kolorektal kanser riskini azaltabileceği gösterilmiştir (Tung ve ark 2001). UDCA'nın hücre büyümesinin inhibisyonu ve kanser hücrelerinin apoptozunun indüklenmesiyle anti-tümöral etkinlik gösterdiği bildirilmektedir (Goossens ve Bailly 2019). Mide kanseri, melanoma, hepatoselüler karsinoma, oral skuamöz karsinoma'da yapılan araştırmalar UDCA'nın antikanser özellikleri vurgulanmıştır (Liu ve ark 2015, Pang ve ark 2015, Yu ve ark 2019).

UDCA ayrıca diğer kemoterapötik yada immün terapilerle kombine olarak kullanılmaktadır (Goossens ve Bailly 2019). Yapılan bir çalışmada, UDCA'nın kolanjiyokarsinomun büyümesini inhibe ettiği ve gefitinible kombine kullanıldığında daha güçlü bir etki gösterdi bildirilmiştir. Bu çalışma UDCA'nın, diğer kemoterapötik ajanların etkilerini sinerjistik olarak arttırmak için terapötik bir seçenek sağlayan potansiyel bir adjuvan veya palyatif antikanser ilacı olabileceğini ortaya koymuştur (Lee ve ark 2022). Benzer şekilde hepatoselüler karsinomada (HCC) anti-PD-1 veya anti-PD-L1 antikorumun UDCA ile birlikte kullanıldığı kombinasyon terapisinin, tekli kullanımlara göre daha etkili olması bu görüşü destekler niteliktedir (Shen ve ark 2022).

PBS’de bağırsak mikrobiyal profiline UDCA etkilerinin araştırıldığı prospektif bir çalışmada 6 aylık UDCA kullanımının mikrobiyal disbiyozisi kısmen hafiflettiği, mikrobiyal çeşitliliği önemli ölçüde etkilemeden bağırsak mikrobiyomunun bileşimini olumlu yönde değiştirdiği bildirildi (Tang ve ark 2018).

Kadmiyum toksisitesi sonucu gelişen karaciğer hasarı, hem veteriner hem de beşeri hekimlikte güncelliğini koruyan bir konudur. Türkiye’de ve dünyada deneysel kadmiyum toksisitesi ile oluşturulan karaciğer hasarı üzerine çok çeşitli çalışmalar yapılagelmektedir. Literatür incelemelerinde kadmiyum ve ursodeoksikolik asit ile ilgili ayrı ayrı çalışmalar mevcuttur fakat kadmiyum ile indüklenen karaciğer hasarına yönelik ursodeoksikolik asitin koruyucu etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, ratlarda deneysel olarak indüklenen kadmiyum toksikasyonuna karşı ursodeoksikolik asitin hepatoprotektif etkileri ilk defa değerlendirilerek etki mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan Materyali ve Etik Kurul İzini

Araştırmada sağlıklı 28 erkek Wistar Albino rat (180-220 gr) kullanıldı. Ratlar, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Deneysel çalışmaya başlamadan T.C. Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, tüm çalışma sürecinde hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek işlemlerin uygunluğuna dair Etik Kurul onayı (No:2023/28) alındı.

2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Çalışmada, otomatik doku takip cihazı (Leica TP 1020), mikrotom (Leica RM-2125 RT), araştırma mikroskobu (Olympus, BX51, Tokyo, Japan), kamera (Olympus ED50), santrifüj, termal blok, qPCR (Qiagen, Rotor-Gene, 5 plex HRM) ve otoanalizör (ILab Instrumentation Laboratory, Milano, Italy) kullanıldı.

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Kitler

Çalışmada kullanılan kadmiyum (Cd), Sigma (Katolog no: 202908), Ursodeoksikolik asit (Ursomed 250 mg/5 ml oral süspansiyon, 250 ml) World Medicine İlaç San. ve Tic. A.Ş'den temin edildi.

Doku tespiti ve takibinde kullanılan solüsyonlar formaldehit (%37) Merck, ksilol Tekkim, alkol ise Isolab'dan temin edilen kimyasallardan hazırlandı. Parafin ise Beslab'dan satın alındı.

qPCR çalışmalarında mRNA izolasyonu dokudan RNA izolasyon kiti (A.B.T.™ RNA Purification Kit, Katolog No: 102-01-05), cDNA sentezi ise A.B.T.™ cDNA Sentez Kiti (Katolog No: C03-01-05) ile yapıldı. PCR reaksiyonu için SYBR Green qPCR Mix (Hibrogen, Lot No: 1745-1) kullanıldı.

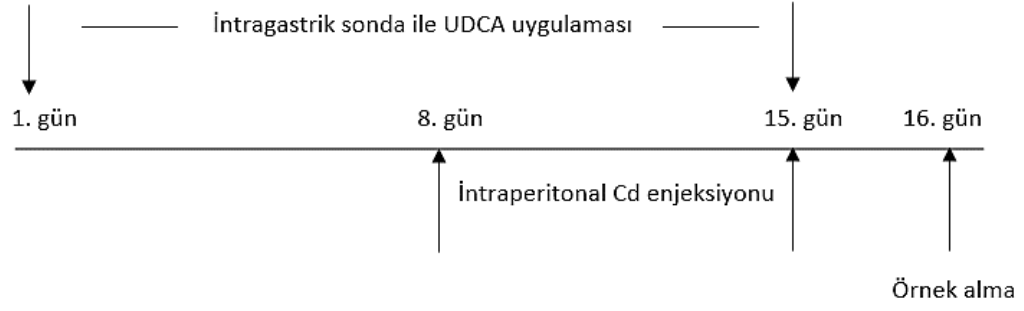
2.2. Yöntem

2.2.1. Hayvanların Gruplandırılması, Barındırılması ve Deneme tasarımı

Yirmi sekiz adet sağlıklı erkek Wistar Albino rat (180-220 gr) kullanılan çalışmanın tüm deneysel uygulama ve prosedürleri Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapıldı. Uygulama periyodu 16 gün sürdü. Hayvanların barındırıldığı ortamın fiziksel özellikleri ve şartları sürekli kontrol altında tutuldu (12/12 saat aydınlık/karanlık- 07:00/19:00, 21±2°C, % 55±3 nem). Deney süresi boyunca tüm ratlara ticari rat yemi (rasyonun bileşimi ham protein %24, ham selüloz %7, ham kül %8, enerji 3000 kcal/kg) verildi.

Ratlar, kontrol (K), Kadmiyum (Cd), Ursodeoksikolik asit (UDCA) Kadmiyum ve ursodeoksikolik asit (UDCA) (Cd+UDCA) olmak üzere aşağıdaki gibi 4 gruba ayrıldı ve deneme tasarımı ayrıca Şekil 2.1’de özetlendi.

1. Kontrol Grubu (K; n=6): Deneme süresince standart rat yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. 1-15.günlerde gavaj ile su ve 8- 15.günlerde intraperitoneal fizyolojik tuzlu su uygulandı.
2. Kadmiyum Grubu (Cd; n=8): Deneme süresince standart rat yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. 3mg/kg CdCl₂ (Sigma) intraperitoneal olarak denemenin 8-15. günlerinde verildi (Goodarzi ve ark 2020).
3. Ursodeoksikolik asit (UDCA; n=6): Deneme süresince standart rat yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Denemenin 1-15. günlerinde UDCA (Ursomed oral süspansiyon) 60 mg/kg gavaj olarak verildi (Şekil 2.2), (Ali ve ark 2020). 8-15.günlerde intraperitoneal fizyolojik tuzlu su uygulandı.
4. Kadmiyum ve ursodeoksikolik asit (Cd+UDCA; n=8): Deneme süresince standart rat yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Denemenin 1-15. günlerinde 60 mg/kg UDCA gavajla, 8-15. günlerinde 3mg/kg CdCl₂ IP olarak verildi.



Şekil 2.1. Deneme tasarımı.



Şekil 2.2. İntragastrik sondayla UDCA uygulaması

2.2.2. Denemenin sonlandırılması ve Nekropsi

Denemenin 13. ve 14. günlerinde Cd grubundaki iki rat ölü bulundu. Canlı kalan hayvanlar 16. gün tartımları yapıldı, ksilazin (10mg/kg, im)-ketamin (50 mg/kg, im) anestezisi altında kanları alındıktan sonra dekapitasyon ile ötanazileri yapıldı. Daha sonra usulüne uygun olarak nekropsileri yapılarak karaciğer örnekleri (ölen hayvanlar dahil) alındı.

2.2.3. Serum Biyokimyasal Parametrelerin Belirlenmesi

Anestezi altında kalpten alınan kanlar serum tüplerine (Vacutte® Tube) aktarıldı ve kanlar 15 dk 5000 devirde santrifüj (Hettich Universal 32R) edildi. Elde edilen serumlar karyotüplere aktararak analiz zamanına kadar -80°C’de saklandı. Serumlardan ticari kitler kullanılarak Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST), Alkalen Fosfataz (ALP) ve Gama Glutamil Transpeptidaz (GGT) düzeyleri oto analizör (ILab Instrumentation Laboratory, Milano, Italy) aracılığıyla belirlendi.

2.2.4. Doku örneklerinin alınması ve muhafaza edilmesi

Deneyisel çalışma sonucunda hem kontrol grubu hem de çalışma gruplarına ait ratlardan alınan karaciğer doku örneklerinin tartımları yapıldıktan sonra histopatolojik analizler için %10’luk formol solüsyonuna alındı. Moleküler analizler için ise karaciğer örnekleri önce serum fizyolojikle yıkanıp karyotüplere alındıktan sonra sıvı azota konuldu ve ardından test edilinceye kadar -80°C’de saklandı.

2.2.5. Histopatolojik inceleme

Formalin solüsyonunda tespit edilen karaciğer dokuları otomatik doku takip cihazına (Leica TP 1020) alınarak doku işleme proseslerine tabi tutuldu. Hazırlanan parafin bloklardan, mikrotom (Leica RM2125RT) aracılığıyla 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin tümü Hematoksilen-Eosin (Luna 1968; Presnell ve ark 1997) ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX53F, Japonya) incelenerek gerekli görülenlerden fotoğraflar çekildi (Olympus ED50, Japonya). Karaciğerdeki histopatolojik skorlamalar daha önce Ates ve ark (2022) tarafından bildirilen metoda göre yapıldı. Buna göre hidropik dejenerasyon, yağlanma, nekroz/apoptoz, dissosiasyon, konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu (MNH) şiddet ve yaygınlıklarına göre (0): lezyon yok; (1): hafif; (2): orta; (3): şiddetli ve (4): çok şiddetli olarak en az beş farklı bölgede incelenerek skorlandı. Dejeneratif puanlar toplanarak toplam lezyon skoru bulundu.

2.2.6. Moleküler Analizler

Nükleik asit ekstraksiyonu

Nükleik asit ekstraksiyonu A.B.T.TM RNA Purification Kit (Cat. No: I01-01-05) prosedürüne göre yapıldı. Nekropsi esnasında alınan ve -80°C’de muhafaza edilen karaciğer örnekleri ayrı ayrı, içerisinde 1ml Buffer P bulunan 2 ml’lik ependorf tüplerine alındı. Daha sonra bu ependorf tüpler içerisinde bulunan organ parçaları, homojenizatör (Isolab) yardımıyla parçalanarak homojen hale getirildi. 200 ul kloroform ile karıştırıldıktan sonra 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 12,000 rpm devirde 15 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı faz 1.5 ml yeni bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Örneğe Buffer RB eklenerek pipetasyon ile iyice karıştırıldı. Ardından lizat spin kolonlara aktarılarak 12,000 rpm devirde 30 saniye santrifüj edildi. Spin kolonlar yeni bir koleksiyon tüpüne aktarıldı. Spin kolonların filtresine temas etmeden 500 ul Wash Buffer I ilave edildi ve 12,000 rpm devirde 30 saniye santrifüj yapıldı. Spin kolonlar yeni koleksiyon tüplerine aktarıldıktan sonra 500 ul Wash Buffer II ilave edildi ve 12,000 rpm devirde 30 saniye santrifüj yapıldı. Koleksiyon tüp yenilendikten sonra maximum hızda 1 dakika santrifüj uygulanarak wash buffer rezidüleri uzaklaştırıldı. Spin tüpler yeni .5 ml yeni bir mikro santrifüj tüpüne konularak 50 ul Nuclease-Free Water su ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakıldı. Maximum hızda 1 dakika santrifüj uygulandı. Pürifiye RNA -20°C’de stoklandı.

Tetkiklerde çalışmanın yapıldığı ve örneklerle temas etme potansiyeline sahip tüm yüzey ve malzemeler RNase dekontaminasyon spreyiyle (RNaseZapTM, AM9780, Invitrogen) temizlendi. Elde edilen RNA’nın saflık derecesi ve RNA düzeyi (nanogram/mikrolitre) NanoDrop 2000 Spektrofotometre cihazı (Thermo ScientificTM) ile saptandı.

cDNA Sentezi

RNA ekstraksiyonun ardından örneklerden cDNA sentezi A.B.T.TM cDNA Synthesis High Capacity Kit (Cat no: C03-01-05) protokolüne göre yapıldı. Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı son hacim 20 µl olarak şekilde Tablo 2.1’de sunuldu. Elde edilen mikşler 25 °C’de 15 dakika, 37 °C’de 120 dakika, 85 °C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra PCR yapılmaya kadar -20°C’de stoklandı.

Tablo 2.1. Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı.

Solüsyon adı	Hacim (µl)
10X Reaksiyon Buffer	2
dNTP mikş (2.5 mM)	1
Random heksamere (50 µM)	2
Reverse transkriptaz (200 U/µl)	1
RNase İnhibitör	0.5
RNase free su	3.5
RNA örneği	10

qPCR Analizi

qPCR (RT-PCR) analizlerinin tamamı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji anabilim dalı Moleküler Patoloji Laboratuvarında Qiagen, Rotor-Gene, 5 plex HRM cihazında SYBR Green qPCR Mix kiti protokolüne göre yapıldı. RT-PCR analizlerinde referans gen olarak β-Aktin kullanıldı. Analizi yapılacak genlerin (Nrf2 ve Kaspaz-3) dizilimleri Tablo 2.2’de sunuldu.

Tablo 2.2. Primer dizileri

Gene	Primer sekans (5'–3')
Nrf2	F: 5'TAGATGACCATGAGTCGCTT3'
	R: 5'CTGTAACCTCGGGAATGGAAA3'
Kaspaz-3	F: 5'GGACAGCAGTTACAAAATGGATTA3'
	R: 5'CGGCAGGCCTGAATGATGAAG3'
β -Aktin	F: 5'CGTGAAAAGATGACCCAGAT3'
	R: 5'ATTGCCGATAGTGATGACCT3'

RT-PCR analizde kullanılan her bir reaksiyon tüpü için uygulanan protokol kapsamında kullanılan master karışımı Tablo 2.3, reaksiyon sıcaklık profili ise Tablo 2.4'te belirtildi. Her PCR döngüsü bünyesinde negatif kontrollü olarak 3 kez tekrar edilerek erime eğrisi analizi yapıldı.

Tablo 2.3. RT-PCR reaksiyon karışımı

Reaktif adı	Hacim (μ l)
2X SYBR Green qPCR Mix	10
Primer Forward (10 pmol/ μ l)	0.4
Primer Reverse (10 pmol/ μ l)	0.4
cDNA örneği	2
Nükleik asit free su	7.2
Toplam	20

Tablo 2.4. RT-PCR termal döngü profili

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Isı aktivasyonu	95	5 dakika	
Denatürasyon	95	10 saniye	
Bağlanma	60	15 saniye	40
Uzatma	72	20 saniye	
Son Uzatma	72	2 dakika	

Hedef genlerin göreceli ifadesi, eş zamanlı olarak analiz programında (Rotor-Gene Q-Pure Detection, Software version 2.3.5) değerlendirildi. Hedef mRNA Ct değerleri dahili kontrol olarak β -aktininkilere normalize edildikten sonra karşılaştırmalı döngü eşiği ($2^{-\Delta\Delta CT}$) yöntemine göre hesaplandı.

2.2.7. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows® version 26.0) programı ile gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin varyasyonunun kontrolü için dağılım analizleri Kolmogrov – Smirnov testi kullanılarak yapıldı. Ayrıca varyansların homojenliği Levene testi ile kontrol edildi. Normal dağılım gösteren veriler ise önce one – way ANOVA testi ile değerlendirildi, daha sonra gruplar arası farklılıkların belirlenmesi için post-hoc Duncan analizi yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata ($\bar{X} \pm S\bar{X}$) şeklinde verildi ve $p < 0,05$ değeri önemli olarak kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1 Serum Biyokimyasal Parametreler

UDCA'nın Cd'nin hepatotoksik etkilerine yönelik koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmada elde edilen serum biyokimyasal parametre sonuçları Tablo 3.1'de sunuldu. Veriler incelendiğinde, AST, ALT, ALP ve GGT değerlerinde kontrol ve UDCA grupları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı saptandı ($p>0.05$). AST düzeyinde Cd ve Cd+UDCA gruplarında kontrol grubuna kıyasla artış belirlendi ($p<0.001$). ALT değeri Cd grubunda artış sergilerken ($p<0.05$), Cd+UDCA grubunda kontrol grubuna kıyasla fark saptanmadı ($p>0.05$). Cd ve Cd+UDCA gruplarında ALP değerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlemlendi ($p<0.001$). GGT değerinin ise Cd grubunda önemli seviyede arttığı ($p<0.001$), Cd+UDCA grubunda ise bu artışın kontrole kıyasla önemsiz olduğu bulundu ($p>0.05$).

Tablo 3.1. Ratlara 60 mg/kg UDCA ve 3 mg/kg Cd uygulamasının karaciğer serum biyokimyasal parametreler üzerine olan etkileri

	KONTROL	UDCA	Cd	Cd+UDCA
AST	108.16±12.79 ^a	110.16±13.52 ^a	251.50±23.37 ^b	232.33±37.53 ^b
ALT	52.83±3.78 ^a	50.33±2.69 ^a	72.00±10.10 ^b	270.66±24.67 ^b
ALP	112.83±10.13 ^a	98.00±11.63 ^a	381.00±90.77 ^b	270.66±24.67 ^b
GGT	2.66±0.42 ^a	2.16±0.47 ^a	7.16±2.24 ^b	5.50±1.62 ^{ab}
	$p<0.001$	$p<0.05$	$p<0.001$	$p<0.05$

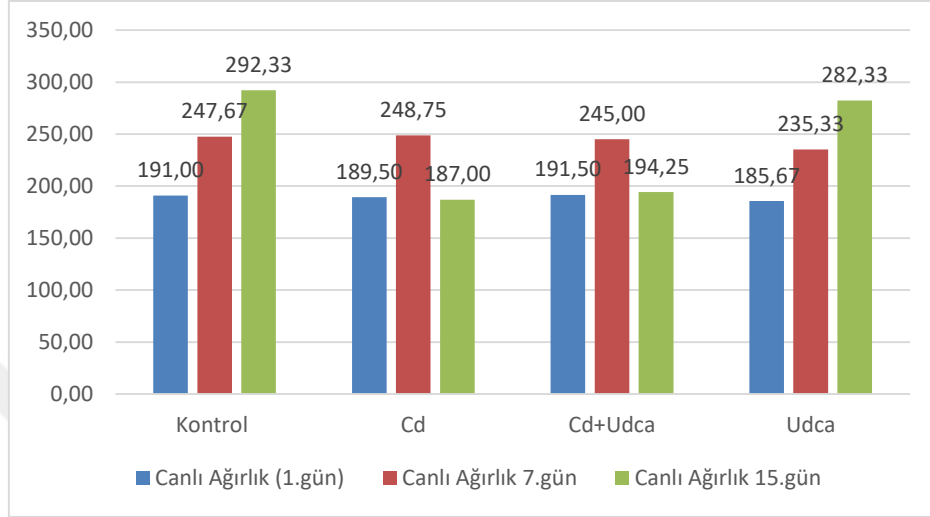
^{a,b} One Way ANOVA, Post hoc Duncan Testine göre aynı sütundaki farklı harfler arasındaki istatistiksel fark önemlidir ($p<0.05$).

3.2.Patolojik Bulgular

3.2.1 Canlı Ağırlık, Relatif Organ Ağırlıkları ve Makroskopik Bulgular

Denemenin başında (1.gün), ortasında ve Cd uygulamasından önce (7.gün) ve deneme sonunda (15.gün) gruplara göre canlı ağırlık tartım sonuçları Grafik 3.1'de

sunuldu. Denemenin başında canlı ağırlık ortalamalarının 185-191 gramdan, 7. günde tüm gruplarda 235-248 grama yükseldiği gözlemlendi. Cd uygulamasının başlaması ile eş zamanlı olarak deneme süresinin sonunda Kontrol ve UDCA gruplarında 282-292 gram aralığında olan canlı ağırlıkların Cd ve Cd+UDCA gruplarında 187-194 grama kadar gerilediği saptandı ($p<0.001$).



Grafik 3.1. Deneme süreci boyunca ratların canlı ağırlık (gram) değişimleri.

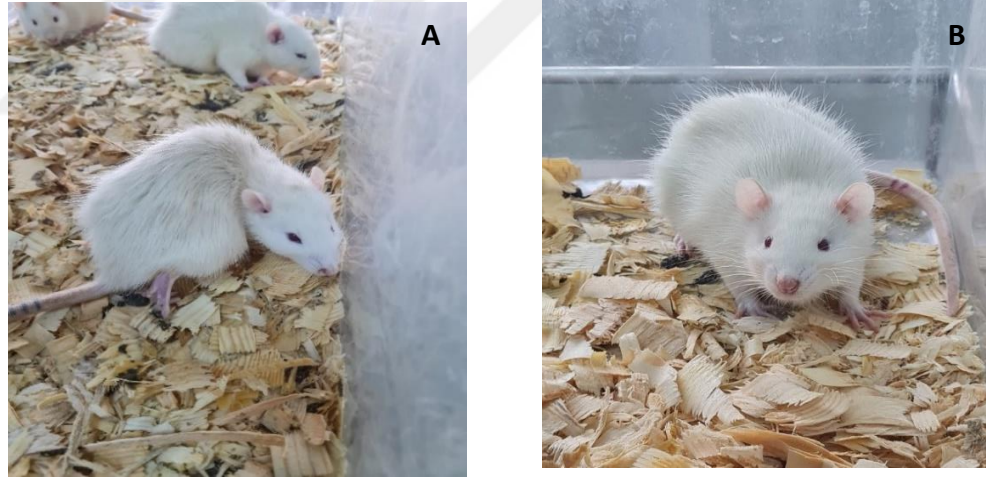
Çalışmada grup içerisindeki hayvanlarda gelişimsel farklar bulunabileceği için karaciğerin direkt ağırlığının, her bir ratın canlı ağırlığına oranlanan karaciğer relatif organ ağırlıkları % olarak ($\text{karaciğer ağırlığı} \times 100 / \text{canlı ağırlık}$) hesaplandı (Ates ve Ortatatlı 2020). Böylece deneme sonunda nekropsi öncesi canlı ağırlıkları kaydedilen ratların karaciğerlerine ait relatif organ ağırlık ortalamaları Tablo 3.2’de gösterildi. Doğrudan karaciğer ağırlıkları değerlendirildiğinde Cd grubunda kontrol ve UDCA grubuna kıyasla önemli oranda azalma kaydedilirken, Cd+UDCA’da daha sınırlı bir azalma gözlemlendi ($p<0.001$). Cd grubunun relatif karaciğer ağırlığı önemli oranda azaldığı belirlendi ($p<0.001$). Cd+UDCA grubunda ise kontrol grubuna kıyasla herhangi bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

Tablo 3.2. Ratlara 60 mg/kg UDCA ve 3 mg/kg Cd uygulamasının Karaciğer, Canlı Ağırlık ve Relatif Karaciğer Ağırlık Verilerine (gram) olan etkileri.

	Karaciğer Ağırlığı	Canlı Ağırlık*	Relatif Karaciğer Ağırlığı
KONTROL	15.84±0.74 ^a	292.33±7.36 ^a	5.43±0.28 ^a
UDCA	14.36±0.48 ^a	282.33±6.03 ^a	5.09±0.17 ^a
Cd	7.49±0.34 ^c	187.00±3.40 ^b	3.97±0.22 ^b
Cd+UDCA	10.00±1.39 ^b	194.25±9.73 ^b	5.23±0.70 ^a
	p<0.001	p<0.001	p<0.05

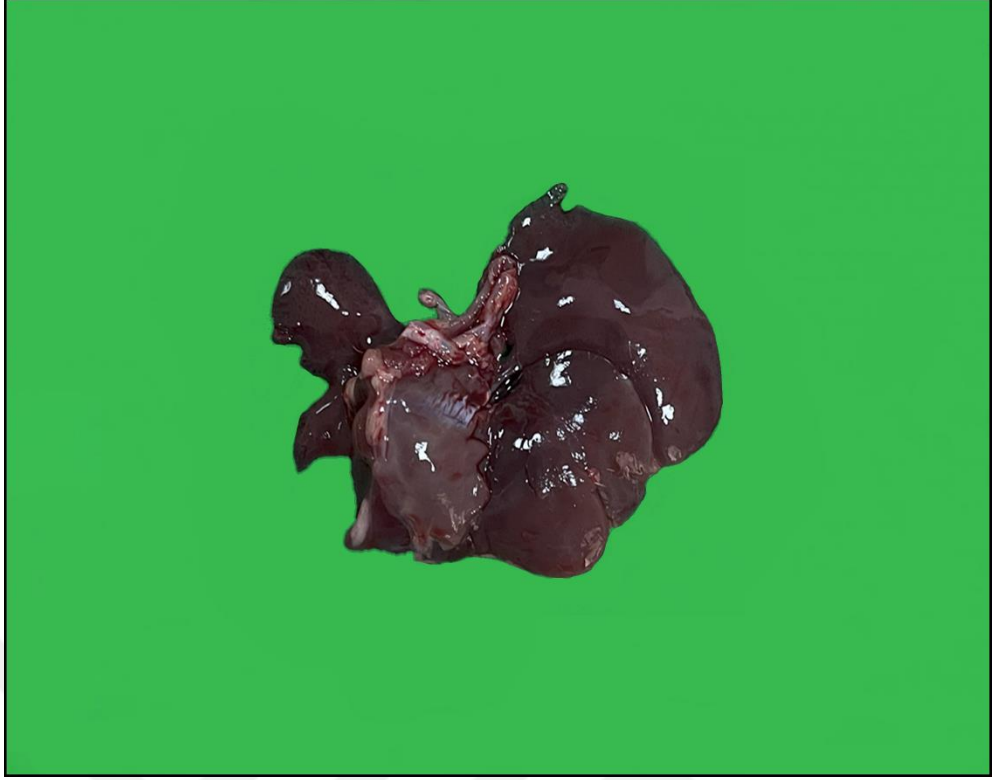
^{a,b,c} One Way ANOVA, Post hoc Duncan Testine göre aynı sütundaki farklı harfler arasındaki istatistiksel fark önemlidir (p<0.05).

* Deneme süresi sonundaki canlı ağırlık tartımlarıdır.



Şekil 3.1. A. Kadmiyum grubu 3 numaralı hayvan uygulamanın 14. günü, B. Cd+UDCA grubu 2 numaralı hayvan uygulamanın 14. günü.

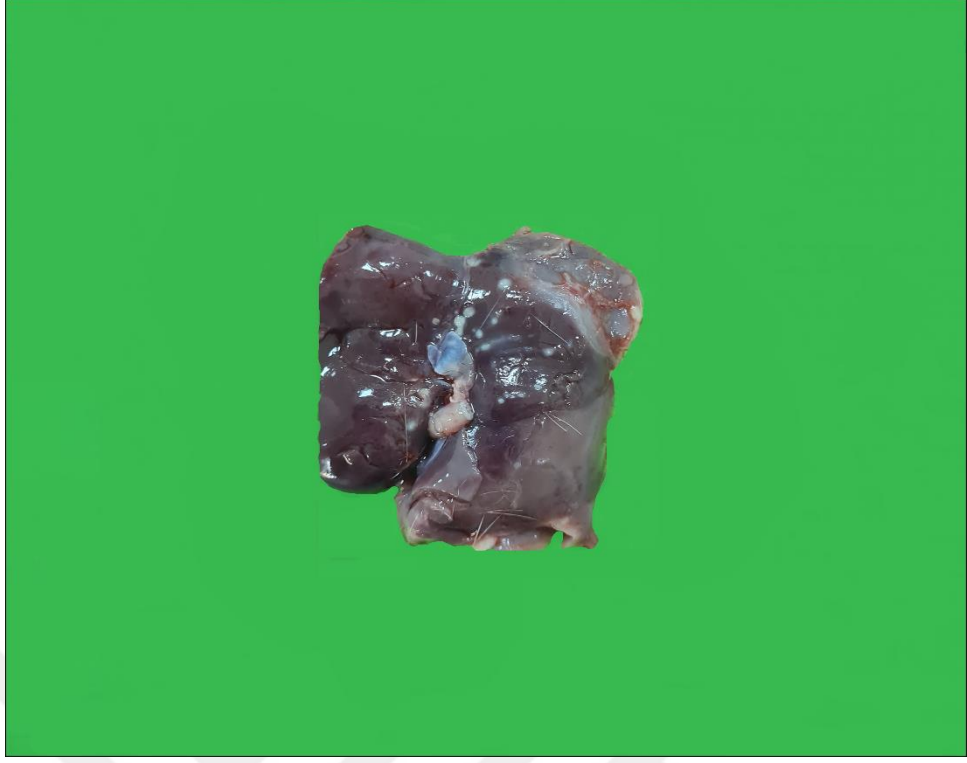
Makroskobik muayenede Cd grubu deneklerinin karaciğerlerinde solgunluk, subkapsular fokal boz beyaz alanlar ve yer yer fibrin iplikçikleri gözlemlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.2. Kontrol grubu karaciğer makroskopik görüntüsü



Şekil 3.3. UDCA grubu karaciğer makroskopik gönrüntüsü



Şekil 3.4. Cd+UDCA grubu karaciğer makroskopik görüntüsü



Şekil 3.5. Cd grubu karaciğer makroskopik görüntüsü

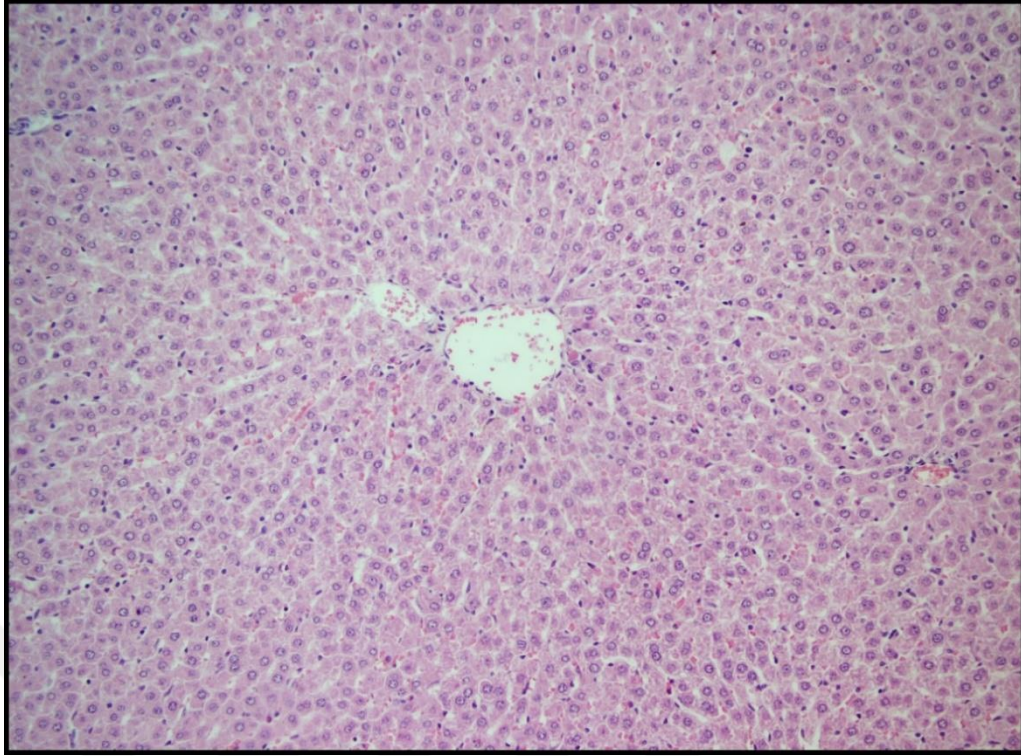
3.2.2 Histopatolojik Bulgular

Karaciğerdeki histopatolojik skorlamalar daha önce Ates ve ark (2022) tarafından bildirilen metoda göre yapıldı. Buna göre hidropik dejenerasyon, yağlanma, nekroz/apoptoz, dissosiasyon, konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu (MNH) şiddet ve yaygınlıklarına göre (0): lezyon yok; (1): hafif; (2): orta; (3): şiddetli ve (4): çok şiddetli olarak en az beş farklı bölgede incelenerek skorlandı. Dejeneratif puanlar toplanarak toplam skor bulundu. Yapılan histopatolojik skorlamalar Tablo 3.3'te sunuldu. İncelenen parametrelerde kontrol ve UDCA grupları arasında bir farka rastlanılmadı ($p>0.05$) (Şekil 3.3-5). Hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve yağlanma açısından Cd grubunda daha çok sentrilobüler bölgede yoğunlaşan lezyonlarda artış gözlenirken bu durumun Cd+UDCA grubunda hafiflediği gözlemlendi ($p<0.001$). Cd grubundaki nekroz alanları, kanama ve hepatositlerdeki apoptozun, Cd+UDCA grubunda önemli oranda düşük seviyelerde kaldığı belirlendi ($p<0.001$) (Şekil 3.9-13). Deneme grubunda kontrol grubuna kıyasla portal alanda safra kanalı proliferasyonu ve MNH infiltrasyonunda belirgin seviyede artış kaydedildi ($p<0.001$). Sinüzoidal konjesyon, dilatasyon ve dissosiyasyonun Cd grubunda kontrol grubuna göre daha şiddetlendiği, bu durumun Cd+UDCA grubunda daha hafif seyrettiği saptandı ($p<0.001$). Toplam karaciğer lezyon skoru açısından yapılan değerlendirmede ise Cd grubunda ciddi seviyelerde artış kaydedilirken, Cd+UDCA grubunda bu skorun normal seviyelere oldukça yaklaştığı belirlendi ($p<0.001$). Her ne kadar çalışmamızda ayrıca skorlanmamış olsa da, Cd grubunda piknotik/büzüşmüş, bazofilik ve hiperkromatik çekirdeğe sahip, sitoplazması eozinofilik ve diğer hücrelerden ayrıran çok sayıda hepatosite ve artan intrahepatik kolestaza (safra pigmenti) rastlanıldı.

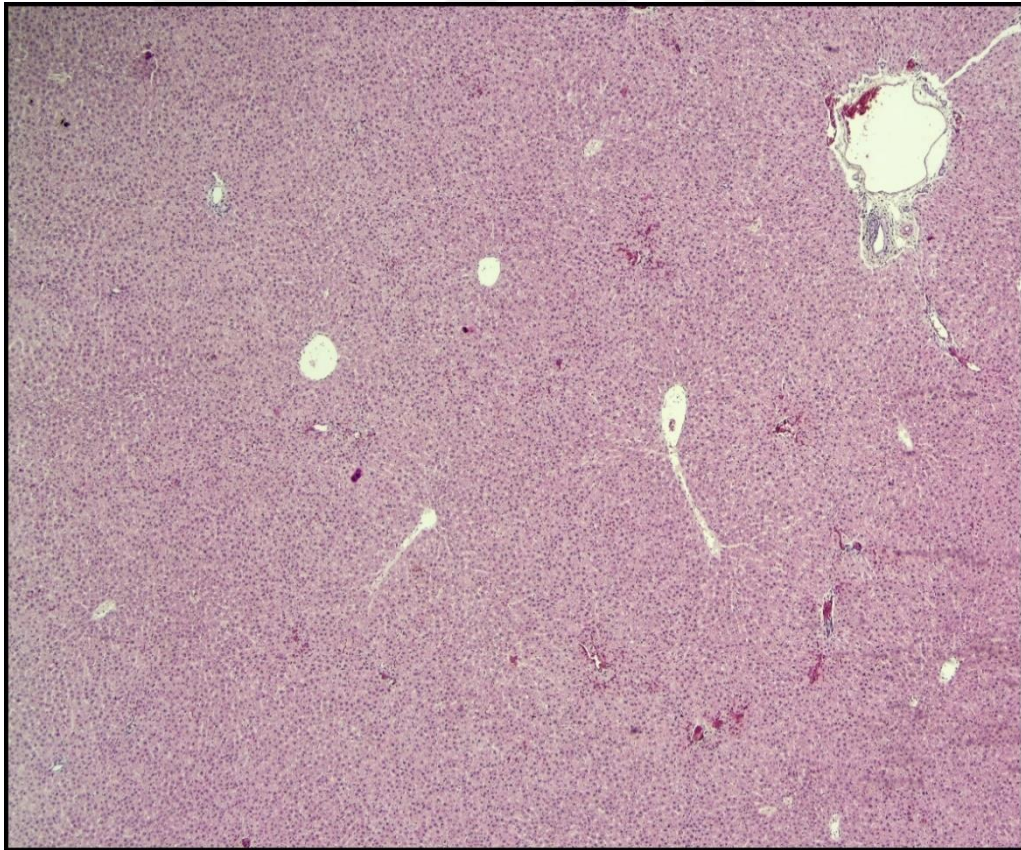
Tablo 3.3. Histopatolojik Skorlama Sonuçları

Bulgular/Gruplar	K	UDCA	Cd	Cd+UDCA	P değeri
Hidropik Dejenerasyon	0.58±0.08 ^a	0.75±0.11 ^{ab}	1.81±0.24 ^c	1.25±0.16 ^b	<0.001
Yağlanma	0.41±0.15 ^a	0.50±0.0 ^a	1.00±0.00 ^b	0.56±0.06 ^a	<0.001
Nekroz/ Apoptoz	0.75±0.11 ^a	0.58±0.08 ^a	2.56±0.17 ^c	1.18±0.13 ^b	<0.001
Safra Kanalı Proliferasyonu	0.75±0.11 ^a	0.75±0.11 ^a	2.37±0.26 ^b	1.12±0.12 ^a	<0.001
Dissosiyasyon	0.75±0.11 ^a	0.50±0.00 ^a	2.5±0.18 ^c	1.31±0.16 ^b	<0.001
Konjesyon	0.83±0.10 ^a	0.83±0.10 ^a	2.75±0.79 ^b	1.18±0.24 ^a	<0.001
MNH	0.75±0.11 ^a	0.75±0.11 ^a	1.50±0.18 ^b	0.56±0.06 ^a	<0.001
Toplam Skor	4.83±0.60 ^a	4.66±0.24 ^a	14.50±1.48 ^b	7.31±0.74 ^a	<0.001

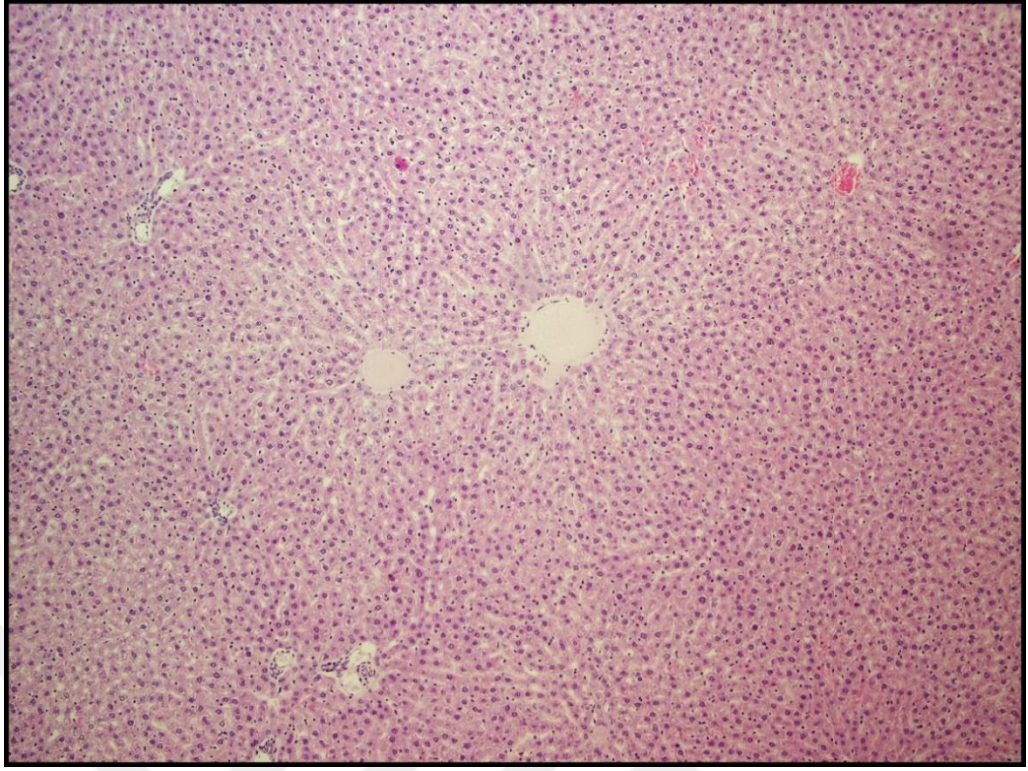
^{a,b,c} One Way ANOVA, Post hoc Duncan testine göre aynı satırdaki farklı harfler arasındaki istatistiksel fark önemlidir (p<0.05).



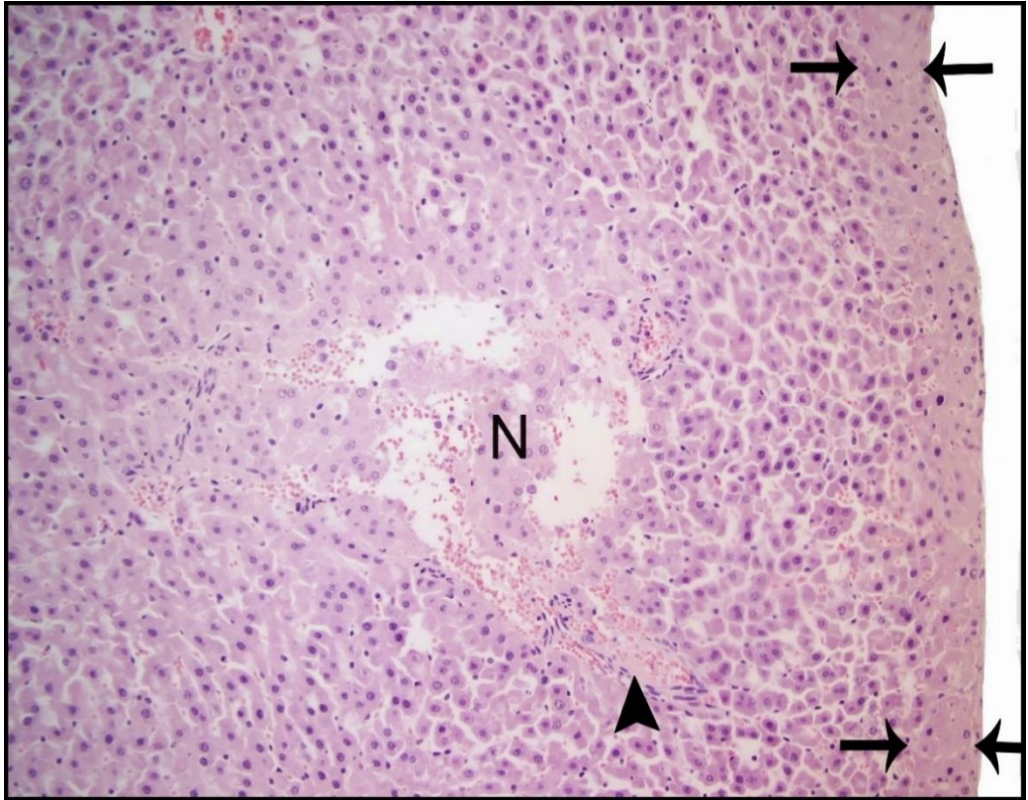
Şekil 3.6. Kontrol grubu. Karaciğer genel görünümü x200, HE



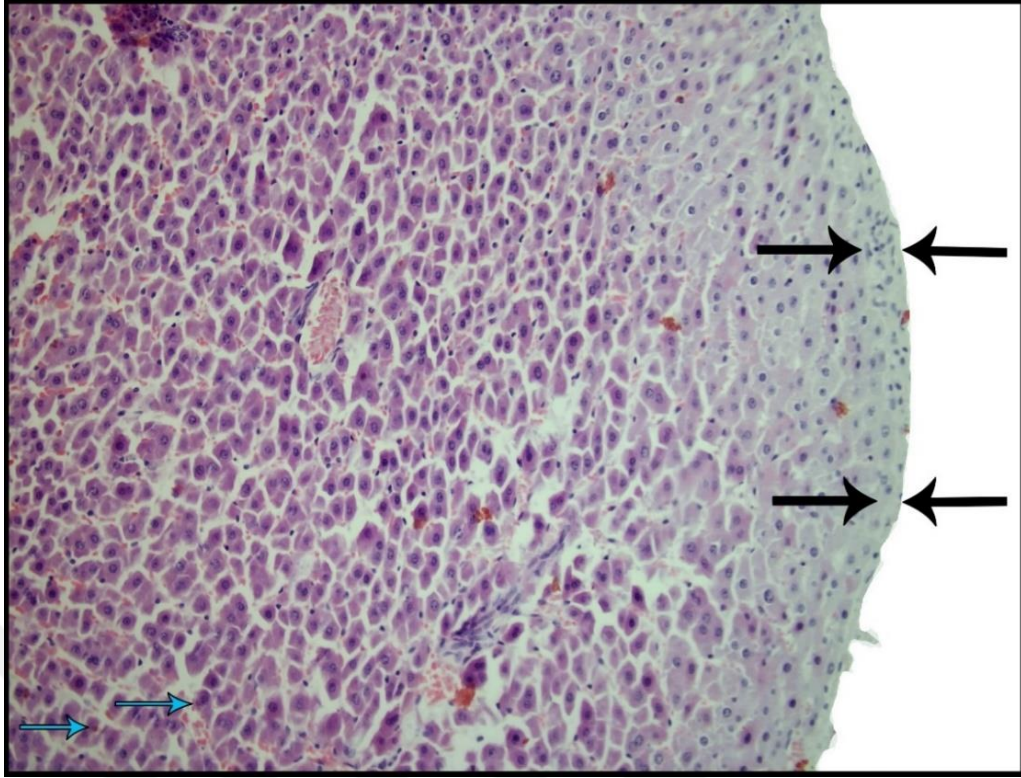
Şekil 3.7. UDCA grubu. Karaciğer genel görünümü, x40, HE



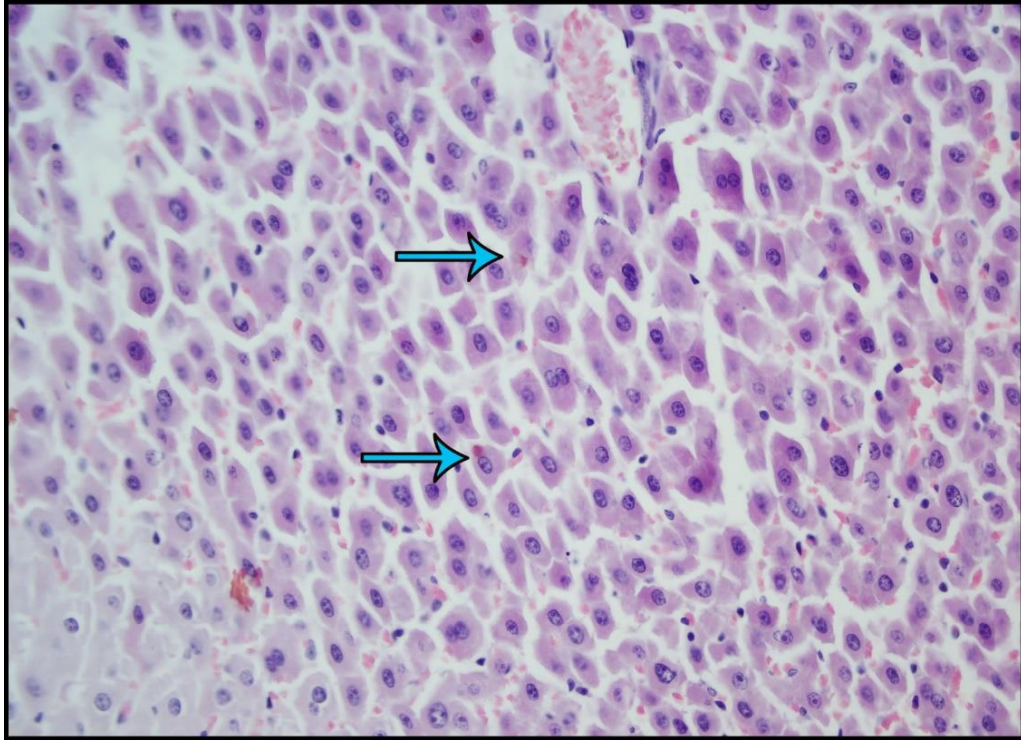
Şekil 3.8. UDCA grubu. Karaciğer genel görünümü, x100, HE



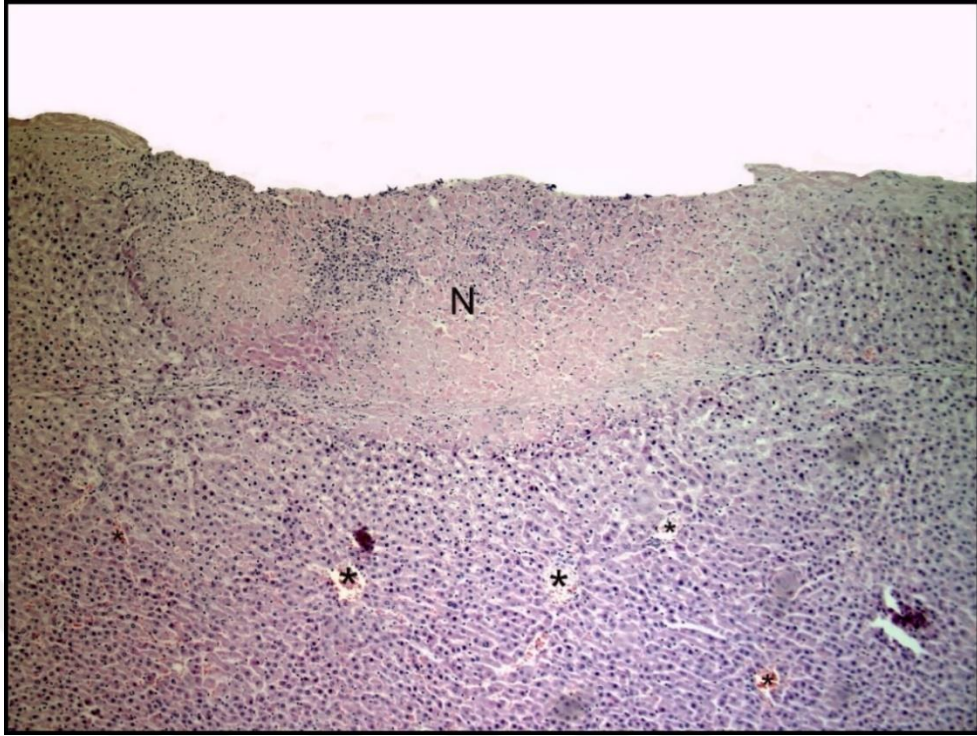
Şekil 3.9. Kadmiyum grubu. Kapsülada kalınlaşma (siyah okların arası), Subkapsular bölgedeki hepatositlerde nekroz-apoptoz, yaygın nekroz alanı (N), kanama alanı (kalın siyah ok), x200, HE



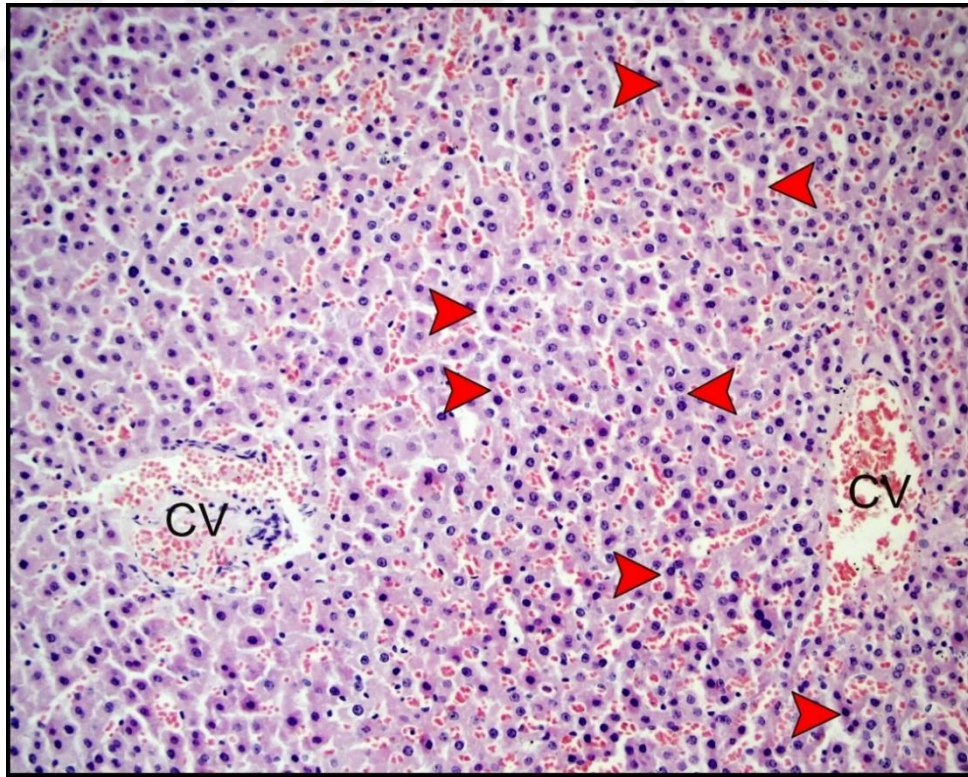
Şekil 3.10. Kadmiyum grubu. Kapsülada kalınlaşma ve subkapsüler bölgede nekrotik değişiklikler (siyah okları), V.centraliste konjesyon, intrahepatik kolestaz (mavi oklar), x200, HE



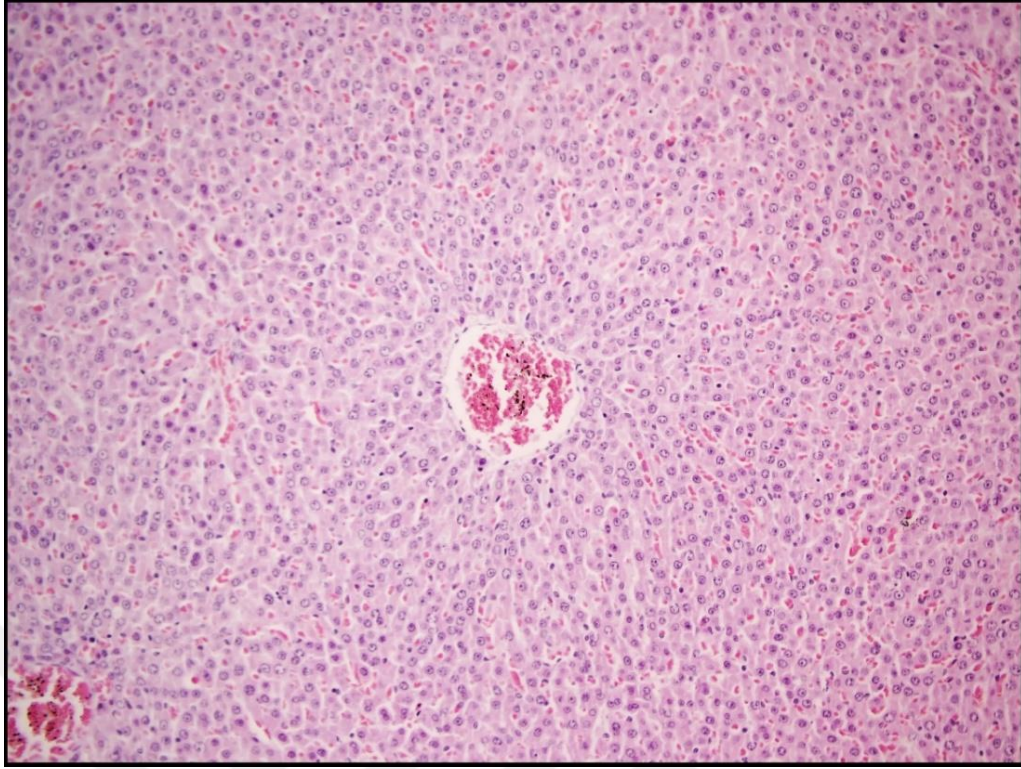
Şekil 3.11. Kadmiyum grubu. İntrahepatik kolestaz (mavi oklar), x400, HE



Şekil 3.12. Kadmiyum grubu. Subkapsular alandan parankime yayılan geniş nekroz odağı (N), damarlarda hiperemi (yıldız), x100, HE



Şekil 3.13. Kadmiyum grubu. V.centralislerde hiperemi (CV) ve sinüzoidal alanlarda hiperemiye bağlı genişleme, hepatositlerde atrofi (kırmızı ok başları), x200 , H&E



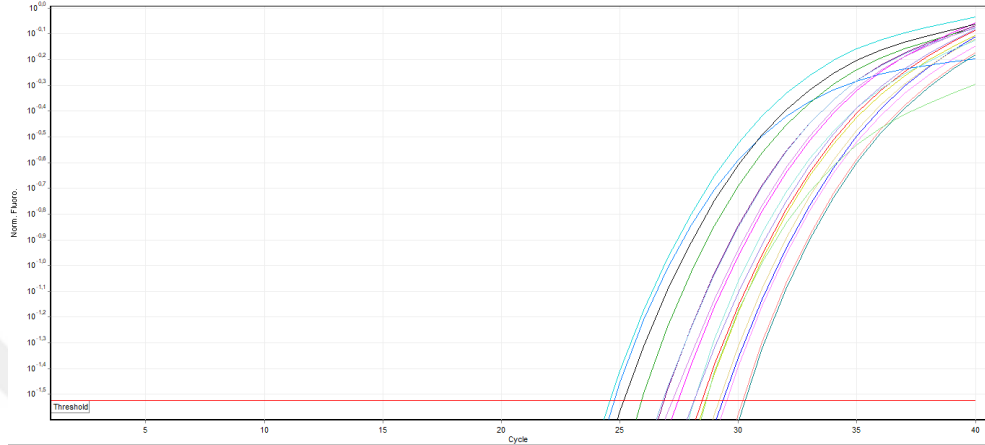
Şekil 3.14. Kadmiyum+UDCA grubu. V. centralisde hiperemi, sinüzoidlerde hafif hiperemi ve genişleme, x100,HE



Şekil 3.15. Kadmiyum+UDCA grubu. Az sayıda hepatositde tek hücre nekrozları (sarı oklar) ve hidropik dejenerasyon (yeşil oklar) x400,HE

3.3. qPCR Bulguları

Çalışmada araştırılan genlerin ekspresyon seviyeleri $\Delta\Delta Ct$ (Delta-delta Ct) yöntemi kullanılarak hesaplandı. Araştırılan her bir genin Ct değerlerinin ortalamalarının, aynı dokuda housekeeping gen olarak seçilen Beta-Actin (Şekil 3.16) için elde edilen Ct değerlerine oranlanmasıyla elde edilen son değerler ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Tablo 3.4'te sunuldu.



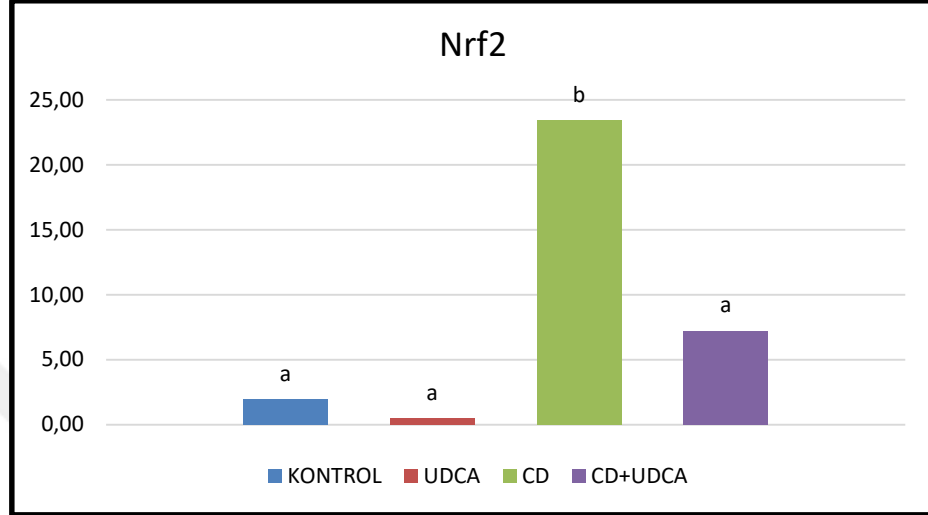
Şekil 3.16. Beta-Actin geni amplifikasyon eğrisi.

Tablo 3.4. qPCR Sonuçları (delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$))

	Nrf2	Kaspaz-3
KONTROL	1.93±0.93 ^a	1,90±1.06 ^a
UDCA	0.49±0.14 ^a	0,76±0.42 ^a
Cd	23.42±3.79 ^b	9.88±1.71 ^b
Cd+UDCA	7.21±2.90 ^a	2.42±0.43 ^a
	p<0.001	p<0.001

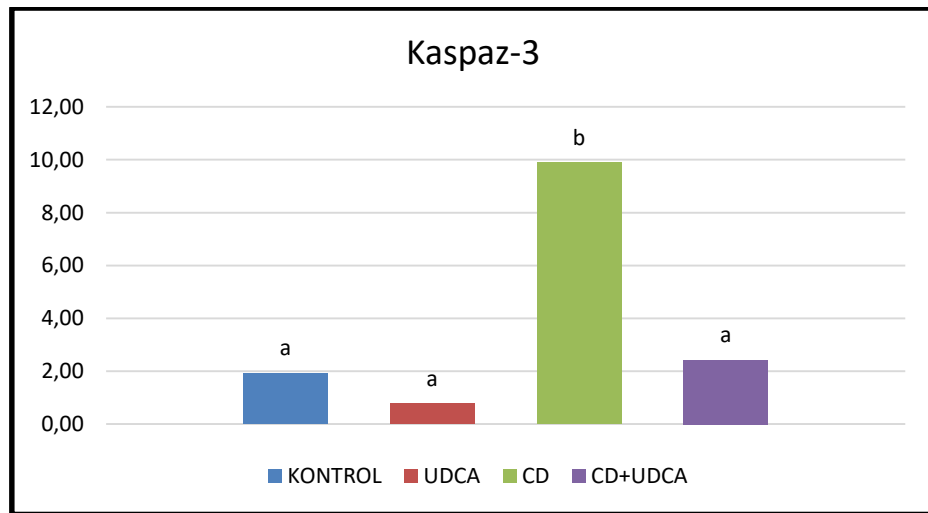
^{a,b} One Way ANOVA, Post hoc Duncan testine göre aynı sütundaki farklı harfler arasındaki istatistiksel fark önemlidir (p<0.05).

Nrf2'nin genine ilişkin olarak Tablo 3.4'teki sonuçlar incelendiğinde Cd grubunda ekspresyonun yüksek oranda arttığı saptandı ($p<0.001$, Grafik 3.2). Aynı genin en az UDCA grubunda ifade edildiği tespit edilirken, Cd+UDCA grubunda ekspresyonun kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmadığı ve normal sınırlar dahilinde olduğu belirlendi.



Grafik 3.2. Gruplara göre Nrf2 ekspresyon seviyelerinin grafiksel gösterimi

Kaspaz-3 genine dair Tablo 3.4'teki sonuçlar incelendiğinde apoptosis için önemli bir protein olan Kaspaz-3 ekspresyonunun Cd grubunda belirgin seviyede artış gösterdiği saptandı ($p<0.001$, Grafik 3.3). Kontrol, UDCA ve Cd+UDCA gruplarında ise istatistiksel bir farka rastlanılmadı.



Grafik 3.3 Gruplara göre Kaspaz-3 ekspresyon seviyelerinin grafiksel gösterimi.

4.TARTIŞMA

Kadmiyum, havada, toprakta, yiyeceklerde bulunan ve tarım ile sanayide sıklıkla kullanılan bir ağır metaldir. Kadmiyum, insanlarda ve hayvanlarda karaciğer, böbrek, akciğer, testis, kalp, iskelet sistemi, sinir sistemi ve bağışıklık sistemi gibi çeşitli sistem ve dokulardaki hücreleri etkileyerek toksisite oluşturabilir (Sarkar ve ark 2013, Canbar ve Tufan 2021). Bu nedenle, kadmiyum maruziyetinin kontrol altına alınması ve azaltılması, hayvan ve insan sağlığının korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Mevcut çalışmada, Ursodeoksikolik asitin (UDCA) deneysel olarak oluşturulan kadmiyum hepatotoksitesine karşı koruyucu etkinliğinin, serum biyokimyasal, makroskopik, histopatolojik ve moleküler olarak araştırılması hedeflendi.

Deney hayvanlarında kadmiyum kaynaklı hepatotoksiste çalışmaları, diğer toksik maddelerden kaynaklanan karaciğer hasarının gelişimine yönelik önemli ipuçları sunmasının yanı sıra metal toksisitesinin mekanizmalarına ışık tutan önemli veriler sağlamıştır. Böylece kadmiyum sık kullanılan deneysel bir hepatotoksik madde haline gelmiştir (Rikans ve Yamano 2000). Uygulama yolundan bağımsız olarak (oral, pulmoner ya da paranteral), maruziyetten hemen sonra Cd'un biriktiği ilk organ karaciğerdir (Baran 2018). Karaciğerdeki birincil hasar, başlangıçta kadmiyumun doğrudan etkilerinden kaynaklansa da ikincil hasar, Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile başlatılan inflamatuvar süreçlerden kaynaklanır. Aktive edilmiş Kupffer hücreleri, sitokinler, adezyon molekülleri, kemokinler ve sitotoksik moleküller veya radikaller gibi bir dizi inflamatuvar mediyatör ortaya çıkarır. Erken yanıt proinflamatuvar sitokinler diğerlerini aktive eder (Rikans ve Yamano 2000). Lipit peroksidasyonu, hücrede oksidatif hasara neden olarak hücre ölümüne yol açan temel moleküler mekanizma olarak gösterilmektedir (Baran 2018). Lipit peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasarıyla sonuçlanan bir hidrojen ayrılması veya bir oksijen radikalinin eklenmesiyle başlatılan bir zincir reaksiyonudur (Baran 2018).

İnsanlarda birincil safra asitleri kolik asit (CA) ve kenodeoksikolik asit (CDCA) ve ikincil safra asitleri olan deoksikolik asit (DCA) ve litokolik asit (LCA) ile bunların glisin ve taurin konjugatları ana safra asitleridir (Mitchell ve ark 2001). Deneysel olarak UDCA rat karaciğerinde daha fazla hidrofilik safra asidi artışı ile

kolestazı önler (Sözen ve Türkay 2011). Safra asidi metabolizması üzerindeki etkisi ile ilgili olarak, çalışmalar UDCA'nın sağlıklı bireylerde, hiperlipidemi hastalarında ve kolestatik karaciğer hastalıklarında kolesterolün safra asitlerine metabolik dönüşümünü arttırdığını göstermiştir (Lazaridis ve ark. 2001). Karaciğerde, hidrofobik safra asitlerinin hücre içi birikimi, artan hücre zarı akışkanlığı ve geçirgenliğinden programlanmış hücre ölümüne (yani apoptoz) ve nekroza kadar değişen bir dizi hücreye zarar veren olaya yol açar (Lazaridis ve ark 2001). Kolestatik karaciğer hastalıklarında UDCA'nın ana terapötik mekanizmalarından birinin, hidrofilik safra asidi havuzunun genişlemesi (yani UDCA ile zenginleştirilmesi) ile endojen hepatotoksik safranın yer değiştirmesi ile ilişkili olduğu varsayılmıştır (Lazaridis ve ark 2001).

Karaciğer ve biliyer sistem fonksiyonların değerlendirilmesinde serum Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST), Alkalen Fosfataz (ALP) ve Gama Glutamil Transpeptidaz (GGT) düzeyleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu parametreler hepatik ve biliyer sistemin bozulmasının hassas serolojik göstergeleri olarak kabul edilmektedir (Pratt ve Kaplan, 2000). Transaminazların (ALT ve AST) bulunduğu dokular akut bir hasara uğradıklarında bu enzimler sistemik dolaşıma katılırlar ve bu durumlarda serum aktivitelerinde artma görülür. Akut karaciğer hasarında serum enzim düzeyleri çok yüksek değerlere kadar çıkabilmektedir (Kadıoğlu 2005). ALP, karaciğerde çoğunlukla safra kanaliküllerine yakın hepatosit membranında ve hepatositlerin sinüzoidallere yakın kısmında lokalize olan bir enzimdir. Yüksek seviyeleri, safra yollarında tıkanıklık veya karaciğer hastalığı gibi durumları göstermektedir (Noyan 2011). GGT, karaciğer ve böbrekte yüksek oranlarda bulunan ve hepatobiliyer fonksiyon bozukluğunu iyi bir şekilde yansıtan spesifik ve duyarlı bir enzimdir. GGT seviyeleri, hepatoselüler bozukluklarda, safra yolu malignitelerinde ve kolanjit olgularında yükselir (Batman 1996). Kadmiyumun bağırsaktan emildikten sonra portal dolaşım yoluyla karaciğere geldiği ve burada çeşitli mekanizmalarla hepatositlerde hasara yol açtığı bildirilmiştir (Arıcı 2008). Mevcut çalışmada, hepatobiliyer sistem hasarının serum biyokimyasal belirteçleri olan AST, ALT, GGT ve ALP seviyeleri 7 gün boyunca 3 mg/kg CdCl₂ uygulamasıyla önemli oranda artmıştır (p<0.01). Cd+UDCA grubundaki ALT, ALP, GGT değerlerin sağlıklı kontrol grubu seviyelerine yaklaştığı gözlemlendi (p<0.05). AST düzeylerinde her

ne kadar bir düşüş gözlense de bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$) (Tablo 3.1). Çalışmamıza benzer şekilde farklı doz ve sürelerde Cd uygulamasının yapıldığı diğer çalışmalarda AST, ALT, ALP ve GGT aktivitesinde artış kaydedilmiştir (Ramakrishnan ve ark 2017, Zhou ve ark 2019, Kim ve ark 2021, Zhu ve ark 2022). UDCA'nın karaciğer fonksiyonlarının değerlendirildiği bir meta-analizde ise, serumdaki karaciğer parametrelerini düşürmek suretiyle hepatoprotektif etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Simental-Mendía ve ark 2020). Çalışmamızda elde edilen serum biyokimyasal parametre sonuçlarının ışığında, Cd uygulamasının doğrudan ve dolaylı toksik etkileriyle hepatosit membran bütünlüğünü bozduğu ve serum parametrelerinde artışa neden olduğu, ancak UDCA'nın söz konusu parametrelerdeki artışı büyük oranda engelleyerek koruyucu etkinlik gösterdiği saptandı. Ayrıca, çalışmanın ilk gününden itibaren yapılan 60mg/kg dozundaki UDCA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla söz konusu parametrelerde olumsuz bir etkisinin olmaması, çalışmadaki doz ve sürelerde UDCA'nın hepatotoksik bir etkiye sahip olmadığına da bir göstergesi olarak yorumlandı.

Vücut ağırlığı ve karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranının hayvanlardaki toksikasyon tablosunu kapsamlı bir şekilde yansıtabilen önemli veriler olduğu bildirilmiştir (Sánchez-Chardi ve ark 2009, Liu ve ark 2019). Çalışmanın başında, ortasında (ilk Cd uygulamasından hemen önce) ve sonunda tüm deneklerin canlı ağırlıkları ölçülerek kayıt altına alındı. Cd grubunda uygulamaya başlamadan önce ağırlık artış seyrinin diğer gruplardan farklı olmadığı belirlendi. Fakat, deneme süresi sonunda yapılan tartımda, Cd grubundaki deneklerin ağırlıklarında çok dramatik bir azalma kaydedildi (Grafik 3.1). Çalışmamızdaki hedef organ olan karaciğerin relatif ağırlıkları değerlendirildiğinde ise Cd grubunda ciddi oranda azalma kaydedilirken Cd+UDCA grubunda bu durumun tersine çevrildiği gözlemlendi (Tablo 3.2). Relatif karaciğer ağırlığındaki azalmanın, Cd kaynaklı hepatotoksisite nedeniyle hepatositlerde oluşan şiddetli nekroz/apoptoz sonucu gerçekleştiği düşünüldü. UDCA'nın ise Cd'nin olumsuz etkilerini azaltarak hepatoprotektif etki gösterdiği belirlendi. Bu bulguların çalışmamızda ölçülen serum biyokimyasal parametre sonuçlarıyla da uyumlu olduğu gözlemlendi. Karaciğerin karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının gerçekleştiği ana organ olduğu göz önüne alındığında, canlı ağırlıklarda meydana gelen Cd kaynaklı azalmaya karaciğer hasarı ve fonksiyonlarının

yetersizliğinin yanı sıra Cd'nin kas ve adipoz doku üzerine olan toksik-yıkıcı etkileri ile iştahsızlığın katkı sağlamış olabileceği düşünüldü (Attia ve ark 2022).

Toksikasyonlarda karaciğerde hasar oluşumu için bazı mekanizmalar önerilmiştir: Hücre içi iyon dengesinin bozulmasıyla toksik maddelerin kovalent bağ ile intraselüler proteinlere bağlanıp Ca dengesini bozması ve apoptoz şekillenmesi; safra kanalikül zarındaki transfer proteinin etkilenmesi veya safra salgısı yapan bölgedeki aktin liflerinin yıkımı sonucu oluşan kolestaz (safra asitlerinin hücre içi birikimi de apoptotik etkiye sebep olur); hücre hasarı ile tetiklenen immun sistem sitokinlerin, kaspazları uyarmasıyla apoptozisin başlatılması; toksik maddelerin hepatositlerde metabolize edilmesi sonucu ortaya çıkan metabolitlerin enzimlere veya proteinlere yaptıkları bileşiklerin antijen etkisiyle hücrel ve humoral immünitinin uyarılması ve hücrelerin yıkımlanması, toksik maddeler veya metabolitlerinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu tetiklemeyle hücrel nekroz ve apoptoz şekillenmesi ve metabolitlerin DNA'ya bağlanıp "addukt" denilen yapıları oluşturması ve özellikle mitokondriyal DNA'nın doğrudan etkilenmesi sonucu hücre ölüm mekanizmalarının aktif hale gelmesi (Jaeschke ve ark 2002, Arıcı 2008, David ve Hamilton 2010). Her ne kadar Cd'nin karaciğer hasarına yol açan toksikasyon mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da yukarıda anılan mekanizmalarla bağlantılı olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Rikans ve Yamano 2000, Ashrafizadeh ve ark 2020, Tian ve ark. 2022).

Bunlardan en önemlilerinden biri olarak kabul edilen oksidatif stres, hücre oksidan/antioksidan homeostazisinde ciddi bir dengesizliğin olduğunu gösterir. Bu durum ROS üretimindeki artıştan ya da reaktif molekülleri nötralizasyon kapasitesindeki düşüşten kaynaklanır (Park ve ark 2023). Bu çalışmada incelenen, detoksifikasyon ve hücre metabolizmasının düzenlenmesi başta olmak üzere hücrel işlevlerde rol oynayan Nrf2, artmış ROS'tan kaynaklanan oksidatif strese karşı savunmada rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Özellikle glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu artırarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltır (He ve ark 2020, Ngo ve Duennwald 2022). Nrf2, lipid peroksidasyonunun ve bunun olumsuz etkilerinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Reaktif oksijen türlerinin aktivitesi ve oksidatif stresin sonucu olan lipid peroksidasyonu, karaciğerde birçok patolojinin

gelişmesinde önemli rol oynamakta ve fibrozis ve hücrel hasara yol açmaktadır (Park ve ark 2023). Ek olarak, Nrf2, karaciğerdeki detoksifikasyon enzimlerinin (örneğin, sitokrom P450 ailesi) gen ekspresyonunu artırarak toksik maddelerin metabolizmasını hızlandırır, vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar ve toksik etkilerini azaltılmasına olanak sağlar (Ashino ve ark 2020). Oksidatif stres, Cd toksikasyonunda hücrel hasarın en önemli yollarından biridir. Karaciğer, detoksifikasyondan sorumlu ana organlardan biri olması nedeniyle Cd toksikasyonundan en çok etkilenen dokudur (Ashrafizadeh ve ark 2020). Ayrıca, ağır metallerin, özellikle kadmiyumun karaciğere afinitesinin, karaciğerde metalotiyonin (MT) varlığından kaynaklandığı da bildirilmiştir (Klaassen ve ark 1999). Hücre hattında yapılan *in vitro* bir çalışmada, Nrf2 aktivasyonun Cd tedavisinden bir saat sonra arttığını ve iki saat sonra zirveye ulaştığını ortaya çıkardı. Apoptozun ise, Cd tedavisinden altı saat sonra tespit edildiği ve sonraki 18 saat içinde apoptotik hücre popülasyonunda konsantrasyona ve zamana bağlı bir artış meydana geldiği saptanmıştır. Söz konusu çalışmada, Nrf2 ekspresyonunun, Cd kaynaklı patolojik apoptoza karşı ilk zamanlarda direnç kazandırdığı sonucuna ulaşılmıştır (Chen ve Shaikh 2009). Farelerde yapılan bir çalışmada ise Nrf2'nin kademeli aktivasyonunun, kadmiyum kaynaklı hepatotoksositeye karşı koruma sağlayan önemli bir hücrel bir yanıt olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark 2013). Ancak bu hücrel antioksidan savunma mekanizması doz ve maruziyet süresine göre değişkenlik göstermektedir. Akut Cd maruziyeti sonrasında Nrf2 düzeyi artarak, oksidatif stresin hücredeki zararlı etkilerine karşı koruma sağlamak için antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu yükselterek tepki verir. Ancak, uzun süreli maruziyet sonucunda Nrf2 yolağının aktivasyonu veya hücrelerin bu aktivasyona olan yanıtı azalabilir. Bu durum oksidatif stres kaynaklı hücrel hasarla sonuçlanır. Yüksek Cd dozları veya uzun süreli maruziyet, hücrelerdeki Nrf2 yolağındaki aktivasyonun aşırı reaksiyonuna ve sonunda Nrf2'nin negatif bir geri besleme mekanizmasıyla inhibe edilmesine neden olabileceği de göz önüne alınmalıdır (He ve ark 2020, Dodson ve ark 2019). Çalışmamız bulguları incelendiğinde, 7 günlük 3 mg/kg Cd uygulamasının karaciğer Nrf2 mRNA düzeylerini normalin yaklaşık 12 katına çıkardığı gözlemlendi. Bu durumun Cd'nin hücrel oksidatif stresi güçlü bir şekilde uyarmasına karşı şekillenen bir hücrel yanıt olduğu düşünüldü. Cd+UDCA grubunda, Nrf2 düzeylerinin çalışma grupları dahilinde normal sınırlar içerisinde kalmayı başardığı gözlemlendi. UDCA'nın

hepatobiliyer hastalıklardaki koruyucu etkisi, anti-kolestastatik, detoksifikasyon ve oksidatif strese karşı sitoproteksiyon özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Okada ve ark 2008). Çalışmanın UDCA'nın tedavi edici değil koruyucu etkinliğinin araştırılması yönünde tasarlandığı göz önünde bulundurulduğunda, UDCA'nın Cd toksikasyonuna bağlı ortaya çıkan/oluşan ROS'ların doğrudan eliminasyonundan ziyade, Cd detoksifikasyonu artırarak ve Cd'nin hücresel düzeydeki olası hasar mekanizmalarını engelleyerek dolayısıyla ROS birikimine mâni olarak hepatoprotektif etkinlik göstermiş olabileceği düşünüldü. Ayrıca UDCA verilen grupta herhangi bir ROS artışın gözlenmemesi de, çalışmadaki doz ve sürelerde tek başına UDCA uygulamasının oksidatif strese yol açmadığının bir kanıtı olduğu yönünde yorumlandı.

Kadmiyumun hücresel reaktif oksijen radikallerini arttırdığı, DNA'da hasara neden olduğu, DNA onarım mekanizmaları ile hücre siklusunu ve proliferasyon döngüsünü değiştirdiği, apoptozu indüklediği ve epigenetik modifikasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Rikans ve Yamano 2000). Kadmiyumun, mitokondriyal elektron transport zincirini bozmak ve ROS birikimine neden olmak suretiyle mitokondriyal disfonksiyona neden olarak apoptozu indüklediği öne sürülmektedir (Rikans ve Yamano 2000). Apoptozis, kolestatik karaciğer hastalıklarında hücre ölümünün en kritik mekanizmasıdır. Bunun en önemli sebebi kolestatik hepatositlerde hidrofobik safra asitlerinin birikimidir. Ratlarda yapılan bir çalışmada Cd maruziyetinin kolestaz ve toksik safra asitlerinde artışa neden olarak karaciğer hasarına yol açtığı bildirilmiştir (Tian ve ark. 2022). Cd uygulamasının, rat HepG2 hücre hattında ve karaciğer dokusunda Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı, Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonunu ise artırdığı rapor edilmiştir (Lawal ve ark 2015, Wang ve ark 2020, Yang ve ark 2021). Tavşanlarda yapılan bir diğer çalışmada 20mg/kg dozunda Cd uygulamasının hem Kaspaz-3'ün mRNA seviyelerini hem de immunohistokimyasal olarak hepatositlerdeki ekspresyon seviyelerini artırdığı tespit edilmiştir (Baiomy ve Mansour 2016). Bax, mitokondriyal sitokrom C'nin (Cyt C) sitoplazmaya salınmasına neden olarak Kaspaz-3 aktivasyonunu başlatmaktadır. Kaspaz-3 ise aktive edildiğinde apoptoza neden olan önemli bir sitoplazmik pro-enzimdir (Souza-Arroyo ve ark 2022). Literatürdeki çalışmalara paralel olarak mevcut çalışmada yalnız Cd uygulanan grupta Kaspaz-3 mRNA ekspresyonunun normalin beş katı kadar yükseldiği saptandı. Cd+UDCA grubunda ise Kaspaz-3 seviyesinin normal sınırlar dahilinde tutulduğu

gözlendi. UDCA'nın Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonlarını azaltarak hücrel apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (Ji ve ark 2009). Ayrıca, mitokondriyal membran depolarizasyonunu ve kanal oluşumunu inhibe ederek, sitokrom c salınımını engellemek suretiyle apoptozu önlediği saptanmıştır (Rodrigues ve ark 1998, Rodrigues ve ark 1999). UDCA'nın, GSH ve tiyol içeren proteinleri artırmak suretiyle, hepatositleri oksidatif hasara karşı koruduğu ifade edilmiştir (Mitsuyoshi ve ark 1999). Tüm bunlar bir arada değerlendirildiğinde, Cd tarafından uyarılan apoptozis belirteci Kaspaz-3 ekspresyondaki artışın, UDCA tarafından başarıyla tolere edildiği, Kaspaz-3 dolasıyla apoptotik aktivitenin inhibe edilerek fizyolojik sınırlar dahilinde tutulduğu saptandı. UDCA'nın bu etkinliğinin Cd tarafından oluşturulan hücrel özellikle de mitokondriyal hasar ile reaktif oksijen türlerinin hücre içi birikimini engelleyerek gerçeşleştirmiş olabileceği düşünöldü. Ek olarak, Cd tarafından da indöklenebilen, hepatosit hasarı, apoptoz ve nekroza neden olan kolestatın (Tian ve ark. 2022), güçlü anti-kolestatik etkinliği bilinen UDCA tarafından engellenmesi bu duruma katkı sağlayan önemli bir husus olarak değerlendirilmiştir.

Nrf2 sinyal yolunun apoptotik hücre ölümlünün düzenlenmesinde dikkate değer bir rol oynadığı son dönemlerde üzerinde durulan konulardan biridir (Ashrafizadeh ve ark 2020). Nrf2 sinyal yolunun nükleer translokasyonunun apoptoz geçiren hücre sayısındaki azalmayla ilişkili olabileceği ifade edilmektedir (Chen ve Shaikh 2009). Aksine, protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK)/Nrf2 sinyal yolunun aktive olmasıyla, artan Nrf2 translokasyonunun ER stresini ve apoptozu artırarak kardiyomiyositlerde hasara neden olduğu bildirilmiştir (Tao ve ark 2019). Paralel olarak, çekirdekte sürekli Nrf2 birikiminin karaciğerde hücre hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Taguchi ve ark 2012). Diğer taraftan Chen ve Shaikh (2009), Cd uygulamasından yaklaşık iki saat içerisinde Nrf2 aktivasyonun zirveye çıktığını, apoptozun ise ilk 6 saatte ortaya çıktığı ve 18 saat içinde doza ve zamana bağlı artış olduğunu belirtmişlerdir. Bu çelişkili bulgular apoptoz sırasında Nrf2 yolunun ikili rolünü vurgulamaktadır. Mevcut çalışmada, Cd grubunda hem Nrf2 hem de apoptoz belirteci Kaspaz-3 ekspresyonu önemli ölçüde artmıştır. Bu durum, Cd uygulamasıyla hızla artan Nrf2 aktivasyonun hücrenin oksidatif strese karşı sergilemiş olduğu ilk yanıt olduğu hatta bunun başlangıçta apoptoza karşı direnç sağlamış olabileceği düşünöldü (Tablo 3.4). Ancak, tekrarlayan doz ve süreye bağlı olarak artan hücrel

hasarın zamanla Kaspaz-3 seviyelerinde yükselmeye neden olduğu yorumlandı. Öte yandan, Cd uygulamasının, PERK/Nrf2/apoptozis yolağını karaciğerde ne yönde etkilediğini araştırmak için ilave çalışmalara ihtiyaç bulunduğu düşünüldü.

Kadmiyum maruziyetine ilişkin olarak; sıçanlara içme suyu ile 15 ppm miktarda 30 gün süreyle yapılan uygulamanın, karaciğerde hepatositlerde vakuoler ve granüler dejenerasyon, heterokromatik nukleus oluşumu ile sinüzoidal ve portal genişlemeye neden olduğu bildirilmiştir (Koyu ve ark 2006). Bir diğer çalışmada, ratlara 5 mg/kg dozda oral Cd verilen grupta birçok hepatositte granüler ve vakuoler dejenerasyon, nekroz, hepatositlerin şişmesiyle birlikte düzensiz hepatik kordlar, daralmış hepatik sinüzoidler ve yoğunlaşmış kromatinli, piknotik çekirdekli hepatositler olmak üzere histopatolojik lezyonlar gözlemlendi (Fang ve ark 2021). 3 mg/kg, intraperitonel CdCl₂ uygulamasının histopatolojik olarak ciddi karaciğer hasarına neden olduğu ve non-spesifik piknotik çekirdeğe sahip çok sayıda hepatosit gözlemlendiği kaydedildi (Goodarzi ve ark 2020). Benzer şekilde çeşitli doz ve sürelerde Cd'nin karaciğer hasarına neden olduğunu kanıtlayan ilave çalışmalar bulunmaktadır (Wu ve ark 2012, Souza-Arroyo ve ark 2022, Tian ve ark 2022). Mevcut çalışmada; Cd grubunda daha çok sentrilobüler bölgede yoğunlaşan hidropik dejenerasyon, fokal nekroz alanları, tek hücre nekrozu (apoptozis) ve kanama bulgularında artış gözlemlendi. Cd grubunda hiperkromatik, piknotik/büzülmüş çekirdekli, eozinofilik sitoplazmalı çok sayıda hepatosit dikkati çekti. Cd grubunda kontrol grubuna kıyasla portal alanda safra kanalı proliferasyonu, MNH infiltrasyonu, sinüzoidal konjesyon, dilatasyon ve dissosiasyonun belirgin şekilde artış sergilediği belirlendi. Skorlanan bulgulardan elde edilen nihai karaciğer lezyon skorunun Cd grubunda diğer gruplara kıyasla oldukça yüksek olması histopatolojik olarak Cd kaynaklı hepatoselüler hasarın geliştiğinin bir göstergesi olarak kabul edildi. Cd+UDCA grubunda anılan histopatolojik bulgular ve toplam skorun başarılı bir şekilde hafifletilmesi, Cd-kaynaklı hepatotoksisiteye karşı UDCA'nın hepatoprotektif etkinliğinin bir göstergesidir. İncelenen parametreler açısından UDCA ve kontrol gurubu arasında herhangi bir farka rastlanılmaması da UDCA'nın karaciğer üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını bir kanıttır (Tablo 3.8). Histopatolojik olarak elde edilen tüm bu veriler, karaciğer hasarını gösteren serum biyokimyasal biyobelirteçlerindeki bozulma ve relatif karaciğer ağırlığındaki Cd kaynaklı azalma

bulgularıyla örtüşmektedir. Ayrıca, Nrf2 mRNA düzeylerindeki artış, hepatositlerde gözlenen hasarın temelinde oksidatif stresin yattığı, Kaspaz-3 mRNA seviyesindeki artışın ise oluşan hasara apoptozisin ciddi oranda katkı sağladığı şeklinde yorumlandı.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde özellikle tarım alanında olmak üzere birçok alanda kullanımı artan kadmiyumun başta karaciğer de olmak üzere canlı vücuduna olumsuz etkileri vardır. UDCA, birincil olarak kolestatik olmak üzere birçok karaciğer hastalıklarında ve son dönemlerde çeşitli tümör tiplerinin tedavisinde kullanılan bir bileşendir. Mevcut çalışmada ratlarda kadmiyumun karaciğer üzerine olan toksik etkileri üzerine UDCA'nın koruyucu özellikleri değerlendirildi.

Yapılan çalışmada $CdCl_2$ 'nin karaciğer hasarı ve fonksiyonlarının yetersizliğine sebep olmasıyla kas ve adipoz doku üzerindeki yıkıcı etkisi sonucu kilo kaybına sebep olduğu görüldü. Cd'nin hepatositlerde nekroz ve apoptoza neden olduğu ve buna bağlı olarak da karaciğer relatif ağırlığında azalmaya sebep olduğu gözlemlendi.

$CdCl_2$ 'nin doğrudan veya dolaylı toksik etkileriyle hepatosit membran bütünlüğünü bozduğu ve karaciğer fonksiyonlarına ilişkin serum parametrelerinde (AST, ALT, ALP ve GGT) artışa sebep olduğu belirlendi.

Moleküler seviyede, $CdCl_2$ kaynaklı oksidatif strese bağlı olarak karaciğer dokusunda Nrf2 mRNA düzeylerinde ciddi artış bulundu.

Apoptozisin önemli bir biyobelirteci olan Kaspaz-3 mRNA düzeyinin $CdCl_2$ uygulamasıyla ciddi oranda artış sergilediği saptandı. Bu verilere ilave olarak histopatolojik olarak artan dejeneratif değişiklikler ve karaciğer lezyon skoru da bir arada değerlendirildiğinde $CdCl_2$ kaynaklı hepatoselüler hasarın geliştiği gözlemlendi.

UDCA verilen gruba çalışmanın 8. gününden itibaren uygulanan $CdCl_2$ etkileri değerlendirildiğinde ($Cd+UDCA$), canlı ağırlık, relatif karaciğer ağırlığı, serum biyokimyasal karaciğer biyobelirteçleri (AST, ALT, ALP ve GGT) seviyelerindeki anormal değişimlerin UDCA tarafından engellendiği ve normal değer aralıklarında tutulmasına yardımcı olduğu görüldü.

UDCA, $CdCl_2$ etkisiyle oksidatif stres ile tetiklenen Nrf2 ve apoptoz biyobelirteci olan Kaspaz-3 seviyelerindeki artışın önüne geçti. Histopatolojik olarak $CdCl_2$ kaynaklı hasarın UDCA ile hafifletildiği gözlemlendi.

Sonuç olarak, $CdCl_2$ tarafından oluşturulan karaciğer toksisitesine karşı UDCA'nın belirgin bir hepatoprotektif etki sergilediği saptandı. UDCA'nın hem

CdCl_2 hem de diğ er hepatotoksik maddelere karş ı hepatoprotektif etki mekanizmasının aydınlatılması için daha geniş moleküler araştırmaların yapılması önerilmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM, 2009. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *Journal of lipid research*, 50, 9, 1721-34.
- Arıcı S, 2008. Toksik hepatit. *Pamukkale Medical Journal*, 1, 2, 113.
- Ashino T, Yamamoto M, Numazawa S, 2020. Nrf2 antioxidative system is involved in cytochrome P450 gene expression and activity: a delay in pentobarbital metabolism in Nrf2-deficient mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 48, 8, 673-80.
- Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Farkhondeh T, Samarghandian S, 2020. Back to nucleus: combating with cadmium toxicity using Nrf2 signaling pathway as a promising therapeutic target. *Biological trace element research*, 197, 52-62.
- Ateş MB, Ortatatlı M, 2020. Protective effect of nigella sativa and thymoquinone on relative liver weight increase caused by aflatoxin in broilers.
- Ateş MB, Özdemir Ö, Öztürk AE, Bucak MN, Bulut A, 2022. Histopathological evaluation of the effects of thymoquinone and resveratrol on the liver in rats administered doxorubicin.
- Attia SM, Varadharajan K, Shanmugakonar M, Das SC, Al-Naemi HA, 2022. Cadmium: An emerging role in adipose tissue dysfunction. *Exposure and Health*, 14, 1, 171-83.
- Bachrach WH, Hofmann AF, 1982. Ursodeoxycholic acid in the treatment of cholesterol cholelithiasis. *Dig Dis Sci*, 27.
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun E, Stohs S, 1996. Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. *Biological trace element research*, 52, 143-54.
- Baran AH, 2018. Kadmiyumun neden olduğu karaciğer, akciğer ve böbrek hasarı üzerine Sildenafil koruyucu etkisi.
- Batman F, Arslan S, 1996. Karaciğer fizyolojisi. *Temel cerrahi*, 2, 1205.
- Bayindir N, Esrefoglu M, Kumas M, Iraz M, Kesgin S, Kilic E, 2016. Ratlarda Kurkuminin Kadmiyum ile İndüklenen Karaciğer Apoptozu Üzerine Koruyucu Etkisi. *Bezmialem Science*, 4, 3.
- Bektas A, Ulusoy M, Dagalp K, 2020. Does Ursodeoxycholic Acid Work with Nondiabetic Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis? *Konuralp Tıp Dergisi*, 12, 1.
- Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, Dombrowski F, 2001. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology*, 33, 5, 1206-16.
- Bulan ÖK, Koyutürk M, Bolkent Ş, Yanardağ R, Oğuz AT, 2014. Sıçan tiroid bezinde kadmiyum hasarına karşı C vitamini, E vitamini ve selenyumun kombine kullanımının etkileri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35, 4.
- Calmus Y, Gane P, Rouger P, Poupon R, 1990. Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology*, 11, 1, 12-5.
- Canbar R, Tufan Ö, (2021). Cadmium Toxicity. International Symposium On Current Developments In Science, Technology And Social Sciences, BILTEK-IV. Gaziantep.
- Carmona-ApAricio L, Pérez-Cruz C, Zavala-Tecuapetla C, Granados-Rojas L, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J, Sampieri AI, Coballase-Urrutia E, 2015. Overview of Nrf2 as therapeutic target in epilepsy. *International journal of molecular sciences*, 16, 8, 18348-67.
- Chen J, Shaikh ZA, 2009. Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 241, 1, 81-9.

- Chen Y-S, Liu H-M, Lee T-Y, 2019. Ursodeoxycholic acid regulates hepatic energy homeostasis and white adipose tissue macrophages polarization in leptin-deficiency obese mice. *Cells*, 8, 3, 253.
- Colombo C, Battezzati PM, Podda M, Bettinardi N, Giunta A, 1996. Ursodeoxycholic acid for liver disease associated with cystic fibrosis: A double-blind multicenter trial. *Hepatology*, 23, 6, 1484-90.
- Cook J, Hoffmann E, Luzio ND, 1975. Influence of lead and cadmium on the susceptibility of rats to bacterial challenge. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 150, 3, 741-7.
- Coşan Dt, Dal A, Soyocak A, Çolak E, Çiçek A, Kurt H, 2017. Kadmiyum Toksisitesi Oluşturulan Sıçanlarda Tannik Asitin, Ağır Metal Giderimi ve Bazı Biyokimyasal Değerler Üzerine Etkisinin Araştırılması. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 18, 4, 146-53.
- Çetinbaş S, 2019. Testiste yer alan hücrelerde akut ve kronik kadmiyum alımına bağlı hücre ölümünün değerlendirilmesi, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Akademik Arşiv Sistemi.
- Çiftçi M, Ortatatlı M, Erer H, Hatipoğlu F, Özdemir Ö, 2015. Veteriner sistemik patoloji 1. Cilt, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Çolakoğlu N, Kükner A, Ozan E, Kara H, Koyutürk L, 2011. Sıçan testis dokusunda kadmiyum klorür'ün oluşturduğu yapısal değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine metallothionein'nin etkileri: Elektron mikroskopik çalışma. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME, 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development*, 13, 22, 2905-27.
- David S, Hamilton JP, 2010. Drug-induced liver injury. *US gastroenterology & hepatology review*, 6, 73.
- Dodson M, de la Vega MR, Cholanians AB, Schmidlin CJ, Chapman E, Zhang DD, 2019. Modulating NRF2 in disease: timing is everything. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 59, 1, 555-75.
- Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J, Flood L, Wang S, Hubbs A, Luster MI, 1998. Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicology and applied pharmacology*, 151, 2, 359-66.
- Elciyar N, Streptozotosin ile diabetes mellitus oluşturulan rat pankreaslarında hidroksitirozolün NRF2 ekspresyonu üzerine etkisi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- Erboğa M, 2013. Kadmiyumun gebeliğin farklı dönemlerindeki sıçan plasentalarında bulunan trofoblast hücre proliferasyonu ve apoptozisi üzerine etkisi.
- Erer H, Kıran M, Çiftçi M, 2009. Veteriner Genel Patoloji, 3. Baskı, Bahçivanlar Basım Sanayi, Konya.
- Fang J, Yin H, Yang Z, Tan M, Wang F, Chen K, Zuo Z, Shu G, Cui H, Ouyang P, 2021. Vitamin E protects against cadmium-induced sub-chronic liver injury associated with the inhibition of oxidative stress and activation of Nrf2 pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111610.
- Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ, 1999. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *The Journal of clinical investigation*, 103, 1, 137-45.
- Glantz A, Marschall HU, Lammert F, Mattsson LÅ, 2005. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a randomized controlled trial comparing dexamethasone and ursodeoxycholic acid. *Hepatology*, 42, 6, 1399-405.
- Goodarzi Z, Karami E, Yousefi S, Dehdashti A, Bandegi AR, Ghanbari A, 2020. Hepatoprotective effect of atorvastatin on Cadmium chloride induced hepatotoxicity in rats. *Life sciences*, 254, 117770.

- Goossens J-F, Bailly C, 2019. Ursodeoxycholic acid and cancer: From chemoprevention to chemotherapy. *Pharmacology & therapeutics*, 203, 107396.
- Guarino MPL, Cocca S, Altomare A, Emerenziani S, Cicala M, 2013. Ursodeoxycholic acid therapy in gallbladder disease, a story not yet completed. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19, 31, 5029.
- Gülçen B, Karaca Ö, Kuş M, Akpolat N, Kuş İ, 2011. Deneysel kadmiyum toksisitesinde melatonin hormonunun karaciğer üzerindeki koruyucu etkisi: immunohistokimyasal bir çalışma. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1, 2, 13-7.
- Habeebu SS, Liu J, Klaassen CD, 1998. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 149, 2, 203-9.
- Haki K, 2016. Veteriner hekimliği alanında civa, kurşun, kadmiyum, arsenik ve bakır toksikasyonları. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 2, 3, 30-7.
- Hanafi NI, Mohamed AS, Sheikh Abdul Kadir SH, Othman MHD, 2018. Overview of bile acids signaling and perspective on the signal of ursodeoxycholic acid, the most hydrophilic bile acid, in the heart. *Biomolecules*, 8, 4, 159.
- He F, Ru X, Wen T, 2020. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *International journal of molecular sciences*, 21, 13, 4777.
- Huang Y, Keller AA, 2015. EDTA functionalized magnetic nanoparticle sorbents for cadmium and lead contaminated water treatment. *Water research*, 80, 159-68.
- Ikegami T, Matsuzaki Y, 2008. Ursodeoxycholic acid: mechanism of action and novel clinical applications. *Hepatology Research*, 38, 2, 123-31.
- Jacquemin E, Hermans D, Myara A, Habes D, Debray D, Hadchouel M, Sokal EM, Bernard O, 1997. Ursodeoxycholic acid therapy in pediatric patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 25, 3, 519-23.
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ, 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological sciences*, 65, 2, 166-76.
- Ji W, Qu Q, Jin Y, Zhao L, He X, 2009. Ursodeoxycholic acid inhibits hepatocyte-like cell apoptosis by down-regulating the expressions of Bax and Caspase-3. *Zhonghua yi xue za zhi*, 89, 42, 2997-3001.
- Johnson GL, Lapadat R, 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298, 5600, 1911-2.
- Junqueira L, Carneiro J, Kelley R, 1998. *Temel Histoloji*. Baskı, Barış Kitapçılık.
- Junqueira LCU, Carneiro J, Aytekin Y, Solakoğlu S, 2009. *Temel histoloji: text & atlas*, Nobel Tıp Kitabevleri, p.
- Kadıoğlu M, 2005. Tıkanma Sarılığı Oluşturulan Modelde Ursodeoksikolik Asit ve Glutamin'in Bakteriyel Translokasyon, Karaciğer Fonksiyon Testleri ve Karaciğer Histopatolojisine Olan Etkileri, TC Sağlık Bakanlığı Dr. Lütü Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi II. Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- Kalaycı G, 1986. *Histoloji*, Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, P. 72-361.
- Kaplan M, Atakan İH, Aydogdu N, Aktoz T, Puyan FÖ, Seren G, Tokuç B, İnci O, 2009. The effect of melatonin on cadmium-induced renal injury in chronically exposed rats/Melatoninin kronik olarak kadmiyum verilen siçanlarda böbrek hasari üzerine etkileri. *Urology Research & Practice*, 35, 2, 139.
- Karaliotas CC, Broelsch CE, Habib NA, 2006. *Liver and biliary tract surgery: embryological anatomy to 3D-imaging and transplant innovations*, Springer, p.
- Kayama F, Yoshida T, Elwell MR, Luster MI, 1995. Cadmium-induced renal damage and proinflammatory cytokines: possible role of IL-6 in tubular epithelial cell regeneration. *Toxicology and applied pharmacology*, 134, 1, 26-34.

- Kim D-W, Ock J, Moon K-W, Park C-H, 2021. Association between Pb, Cd, and Hg exposure and liver injury among Korean adults. *International journal of environmental research and public health*, 18, 13, 6783.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S, 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39, 1, 267-94.
- Koyu A, Gokcimen A, Ozguner F, Bayram DS, Kocak A, 2006. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Molecular and cellular biochemistry*, 284, 81-5.
- Kubitz R, Sütfels G, Köhlkamp T, Kölling R, Häussinger D, 2004. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology*, 126, 2, 541-53.
- Kurtz W, Guldutuna S, Leuschner U, 1988. Differing effect of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on bile acids in rat colonic wall and contents. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 13, 2, 91-7.
- Kurz AK, Graf D, Schmitt M, Vom Dahl S, Häussinger D, 2001. Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38MAPK activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology*, 121, 2, 407-19.
- Lawal AO, Marnewick JL, Ellis EM, 2015. Heme oxygenase-1 attenuates cadmium-induced mitochondrial-caspase 3-dependent apoptosis in human hepatoma cell line. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 16, 1-13.
- Lazaridis, K., Et Al. (2001). "Acide Ursodésoxycholique: 'Mécanismes D'action Et Utilisation Clinique Dans Les Troubles Hépatobiliaires.'" *Journal of Hepatology* 35: 134-146.
- Lee J, Hong EM, Kim JH, Kim JH, Jung JH, Park SW, Koh DH, 2022. Ursodeoxycholic acid inhibits epithelial-mesenchymal transition, suppressing invasiveness of bile duct cancer cells: An in vitro study. *Oncology Letters*, 24, 6, 1-9.
- Lee RG, 1994. *Diagnostic liver pathology*, St. Louis: Mosby, p. 1-517.
- Leuschner U, Leuschner M, Sieratzki J, Kurtz W, Hübner K, 1985. Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up: a pilot study. *Digestive diseases and sciences*, 30, 642-9.
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 757-72.
- Lim S-C, Han SI, 2015. Ursodeoxycholic acid effectively kills drug-resistant gastric cancer cells through induction of autophagic death. *Oncology Reports*, 34, 3, 1261-8.
- Liu H, Xu H-W, Zhang Y-Z, Huang Y, Han G-Q, Liang T-J, Wei L-L, Qin C-Y, Qin C-K, 2015. Ursodeoxycholic acid induces apoptosis in hepatocellular carcinoma xenografts in mice. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21, 36, 10367.
- Liu J, Wu KC, Lu Y-F, Ekuase E, Klaassen CD, 2013. Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 1, 305861.
- Liu Q, Zhang R, Wang X, Shen X, Wang P, Sun N, Li X, Li X, Hai C, 2019. Effects of sub-chronic, low-dose cadmium exposure on kidney damage and potential mechanisms. *Annals of translational medicine*, 7, 8.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N, 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4, 8, 118.
- Makino I, Shinozaki K, Yoshino K, Nakagawa S, 1975. Dissolution of cholesterol gallstones by long-term administration of ursodeoxycholic acid. *Nihon Shokakibyo Gakkai zasshi= The Japanese journal of gastro-enterology*, 72, 6, 690-702.
- Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR, 1998. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends in genetics*, 14, 10, 410-6.

- Mijayi K, Akiyama T, Ito M, Urakawa T, Shimaji Y, 1976. The effect of ursodeoxycholic acid on liver functions in patients with chronic liver disease. A double blind study in one institution and the study on the effect on hepatic blood flow. *Rinsho to Kenkyo*, 53, 1395-403.
- Mirkes PE, 2002. 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. *Teratology*, 65, 5, 228-39.
- Mitchell SA, Bansi DS, Hunt N, Von Bergmann K, Fleming KA, Chapman RW, 2001. A preliminary trial of high-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 121, 4, 900-7.
- Mitsuyoshi H, Nakashima T, Sumida Y, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Inaba K, Sakamoto Y, Okanoue T, Kashima K, 1999. Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants. *Biochemical and biophysical research communications*, 263, 2, 537-42.
- Mizoguchi Y, Kioka K, Seki S, Kobayashi K, Morisawa S, 1989. Effects of ursodeoxycholic acid on intrahepatic cholestasis. *Osaka city medical journal*, 35, 2, 71-82.
- Moore KL, Agur A, Elhan E, Barut Ç, Ersoy M, 2006. *Temel klinik anatomi*, Güneş Kitabevi, p.
- Ngo V, Duennwald ML, 2022. Nrf2 and oxidative stress: A general overview of mechanisms and implications in human disease. *Antioxidants*, 11, 12, 2345.
- Nolan, C. V. ve Shaikh, Z. A. (1986). Akut Kadmiyum Toksisitesinde Hedef Doku Olarak Vasküler Endotel. *Yaşam Bilimleri*, 39(16), 1403-1409.
- Noyan A, 2011. *Yaşamda Ve Hekimlikte Fizyoloji*, Ankara, Turkey, Palme Yayınevi, P. 55-59.
- Okada K, Shoda J, Taguchi K, Maher JM, Ishizaki K, Inoue Y, Ohtsuki M, Goto N, Takeda K, Utsunomiya H, 2008. Ursodeoxycholic acid stimulates Nrf2-mediated hepatocellular transport, detoxification, and antioxidative stress systems in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295, 4, G735-G47.
- Omata M, Yoshida H, Toyota J, Tomita E, Nishiguchi S, Hayashi N, Iino S, Makino I, Okita K, Toda G, 2007. A large-scale, multicentre, double-blind trial of ursodeoxycholic acid in patients with chronic hepatitis C. *Gut*, 56, 12, 1747-53.
- Ozdemir O, Akalin PP, Baspınar N, Hatipoğlu F, 2009. Pathological changes in the acute phase of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bull Vet Inst Pulawy*, 53, 4, 783-90.
- Özbolat G, Tuli A, 2016. Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25, 4, 502-21.
- Pang L, Zhao X, Liu W, Deng J, Tan X, Qiu L, 2015. Anticancer effect of ursodeoxycholic acid in human oral squamous carcinoma HSC-3 cells through the caspases. *Nutrients*, 7, 5, 3200-18.
- Park J-S, Rustamov N, Roh Y-S, 2023. The roles of NFR2-regulated oxidative stress and mitochondrial quality control in chronic liver diseases. *Antioxidants*, 12, 11, 1928.
- Paumgartner G, Beuers U, 2004. Mechanisms of action and therapeutic efficacy of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease. *Clinics in liver disease*, 8, 1, 67-81.
- Poupon R, 2012. Primary biliary cirrhosis. *Textbook of Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 638-41.
- Poupon RE, Balkau B, Eschwège E, Poupon R, Group* UPS, 1991. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *New England Journal of Medicine*, 324, 22, 1548-54.
- Pratt DS, Kaplan MM, 2000. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *New England Journal of Medicine*, 342, 17, 1266-71.
- Ramakrishnan R, Elangovan P, Pari L, 2017. Protective role of tetrahydrocurcumin: an active polyphenolic curcuminoid on cadmium-induced oxidative damage in rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183, 51-69.
- Rikans LE, Yamano T, 2000. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 14, 2, 110-7.

- Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ, 1998. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Molecular medicine*, 4, 165-78.
- Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ, 1999. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death & Differentiation*, 6, 9, 842-54.
- Rodrigues CM, Solá S, Sharpe JC, Moura JJ, Steer CJ, 2003. Tauroursodeoxycholic acid prevents Bax-induced membrane perturbation and cytochrome C release in isolated mitochondria. *Biochemistry*, 42, 10, 3070-80.
- Sánchez-Chardi A, Ribeiro CAO, Nadal J, 2009. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere*, 76, 3, 387-94.
- Sarkar S, Gupta S, Variyar PS, Sharma A, Singhal RS, 2013. Hydrophobic derivatives of guar gum hydrolyzate and gum Arabic as matrices for microencapsulation of mint oil. *Carbohydrate polymers*, 95, 1, 177-82.
- Sauer J-M, Waalkes MP, Hooser SB, Kuester RK, McQueen CA, Sipes IG, 1997. Suppression of Kupffer cell function prevents cadmium induced hepatocellular necrosis in the male Sprague-Dawley rat. *Toxicology*, 121, 2, 155-64.
- Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H, 2004. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology*, 39, 6, 1563-73.
- Schoemaker MH, Ros JE, Homan M, Trautwein C, Liston P, Poelstra K, van Goor H, Jansen PL, Moshage H, 2002. Cytokine regulation of pro-and anti-apoptotic genes in rat hepatocytes: NF- κ B-regulated inhibitor of apoptosis protein 2 (cIAP2) prevents apoptosis. *Journal of hepatology*, 36, 6, 742-50.
- Seth R, 2020. L-cysteine functionalized gold nanoparticles as a colorimetric sensor for ultrasensitive detection of toxic metal ion cadmium. *Materials Today: Proceedings*, 24, 2375-82.
- Sharp PA, 2003. Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35, 3, 288-91.
- Shen Y, Lu C, Song Z, Qiao C, Wang J, Chen J, Zhang C, Zeng X, Ma Z, Chen T, 2022. Ursodeoxycholic acid reduces antitumor immunosuppression by inducing CHIP-mediated TGF- β degradation. *Nature Communications*, 13, 1, 3419.
- Simental-Mendía M, Sánchez-García A, Simental-Mendía LE, 2020. Effect of ursodeoxycholic acid on liver markers: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled clinical trials. *British journal of clinical pharmacology*, 86, 8, 1476-88.
- Souza-Arroyo V, Fabián JJ, Bucio-Ortiz L, Miranda-Labra RU, Gomez-Quiroz LE, Gutiérrez-Ruiz MC, 2022. The mechanism of the cadmium-induced toxicity and cellular response in the liver. *Toxicology*, 480, 153339.
- Sözen M, Türkay C, 2011. Ursodeoksikolik Asit İçin Tıbbi Endikasyonlar Ve Etki Mekanizmaları. *Güncel Gastroenteroloji*, 15, 4, 245-53.
- Stiehl A, 1994. Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Annals of medicine*, 26, 5, 345-9.
- Sünbülçü N, 2022. Kadmiyum verilen sıçanların damar yapılarında oluşan hasara karşı Ankaferd Blood Stoper'ın etkisi, Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi/Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- Şennazlı, G.(2016) "Karaciğer Hastalıkları Patolojisi." İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı.
- Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H, Yamamoto M, 2012. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 34, 13561-6.

- Tanaka H, Makino Y, Miura T, Hirano F, Okamoto K, Komura K, Sato Y, Makino I, 1996. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by ursodeoxycholic acid. Repression of IFN-gamma-induced MHC class II gene expression via a glucocorticoid receptor-dependent pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156, 4, 1601-8.
- Tang R, Wei Y, Li Y, Chen W, Chen H, Wang Q, Yang F, Miao Q, Xiao X, Zhang H, 2018. Gut microbial profile is altered in primary biliary cholangitis and partially restored after UDCA therapy. *Gut*, 67, 3, 534-41.
- Tao T, Wang J, Wang X, Wang Y, Mao H, Liu X, 2019. The PERK/Nrf2 pathway mediates endoplasmic reticulum stress-induced injury by upregulating endoplasmic reticulophagy in H9c2 cardiomyoblasts. *Life sciences*, 237, 116944.
- Thompson EB, 1994. Apoptosis and steroid hormones. *Molecular Endocrinology*, 8, 6, 665-73.
- Tian M, Yan J, Zhang H, Wei Y, Zhang M, Rao Z, Zhang M, Wang H, Wang Y, Li X, 2022. Screening and validation of biomarkers for cadmium-induced liver injury based on targeted bile acid metabolomics. *Environmental Pollution*, 300, 118837.
- Tomida S, Abei M, Yamaguchi T, Matsuzaki Y, Shoda J, Tanaka N, Osuga T, 1999. Long-term ursodeoxycholic acid therapy is associated with reduced risk of biliary pain and acute cholecystitis in patients with gallbladder stones: a cohort analysis. *Hepatology*, 30, 1, 6-13.
- Trauner M, Boyer JL, 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiological reviews*, 83, 2, 633-71.
- Tung BY, Emond MJ, Haggitt RC, Bronner MP, Kimmey MB, Kowdley KV, Brentnall TA, 2001. Ursodiol use is associated with lower prevalence of colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Annals of internal medicine*, 134, 2, 89-95.
- Uçar Ş, Zorlu P, Demirçeken F, Arda N, 2010. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 3. *Turkish Journal Of Pediatric Disease*, 4, 1, 42-7.
- Van Roon-Mom WM, Pepers BA, 't Hoen PA, Verwijmeren CA, den Dunnen JT, Dorsman JC, van Ommen GB, 2008. Mutant huntingtin activates Nrf2-responsive genes and impairs dopamine synthesis in a PC12 model of Huntington's disease. *BMC Molecular Biology*, 9, 1-13.
- Vang S, Longley K, Steer CJ, Low WC, 2014. The unexpected uses of urso- and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases. *Global advances in health and medicine*, 3, 3, 58-69.
- Venneman NG, Besselink MG, Keulemans YC, vanBerge-Henegouwen GP, Boermeester MA, Broeders IA, Go PM, van Erpecum KJ, 2006. Ursodeoxycholic acid exerts no beneficial effect in patients with symptomatic gallstones awaiting cholecystectomy. *Hepatology*, 43, 6, 1276-83.
- Walker NI, Bennett RE, Axelsen RA, 1988. Melanosis coli. A consequence of anthraquinone-induced apoptosis of colonic epithelial cells. *The American journal of pathology*, 131, 3, 465.
- Wang X, Wang T, Pan T, Huang M, Ren W, Xu G, Amin HK, Kassab RB, Abdel Moneim AE, 2020. Senna alexandrina extract supplementation reverses hepatic oxidative, inflammatory, and apoptotic effects of cadmium chloride administration in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 5981-92.
- Wu KC, Liu JJ, Klaassen CD, 2012. Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury. *Toxicology and applied pharmacology*, 263, 1, 14-20.
- Wyllie AH, 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 5756, 555-6.
- Xu M-Y, Wang P, Sun Y-J, Yang L, Wu Y-J, 2017. Joint toxicity of chlorpyrifos and cadmium on the oxidative stress and mitochondrial damage in neuronal cells. *Food and Chemical Toxicology*, 103, 246-52.
- Yamano T, Shimizu M, Noda T, 1998. Comparative effects of repeated administration of cadmium on kidney, spleen, thymus, and bone marrow in 2-, 4-, and 8-month-old male Wistar rats. *Toxicological sciences*, 46, 2, 393-402.

- Yang Z, He Y, Wang H, Zhang Q, 2021. Protective effect of melatonin against chronic cadmium-induced hepatotoxicity by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice. *Ecotoxicology and environmental safety*, 228, 112947.
- Yu H, Fu QR, Huang ZJ, Lin JY, Chen QX, Wang Q, Shen DY, 2019. Apoptosis induced by ursodeoxycholic acid in human melanoma cells through the mitochondrial pathway. *Oncology reports*, 41, 1, 213-23.
- Zhang F, Subbaramaiah K, Altorki N, Dannenberg AJ, 1998. Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 4, 2424-8.
- Zhou X-L, Wan X-M, Fu X-X, Xie C-G, 2019. Puerarin prevents cadmium-induced hepatic cell damage by suppressing apoptosis and restoring autophagic flux. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115, 108929.
- Zhu Y, Zhao Y, Chai X-X, Zhou J, Shi M-J, Zhao Y, Tian Y, Wang X-M, Ying T-X, Feng Q, 2022. Chronic exposure to low-dose cadmium facilitated nonalcoholic steatohepatitis in mice by suppressing fatty acid desaturation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 233, 113306.



7. BENZERLİK RAPORU

Kadmiumun Hepatotoksik Etkilerine Yönelik Ursodeoksikolik Asitin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 10	% 5	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 2
3	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	abakus.inonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	ÇOLAKOĞLU, Neriman, KÜKNER, Aysel, OZAN, Enver, KARA, Haki, KOYUTÜRK, Leyla and KULOĞLU, Tuncay. "Sıçan testis dokusunda kadmiyum klorür'ün oluşturduğu yapısal değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine metallothionein'nin etkileri: Elektron mikroskopik çalışma", TUBITAK, 2011. Yayın	<% 1
6	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1