

Kurkumin ve Naringenin'in Bakır Nanopartikülleri ile Oluşturulmuş Karaciğer Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*

Study The Effects of Curcumin and Naringenin on Liver Damage Caused by Copper Nanoparticles

Hiba Lalouⁱ, Metin Yıldırımⁱⁱ, Merih Akkapuluⁱⁱⁱ, Serap Yalın^{iv}, Ali Erdiñç Yalın^v

ⁱYüksek Lisans Öğr., Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya AD. <https://orcid.org/0000-0002-7935-6565>

ⁱⁱDr.Öğr. Üyesi, Tarsus Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü <https://orcid.org/0000-0003-1346-312X>

ⁱⁱⁱArş. Gör., Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya AD. <https://orcid.org/0000-0002-5884-2986>

^{iv}Prof.Dr., Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya AD. <https://orcid.org/0000-0002-1286-2172>

^vProf. Dr., Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya AD. <https://orcid.org/0000-0002-3351-6885>

ÖZ

Giriş: Bakır nanopartiküllerinin (CuNP) günümüzde kullanım sıklığındaki artış insanların bu maddeye olan maruziyetin artması ile sonuçlanmaktadır. Curcuma longa L. ve Naringenin kanser türlerinin oluşma riskinin azaltmakta ve insanlarda koruyucu biyolojik etkilere yardımcı olmaktadır.

Amaç: Çalışmamızda, bakır nanopartiküller ile oluşturulmuş oksidatif strese karşı kurkumin ve naringenin olası koruyucu etkileri incelenmiştir.

Yöntem: Çalışmamızda 42 rat 6 gruba ayrılmıştır. Gruplardan biri kontrol grubu iken, diğer gruplara farklı dozlarda kurkumin ve naringenin maddeleri ile CuNP uygulanmıştır. Çalışma sonunda karaciğer dokusu izole edildi ve Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (KAT) aktiviteleri, Glutasyon (GSH), Malondialdehit (MDA) düzeyleri ve inflamasyon belirteçleri (IL-1 α , IL-1 β) araştırılmıştır.

Bulgular: Elde edilen bulgular sonucunda, bakır nanopartiküllerin oksidatif stresi arttırdığı ve antioksidan enzim seviyelerinde düşüşe sebep olduğu; kurkumin ve naringenin ise oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan enzim seviyelerini arttırdığı saptanmıştır. Karaciğer dokusunda IL-1 α parametresi incelendiğinde, kontrol grubu ve farklı dozlarda kurkumin ve naringenin CuNP ile karşılaştırıldığında, IL-1 α düzeyinde azalma saptanmıştır. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi. IL-1 β parametresi, kontrol grubuna kıyasla CuNP grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.05$). IL-1 β düzeyi incelendiğinde diğer gruplara kıyasla CuNP grubunda artma saptanmıştır.

Sonuç: İnsanların bakır nanopartiküllere maruz kalması durumunda oluşabilecek zararlı etkilerden korunma ve tedavi için kurkumin ve naringenin kullanılabileceği düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Bakır nanopartikül, Karaciğer, Oksidatif stres, Kurkumin, Naringenin

ABSTRACT

Introduction: The increase in the frequency of use of copper nanoparticles (CuNP) results in an increased exposure of humans to this substance. Curcuma longa L. and Naringenin consumption reduces the risk of developing cancer types and helps protective biological effects in humans.

Aim: In our study, the possible effects of different doses of curcumin and naringenin on the application of copper nanoparticles, oxidative stress and inflammation were investigated.

Methods: In this study, 42 rats were divided into 6 groups. One of the groups was the control group, while the other groups were administered different doses of curcumin and naringenin substances as well as CuNP. At the end of the study, after the liver tissue was isolated and Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione (GSH), Malondialdehyde (MDA) activities and inflammation markers (IL-1 α , IL-1 β) were investigated.

Result: As a result, it was found that copper nanoparticles increased oxidative stress and decreased antioxidant enzyme activities, while curcumin and naringenin decreased oxidative stress and increased antioxidant enzyme levels. When the IL-1 α parameter in liver tissue was examined, the level of IL-1 α decreased, this decrease was not statistically significant. The IL-1 β parameter showed a statistically significant increase in the CuNP group compared to the control group ($p<0.05$). IL-1 β level was decreased in different doses of curcumin and naringenin groups compared to CuNP group ($p<0.05$).

Conclusion: It can be thought that curcumin and naringenin can be used for the protection and treatment against detrimental effects that may occur in case of exposure to copper nanoparticles in humans.

Keywords: Copper nanoparticles, Liver, Oxidative stress, Curcumin, Naringenin

*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi 2023; 13 (1):107-117

DOI: 10.31020/mutfd.1186446

e-ISSN: 1309-8004

Geliş Tarihi – Received: 09 Ekim 2022; Kabul Tarihi - Accepted: 28 Kasım 2022

İletişim - Correspondence Author: Ali Erdiñç Yalın <aeyalin@gmail.com>

Etik Kurul Onayı: Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı (Tarih: 23/12/2019, Sayı: 2019/28)

Giriş

Günümüzde nanoteknolojinin gelişmesine paralel olarak önem kazanan nanopartiküllerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri ve riskleri hakkında az bilgi bulunmaktadır.¹

Nanopartiküller (NP) karbon, silikon ve metaller gibi çok farklı temel materyalden oluşabilmektedir. NP'lerin insan vücudunda en önemli hedef organı akciğerlerdir. NP'ler üç boyutludurlar ve 1 ile 100 nanometre arasında değişen uzunluğa sahiptirler.² Bunlar nano filmler (bir boyutlu), nanoteller ve nanotüpler (iki boyutlu) veya nanopartiküller (üç boyutlu) gibi materyaller olabilirler. Üretilen büyük boyutlu materyallardan benzersiz elektrik, termal, mekanik ve görüntüleme gibi gelişmiş veya ayırıcı fizikokimyasal özelliklere sahiptirler.³ NP'lerin türleri arasında yer alan metalik nanopartiküller (MNP), küçük boyutu ve daha büyük yüzey alanı/hacim oranı gibi benzersiz özellikleri ve farklı elektronik, manyetik, optik ve mekanik özellikleri ve özel partikül şekli nedeniyle önemli ölçüde ticari ilgi yaratmıştır. MNP'ler; metal NP'ler ve metal oksit NP'ler diye iki sınıfa ayrılmaktadır. MNP'ler, elektronik cihazlar, kozmetikler, boyalar, gıdalardaki katkı maddeleri, biyolojik ve tıbbi sistemler gibi çeşitli alanlarda geniş ölçüde kullanılmaktadırlar. MNP'ler birçok alanda kullanıldığı için, çevre ve insanın bu MNP'lerine direkt maruz kalmasından dolayı insan sağlığı üzerinde potansiyel risklerinin araştırılması daha fazla dikkat çekmiştir.^{4,5} MNP'ler inhalasyon, gastrointestinal sistem veya deri yoluyla vücuda girebilir, kan veya lenfatik sistem yoluyla vücutta dolaşır ve farklı organlarda birikebilirler.⁶ Metal NP'ler ve metal oksit NP'ler (Nano-Cu, nano-Ag, nano-Ni, nano-TiO₂ ve nano-ZnO) ile ilgili çalışmalar, MNP'lerin solunum ve sindirim sistemi yoluyla akciğer ve gastrointestinal sisteme ulaştığını göstermiştir. Kana girdikten sonra karaciğerde ve mononükleer fagositik sistemde hedef organlarda birirmektedir.⁷ MNP'ler karaciğerde diğer organlara kıyasla çok daha yüksek oranda biriktiği gösterildiğinden, karaciğer üzerinde toksik etki araştırması son derece önemlidir.⁸ MNP'ler hepatik hücrelerin yapılarının değişmesine yol açarak fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır.^{9,10} İn vitro koşullarda yapılan son çalışmalar, bakır nanopartiküllerinin diğer metal oksit nanopartiküllere kıyasla oldukça toksik olduğunu bildirmiştir.^{11,12} Metal oksit nanopartiküllerinin hücrelerde oluşturduğu oksidatif stres en çok tartışılan mekanizmadır.

Curcuma longa L. (Zerdeçal veya turmerik), baharat ve boyar madde olarak kullanılan tropik bir bitkidir. Bitki köklerinin öğütülmesi ile sarı renkli pigmentler elde edilmektedir. Zerdeçal tüketimi, kanser türlerinin oluşma riskinin azaltmasına ve insanlarda koruyucu etkilere yardımcı olmaktadır.¹³

Naringenin, turunçgil türleri ve domates gibi bazı yenilebilir meyvelerde bulunan ayrıca *Ficus carica* türüne ait olan incirde de doğal olarak oluşan en önemli flavonoidlerinden biridir.^{14,15} Kimyasal olarak 2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-[4-hidroksifenil] 4H-1-benzopiran-4-on olarak adlandırılan naringenin (C₁₅H₁₂O₅) 272.26 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Naringenin, insan sağlığı üzerinde geniş biyolojik etkilere sahiptir. Lipid peroksidasyonun ve protein karbonilasyonun azalması ve karbonhidrat metabolizmasını desteklemesi, antioksidan savunma sistemini güçlendirmesi, biyolojik ortamda bulunan reaktif oksijen türlerini temizlemesi, bağışıklık sisteminin aktivitesini modüle etmesi ve ayrıca anti-aterojenik ve anti-inflamatuar etkilere sahiptir.¹⁶

Bu nedenle, çalışmamızda bakır nanopartiküller ile oluşturulmuş oksidatif strese karşı farklı dozlarda kurkumin ve naringenin'in olası koruyucu etkileri incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Çalışmamızdaki tüm deneysel işlemler Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2019/HADYEK/28) tarafından onaylanmıştır.

Planlanan çalışmada 42 Adet 250-300 g erkek Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, Mersin Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanmış olup, barınma ve bakımları yine bu merkezde yürütülmüştür. Gruplar kendi içinde homojen dağıtılmıştır. Gruplardaki sıçanların ağırlık toplamları yaklaşık olarak aynı değerde olmasına dikkat edilmiştir. Sıçanlar, standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir. Sıçanlar, 12 saat ışık/karanlık periyodunda ve 18 ile 22°C sıcaklıklar arasında bakılmışlardır. Sıçanlar uygulama yapılmadan 7 gün önce adaptasyon amacıyla karantina altına alınmışlardır. Deney süresince gün aşırı içme suları değiştirilmiştir. Çalışmada ticari olarak satın alınan 40-60 nm boyutunda ve 200 mg/kg dozlarında bakır nanopartikülleri kullanılmıştır. Nanopartiküller deney gruplarına gavaj yoluyla uygulanmıştır.

Toplamda 6 deney grubu oluşturulmuştur:

Kontrol grubu (Grup 1) (n=7): Herhangi bir ilaç uygulaması olmadan sadece mısır özü yağı gavaj yoluyla uygulanmıştır.

Bakır nanopartiküller (Grup 2) (n=7): Bu grupta yer alan sıçanlara 21 gün sürecinde bakır nanopartiküller serum fizyolojikte çözülerek oral olarak verildi.

Kurkumin grubu (Grup 3) (n=7): 21 gün boyunca sıçanlara 200 mg/kg bakır nanopartiküller serum fizyolojikte çözülerek ve 40 mg/kg kurkumin mısır özü yağında çözülerek oral olarak verildi.

Kurkumin grubu (Grup 4) (n=7): 21 gün boyunca sıçanlara 200 mg/kg bakır nanopartiküller serum fizyolojikte çözülerek ve 100 mg/kg kurkumin mısır özü yağında çözülerek oral olarak verildi.

Naringenin grubu (Grup 5) (n=7): 21 gün boyunca sıçanlara 200 mg/kg bakır nanopartiküller serum fizyolojikte çözülerek ve 50 mg/kg naringenin mısır özü yağında çözülerek oral olarak verildi.

Naringenin grubu (Grup 6) (n=7): 21 gün boyunca sıçanlara 200 mg/kg bakır nanopartiküller serum fizyolojikte çözülerek ve 100 mg/kg naringenin mısır özü yağında çözülerek oral olarak verildi.

Analiz Yöntemleri

Lowry Yöntemi

Bakır-protein kompleksi alkali çözeltide, fosfomolibdat fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Fenol Reaktifi) azaltmakta ve koyu mavi bir renk oluşturmaktadır. Oluşan bu mavi renk spektrofotometrede 750 nm'de numunenin ve standardın absorbansı eğriye karşı okunmaktadır.¹⁷

Malondialdehit (MDA) Seviyeleri

Lipid peroksidasyonu, karaciğer ve böbrek dokuları homojenatında oluşan malondialdehit (MDA) miktarı ile ölçülmüştür. Yagi metoduna göre, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA'nın tiobarbitirik asitle reaksiyonu ile sonucu oluşan pembe-kırmızı renk spektrofotometre ile 532 nm'de ölçülmüştür.¹⁸

Süperoksit Dismutaz Enzim (SOD) Aktivitesi

SOD aktivitesi, Sun ve ark. (1988) tarafından geliştirilen yöntemle göre belirlenmiştir. 560 nm'de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir.¹⁹

Katalaz (KAT) Enzim Aktivitesi

Aebi tarafından belirlenen yöntemle göre katalaz aktivitesi ölçülmüştür. 240 nm'de H₂O₂ tüketiminden kaynaklanan absorpsiyon azalması ölçülerek yapıldı.²⁰

Glutatyon (GSH) Aktivitesi

GSH seviyeleri spektrofotometre ile 412 nm'de Sedlak ve Lindsay yöntemine göre belirlendi.²¹

İnflamasyon Belirteçlerinin Saptanması

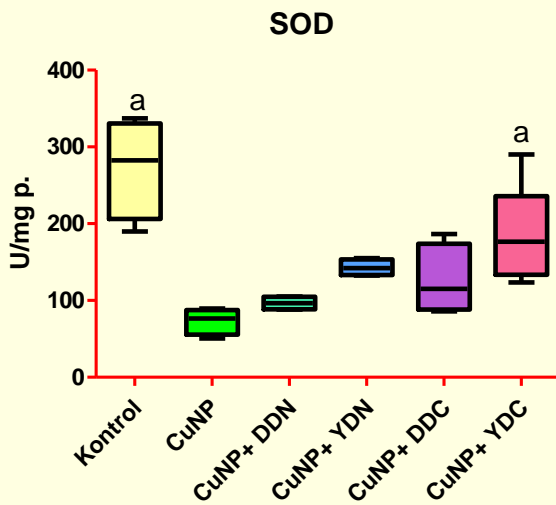
Sitokinler, immün sistem hücrelerinin gelişmesi, farklılaşması ve aktivasyonunda immün yanıt ve inflamasyon oluşumu gibi birçok biyolojik olaylarda hücreler arasındaki ilişkileri düzenleyen spesifik proteinlerdir. IL-1 monosit ve makrofaj gibi hücrelerden salınmaktadır. Endojen pirojenlerin ve lenfosit aktive edici faktörün biyolojik etkilerinden de sorumludurlar. IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. IL-1 α hücre membranında yer almaktadır, IL-1 β ise sitozolde bulunmakta ve hücre parçalanınca ortaya çıkmaktadır. İnterloklin-1 β , inflamasyona ateş ve akut faz cevabının oluşumunda önemli bir sitokindir.²² IL-1 α ve IL-1 β 'nin düzeyleri ticari olarak satın alınan kitler ile ELISA yöntemiyle kit prosedürüne uygun olacak şekilde ölçülmüştür.

İstatistiksel analiz

Çalışmamızın sonuçları "SPSS 20.0 for Windows" paket programı ile "One Way Anova-Tukey" testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde gösterilmiştir. İstatistiksel testler sonucunda, $p < 0,05$ önem derecesinde anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

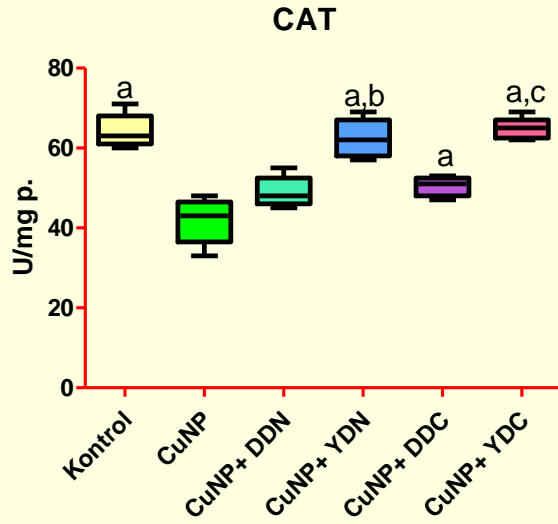
SOD parametresi için, CuNP grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aktivitenin %73 azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). CuNP+YDC grubu ile CuNP grubu karşılaştırıldığında enzim aktivitesinde artış gözlemlenirken bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). CuNP+DDN, CuNP+YDN, CuNP+DDC ile CuNP karşılaştırıldığında enzim aktivitesinin arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (**Şekil 1**).



Şekil 1. Karaciğer dokusu SOD seviyeleri

a: CuNP grubu ile kıyaslama

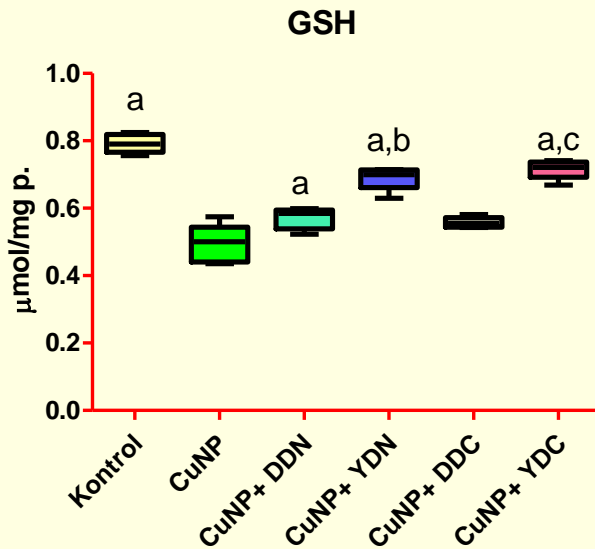
CuNP grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında KAT aktivitesinin 1,5 kat azaldığı bulunmuştur ($p < 0,05$). CuNP+YDN grubu ile CuNP grubu kıyaslandığında KAT aktivitesinin 1,49 kat arttığı bulunmuştur. CuNP+YDN ile CuNP+DDC karşılaştırıldığında doza bağlı olarak enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). CuNP+DDC ve CuNP+YDC, CuNP ile karşılaştırıldığında enzim aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. CuNP+YDC ile CuNP+DDC karşılaştırıldığında enzim aktivitesi doza bağlı artış göstermiştir ($p < 0,05$) (**Şekil 2**).



Şekil 2. Karaciğer dokusu KAT seviyeleri

a: CuNP grubu ile kıyaslama b: CuNP+ DDN grubu ile kıyaslama, c: CuNP+ DDC grubu ile kıyaslama

Karaciğer dokusunda GSH düzeyleri, CuNP grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bu değerlerin % 37 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. CuNP+YDN ile tedavi edilen grup ile CuNP karşılaştırıldığında GSH düzeyinin %39 arttığı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). CuNP+YDC grup ile CuNP grubu karşılaştırıldığında GSH düzeylerinin %45 arttığı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). CuNP+YDN grubu ile CuNP+DDN grubu karşılaştırıldığında GSH düzeylerinin %20,9 arttığı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$). CuNP+YDC ile CuNP+DDC karşılaştırıldığında GSH düzeylerinin %28,4 arttığı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 3).

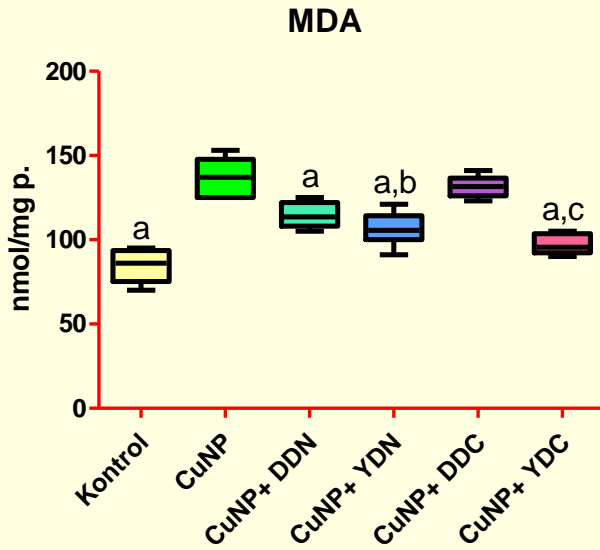


Şekil 3. Karaciğer dokusu GSH seviyeleri

a: CuNP grubu ile kıyaslama b: CuNP+ DDN grubu ile kıyaslama, c: CuNP+ DDC grubu ile kıyaslama

MDA seviyesi için, CuNP grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında; MDA seviyesi 1,62 kat artmıştır ($p < 0,05$). CuNP+DDN grubu ile CuNP grubu karşılaştırıldığında ise MDA seviyesinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p < 0,05$). CuNP+YDC ile CuNP grubu karşılaştırıldığında MDA seviyesinin 1.41 oranında azaldığı ve bu azalışın

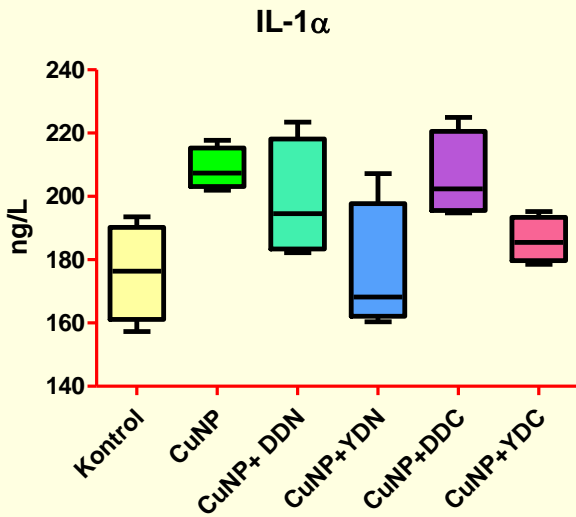
istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). CuNP+YDC grubu ile CuNP+DDC grubu karşılaştırıldığında doza bağlı olarak MDA seviyesi 1.35 oranında azalmıştır ($p<0,05$). CuNP+YDN ile CuNP+DDN karşılaştırıldığında MDA seviyesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (**Şekil 4**).



Şekil 4. Karaciğer dokusu MDA seviyeleri

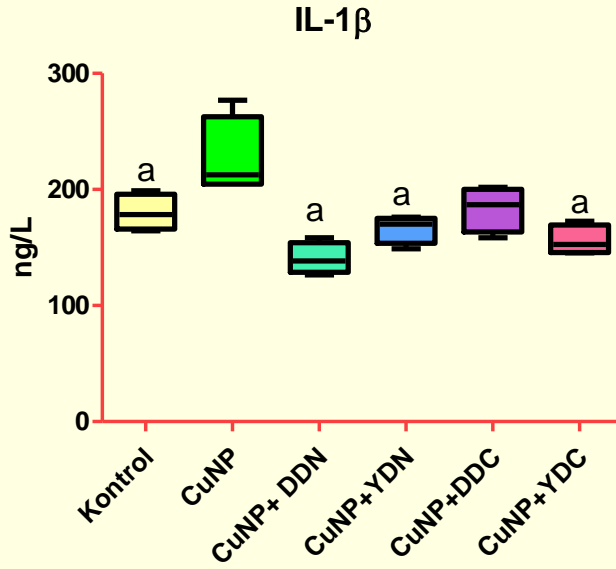
a: CuNP grubu ile kıyaslama, b: CuNP+ DDN grubu ile kıyaslama, c: CuNP+ DDC grubu ile kıyaslama

Karaciğer dokusunda IL-1 α parametresi incelendiğinde, CuNP grubunda IL-1 α seviyesinin kontrol grubuna kıyasla artmıştır ($p>0,05$). CuNP+YDN ve CuNP+YDC ile CuNP karşılaştırıldığında IL-1 α seviyesi azalmıştır ($p>0,05$) (**Şekil 5**).



Şekil 5. Karaciğer dokusu IL-1 α seviyeleri

IL-1 β parametresi CuNP grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p<0,05$). CuNP+DDN, CuNP+YDN ve CuNP+YDC gruplarında IL-1 β seviyesi CuNP grubuna kıyasla azalmıştır ($p<0,05$) (**Şekil 6**).



Şekil 6. Karaciğer dokusu IL-1 β seviyeleri
a: CuNP grubu ile kıyaslama

Tartışma ve Sonuç

Bakır nanopartiküllerinin araştırılması sonucu; insan ve ekolojik sistem üzerinde toksik etkilere sahip olduğu ortaya çıkmıştır.²² Bakır, insan vücudunun denge halinde tutulmasına yardımcı olmaktadır. Fakat vücutta bakırın aşırı seviye artması sonucu toksik etkiler ortaya çıkmaktadır. Bakır nanopartiküller, bakır ve bakır mikropartiküllerine kıyasla daha çok toksik etkilere sahiptirler. Bakır NP'lerin hedef organları, böbrek ve karaciğerdir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar bakır nanopartiküllerin enflamasyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir.²³

Kim ve ark.'larının 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada, bakır nanopartiküllerin farelerde pulmoner etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, bakır NP'lerinin demir oksit, titanyum dioksit ve gümüş NP'lere göre daha güçlü bir inflamatuvar yanıtı neden olduğu, akciğerdeki nötrofillerin sayısının artışı ve bronşta LDH aktivitesinin arttığını göstermiştir.²⁴ Wilson hastalığı ve Parkinson semptomlarında beyin ve merkezi sinir sisteminde büyük miktarda bakır bulunduğu gösterilmiştir.²⁵ Demir, çinko ve kalsiyumun konsantrasyonlarının artması genellikle nörodejeneratif hastalık koşullarında ortaya çıkan değişikliklere neden olabilir. Beyindeki nörotransmitterler ve metabolitlerinin değişiklikleri nörotoksite ve nörolojik bozukluğa neden olmaktadır.²⁶ NP gastrointestinal sisteme birçok yolla mukozadan veya doğrudan oral yoldan vücuda girebilir.²⁷ NP'lerin gastrointestinal sistemde toksikolojik etkisi hakkında literatürde çok az bilgi bulunmaktadır. Yalnızca nanobakır ile tedavi edilen tüm fareler, yiyecek kanalı disfonksiyonu, iştahsızlık, ishal ve kusma gibi semptomlar göstermişlerdir.²⁸

Hüresel savunma sisteminde tiyol grubu içeren antioksidan bileşenler, hücre içi reaktif ara maddelerini temizler. Bu görevi gerçekleştirmek için GSH seviyesinin çok fazla bulunması gerektiği belirlenmiştir. GSH seviyesi normal seviyesinin altına düştüğünde, reaktif ara ürünlerin konsantrasyonu artmasını ve GSH/GSSG oranını azalmasından oksidatif stresin oluşmasına yol açmaktadır.²

Meng ve ark.'ları, CuNP'lerin dalakta şiddetli atrofiye ve renk varyasyonlarına neden olduğunu göstermiştir. CuNPler, dalağın küçülmesi, lenfositlerin sayısının azalmasına ve dalak fibrozuna neden olmaktadır.²⁸ CuNP'lerin reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşmasına ve hücre içi ROS ve NO oluşumunun değişmesine neden olmaktadır.²⁹ Nano bakırın yüksek dozu, sıçanların karaciğerinde belirgin hasara neden olmaktadır. AST ve ALT enzim seviyelerini önemli ölçüde arttırmaktadır ve bu enzimler karaciğer

hasarının göstergeleri olarak kullanılmaktadır.³⁰ Nano bakır, farklı bir biyolojik bariyer üzerinden geçip, vücudun dolaşım sistemine girmektedir.³¹ Daha sonra karaciğerde birikmekte ve biyomakromoleküllerle etkileşime girmektedir. Vücutta bakır nanopartiküllerin neden olduğu sitotoksitesinin ana mekanizması oksidatif streştir.³²

Serbest radikaller (ROS/RNS) normal metabolizma esnasında üretilir ve çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynamaktadırlar. Antioksidanlar ve oksidanların arasında bir dengesizlik olduğunda, serbest radikaller birikerek nükleik asitler, proteinler ve lipidler gibi makromoleküllerde ciddi hasara yol açmaktadırlar. Bu durumda diabetes mellitus, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, romatoid artrit, astım gibi çeşitli hastalık koşullarında doku hasarına yol açmakta ve böylece hastalığın ilerlemesini ciddi bir şekilde hızlandırmaktadırlar. Aynı zamanda oksidatif stresin birçok inflamatuvar sitokinin salınması yoluyla enflamasyonun oluşumu ile ilişkilidir.³³ Obert ve ark.'larının 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada, enflamatuvar sitokinleri IL-1, TNF- α , IL-6 ve MIP-1'in seviyeleri, özellikle yüksek dozlarla bakır nanopartiküllere maruz kalan sıçanlarda, önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, oksidatif stresin belirteçleri (MDA, NO, iNOS ve KAT) önemli ölçüde artmıştır. Cu iyonlarının sıçanların karaciğerinde enflamasyona neden olduğu bulunmuştur, bu yüzden Cu nanopartiküllerin ve mide asidinde nano bakırın bir kısmını iyonize olduğunda oluşan Cu iyonları, karaciğerin enflamasyonuna ve oksidatif strese neden olduğu düşünülmüştür. Nano bakır nedeniyle oluşan oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt, karaciğerin disfonksiyonunu kötüleştirmektedir.³⁴

Karaciğer hastalığı, erken steatozdan şiddetli hepatit, fibroz, siroz ve hepatosellüler karsinomaya (HCC) kadar değişen hastalıklardır. Karaciğer hastalıkları obezite, virüs, alkol, ilaçlar ve diğer toksinler gibi çeşitli risk faktörlerine bağlıdır.³⁴ Karaciğer, detoksifikasyon ve besin metabolizmasından sorumlu olması, vücuttaki toksinler ve metabolitlerden üretilen oksidatif stres ve enflamasyona karşı daha çok maruz kaldığından dolayı karaciğer hasarına yol açmaktadır.²

Oksidatif stres ve enflamasyon akut ve kronik karaciğer hastalıklarının patogenezinde kritik bir öneme sahiptir. Oksidatif stres, DNA, proteinler ve lipidler gibi biyolojik moleküllerin değişmesine neden olmaktadır. Özellikle genlerin transkripsiyonu, protein ekspresyonu, hücre apoptozu ve hepatik yıldız hücre aktivasyonu ile ilişkili biyolojik yolları modüle ederek hepatik hasara neden olmaktadır.³⁵ Enflamasyon, vücut savunma sisteminin bir parçasıdır. Enflamasyondan sorumlu olan hücreler, patojen istilasına karşı savaşmak için öncelikle karaciğere sızacak şekilde kendilerini göstermektedirler. Bu uyarı uzun süre devam ederse veya büyük ölçüde şiddetliyse, hücresel hasar ve lipid birikimine yol açmaktadır. Bu hasarlar steatohepatit, fibroz ve kanser gibi ciddi karaciğer hastalıklarının riskinin artışı ile ilişkilidir.³⁶

Çalışmamızda anti-oksidatif madde olarak kullanılan kurkumin, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve ROS'u (süperoksit, peroksil, hidroksil radikalleri) nötralize ettiği bulunmuştur. Kurkuminin oksidatif strese karşı koruyucu etkisi daha önce in vitro ve in vivo olarak kanıtlanmıştır. Kurkuminin koruyucu etkisi, ROS'un temizleme etkisi ile bağlantılıdır. Hidrojen verici kabiliyeti içerdiği fenolik ve/veya imetilenik gruplara aittir. Kurkuminin enol formunun, diketo formundan daha stabil olduğu gösterilmiştir. Kurkumin çalışması aynı zamanda hidrojen atomunu verici kabiliyetinin fenolik grupta gerçekleştiğini ileri sürmüştür. Doğada kimyasal çeşitlilikleri bolca bulunan bitkisel ilaçların toksisiteyi ve yan etkisini sentetik ilaçlara kıyasla daha az olduğu için Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da karaciğer hastalıklarında hastaların yaklaşık %65'i bitkisel ilaçlar kullanmaktadırlar.³⁷ AL-Rubaie ve ark. tarafından yapılan çalışma, uygulanan H₂O₂'in karaciğer hücrelerine zarar verdiğini göstermiştir. Kurkumin tedavisi ile de, karaciğer toksisitesini önlediği ve alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalin fosfataz (ALP) enzimlerinin seviyelerini azalttığını göstermiştir.³⁸ Kurkumin ile tedavi edilen sıçanlar, doza bağımlı bir şekilde GSH düzeyini önemli ölçüde artırmıştır. Bu nedenle kurkumin, detoksifiyeden sorumlu olan enzimleri indükleyerek etkisini göstermektedir. Hidrojen peroksit uygulandıktan sonra indüklenen enzimler, oluşan reaktif oksijen türlerini

ortadan kaldırmaktadır. ROS ve oksidatif stresin neden olduğu karaciğer hasarını değerlendirmesi için SOD ve KAT enzimlerinin aktivitelerinin ölçülmesi en duyarlı enzimatik indeks olarak kullanılmaktadır. Bu enzimlerin aktivitelerindeki azalma, H₂O₂ tarafından üretilen ROS'un toksik etkilerini göstermektedir. Kurkumin ile ön tedavi gören sıçanlarda hepatik SOD ve KAT aktivitelerinde önemli bir artışa neden olduğu görülmüştür. Kurkumin, ROS'u azaltarak hepatositlerde oksidatif hasarı azaltmakta ve karaciğerde bulunan antioksidan enzimlerinin aktivitelerini arttırmaktadır. Bu mekanizma ile karaciğerin oksidatif stresten koruyabileceği düşünülmüştür.³⁸

Çalışmamızda, kurkumin uygulanan grupta katalaz aktivitesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmiştir. Bakır nanopartiküllerin katalaz enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açtığı ve kurkuminin bu azalmayı değiştirdiği gözlemlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan diğer anti-oksidatif madde olan naringenin, flavanone ailesine ait bir flavonoiddir. Naringenin hipolidemik, antihipertansif, antiinflamatuvar, antifibrotik özellikleri sahip olduğu için çeşitli farmakolojik alanlarda kullanılmıştır. Naringenin SOD, KAT ve GSH seviyelerinin azalmasını önleyen antioksidan özelliklere sahiptir. Erkek sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, kurşun asetat'ın, oksidatif stres ve karaciğer hasarına karşı naringenin etkisi değerlendirilmiştir. Karaciğerin MDA seviyeleri kurşun asetat uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, kurşunun lipid peroksidasyonuna neden olabileceğini göstermektedir. Bulgularımıza benzer şekilde, Jain ve ark. tarafından yapılan çalışmada, naringenin'in kurşun arsenik veya kadmiyuma maruziyete karşı sıçanların karaciğerindeki yüksek MDA düzeylerini azattığını göstermiştir.³⁹ Kurşuna bağlı düşük GSH, KAT ve GSH-Px seviyelerinin naringenin uyguladığında önemli ölçüde arttığını da bildirilmiştir.⁴⁰ Yapılan bu çalışmada bakır nanopartiküllerine maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokusunda, naringenin ve kurkuminin kullanılması enflamasyon düzeylerinde azalışa ve KAT, SOD aktivitesi, GSH düzeyinde artışa, ayrıca MDA seviyelerinde azalışa neden olmuştur. Yapılmış olan çalışmalar ile korelasyon göstermiş ve mevcut verilere göre Cu NP'lerin oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, kuvvetli antioksidan özelliklere sahip kurkumin ve naringenin Cu nanoartiküllerin neden olduğu enflamasyon ve oksidatif hasarlara karşı doku ve organların korunmasında etkili olabilecekleri gösterilmiştir.

Bilgi

Çalışmada çıkar çatışması bulunmamaktadır. Çalışma 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 22-25 June 2021, Ankara/Turkey'de sunulmuştur.

Bu çalışma, 2020-1-TP2-4062 numaralı proje kapsamında Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Etik Onay

Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan 23/12/2019 tarih, 2019/28 sayısı ile etik kurul izni alınmıştır.

Araştırmacı Katkı Oranı Beyanı

Hiba Lalou: Fikir/kavram, tasarım, veri toplama veya işleme, analiz veya yorum, kaynak taraması, makalenin yazımı, malzemeler.

Metin Yıldırım: Fikir/kavram, tasarım, denetleme/danışmanlık, veri toplama veya işleme, analiz veya yorum, makalenin yazımı, eleştirel inceleme, malzemeler.

Merih Akkapulu: Veri toplama veya işleme, analiz veya yorum, makalenin yazımı.

Serap Yalın: Veri toplama veya işleme, analiz veya yorum, makalenin yazımı, eleştirel inceleme, kaynaklar ve fon sağlama.

Ali Erdiñç Yalın: Fikir/kavram, tasarım, denetleme/danışmanlık, veri toplama veya işleme, analiz veya yorum, kaynak taraması, makalenin yazımı, eleştirel inceleme, kaynaklar ve fon sağlama, malzemeler.

Kaynaklar

1. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry* 2019;12(7):908-931.
2. Masciangioli T, Zhang WX. Peer reviewed: environmental technologies at the nanoscale. *Environmental Science & Technology* 2003;37(5):102A-108A.
3. Handy RD, et al. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology* 2008;17(4):287-314.
4. Parada J, et al. The nanotechnology among US: are metal and metal oxides nanoparticles a nano or mega risk for soil microbial communities? *Critical reviews in biotechnology* 2019;39(2):157-172.
5. Andra S, et al. Phytosynthesized metal oxide nanoparticles for pharmaceutical applications. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2019;392(7):755-771.
6. Yah CS, Iyuke SE, Simate GS. A review of nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012;8(1):299-314.
7. Oberdörster G, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology* 2007;1(1):2-25.
8. Almeida JPM, et al. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine* 2011;6(5):815-835.
9. Jones CF, Grainger DW. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced drug delivery reviews* 2009;61(6):438-456.
10. Landsiedel R, et al. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations—many questions, some answers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2009;681(2-3):241-258.
11. Karlsson HL, et al. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical research in toxicology* 2008;21(9):1726-1732.
12. Karlsson HL, et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology letters* 2009;188(2):112-118.
13. Ravindran PN, Nirmal-Babu K, Sivaraman K. *Turmeric: The golden spice of life. Turmeric: The Genus Curcuma*. FL, USA: CRC Press, Boca Raton 2007.
14. Mbaveng AT, Qiaoli Z, Victor K. In *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. Elsevier 2014;577-609.
15. Zobeiri M, et al. Naringenin and its nano-formulations for fatty liver: cellular modes of action and clinical perspective. *Current pharmaceutical biotechnology* 2018;19(3):196-205.
16. Salehi B, et al. The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. *Pharmaceuticals* 2019;12(1):11.
17. Lowry OH, et al. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193(1):265-275.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 1979;95(2):351-358.
19. Sun YI, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry* 1988;34(3):497-500.
20. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 1984;105:121-126.
21. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry* 1968;25(1):192-205.
22. Lee IC, et al. Comparative toxicity and biodistribution of copper nanoparticles and cupric ions in rats. *International journal of nanomedicine* 2016;11:2883.
23. Pettibone JM, et al. Inflammatory response of mice following inhalation exposure to iron and copper nanoparticles. *Nanotoxicology* 2008;2(4):189-204.
24. Kim JS, et al. Effects of copper nanoparticle exposure on host defense in a murine pulmonary infection model. *Particle and fibre toxicology* 2011;8(1):1-14.
25. Madsen E, Gitlin JD. Copper and iron disorders of the brain. *Annu. Rev. Neurosci* 2007;30(1):317-337.
26. Sharma RP, et al. Fumonisin toxicity in a transgenic mouse model lacking the *mdr1a/1b* P-glycoprotein genes. *Environmental toxicology and pharmacology* 2000;8(3):173-182.

27. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives* 2005;113(7):823-839.
28. Meng H, et al. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: explanation of oral toxicity of nano-copper particles. *Toxicology letters* 2007;175(1-3):102-110.
29. Sarkar A, et al. Nano-copper induces oxidative stress and apoptosis in kidney via both extrinsic and intrinsic pathways. *Toxicology* 2011;290(2-3):208- 217.
30. Manna P, et al. Contribution of nano-copper particles to in vivo liver dysfunction and cellular damage: Role of I κ B α /NF- κ B, MAPKs and mitochondrial signal. *Nanotoxicology* 2012;6(1):1-21.
31. Prabhu BM, et al. Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat. *Nanotoxicology* 2010;4(2):150-160.
32. Xu P, et al. Nano copper induced apoptosis in podocytes via increasing oxidative stress. *Journal of hazardous materials* 2012;241:279-286.
33. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. *Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity* 2013.
34. Obert J, Cave M, Marsano L. Liver diseases. In *Nutrition for the Primary Care Provider USA*; Karger Publishers 2015;111:146-150.
35. Li S, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International journal of molecular sciences* 2015;16(11):26087-26124.
36. De Andrade, KQ, et al. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. *International journal of molecular sciences* 2015;16(12):30269-30308.
37. Harvey A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today* 2000;5(7):294-300.
38. Al-Rubaei ZM, Mohammad TU, Ali LK. Effects of local curcumin on oxidative stress and total antioxidant capacity in vivo study. *Pak J Biol Sci* 2014;17(12):1237- 1241.
39. Jain A, et al. Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats. *Ecotoxicology and environmental safety* 2011;74(4):607-614.
40. Wang J, et al. Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biological trace element research* 2012;146(3):354-359.