Sıçan Karaciğerinde Parsiyal Hepatektomi Sonrası Borik Anhidrit (B_2O_3) ile Apoptozun İndüklenmesi

Ahmet Özen

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan 2013

Apoptosis Induced by Boric Anhydride (B_2O_3) After Partial Hepatectomy in Rat Liver

Ahmet Özen

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

April 2013

Sıçan Karaciğerinde Parsiyal Hepatektomi Sonrası Borik Anhidrit (B_2O_3) ile Apoptozun İndüklenmesi

Ahmet Özen

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Mediha Canbek

Nisan 2013

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ahmet ÖZEN'in DOKTORA tezi olarak hazırladığı "Sıçan Karaciğerinde Parsiyal Hepatektomi Sonrası Borik Anhidrit (B_2O_3) ile Apoptozun İndüklenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Mediha CANBEK

İkinci Danışman **:** -

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye : Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ

Üye : Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Üye : Doç. Dr. Filiz ALANYALI

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .....tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, bor bileşiklerinden B_2O_3'ün sıçanlarda %70 parsiyel hepatektomi sonrası indüklenen karaciğer rejenerasyonu üzerindeki apoptotik etkileri ortaya konmuştur.

Bor, çok hücreli canlılar için iç dengenin sağlanmasında görev alan önemli bir elementtir. Herhangi bir hasar karşısında yanıt oluşturma yeteneğine sahip olan bor, hücre çoğalmasını baskılayıcı bir etkiye de sahiptir. Bu amaçla *Wistar albino* türü erkek sıçanlar kullanılarak n=7 olacak şekilde 6 grup oluşturuldu. Sham kontrol grubu olan Grup I ve II'ye sadece laparoktomi yapılırken, diğer 4 grup hayvana ayrı ayrı %70 parsiyel hepatektomi işleminden hemen sonra tek doz serum fizyolojik ve 1,8 $g.kg^{-1}$ B_2O_3 intraperitonel enjeksiyonları yapılmıştır. Cerrahi işlemlerden 3 ve 6 saat sonra diseksiyonları yapılıp karaciğer ağırlık indeksi hesaplandı. Tüm gruplardan histolojik, RT-PCR ve QPCR incelemeleri için karaciğer doku örnekleri alındı. RT-PCR ve QPCR analizinde NF-κB ve kaspaz-3 gen ve protein ifade düzeylerine bakıldı. Grup V ve VI hayvanlarından alınan örneklerde NF-κB gen ve protein ifadeleri incelendiğinde azaldığı; kaspaz-3 gen ve protein ifadelerinin ise anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca B_2O_3' ün karaciğerde apoptotik etkisi TUNEL analizi ile de desteklenmiştir.

Bu çalışma intraperitonel olarak uygulanan B_2O_3'ün, parsiyal hepatektomiden 6 saat sonra hepatosit proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu indüklediğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Parsiyal hepatektomi, Borik anhidrit, Apoptoz, Kaspaz-3, NF-κB

SUMMARY

In this study, the apoptotic effects of boron compound B_2O_3 on induced liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats have been revealed.

Boron is an important element for multicellular organisims to provide homeostasis. Against any damage boron has the ability to form a response and shows cell growth inhibitory effect. For this purpose, *Wistar albino* male rats were divided into 6 with groups, n = 7. Laparoctomy was applied to sham control group, Group I and II to the other 4 groups of animals a single dose of saline and 1,8 $g.kg^{-1}$ B_2O_3 was immediately injected intraperitoneally after 70% partial hepatectomy. 3 and 6 hours after the surgical procedures, liver mass index was calculated. For histological, RT-PCR and QPCR for analysis liver tissue samples were taken from all groups. RT-PCR and QPCR analysis of nuclear factor-κB (NF-κB) and caspase-3 gene and protein expression levels were determined. Group V and VI of the samples taken from the animals examined NF-kB gene and protein expressions were decreased; however caspase-3 gene and protein expressions were significantly increased. In addition, B_2O_3's apoptotic effect was supported by the TUNEL analysis in the liver.

This study has shown that intraperitoneally applied B_2O_3 induced apoptosis by inhibiting hepatocytes proliferation after 6 hour of partial heaptectomy.

Keywords: Partial hepatectomy, Boric anhydride, Apoptosis, Caspase 3, NF-κB

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgisini ve yol göstericiliğini benden bir an olsun esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Mediha CANBEK'e, deneyimleri ile tez çalışmamda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU'na ve Araş. Görv. Emre CEYHAN'a, tezimin şekillenmesinde katkılarından dolayı Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya,

Tezime katkılarından dolayı Prof. Dr. Hüseyin ÖZDAĞ'a, Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR'a, Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ'a, Doç. Dr. Filiz ALANYALI'ya, Sn. Funda ALTUN'a ve Eti Maden İşletmeleri Emet Bor İşletme Müdürlüğü' den Sn. Hüseyin Kadri KIRAÇ' a,

Gerek tez çalışmamda, gerekse sosyal hayatta yanımda olan ve destekleri ile çalışmamın zorluklarını aşmamda yardımcı olan, Doktora Öğrencisi Başak DURMUŞ'a, Doktora Öğrencisi Muzaffer BİLGİN'e, Doktora Öğrencisi Çağrı ÖNER'e, Dr. Fatma Özgül ÖZALP'e, Araş. Görv. Öge ARTAGAN'a, Biyolog Handan ÇİFÇİ' ye

Eğitimim süresince benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Annem Sevgi ÖZEN, Babam Mehmet Orhan ÖZEN ve Kardeşim Can ÖZEN'e sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Ahmet ÖZEN

Nisan 2013

** Bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca 201219A201 kodlu proje ile desteklenmiştir.*

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ONAY iv

ÖZET v

SUMMARY vi

TEŞEKKÜR vii

ŞEKİLLER DİZİNİ xi

ÇİZELGELER DİZİNİ xii

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xiii

1. GİRİŞ ve AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1 Karaciğer 3

2.1.1 Karaciğerin yapısı 3

2.1.2 Sıçan karaciğeri 10

2.1.3 Hepatik hasar 12

2.2 Apoptoz 14

2.2.1 Apoptoz terimi 16

2.2.2 Apoptoz mekanizmaları 17

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devamı)

Sayfa

2.2.2.1 Kaspazlar ve apoptoz 20

2.2.2.2 Apoptoz ve NF-κB yolağı 22

2.2.3 Organizma gelişiminde ve hastalıklarda apoptoz 24

2.3 Bor 26

2.3.1 Bor elementinin kimyasal özellikleri 26

2.3.2 Endüstride bor bileşiklerinin kullanımı 28

2.3.3 Canlılar açısından bor bileşiklerinin önemi 30

3. MATERYAL ve METOD 35

3.1 Deney hayvanları 35

3.2 Deney grupları 35

3.3 Borik anhidrit uygulaması 36

3.4 Anestezi ve cerrahi işlemler 37

3.4.1 Anestezi işlemi 37

3.4.2 Parsiyal hepatektomi işlemi 37

3.5 Doku örneklerinin değerlendirilmesi 38

3.5.1 Real Time-PCR analizi 38

3.5.1.1 Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu 38

3.5.1.2 RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi 40

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devamı)

Sayfa

3.5.1.3 RT-PCR işlemi 41

3.5.2 Quantitative RT-PCR analizi 42

3.5.2.1 Karaciğer dokusundan protein izolasyonu 42

3.5.2.2 QRT-PCR işlemi 42

3.5.3 TUNEL analizi 43

3.6 İstatistiksel değerlendirmeler 47

4. BULGULAR 48

4.1 Karaciğer ağırlık değişimi 48

4.2 TUNEL bulguları 49

4.3 RT-PCR bulguları 57

4.4 Quantitative RT-PCR ile protein miktar bulguları 60

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 62

6. KAYNAKLAR DİZİNİ 70

7. EKLER 79

7.1 Ek1: Etik Kurul Raporu 79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Adı **Sayfa**

Şekil 2.1 Karaciğerin yapısı. 6

Şekil 2.2 Hepatositlerin yapısı. 8

Şekil 2.3 Sıçan karaciğeri. 11

Şekil 2.4 Hepatosit hücre ölümü ve rejenerasyonu. 13

Şekil 2.5 Apoptozun morfolojik süreci. 16

Şekil 2.6 Apoptoz mekanizmaları. 19

Şekil 2.7 NF-κB sinyal ileti yolağı. 23

Şekil 2.8 Borik anhidritin kimyasal formülü. 28

Şekil 4.1 Karaciğer ağırlık değişimleri. 49

Şekil 4.2 Apoptotik indeks formülü. 50

Şekil 4.3 TUNEL testi ile apoptotik indeks tayini. 51

Şekil 4.4 TUNEL kesitlerinde portal alan (PA) çevresindeki hepatositler. 53

Şekil 4.5 TUNEL kesitlerinde sentral ven (SV) çevresindeki hepatositler. 54

Şekil 4.6 TUNEL kesitlerinde mitotik aktivite. 55

Şekil 4.7 TUNEL kesitlerinde TUNEL pozitif hepatositler. 56

Şekil 4.8 NF-κB gen ifadesi. 58

Şekil 4.9 Kaspaz-3 gen ifadesi. 59

Şekil 4.10 NF-κB protein ifadesi grafiği 61

Şekil 4.11 Kaspaz 3 protein ifadesi grafiği 61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge Adı **Sayfa**

Çizelge 2.1 Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar 15

Çizelge 2.2 Dünya bor rezervlerinin ülkelere göre dağılımı 27

Çizelge 2.3 İnsan vücudundaki doku ve organlarda bulunan bor miktarı. 31

Çizelge 4.1 Karaciğer ağırlık değişimleri 48

Çizelge 4.2 TUNEL testi ile apoptotik indeks tayini. 50

Çizelge 4.3 NF-κB gen ifadesi. 57

Çizelge 4.4 Kaspaz 3 gen ifadesi. 59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
%	Yüzde
µ	Mikron
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol
^{0}	Derece
C	Santigrad
cm	Santimetre
cm^2	santimetre kare
C_T	Eşik Döngü Sayısı
dk.	Dakika
g	G Kuvveti
gr	Gram
Kg	Kilogram
Kj	Kilo Jül
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
Ppm	Milyonda Bir
U/L	Unite/Litre

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltma	Açıklama
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
AKT	Mürin Timoma Viral Onkogen
ALP	Alkalen Fosfataz
ALPS	Akut Lenfoproliferatif Sendrom
ALT	Alanin Amino Tranferaz
APAF-1	Apoptotik Proteaz Aktivasyon Faktörü
AST	Aspartat Amino Transferaz
ATP	Adenozin Tri Fosfat
Bak	Bcl-2 Homoloğu Antagonist Öldürücü
Bax	Bcl-2 İlişkili X Proteini
Bcl-2	B Hücre Lemfoması-2
BNCT	Bor Nötron Yakalama Terapisi
CED	Hücre Ölümü
DEPC	Dietilpirokarbonat
Diablo	Düşük Fosfolipid ile Direkt IAP Bağlanma Proteini
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Tri Fosfat
FAK	Fokal Adhezyon Kinaz
FITC	Dalgalı İndüklemeli Tunnelleme İletkenliği
GGT	Gama Glutamil Transferaz
GSK-3	Glicojen Sentaz Kinaz-3
IAP	Apoptoz İnhibitör Proteini
IKK	κB İnhibitör Kinaz
ISEL	In Situ Son İşaretleme
IκB	κB İnhibitörü
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MEK3	MAPK/ERK Kinaz-3
NF-κB	Nüklear Faktör κB
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QPCR	Niceliksel Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltma	Açıklama
PH	Parsiyal Hepatektomi
ras	Sıçan Sarkoma
RNA	Ribonükleik Asit
SGOT	Serum Glutamat-Okzalasetat Transaminaz
SGPT	Serum Glutamat-Piruvat Transaminaz
Smac	Mitokondriden Ayrılmış İkinci Kaspaz Aktivatörü
SOD	Süper Oksit Dismutaz
Syk	Huysuz Tirozin Kinaz
TdT	Terminal deoksinükleotidil Transferaz
TNF-R	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
TRADD	Tümör Nekroz Faktör Tip 1 Reseptörü İlişkili Ölüm Alanı Proteini
TUNEL	TdT-Aracılı dUTP Son İşaretleme
γ -GCS	Gama Glutamil Sistein Sentetaz

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Vücudun en büyük organı olan karaciğer, tüm vücuttaki kanın drenaj merkezidir (Burtis ve Ashwood, 2005). Ayrıca karaciğer vücut için gerekli olan mineral ve glukozun depolandığı bir organdır. Birçok biyokimyasal olayı gerçekleştiren karaciğer, aynı zamanda yüksek rejenerasyon kabiliyetiyle de öne çıkan bir organdır (Dilek, 2003). Bu nedenle karaciğerde oluşacak herhangi bir hasar, organın görevini yerine getirmesini engelleyebilir. Bunlardan en önemlisi de kontrolsüzce gerçekleşen hücre çoğalmasıdır. Kontrolsüz hücre çoğalması organizma açısından hayati tehlike taşımaktadır.

Hücre çoğalmasının en önemli basamağı hücre hayat döngüsüdür. Bu döngünün en önemli unsurlarından biri, yaşlanan veya ihtiyaç duyulmayan hücrelerin etrafındaki hücrelere zarar vermeden bulunduğu ortamdan elenmesini sağlayan apoptozdur. Kontrolsüzce çoğalan hücrelerde aktivitesi kaybolmuş ya da azalmış olan hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz, çok hücreli canlıların iç dengesinin (homeostasis) düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Yıldırım vd., 2007). Bu ölüm mekanizması sağlıklı çok hücreli organizmaların gelişiminde gözlenen normal bir süreçtir. Uyarılmış hücre çoğalmasında bu mekanizmanın çalışmaması özellikle karaciğer için hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle apoptotik süreçlerin in vivo şartlarda yapılan araştırmaları büyük önem taşımaktadır. Yapılan birçok çalışma özellikle manganez ve methotrexate (antifolat kemoterapik bir ajan) gibi maddelerin de apoptotik süreçleri aktifleştirdiğini göstermiştir (Sakamoto et al., 1999; Kobayashi et al., 2002). Ancak bu paralellikte yapılan çalışmalardan özellikle bor ve bor bileşikleri ile ilgili in vivo çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Binlerce yıl önce tıpta tedavi amacı ile kullanılan bor, bitki ve hayvanlar için son derece önemli bir eser elementtir (Abu Ali et al., 2005; Kahyaoğlu vd., 2009). Çok hücreli organizmalarda da başta kanser olmak üzere birçok tedavi alanında kullanılmakta olan bor, bazı biyokimyasal olaylar için de önemli elementler arasındadır (Geyikoğlu et al., 2009). Ancak kanser gibi kontrolsüz çoğalma eğilimi gösteren hücrelerde in vitro çalışmalar olmasına karşın, bu konudaki in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu nedenle çalışmamızda bor bileşiklerinden B_2O_3'ün in vivo ortamda sıçanlarda %70 parsiyal hepatektomi ile indüklenmiş karaciğer hücre çoğalmasına karşı apoptotik etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda intraperitonel olarak parsiyal hepatektomi sonrası 1,8 $g.kg^{-1}$ B_2O_3 enjeksiyonu yapılmıştır. Deney sonunda, apoptoz belirteçlerinden kaspaz-3 ve hücre çoğalmasında önemli bir mediatör olan NF-κB seviyelerinin RT-PCR ve QRT-PCR teknikleri ile incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca TUNEL metodu ile de apoptoza giden hücreler belirlenmiştir. Elde edilen veriler B_2O_3 bileşiğinin uygulama dozunun apoptotik etki derecesini ortaya koymuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Karaciğer

2.1.1 Karaciğerin yapısı

Karaciğer, anatomik olarak karın boşluğunun sağ üst kısmını tamamen dolduracak şekilde yerleşmiş (Patrick and McGee, 1980; Dilek, 2003), yaklaşık 1200-1500 gr ağırlığıyla vücudun en büyük organıdır (Akın vd., 1992; Burtis ve Ashwood, 2005). İnsan karaciğeri, sert bir fibröz kapsül olan Glisson kapsülü ile sarılmış (Dilek, 2003) iki lobdan oluşur (Akın vd., 1992; Burtis ve Ashwood, 2005). Sağ lobun posteriorunda kaudat lob, inferiorunda ise kuadrat lob adı verilen iki küçük lob bulunur (Şekil 2.1) (Sherlock and Dooley, 2002; Burtis ve Ashwood, 2005).

Karaciğerin fonksiyonel birimi lobüldür (Patrick and McGee, 1980; Akın vd., 1992). Lobül, gözle görülebilen en küçük doku parçasıdır (Akın vd., 1992). Her bir lobül, bir sentral ven etrafına dizilmiş hepatositlerden oluşmaktadır (Şekil 2.1) (Patrick and McGee, 1980; Akın vd., 1992).

Lobül içerisindeki sentral vene çok sayıda venöz sinüzoid açılır (Akın vd., 1992). Bu sinüzoidler lobül içine genişlemiş kapillerdir ve portal venlerden kan alınımını sağlar (Akın vd., 1992). Lobül içindeki kan venöz sinüzoidlerden sentral vene boşalır (Akın vd., 1992).

Lobül içindeki hepatik hücreler iki venöz sinüzoid arasında bulunmaktadır (Patrick and McGee, 1980; Akın vd., 1992). Hepatositler tarafından sentezlenen safra, canaliculi adı verilen kanala iletilir (Akın vd., 1992). Karaciğer hücrelerinin bir yüzü safra kanalına bakarken diğer bir yüzü sinüzoidlere bakar (Akın vd., 1992).

Karaciğere, ihtiyacı olan kan hepatik arter ve portal ven olmak üzere iki farklı kaynaktan gelmektedir (Akın vd., 1992; Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005).

Bunun %70-80'lik kısmı portal venden karşılanırken, %20-30'luk kısmı ise hepatik arterden sağlanır (Akın vd., 1992; Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005). Hepatik arterden gelen kanın fonksiyonu sinüzoidal kısma giden kanın oksijen içeriğini ve basıncı arttırmaktır (Dilek, 2003). Bu yüzden karaciğer vücutta arter ve ven kanının birbirine karıştığı tek organdır (Akın vd., 1992). Ayrıca karaciğer lenfatik drenajı yüksek bir organdır (Dilek, 2003). Tüm vücuttaki lenf üretiminin yaklaşık %30-50'sinden sorumludur. Burada üretilen lenf, lenf nodlarına iletilir (Dilek, 2003).

Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde lobüller bal peteğini andıran bir dizilim içerisindedir. Ayrıca lobüller birbiri içine girdiği için mikroskobik incelemelerde ayrım son derece güçtür. Lobüller kaynaşma noktalarının ilerisinde bir takım boşluklar oluştururlar (Dilek, 2003). Portal alan (Kiernan aralığı) adı verilen bu alanda üç farklı yapı göze çarpar (Dilek, 2003):

1. Portal venin bir dalı
2. Hepatik arterin uzantıları
3. Safra kanalı

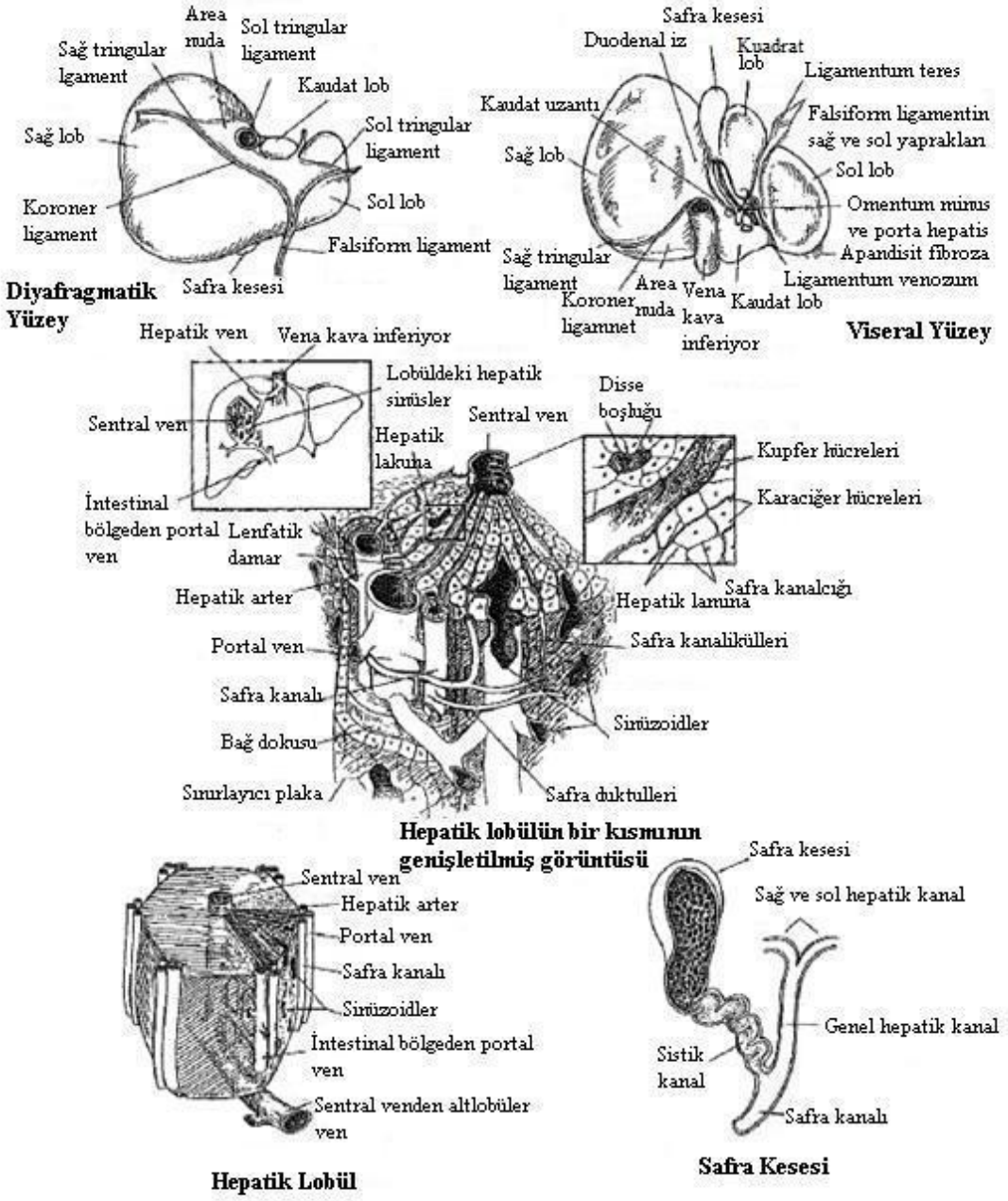
Sindirim sistemi ve venöz drenaj arasında bir köprü vazifesi gören karaciğer, sentezlediği ürünleri doğrudan kana vermesi ile endokrin bez gibi; safra salgısını özelleşmiş safra kanalları aracılığıyla safra kesesine iletmesi ile de ekzokrin bez gibi işlev görür (Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005).

Karaciğerde hepatositler bir ışınsal simetriye göre dizilmişlerdir. Bu durum portal asinüs modeli ile açıklanmaktadır. Bu modelde hücreler merkezden perifere doğru aldıkları kan ve madde içeriğine göre üç farklı zona ayrılır (Dilek, 2003). Bunlar:

a. Perfierik zon (Zon I): Bu zondaki hücrelerde granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve bol kristalı mitokondriler gözlenir. Periferik zon hücreleri dolaşımda herhangi bir sorun olduğunda en geç ölen ve rejeneratif özelliği en yüksek hücre grubudur (Dilek, 2003).

b. Ara zon (Zon II): Kana ikinci derecede tepki gösteren bu ara bölge hücreleri orta düzeyde metabolik aktivite gösterirler. Bu bölgenin sınırları tam olarak belli değildir (Dilek, 2003).

c. Santral zon (Zon III): Sentral veni çevreleyen hücre grubudur. Hücreler periferik zona göre daha az aktiftir. Düz endoplazmik retikulumca (DER) zengin, diğer organelleri açısından az gelişmiştir. Perfüzyon azaldığı zaman ilk nekroza uğrayan, fizyolojik ve patolojik yağ birikiminin ilk olarak gözlediği alandır (Dilek, 2003).



Şekil 2.1 Karaciğerin yapısı (Burtis ve Ashwood, 2005).

- **Hepatositlerin sitolojik özellikleri:** Pek çok organ gibi karaciğer dokusu da iki ana yapıdan oluşur. Bunlar; bir organın kendine özgü fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlayan hücre ve diğer yapıların organizasyonu şeklindeki parankima; bu

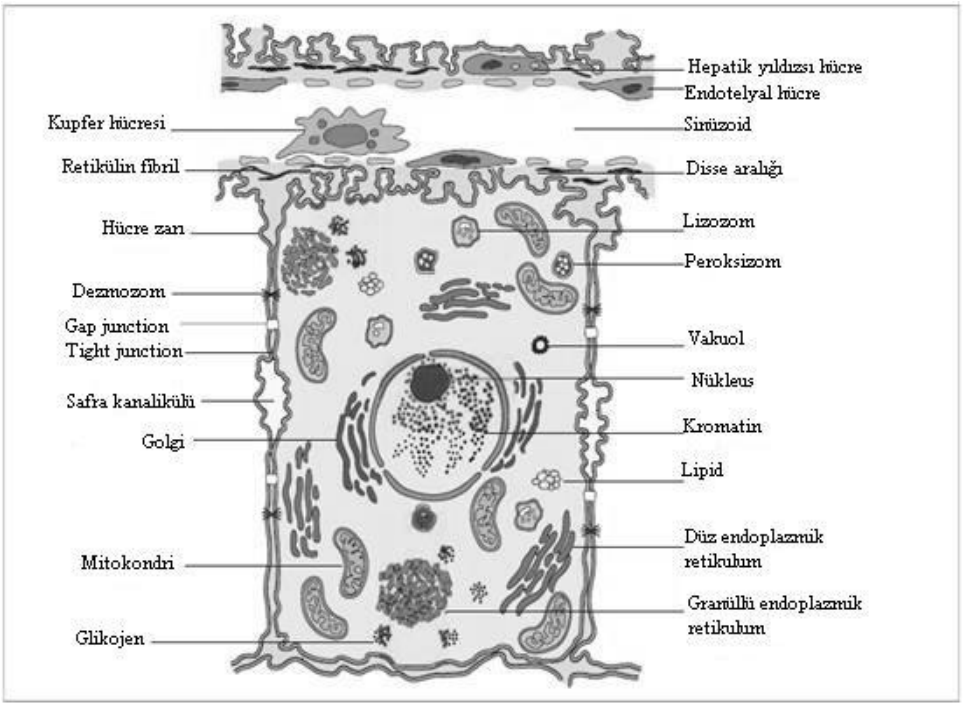
parankimaya desteklik sağlayan ve genelde organın iskeletini oluşturan kapsül benzeri yapıların tümünü içeren stromadır (Dilek, 2003).

Ortalama 20-35 μ çapında poligonal hücreler olan hepatositler, karaciğeri oluşturan hücre populasyonunun yaklaşık %80'ini oluştururlar (Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005). Hepatositler merkezden perifere doğru tek ya da iki hücre kalınlığında olacak şekilde, lobül içerisine aralarında sinüzoidlerin uzandığı ışınsal düzende dizilmişlerdir (Şekil 2.1) (Dilek, 2003).

Sinüzoidlere bakan tarafta hücre yüzeyi ile sinüzoid arasında Disse boşluğu adı verilen ince bir boşluk yer alır (Patrick and McGee, 1980; Akın vd., 1992). Bu boşluk, sinüzoid endotelyumundan filtre edilen plazmadan ve retikulin ipliklerinden oluşan bir sıvı ile doludur (Patrick and McGee, 1980; Akın vd., 1992). Hepatositler madde alışverişini bu boşluk aracılığıyla yapar ve subendotelyal alanda retiküler lifler ve hepatositlerin mikrovillusları da bulunur (Dilek, 2003). Böylece hepatositlerin madde alışverişi de kolay hale gelmiştir.

Disse boşluğunda fonksiyonları henüz belirlenmemiş İto hücreleri (perisinüzoidal hücre, stellat ya da yağ hücresi) bulunur (Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005). Bu hücrelerde yer alan lipid damlacıkları sitoplazmik uzantılara kadar tüm hücrede gözlenir (Dilek, 2003). Bu hücreler hasar sırasında fibrozise yol açan kollajen sentezi yapan fibroblastlara dönüşürler (Şekil 2.2) (Burtis ve Ashwood, 2005).

Venöz sinüzoidlerin çeperi iki tip hücreden oluşmaktadır (Akın vd., 1992). Bunlar, tipik endotel hücreleri ve Kupffer hücreleridir (Patrick and McGee, 1980; Akın vd., 1992). Kupffer hücreleri plazmadan biluribin, boya, özel madde ve harap olmuş eritrositler gibi yapıları alıp onları fagosite ederler (Şekil 2.2) (Akın vd., 1992). Endotel hücreleri ise sinüzoidlerin olduğu karaciğer boyunca kanı dağıtır (Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005) .



Şekil 2.2 Hepatositlerin yapısı (Sherlock and Dooley, 2002).

Fizyolojik ve biyokimyasal açıdan vücuttaki diğer sistemlere olan etkilerinin dışında karaciğer, kendi içinde gerçekleştirdiği birçok karmaşık fonksiyondan ve bunların düzenlenmesinden de sorumludur. Bunlar:

1. Sekresyon fonksiyonu
    a. Safra yoluyla bilurubin atılımı ve bilurubin metabolizması
    b. Xenobiyotik metabolizması ve atılımı
    c. Gastrointestinal yolla safra salgılama

2. Sentez fonksiyonu
    a. Albumin, globulin, immünoglobulin, seruloplazmin, koagülasyon proteinleri, fibronektin, kreatin gibi proteinler ve lipoprotein sentezi,
    b. Karaciğer enzimleri ve üre sentezi
3. Metabolik fonksiyon
    a. Amonyak metabolizması
    b. Karbonhidrat metabolizması
    c. Yağ metabolizması
    d. Protein metabolizması
4. Depolama fonksiyonu
    a. Vitamin depolanması
    b. Demir depolanması
    c. Glikojen depolanması
5. Sindirim sisteminden kaynaklanan bakterilerin filtrasyonu
6. Bağırsaktan dönen kanın filtrasyonu

Karaciğer bu fonksiyonlarını üç ana sistemde gerçekleştirir:

1. Hepatositler: Temel biyokimyasal süreçlerin yürütülmesini gerçekleştirirler.
2. Safra yolu: Biluribin atılımını düzenler.

3. Retikuloendotelyal sistem (RES): Hemoglobin ve biluribin metabolizmasını içeren bir sistemdir (Dilek, 2003).

Ayrıca karaciğerde birçok enzim sentezlenmektedir. Bunlar:

1. AST (SGOT)
2. ALT (SGPT)
3. LDH
4. ALP
5. GGT
6. 5'-Nükleotidaz

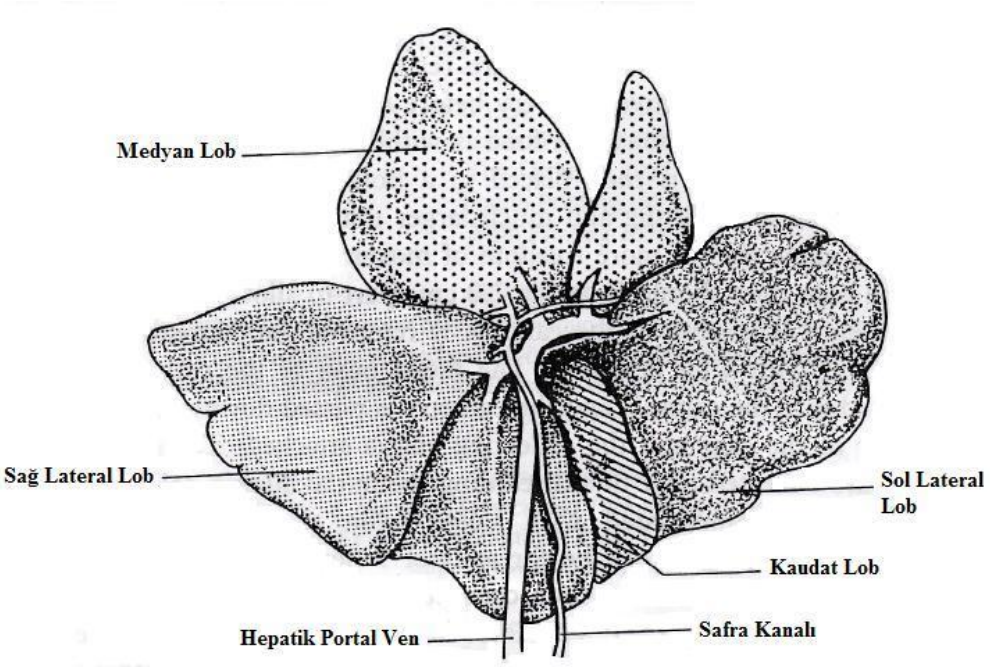
Üretilen bu enzimlerden karaciğerin fonksiyonları ile ilgili net bilgileri AST ve ALT verir (Akın vd., 1992; Dilek, 2003; Huang et al., 2006).

2.1.2 Sıçan karaciğeri

Diğer memelilerde de olduğu gibi sıçan karaciğeri de multilobular (çok loblu) bir yapıya sahiptir (Gershbein and Elias, 1954; Martins and Neuhaus, 2007). Sıçan karaciğeri medyan lob, sağ lateral lob, sol lateral lob ve kaudat lobdan oluşur. Üst üste yığınlar halinde bulunan sıçan karaciğerinde sadece kaudat lob mide sayesinde bu yığından ayrılır (Şekil 2.3) (Gershbein and Elias, 1954; Martins and Neuhaus, 2007).

Sıçan karaciğerinde loblar anatomik açıdan incelendiğinde, medyan lob olarak adlandırılan lob en büyük lobdur (Gershbein and Elias, 1954; Martins and Neuhaus, 2007). Sol lateral lob ile ilişki içinde bulunan medyan lob, medyan çizik ile sağ ve sol medyan loba ayrılır (Şekil 2.3) (Martins and Neuhaus, 2007).

Kaudat lob, portal ven ve inferior vena cavanın sol tarafında ve sol lateral lobun arkasında konumlanmıştır (Martins and Neuhaus, 2007). Kaudat lob iki bölümden oluşur (Gershbein and Elias, 1954; Martins and Neuhaus, 2007).



Şekil 2.3 Sıçan karaciğeri (Waynforth and Flecknell, 1994).

2.1.3 Hepatik hasar

Çeşitli etkilerle gerçekleşen karaciğer hasarı birkaç farklı sınıfta karşımıza çıkmaktadır. Yapılan bu sınıflama karaciğerde oluşan hasara göre yapılmaktadır. Bunlar;

1. Akut Karaciğer Hasarı: Akut hepatik hasar, sarılık veya nonspesifik hastalık belirtilerine AST ve ALT seviyelerinin yükselmesi ile belirlenir (Dilek, 2003).

2. Alkole Bağlı Karaciğer Hasarı: Alkole bağlı karaciğer hasarında, hasarın belirtileri son derece karmaşıktır. Kişilik değişikliği, karaciğer enzimlerinin hafif bir yükseliş göstermesi ve sarılık benzeri bazı belirtileri vardır (Dilek, 2003).

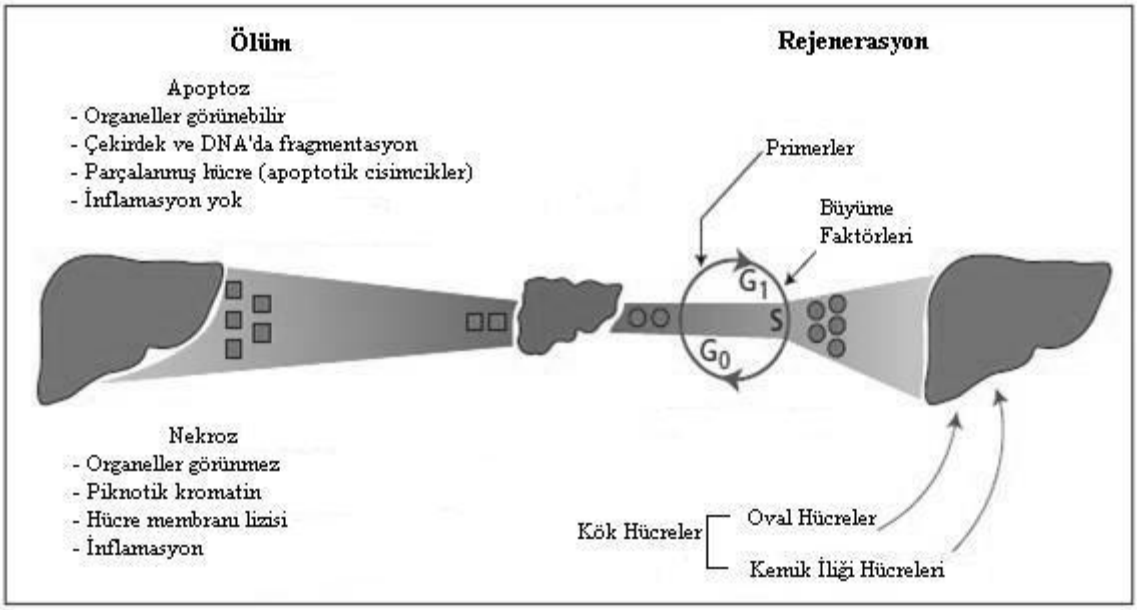
3. Kronik Karaciğer Hasarı: İnflamasyonla kendini gösteren bir durumdur. Kronik hepatitin belirlenmesinde sitoplazmik enzimlerdeki artış ve viral belirteçler önemli rol oynar (Dilek, 2003).

4. İlaçlara Bağlı Karaciğer Hasarı: Karaciğer, toksik ilaç artıklarının vücuttan uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar. Pek çok ilaç lipofilik özelliklerinden dolayı mide-bağırsak sisteminde pasif geçişle alınır ve böylece karaciğere kadar ulaşır. Karaciğerde ya bir madde detoksifiye edilir ya da vücuda alınan bir ilacın etkinliğine son verilir. Fakat bazı durumlarda karaciğere gelen zararsız bir madde toksik hale dönüşebilmekte ya da inaktif halde bulunan bir madde öncülü olan aktif bir toksik maddeye dönüşebilmektedir (Dilek, 2003).

a. Toksik reaksiyonlar: Toksik madde maruziyetinin ardında gelişen bir durumdur. Etkenin karaciğer üzerinde oluşturduğu hasar direkt olarak hepatositlerde gözlenir. Bunun sonucunda hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz durumu gözlenebilir (Dilek, 2003).

b. Zonal hepatik nekroz: Direkt olarak etken maddeden kaynaklanan bir hasardır (Patrick and McGee, 1980; Dilek, 2003).

c. Asidofilik cisimcik oluşumu: Hepatositlerde hasara yol açan maddenin apoptoz yoluyla ölen hücrede eozinofilik, yuvarlak bir görüntü oluşturmasıdır (Şekil 2.4) (Patrick and McGee, 1980; Sherlock and Dooley, 2002; Dilek, 2003).



Şekil 2.4 Hepatosit hücre ölümü ve rejenerasyonu (Sherlock and Dooley, 2002).

2.2 Apoptoz

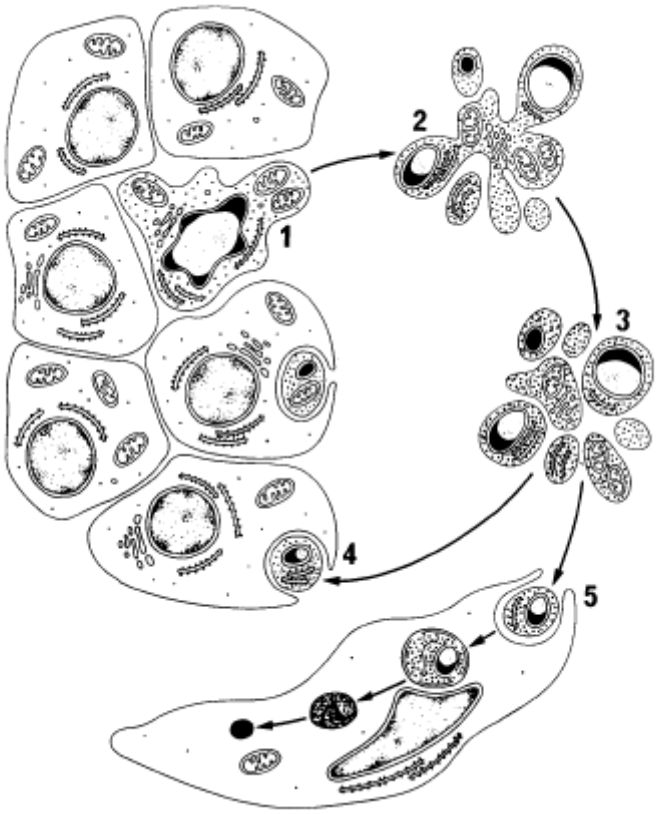
Hücreler, onları ortam şartlarında hayatta tutacak ya da onların adaptasyonlarını sağlayacak hücre dışı sinyallere tepki vermek zorundadır (Hancock, 2005). Çok hücreli organizmalarda, hücreler doğru yer ve zamanda ölür (Öktem vd., 2001; Hancock, 2005; Güneş, 2006). Bu hassas mekanizmanın sonucu olarak gerçekleşen hücre ölümü, genellikle apoptoz olarak tanımlanan "*Programlı Hücre Ölümü*"dür (Hancock, 2005).

Sağlıklı çok hücreli organizmalarda gözlenen apoptoz, organizmanın gelişimi sırasında gözlenen normal bir hücresel süreçtir (Yıldırım vd., 2007; Altunkaynak ve Özbek, 2008). Hücre bölünmesi ile artan hücre sayısı apoptoz mekanizmaları ile düzenlenir (Güneş, 2006; Yıldırım vd., 2007). Bu sayede çok hücreli organizmalarda homeostasis (iç denge) korunur (Kerr et al., 1972; Yıldırım vd., 2007; Akşit ve Bildik, 2008).

Çok hücreli organizmalarda genel olarak iki tip hücre ölümü vardır (Yıldırım vd., 2007; Akşit ve Bildik, 2008). Bunlar hücresel zedelenme sonucu hücrelerin şişip patlayarak yok olması, oksijensiz kalma, aşırı ısı değişimi, toksik maddeler vb. etkenlerle gerçekleşen nekroz; diğeri ise yaşlanmış, fonksiyonunu kaybetmiş, gelişimi düzensizleşmiş, hasar görmüş veya artık gerek duyulmayan hücrelerin elendiği apoptozdur (Şekil 2.5) (Güneş, 2006; Yıldırım vd., 2007; Akşit ve Bildik, 2008). Bu iki ölüm şekli arasında bazı farklar bulunmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (Öktem vd., 2001; Yıldırım vd., 2007).

Apoptoz	**Nekroz**
Kromatin yoğunlaşmasının gözlenmesi	Çekirdeğin şişmesi
Hücrenin küçülmeye başlaması	Hücrenin büyüyüp şişmesi
Organel ve hücre membranlarında bütünlüğün korunması	Organel bütünlüğünün bozulması
Artıkların komşu hücreler tarafından hızlı bir şekilde sindirilmesi	Hücrelerin parçalanması ve içeriklerinin bulunduğu çevreye yayılması
DNA fragmentasyonunun gerçekleşmesi	Enflamasyon oluşumu
Patolojik ya da fizyolojik kaynaklı	Patolojik kaynaklı
Kimyasal ya da yapısal nedenlerle yıkım	Makromolekül sentezi ile gerçekleşen aktif yıkım



Şekil 2.5 Apoptozun morfolojik süreci. 1- Apoptotik hücre, 2- Nukleus fragmentasyonu, 3- Apoptotik cisimcik oluşumu, 4- Komşu hücreler tarafından fagosite edilme, 5- Mononükleer fagositler tarafından fagositoz (Sluyser, 1996).

2.2.1 Apoptoz terimi

Hücrelerin ölmesi gerektiği fikri 1842 yılında Carl Vogt tarafından ortaya atılmıştır (Hancock, 2005; Koçtürk ve Vatansever, 2011). Fakat 1972 yılına kadar bu alanda apoptoz terimi kullanılmamıştır (Hancock, 2005). Bu süre zarfında 1885'te W. Flemming programlı hücre ölümüne ilişkin bazı tanımlamalarda bulunmuş, 1951'de Glücksmann programlı hücre ölümünün omurgalı gelişiminin bir parçası olduğunu gözlemlemiş ve bu konuyla ilgili ilk sınıflandırma ve tanımlamayı yapmıştır (Flemming, 1885; Koçtürk ve Vatansever, 2011).

1964 yılında ise Lockshin ve Williams gelişim sırasında hücre ölümünün hücresel mekanizmalarla kontrol edildiğini tespit etmiş ve ilk kez *"Programlı Hücre Ölümü"* terimini kullanmıştır (Lockshin and Williams, 1964; Koçtürk ve Vatansever, 2011). 1966 yılında Taba hücre ölümü için özel bir RNA ve DNA sentezine ihtiyaç olduğunu gözlemlemiş (Koçtürk ve Vatansever, 2011) ve aynı yıl Saunders ilk deneysel çalışmayı gerçekleştirmiştir (Saunders, 1966). 1972 yılına gelindiğinde ise Kerr, Wyllie ve Currie programlı hücre ölümünün tipik morfolojik görünümlerini tespit ederek bu şekilde gerçekleşen hücre ölümünü *"apoptoz"* olarak adlandırmışlardır (Kerr et al., 1972; Yıldırım vd., 2007; Altunkaynak ve Özbek, 2008; Koçtürk ve Vatansever, 2011).

Apoptoz kelimesi Yunanca *"bir yerden düşmek"* ya da *"yaprak dökümü"* anlamına gelen *"apoptosis"* kelimesinden gelmektedir (Öktem vd., 2001; Hancock, 2005; Yıldırım vd., 2007; Koçtürk ve Vatansever, 2011).

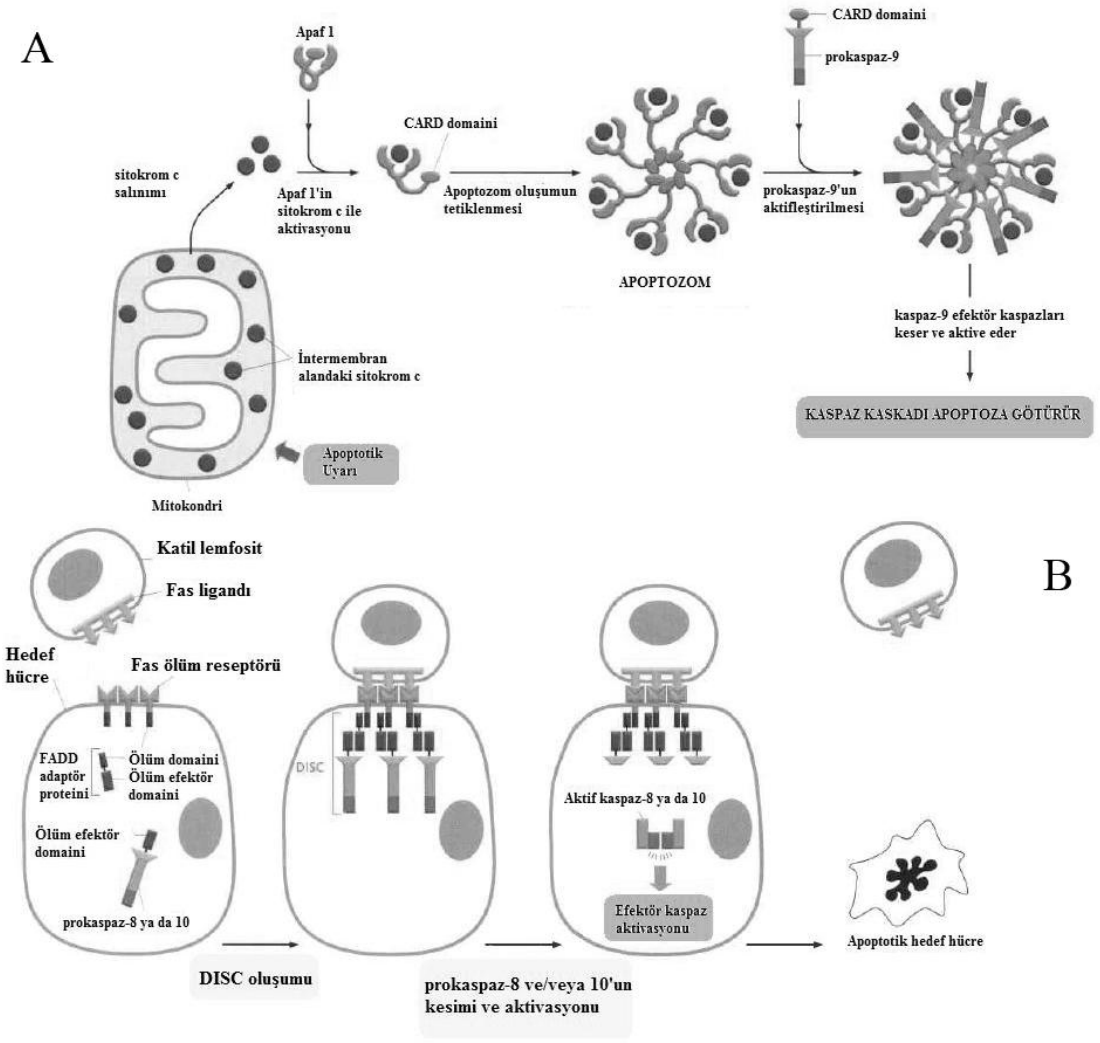
2.2.2 Apoptoz mekanizmaları

Apoptozun iç yolak ile kontrolü hücre mitokondrisi ile sağlanır. DNA hasarı, topoizomeraz inhibisyonu ve benzer birçok olayın etkilediği mitokondride zar geçirgenliği artar ve bunu birçok proteinin salınması izler (Şekil 2.6A) (Hancock, 2005; Yıldırım vd., 2007). Geçirgenlikle birlikte mitokondriden salınan proteinlerden biri de sitokrom c'dir. Sitokrom c'nin salınması bağlı bulunduğu mitokondri iç membranının matrikse bakan kısmında bulunan lipidlerden ayrılmasıyla başlar (Lawen, 2003; Hancock, 2005). Sitokrom c'nin mitokondrial solunumun bir parçası olduğu ve hücre için ATP üretiminde kullanıldığından mitokondri dışına salınmasının iki farklı etkisi olur. Bunlardan birincisi, sitokrom c'nin apoptotik yolakta sinyal molekülü olarak rol oynaması; ikincisi ise elektron taşıma sisteminde ATP üretimini sekteye uğratmasıdır (Hancock, 2005).

Endonükleaz G'nin de içinde bulunduğu mitokondriden salınan diğer proteinler ise Smac/Diablo ve AIF'tir (Hancock, 2005; Yıldırım vd., 2007).

Bcl-2 protein ailesi üyeleri apoptozu başlatabilir (pro-apoptotik) ya da inhibe edebilir (anti-apoptotik) (Alberts vd., 2002; Hancock, 2005; Cooper ve Hausman, 2006). Pro-apoptotik proteinlerin başında Bax ve Bak gelir (Hancock, 2005; Yıldırım vd., 2007). Anti-apoptotik proteinler ise Bcl-2 ve Bcl-XL'dir (Alberts vd., 2002; Hancock, 2005; Cooper ve Hausman, 2006).

DNA hasarı ya da hücresel stres pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aktivasyonuna öncülük eder (Hancock, 2005; Yıldırım vd., 2007). Bu sayede mitokondri geçirgenliği artar ve sitokrom c ve diğer proteinler salınır. Sitokrom c, APAF-1 adı verilen bir protein ile kompleks bir yapı oluşturur (Hancock, 2005; Cooper ve Hausman, 2006; Yıldırım vd., 2007). APAF-1'in yapısındaki konformasyonel değişim ATP varlığında gerçekleşir (Lawen, 2003; Hancock, 2005). Bu sayede APAF-1 oligomerik bir yapı kazanır (Hancock, 2005). Daha sonra bu yapı pro-kaspaz-9 ile birleşerek apoptozom adı verilen bir yapıya dönüşür (Hancock, 2005; Cooper ve Hausman, 2006). Pro-kaspaz-9, apoptozom ile kesime uğratılarak aktif hale geçirilir (Hancock, 2005; Cooper ve Hausman, 2006; Yıldırım vd., 2007). Böylece apoptotik etki işlemeye başlar. Mitokondriden salınan proteinler, gözlemlenen diğer morfolojik değişimlere katkı sağlar (Hancock, 2005). Endonükleaz G, oluşan DNA dejenerasyonundan dolayı, nükleus içine göç edebilir ve AIF, yoğunlaşmanın da içinde bulunduğu nüklear değişikliklere öncülük edebilir (Hancock, 2005).



Şekil 2.6 Apoptoz mekanizmaları. Apoptotik mekanizmaların şematik görünümü. A) İç yolak, B) Dış yolak (Alberts vd., 2002).

Apoptozda dış yolağı birçok farklı protein düzenleyebilir. Örneğin p53 apoptoz inhibitör proteinlerin varlığında bile anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini nötralize edebilir (Hancock, 2005). Apoptozun iç yolak ile başlatılmasında mitokondriden salınan Smac/Diablo proteini IAP'ların aktivitesini durdurabilir (Hancock, 2005; Cooper ve Hausman, 2006). Bu da kaspazların aktivitesini sağlar. İç yolak, birbirlerini etkileyen birçok protein açısından karmaşık bir yoldur.

2.2.2.1 Kaspazlar ve apoptoz

Bu olayların altında yatan moleküler mekanizmayı ilkin kontrol ve ikincil olarak da yürüten moleküllerin başında kaspazlar gelir (Hancock, 2005). Kaspaz, sistein-aspartat-spesifik proteaz kelimesinden türetilmiştir (Hancock, 2005; Yıldırım vd., 2007). Kaspazlar, apoptozda hücre büzüşmesi, DNA fragmentasyonu ve diğer değişimleri yönetir (Hancock, 2005).

i. Kaspazlar

Kaspazlar diğer proteinleri kestikleri ve aktif merkezlerinde sistein amino asidi bulundurdukları için sistein proteazlar sınıfında yer alırlar (Hancock, 2005; Yıldırım vd., 2007). Memelilerde tanımlanmış 14 farklı kaspaz bulunmaktadır (Lawen, 2003). Bunlardan 11 tanesi insanda tanımlanmıştır (Hermann and Kalden, 2003; Hancock, 2005).

Kaspazlar iki ana aileye ayrılırlar. Birinci grup kaspaz-1 ile ilgili enzimleri içerirken, ikinci grup ise *Caenorhabtidis elegans* tarafından üretilen CED-3 ölüm geni ile ilgilidir (Klug ve Cummings, 2003; Hancock, 2005; Cooper ve Hausman, 2006). Bir diğer kaspaz grubu ise apoptozdan ziyade sitokin olgunlaşması için kullanılır (Lawen, 2003). Kaspaz 1 ailesi hücre ölümü sürecinde kaspaz-2 ve kaspaz-3 alt ailesi ile birlikte sitokin yapımında rol oynar (Hancock, 2005).

ii. Kaspaz aktivasyonu

Sistein proteazlar olarak bilinen kaspazların aktif merkezlerinde korunmuş bir şekilde “-Glu-Ala-Cys-X-Gly-” (X: herhangi bir amino asit) dizisi bulunur (Hancock,

2005). Kaspazlar hangi hedef diziye etki edeceklerine göre üç gruba ayrılır. Bunlardan ilki kaspazların kendi dizileridir. İkinci grupta kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi içeren alt grup hedef dizi olarak "-Asp-Glu-X-Asp-" dizisini tanırken, aynı grupta yer alan ve kaspaz-2 içeren alt grup ise hedef dizi olarak "-Val-Asp-Val-Ala-Asp-" dizisini tanır (Hancock, 2005). Kaspaz 6, 8, 9 ve 10'u içeren üçüncü grup ise kesimi "-(Ile/Leu/Val)-Glu-X-Asp-" bölgesinden yapar (Hancock, 2005).

Kaspaz aktivasyonu kendi kendini proteolitik kesimle başlar ve daha sonra bu işlem bir kaspazın diğerini proteolitik olarak kesmesi ile devam eden bir kaspaz kaskadı şeklinde gerçekleşir (Hancock, 2005; Yıldırım vd., 2007). İnaktif kaspaz kesime uğramamış ve pro-kaspaz olarak adlandırılan kaspazdır. İlk kesim olayı otokatalite olarak gerçekleşir (Hancock, 2005; Cooper ve Hausman, 2006). Bu şekilde kaspaz kendi kendini keser ve aktifleştirir. Devamında aktifleşen kaspaz, diğer kaspazı kesime uğratır. Burada kaspazlar iki şekilde ifade edilir: Başlatıcı kaspazlar ve Efektör kaspazlar (Hancock, 2005; Yıldırım vd., 2007).

İnaktif durumdaki pro-kaspazlar 3-4 etki alanı içerir. Bunlardan bir tanesi N-terminal ucunda yer alan pro-domaindir (Hancock, 2005). Bu alanı büyük alt birim domaini takip eder. Son olarak C-terminal uçta küçük alt birim domaini bulunur. Ayrıca bu uçta alt birimleri birbirine bağlayan bağlantı bölgesi yer almaktadır (Hancock, 2005). Kesimden sonra bu birimler heterotetramerik tarzda bir araya gelirler (Lawen, 2003). İki küçük alt birim ve iki büyük alt birim bir araya gelerek aktif enzimi oluştururlar. Bu sırada pro-domain bölgesi kesilip atılabilir (Hancock, 2005). Böylece aktif merkezi işler bir enzim oluşturulmuş olur.

2.2.2.2 Apoptoz ve NF-κB yolağı

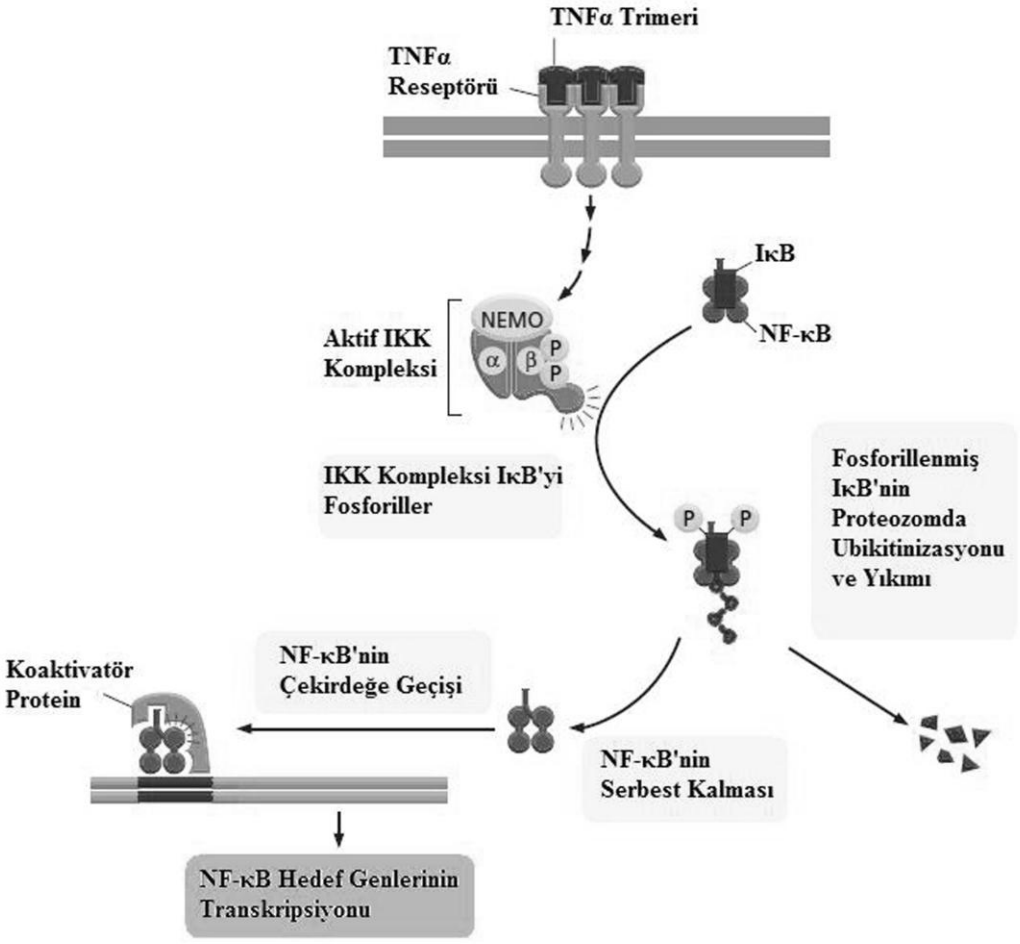
Hücrede en büyük sinyal ileti yolaklarından birisi de hücrenin hayatta kalmasını sağlayan sinyal ileti yolaklarıdır. Apoptoz sırasında hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bu yolaklar kimi tedavilerde önemli roller oynamaktadır. Hayatta kalma sinyalleri hücre canlılığının korunması ve hücrenin çoğalabilmesinde önem arz etmektedir.

Çok hücreli canlılarda hücrelerin immün yanıt ve enflamatuar uyaranlara karşı verdiği yanıtı düzenleyen ve hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan en önemli protein grubu NF- κB ailesi transkripsiyon faktörleridir (Hermann and Kalden, 2003; Yıldırım vd., 2007). NF-κB ilk olarak 1986 yılında David Baltimore tarafından B hücrelerinde keşfedildi. Bu yapı B hücrelerinin nükleusu içinde immünglobulin promotorlarının kappa zincirlerine bağlanan bir faktör olarak tanımlandı (Ahn and Aggaarwal, 2005). NF-κB insandan Drosophila'ya kadar bütün canlılarda sitoplazmada inaktif halde bulunurlar (Ahn and Aggaarwal, 2005; Yıldırım vd., 2007). Memeli hücrelerinde tanımlanmış beş farklı NF-κB ailesi üyesi bulunmaktadır. Bunlar; NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (p65), RelB ve c-Rel'dir (Yıldırım vd., 2007).

NF-κB, uyarılmamış hücrelerde IκB ile bir kompleks oluşturarak sitoplazma içerisinde inaktif halde bulunur (Şekil 2.7) (Hermann and Kalden, 2003; Ahn and Aggaarwal, 2005; Cooper ve Hausman, 2006). Bu durumda NF-κB'nin nükleer yerleşim sinyalleri maskelenir ve NF-κB çekirdeğe taşınamaz (Hermann and Kalden, 2003). Uyarı ile IκB fosforillenir ve ubikitin-aracılı proteoliz ile yıkıma uğrar (Cooper ve Hausman, 2006). Serbest kalan NF-κB, immünglobulin-κ hafif zincirinin transkripsiyonuna başlar. NF-κB sinyal ileti yolağında I-κB degredasyonu (Hermann and Kalden, 2003; Ahn and Aggaarwal, 2005), NF-κB'nin nükleusa geçmesi ve transkripsiyonu başlatması ile sonuçlanır (Şekil 2.7) (Ahn and Aggaarwal, 2005). Aktif

NF-κB DNA üzerinde κB elementleri içeren özel dizilere bağlanır ve birçok gen transkribe olur (Ahn and Aggaarwal, 2005).

NF-κB'nin aktivasyonu TNF-R, TRADD, TRAF2, RIP ve IKK gibi moleküllerle olabileceği gibi ras, syk, β-GSK, AKT, MEK3, FAK gibi moleküllerle de olabilir (Plümpe et al., 2000). Hücre içindeki SOD ve γ-GCS ile NF-κB aktivasyonu durdurulabilir (Hermann and Kalden, 2003; Ahn and Aggaarwal, 2005).



Şekil 2.7 NF-κB sinyal ileti yolağı (Alberts vd., 2002).

NF-κB kanser, diyabet ve alerji gibi birçok hastalıkta aktive olabilmektedir. Özellikle karaciğer, göğüs ve prostat kanserlerinde yoğun NF-κB aktivitesi gözlenmiştir (Ahn and Aggaarwal, 2005). Ayrıca NF-κB'nin hücre döngüsünde pozitif yönde etki gösteren önemli bir moleküldür. NF-κB'nin aktivasyonu kadar inhibisyonu da önemlidir. NF-κB inhibisyonu; sitokinler, hormonlar, stres, antioksidanlar, proteozom ve apoptoz enzimlerinden kaspazların da içinde bulunduğu bazı enzim grupları ile sağlanmaktadır (Ahn and Aggaarwal, 2005).

2.2.3 Organizma gelişiminde ve hastalıklarda apoptoz

Çok hücreli organizmaların gelişimi açısından apoptotik süreçleri varlığı organizmanın şekillenmesi ve birçok patolojik değişimlerden korumak için bir garanti niteliğindedir. Organizmanın gerek gelişimi, gerekse yaşamının süreklilik arz etmesi açısından apoptotik süreçlerin sağlıklı işlerliği çok hücreli organizmalarda önemli rol oynamaktadır.

Apoptoz, organizmada erişkin dokuların korunmasında ve embriyo gelişiminde önemli bir rol üstlenmektedir (Klug ve Cummings, 2003). Gelişim sırasında apoptoz, görevini tamamlamış hücrelerin elenmesinde devreye girer. Özellikle amfibi gelişiminde larva dokusunun ortadan kaldırılması, el ve ayak parmaklarının oluşumu ile parmak aralarının oluşumunda görev almaktadır (Klug ve Cummings, 2003; Cooper ve Hausman, 2006). Bunların dışında apoptoz, nöronal gelişim sırasında oluşturulan sinir hücrelerinin yaklaşık olarak yarısının elenmesine neden olur (Hutchins and Barger, 1998). Burada sağ kalan hücreler apoptozun bloklanması ve hücre sağ kalım sinyalleri ile hayatta tutulur (Cooper ve Hausman, 2006).

Erişkin organizmalarda apoptoz, hücre çoğalmasını dengeleyici bir etki yapar. Burada apoptoz, yaşlanan kan hücrelerinin ölümü, hasarlı ya da tehlikeli hücrelerin

ortandan kaldırılması, virüs enfeksiyonuna uğramış hücrelerin elenmesi ve DNA hasarı gibi durumlarda aktif rol oynar (Hermann and Kalden, 2003; Cooper ve Hausman, 2006). İnsan hayatı açısından önemli patolojik durumların başında kanser gelir. Bazı virüsler enfekte ettikleri hücrelerin apoptoz yolaklarını engelleyerek kanserleşmelerine neden olur (Hermann and Kalden, 2003; Yıldırım vd., 2007). Burada virüslerin ürettikleri proteinler p53 gibi kontrol proteinlerini inaktive ederken, bazen de Bcl-2 benzeri proteinler üreterek apoptoza engel olurlar (Yıldırım vd., 2007). Bazı virüsler ise ya Bcl-2 ifadesinde artışa neden olur ya da APAF-1 ifadesini engellerler (Yıldırım vd., 2007).

Diğer bir yandan immün sistemde yer alan T ve B hücreleri görevlerini tamamladıktan sonra, hafıza hücreleri dışında kalan hücreler, apoptozla elenme sürecine girerler (Yıldırım vd., 2007). Bu şekilde eskiyen hücreler immün sistemden uzaklaştırılmış olur.

İnsan apoptoz mekanizmalarında genetik bozukluk çok nadir görülen bir durumdur. En çok görülen genetik bozukluk Fas genindeki mutasyondur (Yıldırım vd., 2007). Gerek FasL gerekse kaspazlarda gözlenen mutasyon çok nadir bir durumdur. Nadiren de olsa gerçekleşen bu durum ALPS'e neden olur. Bu hastalarda genetik mozaiklik gözlenir (Yıldırım vd., 2007). Bu sendromda lenfositlerin bir kısmı apoptoza girerken diğer bir kısmı ise bundan kaçarak çoğalma sürecine girer. Böylece kaçan lenfositler lenf nodları oluşturarak kanda baskın populasyona neden olurlar.

2.3 Bor

Türkiye, yer üstü ve yer altı zenginlikleri bakımından bölgesinde önemli bir konuma sahiptir. Bu konumu özellikle stratejik açıdan önem arz eden bor minerallerinin büyük bir rezerv kapasitesine sahip olmasıyla daha da pekişmektedir (Çizelge 2.2) (Kılıç vd., 2009).

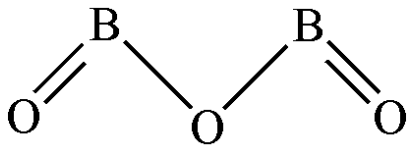
2.3.1 Bor elementinin kimyasal özellikleri

Periyodik tabloda bor, B simgesiyle gösterilen ve atom numarası 5 olan bir elementtir. Bor elementi, 10,81 atom ağırlığına ve 2,84 gr/cm^3 yoğunluğuna sahiptir. 2300^{o}C' de ergime ve 2550^{o}C'de ise kaynama noktasına ulaşan bor, metal ile ametal arasında bir özellik gösteren yarı iletken bir elementtir. Yaklaşık 230 çeşit doğal bor minerali vardır (Kahyaoğlu vd., 2009; Kılıç vd., 2009).

Çizelge 2.2 Dünya bor rezervlerinin ülkelere göre dağılımı (Kılıç vd., 2009).

Ülke	Görünür Ekonomik Rezerv	Muhtemel Mümkün Rezerv	Toplam Rezerv	Toplam Rezervdeki Payı (%)	Görünür Ekonomik Rezerv Ömrü (Yıl)	Toplam Rezerv Ömrü (Yıl)
Türkiye	227.000	624.000	851.000	72,20	240	412
Rusya	40.000	60.000	100.000	8,50	16	78
A.B.D.	40.000	40.000	80.000	6,80	33	76
Şili	8.000	33.000	41.000	3,50	5	26
Çin	27.000	9.000	36.000	3,10	17	23
Peru	4.000	18.000	22.000	1,90	3	14
Bolivya	4.000	15.000	19.000	1,60	3	12
Kazakistan	14.000	1.000	15.000	1,30	2	10
Arjantin	2.000	7.000	9.000	0,80	1	6
Sırbistan	3.000	0.000	3.000	0,30	2	2
TOPLAM	369.000	807.000	1.176.000	100,00	317	652

Maden sahalarında bor yataklarının değeri, maden yatağının barındırdığı B_2O_3 (bor oksit – borik anhidrit) oranı ile saptanmaktadır (Şekil 2.8) (Sarıhan, 2006; Kılıç vd., 2009).



Şekil 2.8 Borik anhidritin kimyasal formülü.

Bor ilk defa 1702 yılında Willem Homberg tarafından borakstan borik asit elde edilmesiyle kimyasal çalışmalara dahil olmuş ve 1732 yılında kimyasal yapısı tanımlanmıştır (Habashi, 2009; Kahyaoğlu vd., 2009). 1808 yılına gelindiğine Fransız kimyagerler Joseph Louis Gay-Lussac ve Louis-Jacques Threnard potasyumun B_2O_3 ile redüksiyonu sonucu ilk elementer boru elde etmişler ve İngiliz kimyager Sir Humphry Davy ise elektroliz metodu ile borik asitten saf boru elde etmişlerdir (Habashi, 2009; Kahyaoğlu vd., 2009).

Elementer bor 100^oC'da yavaş bir şekilde oksitlenmekte ve oksijenle kolayca B_2O_3 bileşiğini oluşturmaktadır (Kahyaoğlu vd., 2009).

2.3.2 Endüstride bor bileşiklerinin kullanımı

Çağımız teknolojisi ile birlikte, bor ve türevleri endüstride geniş bir kullanım alanına ulaşmıştır. Tarımdan sanayiye ve hatta sağlık sektörüne kadar birçok alanda bor ve türevleri aktif olarak kullanılmaktadır (Kılıç vd., 2009).

1. İnşaat-Çimento Sektöründe: (Yiğitbaşıoğlu, 2004).
2. Cam Elyafı: (Kılınç vd., 2001; Kıhç, 2004).
3. Ahşap Koruma: (Altun, 2009; Merdan, 2009).

4. Nükleer Uygulamalar: (Acarkan, 2002; Kıhç, 2004).

5. Metalurji: (Kılınç vd., 2001; Kıhç, 2004).

6. Otomobil Hava Yastıkları, Antifriz: (Yiğitbaşıoğlu, 2004).

7. Sağlık: BNCT kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle; beyin kanserlerinin tedavisinde hasta hücrelerin seçilerek imha edilmesine yaraması ve sağlıklı hücrelere zararının minimum düzeyde olması nedeniyle tercih nedeni olabilmektedir. Metabolizmadaki bor, kalsiyum, magnezyum ve fosfor dengesini ayarlar. Sağlıklı kemiklerin oluşumuna, kasların ve beyin fonksiyonlarının gelişimine yardım eder (Onrat ve Konuk, 2004; Yiğitbaşıoğlu, 2004).

8. Füze/Uçuş Yakıtları: (Yiğitbaşıoğlu, 2004).

9. Atık Temizleme:

10. Borlu Katı Yakıtlar/Hücre Yakıtları/Fuel Cells:

11. Enerji Üretimi ve Isı Depolama:

12. DİĞER

- Fiber Optik
- Kozmetik
- Kauçuk ve Plastik Sanayii
- Fotoğrafçılık
- Patlayıcı Maddeler (havai fişek vb.)
- Antifirizler, hidrolik yağlar
- Petrol Boyaları, yanmayan ve erimeyen boyalar, tekstil boyaları
- Zımpara ve aşındırıcılar
- Kompozit malzemeler

- Manyetik cihazlar
- İleri Teknoloji Araştırmaları (moleküler biyoloji vb.)
- Mumyalama

ve diğer birçok alanda kullanılmaktadır (Kılınç vd., 2001; Kıhç, 2004).

2.3.3 Canlılar açısından bor bileşiklerinin önemi

Bor ve türevleri binlerce yıldır insanlar tarafından bilinmektedir. Özellikle Eski Yunanlılar ve Romalılar tarafından bor ve türevleri temizlik malzemesi olarak kullanılmıştır. Ayrıca M.S. 875 yıllarında Arap hekimler tarafından tıpta tedavi amacıyla kullanılmıştır (Kahyaoğlu vd., 2009).

Bor bileşikleri su, hava ve toprakta bulunduğu gibi bitki ve hayvan yapısında da bulunmaktadır. Bu nedenle bor ve türevleri canlı sistemler için önem arz eden bir yarı metaldir (Goldbach et al., 2002; Abu Ali et al., 2005). Ayrıca yapılan incelemeler sonucunda borun bitki ve hayvanlar için önemli bir esansiyel element olduğu bulunmuştur (Tanaka and Fujiwara, 2008). İlk kez 1897 yılında Wittstein ve Apoiger bitkilerde bor bileşiklerini tespit etmişlerdir. Uzun yıllardan beri yapılan çalışmalarda borun bitkiler için mikrobesin olabileceği düşünülmüştür (Akgüç vd., 2009). Bitkilerle yapılan çalışmalarda, Bor1 ve Bor4 olarak adlandırılan membran proteinleri bitki hücrelerinin bor transportunda görev almaktadır (Çöl vd., 2009). Yapılan çalışmaların ardından bor, bazı hayvan türleri ve ökaryotik canlılar için de gerekli bir besin olduğu vurgulanmıştır (Akgüç vd., 2009). Ayrıca bor, insan vücudunda da belli oranlarda bulunmaktadır (Çizelge 2.3) (Moseman, 1994; Kahyaoğlu vd., 2009).

Çizelge 2.3 İnsan vücudundaki doku ve organlarda bulunan bor miktarı (Kahyaoğlu vd., 2009).

Doku ve Organlar	Bor (ppm)	Doku ve Organlar	Bor (ppm)
Deri	0,12	Yağ	0,07
Kemik	0,90	Kan	0,14
Kas	0,07	İdrar	0,75
Kalp	0,04	Dışkı	0,18
Karaciğer	0,11	Saç	4,3
Akciğer	0,07	El tırnağı	15,2
Böbrek	0,25	Ayak tırnağı	17,9
Bağırsak	0,08		

Çok hücreli sistemlerde bor, kanser ve cilt hastalıkları gibi birçok alanda tedavi ürünü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca biyokimyasal olaylarda da önemli görevler üstlenmektedir (Geyikoğlu et al., 2009).

Borik asit vb. bor bileşikleri insan ya da diğer çok hücreli organizmaların vücutlarına deri ve oral yol gibi birçok farklı şekilde girebilmektedir (Kahyaoğlu vd., 2009; Özen vd., 2009). Vücuda giren bor, önce bütün vücutta dağılmakta, ardından beyin, böbrek ve özellikle de karaciğerde birikmektedir (Kahyaoğlu vd., 2009).

Metabolizma dahilinde bulunan borik asit, derişiminin %50'sini ilk 20 saatte; %90'ını ise ilk 96 saatte böbreklerden herhangi bir değişikliğe uğramadan kaybetmektedir (Kahyaoğlu vd., 2009).

Yapılan in vitro çalışmalarda bor bileşiklerinden borik asidin bakteriyostatik ve bakteriyosidal etkileri araştırılmış; *Streptococcus* ve *Staphilacoccus*'lara karşı antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (Kahyaoğlu vd., 2009). Ayrıca yapılan araştırmalarda borik asidin idrar yolları enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmalara karşı etkili olduğu vurgulanmıştır (Porter and Brodie, 1969; Kahyaoğlu vd., 2009).

Türkiye, Çin ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde doğal su kaynaklarındaki güvenli bor konsantrasyonu alımını, tahmini seviyeden çok uzak bir noktada alımı şart koşmaktadır. Bu bölgelerde yaşayan insan populasyonlarında yüzyıllardır bor toksisitesi ya da diğer hastalıklar hakkında herhangi bir veri yoktur. Bu bölgelerdeki insan populasyonları bor ihtiyaçlarını yiyecekler ve sulardan karşılamaktadır (Meacham, 2009). Yetişkin bireyler gıda kaynaklarından ortalama günde 1 mg ve içme sularından günde 1 litre su tüketimi varsayılarak 0,2-0,6 mg bor alır (Anderson et al., 1994; Rainey and Nyquist, 1998; Hunt and Meacham, 2001; Meacham, 2009). Günlük 1-3 mg bor alınımının bor yoksunluğundan korunmak için yeterli olduğu düşünülmektedir (Nielsen, 2008). 2000 yılında A.B.D. ve Kanada'da yaşayan insanlar için tolere edilebilir güvenli üst limitin günlük 20 mg olduğu belirtilmiştir (Meacham, 2009). 2004 yılında ise A.B.D.'de su kaynaklarından alınan bor için toksik değer olan 6,3 mg/gün değerini 14 mg/gün'e çıkarmıştır. İngiltere'de ise güvenli üst limit 60 kg ağırlığındaki yetişkin bir birey için 9,6 mg/gün olarak belirlenmiştir (Meacham, 2009). Borca zengin alanlarda yaşayan insanlar yaşamları boyunca ve yiyecek ya da diğer katkılardan günlük 1 L'de 29 mg'a kadar alınabilecek şekilde, ortalama 6-8 mg boru kolaylıkla alabilmektedir (Meacham, 2009).

Yetişkinler için çok çeşitli bor alım kaynakları olmasına rağmen günlük alım dozu 1-2 mg/gün seviyesindedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre güvenli aralık 1-13 mg ve günlük en üst seviye ise 28 mg/gün'dür (Meacham, 2009).

Yetişkin insanlar için bazı özel yapılı bor içerikli bileşikler bazı kullanım amaçları için oluşturulmuştur. Bunlar:

1. Bor, kemik metabolizması ve kemik kalsifikasyonu için önemli bir elementtir ve kalsiyum, magnezyum ve fosfor seviyelerini etkiler.
2. Bor ve D vitamini kalsiyum kullanımını düzenler.
3. Bor, vücutta kalsiyum emiliminde önemli bir eser elementtir.
4. Bor ve magnezyum gibi elementler optimal kemik mineralizasyonunun sağlanması için kalsiyum arttırıcı etki yapar (Meacham, 2009).

Bor, gastrointestinal sistem ve solunum sistemi tarafından kolaylıkla absorbe edilir. Çoğunlukla borik asit, adipoz doku dışındaki yumuşak dokularda dağılır ve yüksek orandan kemikte birikir ve semende kandan daha yüksek orandan gözlenir (Meacham, 2009).

Vücutta bor metabolizması enerjetik olarak esnek değildir ve bor-oksijen arasındaki bağların koparılması için 523 kJ/mol enerji gerekir. Birçok biyomoleküllerle kompleks halindeki bor, bilinen molekül etkilerinin dışında anahtar bir rol oynar (Meacham, 2009).

İnsan kemik, beyin, inflamasyon ve hormon fonksiyonundaki görevi açık bir şekilde borun, insan beslenmesinde esansiyal bir element olduğuna ilişkin bilgilerimize yeni ekler yapmamız gerekmektedir (Nielsen, 2008). Biyokimyasal rolünün bilinmesine karşın insanlarda bor yoksunluğunda ilaveten fonksiyon kaybının da gösterilmesi gerekmektedir (Meacham, 2009).

Yapılan birçok çalışmada, özellikle prostat kanseri hücre hatlarında borik asidin büyümeyi ve çoğalmayı engelleyici etki yaptığına dair bilgiler mevcuttur (Barranco and Eckhert, 2004; Barranco and Eckhert, 2006; Meacham, 2009). Bor bileşiklerinin kanser hücreleri üzerinde yarattığı etki ile ilgili in vitro çalışmalarda, bu bileşiklerin kanser tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında bor bileşiklerinin hücre büyüme faktörlerine karşı bir yanıt oluşturduğu bilinmektedir (Meacham, 2009).

Öte yandan bor bileşiklerinin sadece büyüme faktörlerini durdurucu yönde değil aynı zamanda kaspaz-3 aktivitesini de etkileyen bir yönde iş görüp, nekrotik ya da sitotoksik hücre ölümünden ziyade apoptotik hücre ölümünü uyardığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Apoptotik hücre ölümünde bor bileşiklerinin etkisinin en iyi belirteci kaspaz-3 aktivitesi olduğu ve özellikle de örneğin fenil borik asit, bir taşıyıcı ile hücre içine gönderilen bor, hücre döngüsünü doza bağlı olarak S fazında durdurduğu bildirilmiştir (Meacham, 2009).

Karaciğer, herhangi bir hasar meydana geldiğinde oluşan fonksiyon kaybını telafi edebilmek amacıyla bir yanıt oluşturur. Karaciğerin fonksiyon kaybı yaşayan hepatositlerinde oluşan bu yanıt genellikle apoptoz olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda sıçan karaciğerinde %70 parsiyal hepatektomi sonrası indüklenen karaciğer hücre çoğalmasına karşı B_2O_3'ün apoptotik etkileri RT-PCR, QPCR ve TUNEL metodları ile araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve METOD

Deneysel çalışmamız; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Moleküler Biyoloji ve Toksikoloji Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'nun 271/2012 sayılı izni ile yapılmıştır (Ek1: Etik Kurul Raporu).

3.1 Deney hayvanları

Deneysel çalışmamızda sağlıklı, erkek, 200±20 g ağırlıkta, 3-4 aylık, Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Tüm deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilerek deney süresince 12:12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22±2^{o}C) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Bu süre içerisinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslenmiş ve sıçanlara çeşme suyu verilmiştir.

3.2 Deney grupları

42 adet sağlıklı erkek *Wistar albino* sıçan arasından rastgele seçimle her birinde n=7 olmak üzere toplam 6 grup oluşturulmuştur. Bu gruplar;

Grup I (Sham-3 saat grubu): Bu grup hayvanlarına cerrahi ya da enjeksiyon uygulamaları yapılmadan sadece cerrahi strese maruz bırakılmıştır. İşlem sonrası 3 saat yaşatılıp ardından diseksiyonu yapılmıştır.

Grup II (Sham-6 saat grubu): Bu grup hayvanlarına cerrahi ya da enjeksiyon uygulamaları yapılmadan sadece cerrahi strese maruz bırakılmıştır. İşlem sonrası 6 saat yaşatılıp ardından diseksiyonu yapılmıştır.

Grup III (%70 PH+SF-3 saat grubu): Her hayvana %70 parsiyal hepatektomi işleminden sonra 1 ml serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılmıştır. 3 saat yaşatılıp ardından diseksiyonu yapılmıştır.

Grup IV (%70 PH+SF-6 saat grubu): Her hayvana %70 parsiyal hepatektomi işleminden sonra 1 ml SF enjeksiyonu yapılmıştır. 6 saat yaşatılıp ardından diseksiyonu yapılmıştır.

Grup V (%70 PH+ B_2O_3-3 saat grubu): Her hayvana %70 parsiyal hepatektomi işleminden sonra 1,8 $g.kg^{-1}$ borik anhidrit (B_2O_3) enjeksiyonu yapılmıştır. 3 saat yaşatılıp ardından diseksiyonu yapılmıştır.

Grup VI (%70 PH+ B_2O_3-6 saat grubu): Her hayvana %70 parsiyal hepatektomi işleminden sonra 1,8 $g.kg^{-1}$ borik anhidrit (B_2O_3) enjeksiyonu yapılmıştır. 6 saat yaşatılıp ardından diseksiyonu yapılmıştır.

3.3 Borik anhidrit uygulaması

Borik anhidrit Eti Maden İşletmeleri Emet Bor İşletme Müdürlüğü'nden temin edilmiştir. Deneylerimizde borik anhidritin tek dozu sublethal doz baz alınarak (1,8 $g.kg^{-1}$) 1 kez olmak üzere, hepatektomi işleminden hemen sonra ve taze olarak uygulanmıştır (Izmerov et al., 1982). Borik anhidrit dozu; 1 ml %0,9 steril serum

fizyolojik ile çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirilmiştir. Kimyasal madde enjeksiyonları, çözeltilerin taze olarak hazırlanmasından sonra, steril tek kullanımlık enjektörler ile tek doz olarak intraperitonel olarak uygulanmıştır.

3.4 Anestezi ve cerrahi işlemler

3.4.1 Anestezi işlemi

Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarına ait hayvanlar intramuskular olarak 10 $mg.kg^{-1}$ ksilazin ve 70 $mg.kg^{-1}$ ketamin anestezisi altında parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilmiş ve yine aynı anestezi altında intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürülüp, orta hat kesisi gerçekleştirilerek karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

3.4.2 Parsiyal hepatektomi işlemi

Parsiyal hepatektomi yapılacak deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edilip rektal ısı kontrolü yapılmıştır. Cerrahi uygulama bölgesinin %70'lik etilalkol ile temizliği yapılıp Higgins ve Anderson'un (1931) tekniğiyle parsiyal hepatektomi gerçekleştirilmiştir. Buna göre, deney hayvanının karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir midline kesisi ile laparoktomi yapılmıştır. Karaciğer loplarını birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin yaklaşık %68-70 oranında kütlesini teşkil eden öndeki sağ, orta ve sol yan lopları ayrılmıştır. Bu loplara ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanmıştır. Bağın lop tarafının hemen üstünden kesim gerçekleştirilmiştir.

Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna 1 mL steril serum fizyolojik verilmiştir (Uyanoğlu, 2006). Sonra, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kapatıldı ve poviiodeks antiseptik solüsyon ile laparoktomi bölgesi temizlenmiştir. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın gruplara bağlı olarak 3 ve 6 saatlik periyodlarda yaşatılmıştır.

3.5 Doku örneklerinin değerlendirilmesi

Doku örnekleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Toksikoloji Araştırma Laboratuvarlarında etik kurallar çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Hayvanlardan intrakardiyak kan alım yöntemi ile hayvanın öldürülmesi suretiyle dokular alınmıştır. Alınan örneklere incelemeler için aşağıda belirtilen teknikler uygulanmıştır.

3.5.1 Real Time-PCR analizi

3.5.1.1 Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu

Deney sonunda elde edilen karaciğer doku örnekleri PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Cat. No: 12183018A) kullanılarak TRIzol (Ambion, Cat. No: 15596-026) yardımıyla izole edilmiştir. RNA eldesi belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. 50-100 mg karaciğer doku örneği 1 mL TRIzol kullanılarak homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir.

2. TRIzol içeren lizatlar oda ısısında nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışmasını sağlamak amacıyla 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
3. Ardından 0,2 mL kloroform lizatlar üzerine eklenmiştir ve 15 saniye boyunca elde tüpler titreştirilerek çalkalanmıştır.
4. 2-3 dakika boyunca lizatlar oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
5. Örnekler 12000 x g'de 15 dakika +4^{o}C'da santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrası karışım zayıf faz, kırmızı fenol klorofom fazı, ara faz ve renksiz RNA içeren üst faza ayrılmıştır. Üst fazın hacmi ~600 µL'dir.
7. RNA içeren renksiz üst fazdan RNAaz-free tüplere ~400 µL transfer edilmiştir.
8. Daha sonra tüplere eşit hacimde %70 etanol ilave edilmiştir.
9. Karışım iyice vortekslenmiştir.
10. Etanol ilave edildikten sonra oluşabilecek çökeltileri dağıtmak için tüpler ters yüz edilmiştir.
11. Örneklerden ≤ 700 µL koleksiyon tüpleri içeren Spin kartuşlara transfer edilmiştir.
12. 12000 x g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edilmiştir.
13. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atıldı ve aynı koleksiyon tüpü Spin kartuşa takılmıştır.
14. Bütün örnek işlemden geçinceye kadar 12 ve 13. basamaklar tekrar edilmiştir.
15. Spin kartuşların üzerine 700 µL Wash Buffer I ilave edilmiştir. Kartuşlar 12000 x g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı ve aynı koleksiyon tüpü atılmıştır. Spin kartuşa yeni koleksiyon tüpü takılmıştır.
16. Kartuşa etanollü Wash Buffer II'den 500 µL ilave edilmiştir.

17. 12000 x g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atıldı ve aynı koleksiyon tüpü Spin kartuşa takılmıştır.
18. 16 ve 17. basamaklar tek seferliğine tekrarlanmıştır.
19. 12000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika membran kuruyuncaya kadar santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpü atıldı ve Spin kartuş geri kazanım tüpüne yerleştirilmiştir.
20. 30-100 µL RNaz-free su Spin kartuşların merkezine ilave edilmiştir.
21. Örnekler oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir.
22. Geri kazanım tüpüne yerleştirilmiş Spin kartuşlar oda sıcaklığında ≥ 12000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
23. Arındırılmış RNA'lar hemen kullanım için birkaç saat buz üzerinde ya da uzun süreli saklama için -80^{o}C'da saklanmıştır.

3.5.1.2 RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi

RT-PCR işlemi için gerekli olan cDNA için RNA örnekleri High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosysems, Cat. No: 4368814) kullanılarak belirtilen protokol çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

1. cDNA için RNA örnekleri konsantrasyonları 200 ng'a eşitlenmiştir.
2. Kit içeriği buz üzerine alınmıştır ve 2X RT master mix hazırlanmıştır. Örnek başına;
    a. 10X RT Buffer'dan 10 µL,
    b. 25X dNTP Mix (100 mM)'ten 0,8 µL,
    c. 10X RT Random Primers'den 2 µL,

d. MultiScribe Reverse Transcriptase'dan 1 µL,

e. RNaz inhibitöründen 1 µL,

f. Nükleaz-free sudan 3,2 µL alınıp karıştırıldı.

3. Hazırlanan karışım nazikçe karıştırılıp buz üzerine konulumştur.

4. Her bir kuyucuğa 10 µL 2X RT master mix ve 10 µL RNA örneği konularak cDNA reverse transkripsiyonu yapılmıştır.

3.5.1.3 RT-PCR işlemi

Bu işlem TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Cat. No: 1108124) kullanılarak verilen prosedür çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa

1. cDNA örnekleri 100 ng olacak şekilde nükleaz free su kullanılarak ayarlandı ve 9 µL eklenmiştir.

2. 2X TaqMan Gene Expression Master Mix'ten 10 µL eklenmiştir.

3. TaqMan Gene Expression Assay'den 1 µL eklenmiştir ve RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.2 Quantitative RT-PCR analizi

3.5.2.1 Karaciğer dokusundan protein izolasyonu

Diseksiyon sonrası alınan karaciğer örneklerinden protein izolasyonu PARIS Kit (Ambion, Cat. No: AM1921) kullanılarak belirtilen prosedür çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda;

1. Alınan karaciğer örnekleri nemi uzaklaştırılmak amacıyla kurutulmuştur.
2. Örneklerin üzerine 100- 600 µL (örnek kütlesinin 6-8 katı olacak şekilde) buz soğukluğunda Cell Disruption Buffer eklenmiştir.
3. Homojenizatör yardımıyla örnekler homojenize edilmiştir.

3.5.2.2 QRT-PCR işlemi

1. Referans ve test hücre lizatlarını 1:2 veya 1:10 oranında dilüe edilmiştir.
2. Ardından platelere seri dilüsyonlar yapılmıştır.
3. Daha sonra Assay probelar, 5 µL 200 nM biyotinlenmiş antibody (kaspaz-3 için, LS Bio, Cat. No: LS-C88630; NF-κB için, IMGENEX, Cat. No: IMG-150B) + 5 µL Prox-oligo karıştırılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 60 dakika bekletildi. Ardından 90 µL Assay Storage Buffer eklenmiştir.
4. 12 µl Assay Probe A, 12 µL Assay Probe B ve 216 µL Assay Probe Dilution Buffer kullanarak assay solüsyonu hazırlanmıştır.
5. Kuyucuk başına 2µl Assay Probe solüsyonu ve 2µl hücre lizatı eklenmiştir.

6. 37^{o}C'da 60 dk. inkübe edilmiştir.
7. Ardından 2 µl DNA Ligaz ve 998 µl Ligaz Dilüsyon Buffer kullanarak DNA ligazı dilüe edilmiştir.
8. 600 µl Ligation Reaction Buffer, 10908 µl su ve 12 µl dilüe DNA Ligaz kullanarak ligasyon solüsyonunu hazırlanmıştır.
9. Kuyucuk başına 96 µl ligasyon solüsyonu eklenmiştir ve 37^{o}C'da 10 dk. inkübe edilmiştir.
10. Daha sonra ligasyonu durdurmak için 4 µl Proteaz ve 396 µl PBS karıştırıldı. Her bir kuyucuğa 2 µl dilüe proteaz solüsyonu eklenmiştir.
11. 37^{o}C'da 10 dk. ve ardından 95^{o}C'da 5 dk. inkübe edilmiştir.
12. 1200 µl TaqMan Protein Assay Fast Master Mix ve 120 µl Universal PCR Assay'i karıştırarak RT-PCR karışımı oluşturulmuştur. Ardından kuyucuk başına 11 µl PCR karışımı ve 9 µl proteazla muamele edilmiş ligasyon ürünleri ilave edilmiştir.
13. RT-PCR işlemini gerçekleştirilmiştir.
14. Elde edilen verilerden C_T değerlerini elde edip analizlerinizi yapılmıştır.

3.5.3 TUNEL analizi

Apoptotik hücreleri belirlemek için birçok metod önerilmiştir. Endonükleolizis apoptozun biyokimyasal anahtarı olarak bilinmektedir ve oligonükleozom fragmentleri içerisinde nükleer DNA'nın kırılmasıyla meydana gelmektedir. Bu nedenle bu basamaklar apoptozun belirlenebilmesinde yaygın olarak kullanılır.

Bu metodda DNA ipliğinde ortaya çıkan kırıkların in situ işaretlenmesi enzimatik olarak gerçekleşmektedir. TdT'a ek olarak DNA polimeraz, in situ olarak DNA ipliği kırıklarında işaretlenmiş nükleotidlerin birleştirilmesi için kullanılan bir metoddur. TdT kullanılarak yapılan son reaksiyon ISEL ya da TUNEL olarak tanımlanır.

Diseksiyon sonrası TUNEL analizi için karaciğer dokuları %10 nötral formol içine alınmıştır. Daha sonra TUNEL işaretlemesi ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Milipore, Cat. No: S7101) kullanılarak kit protokolü dahilinde gerçekleştirilmiştir.

1. Doku kesitlerinde deparafinizasyon işlemi (şale içerisinde).
    a. Kesitler 3 defa 5'er dakika ksilende yıkanmıştır.
    b. Daha sonra kesitler 2 defa 5'er dakika absolü etanolde yıkanmıştır.
    c. Ardından kesitler, %95 ve %70 etanollerde 1'er kez 3'er dakika yıkanmıştır.
    d. Bu işlemden sonra kesitler 5 dakika PBS'te yıkanmıştır.
2. Dokulara ön muamele işlemi.
    a. Taze dilüe edilmiş Protein Sindirim Enzimi ya da Proteinaz K oda sıcaklığında her bir kesit üzerine 15 dakika boyunca uygulanmıştır.
    b. Daha sonra kesitler 2 defa 2'şer dakika süre ile şale içerisinde yıkanmıştır.
3. Endojen peroksidazı bastırmak.
    a. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca PBS içinde %3 hidrojen peroksit ile baskılanmıştır.

b. Her biri 5 dakika bir süre ile PBS veya iki kez su ile örnek durulanmıştır.

4. Dengeleme tamponu uygulaması.

a. Dokunun etrafındaki fazla sıvı dikkatlice kurutulmuştur.

b. Hemen her bir kesit üzerine 75 µL/5 cm^2 dengeleme tamponu uygulanmıştır.

c. Oda sıcaklığında en fazla 10 saniye inkübe edilmiştir.

5. TdT enziminin uygulanması.

a. Dokunun etrafındaki fazla sıvı dikkatlice kurutulmuştur.

b. Hemen dokunun üzerine 55 µL/5 cm^2 olacak şekilde TdT enzimi uygulanmıştır.

c. Kesitler 1 saat boyunca 37°C'da nemlendirilmiş ortamda inkübe edilmiştir.

6. Durdurma/Yıkama tamponunun uygulanması.

a. Kesitler içerisinde durdurma/yıkama tamponu bulunan şaleler içerisine alınmıştır, 15 saniye çalkalanmıştır ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

b. Anti-Digoxignenin konjugatından istenilen örnek sayısı kadar parça çıkarıldı ve kapaklı tüplere alınmıştır. Parçalar oda sıcaklığına ısıtılmıştır.

7. Anti-Digoxigenin konjugatının uygulanması.

a. Kesitler 3 defa 1'er dakika PBS ile yıkanmıştır.

b. Dokunun etrafındaki fazla sıvı dikkatlice kurutulmuştur.

c. Oda ısısında Anti-Digoxigenin konjugatı 65 µL/5 cm^2 olacak şekilde kesitlerin üzerine uygulanmıştır.

d. Kesitler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında nemlendirilmiş ortamda inkübe edilmiştir.

8. PBS ile yıkama.

a. Kesitler 4 defa oda sıcaklığında 2'şer dakika şale içerisinde PBS ile yıkanmıştır.

b. Bu sırada peroksidaz substrat solüsyonu hazırlanmıştır.

9. Perokisdaz substratın renk geliştirmesi.

a. Dokunun etrafındaki fazla sıvı dikkatlice kurutulmuştur.

b. Peroksidaz substratı tüm dokuyu kaplayacak şekilde uygulanmıştır.

c. Oda sıcaklığında 3-6 dakika işaretleme yapılmıştır.

d. Uygun işaretlemeyi yakalamak için kesitlerin boyanması mikroskop altında izlenmiştir.

10. Kesitlerin yıkanması.

a. Kesitler dH_2O ile 3 defa 1'er dakika şale içerisinde yıkanmıştır.

b. Ardından kesitler oda sıcaklığında şale içerisinde dH_2O ile 5 dakika inkübe edilmiştir.

11. Örneklerin karşıt boyaması.

a. Kesitler şale içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika boyunca %0.5'lik metil green ile karşıt boyama işlemi yapılmıştır.

b. Ardından kesitler şale içinde 3 defa dH_2O ile yıkanmıştır. Her yıkamada kesitler 10'ar kez 30 saniyelik süreler ile şale içerisine daldırılmıştır.

c. Daha sonra kesitler şale içinde 3 defa %100'lük N-Bütanol ile yıkanmıştır. Her yıkamada kesitler 10'ar kez 30 saniyelik süreler ile şale içerisine daldırılmıştır.

12. Kesitler kapatıldı ve mikroskop altında incelenmiştir.

3.6 İstatistiksel değerlendirmeler

Elde ettiğimiz veriler IBM SPSS Statistics 20.0 paket programı kullanılarak Kruskall-Wallis ve Kolmogorov-Smirnov test yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal olarak ortaya çıkan değer (P) açısından gruplar karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklar $P < 0,05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Karaciğer ağırlık değişimi

Çalışmamızda Grup III, IV, V ve VI hayvanlarına %70 parsiyal hepatektomi işlemi uygulanmış ve kalan %30'luk kısmın ağırlık değişimleri incelenmiştir.

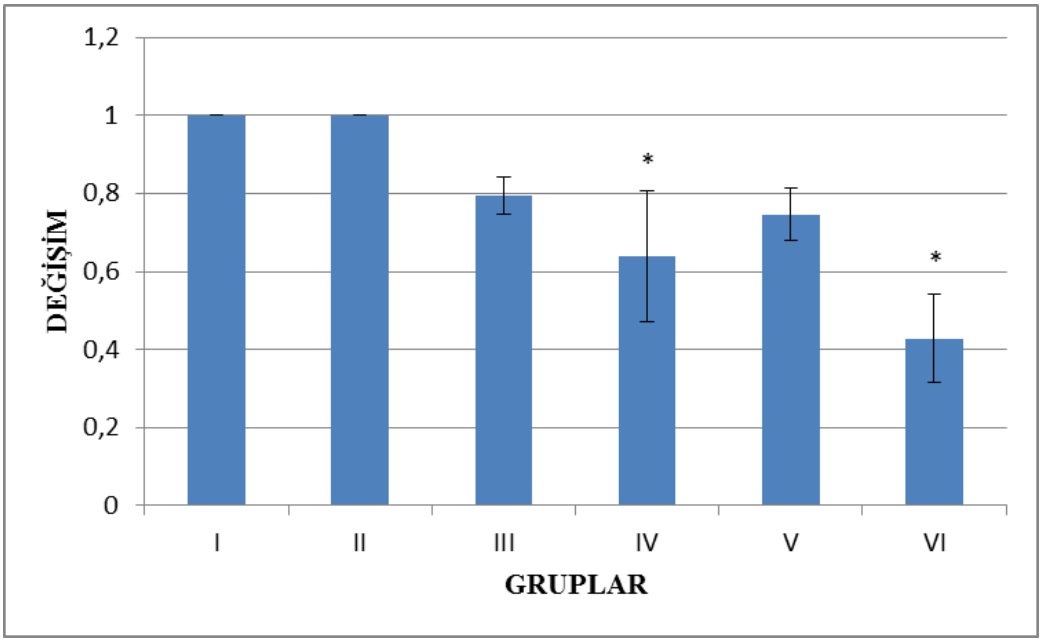
Elde edilen bulgulara göre en fazla karaciğer ağırlık değişimi Grup VI'da, en az değişim ise Grup III'te gözlenmiş olup, deney gruplarımız olan Grup V ve VI'da B_2O_3 ile indüklenmiş çoğalma sürecinde karaciğer ağırlığında azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Karaciğer ağırlık değişimleri (ortalama±standart hata) (n=7).

GRUPLAR	DEĞİŞİM (%)
I	1,0000±0,0000
II	1,0000±0,0000
III	0,7934±0,0470
IV	0,6378±0,1677*
V	0,7465±0,0662
VI	0,4286±0,1122*

P < 0,05

Elde edilen bulgular incelendiğinde Grup IV ile VI'nın, Grup II'den anlamlı farklı olduğu (P < 0,05) gözlenmiştir (Şekil 4.1). Grup V ile VI arasında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.1 Karaciğer ağırlık değişimleri. Bulgular ortalama değer ± standart hata olarak sunulmuştur. * P < 0,05 Grup II'den anlamlı farklıdır (n = 7) .

4.2 TUNEL bulguları

Çalışma sonucunda elde edilen karaciğer dokuları üzerinde TUNEL boyamaları yapılmış olup gruplara ait apoptotik indeksler belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Apoptotik indeks rastgele seçilen beş farklı alandaki apoptotik hücreler sayılmış ve alandaki normal görünümlü hepatositlere oranlanarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2).

$$Apoptotik\ İndeks = \frac{Toplam\ TUNEL\ pozitif\ hücreler}{Toplam\ normal\ görünümlü\ hücreler}$$

Şekil 4.2 Apoptotik indeks formülü.

Çizelge 4.2 TUNEL testi ile apoptotik indeks tayini.

GRUP	APOPTOTİK İNDEKS
I	0,06
II	0,04
III	0,06
IV	0,05
V	0,09
VI	0,27*+

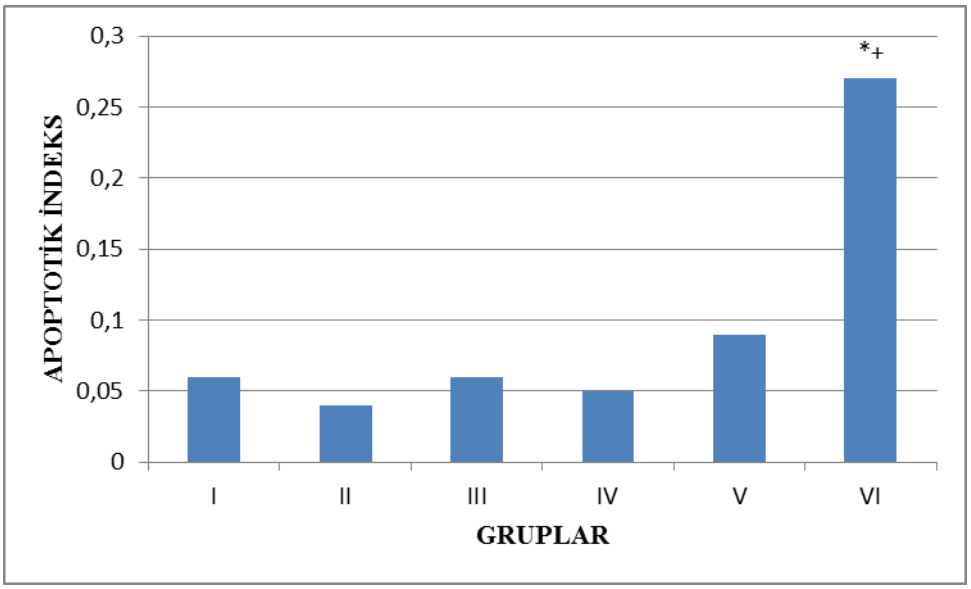
χ^2 = 50,834; standart sapma = 5;

*+ P < 0,01 Grup ve zamana göre anlamlı farklıdır (n=7)

Elde edilen bulgularda en yüksek apoptotik indeks değerinin Grup VI'da olduğu, en düşük indeks değerinin ise Grup II'de olduğu görülmektedir. Grup II ile Grup VI arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir fark gözlenmiştir (P < 0,01). Grup II ile IV arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Ancak Grup IV ile VI arasında ileri derecede anlamlı bir fark gözlenmektedir (P < 0,01). Grup III ile Grup IV arasında anlamlı fark gözlenmezken, Grup V ile VI arasında ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir (P < 0,01). Grup Grup I ile Grup III ve V arasında anlamlı fark gözlenmemiştir.

Elde edilen apoptotik indeks verilerine göre Grup I ve II'de zamana bağlı bir şekilde apoptoza giden hücrelerde azalma olduğu görülmektedir. Benzer durum Grup III ve IV için de geçerlidir. İlk üç saat içerinde apoptoza giden hücrelerde Grup I ve III'te yaklaşık değerler gözlenirken Grup V'te apoptoza giden hücre sayısında bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.3). Diğer taraftan Grup II ve IV'te 6. saatte apoptoza giden hücrelerde bir azalma gözlenirken Grup VI'da bu grupların aksine bir artış gözlenmiştir.

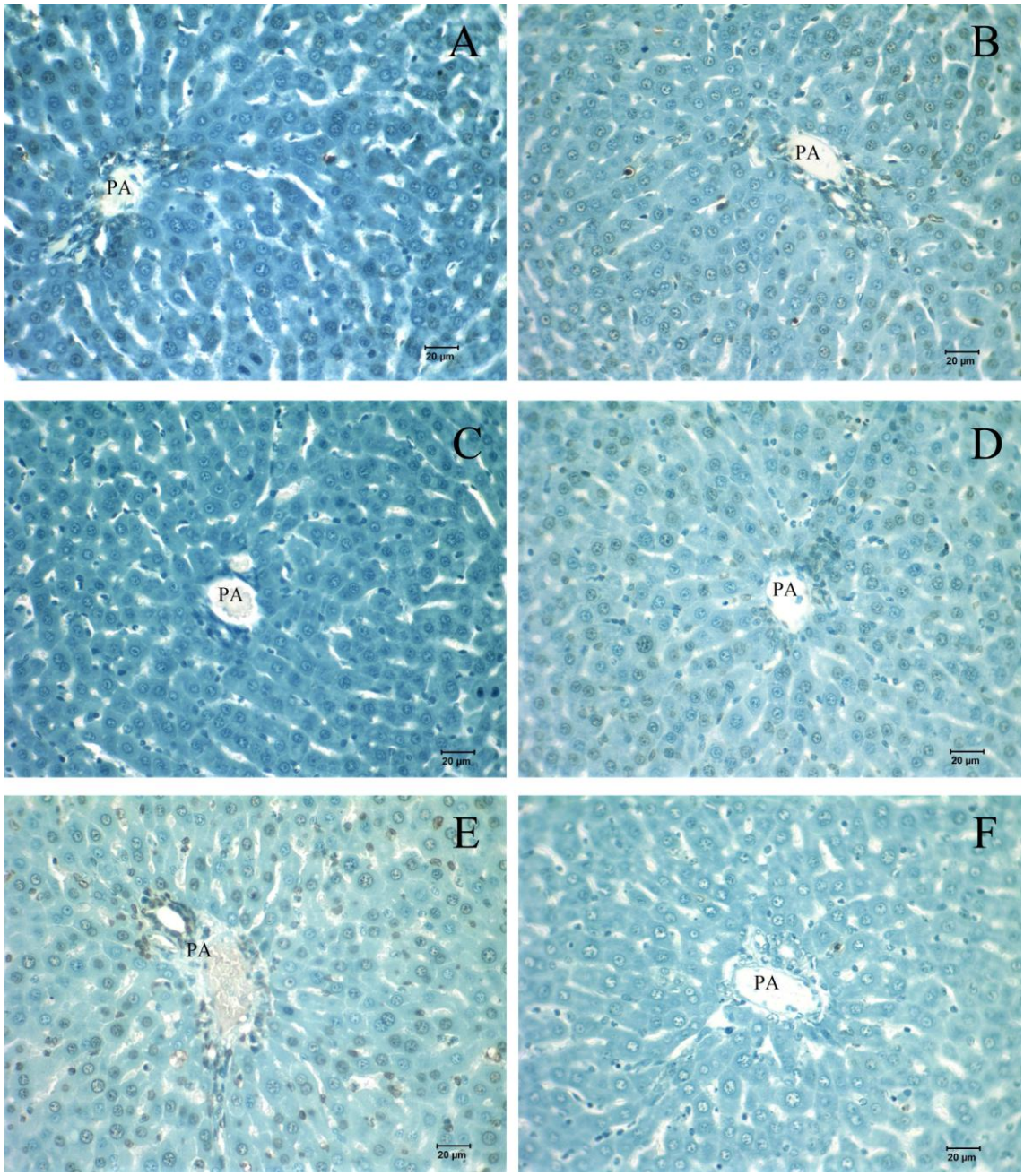
Deney gruplarında Grup V ve VI'da zamana bağlı olarak parsiyal hepatektomiden sonra karaciğer hücrelerinde B_2O_3 bileşiğinin apoptozu indüklediği görülmektedir (Şekil 4.3).



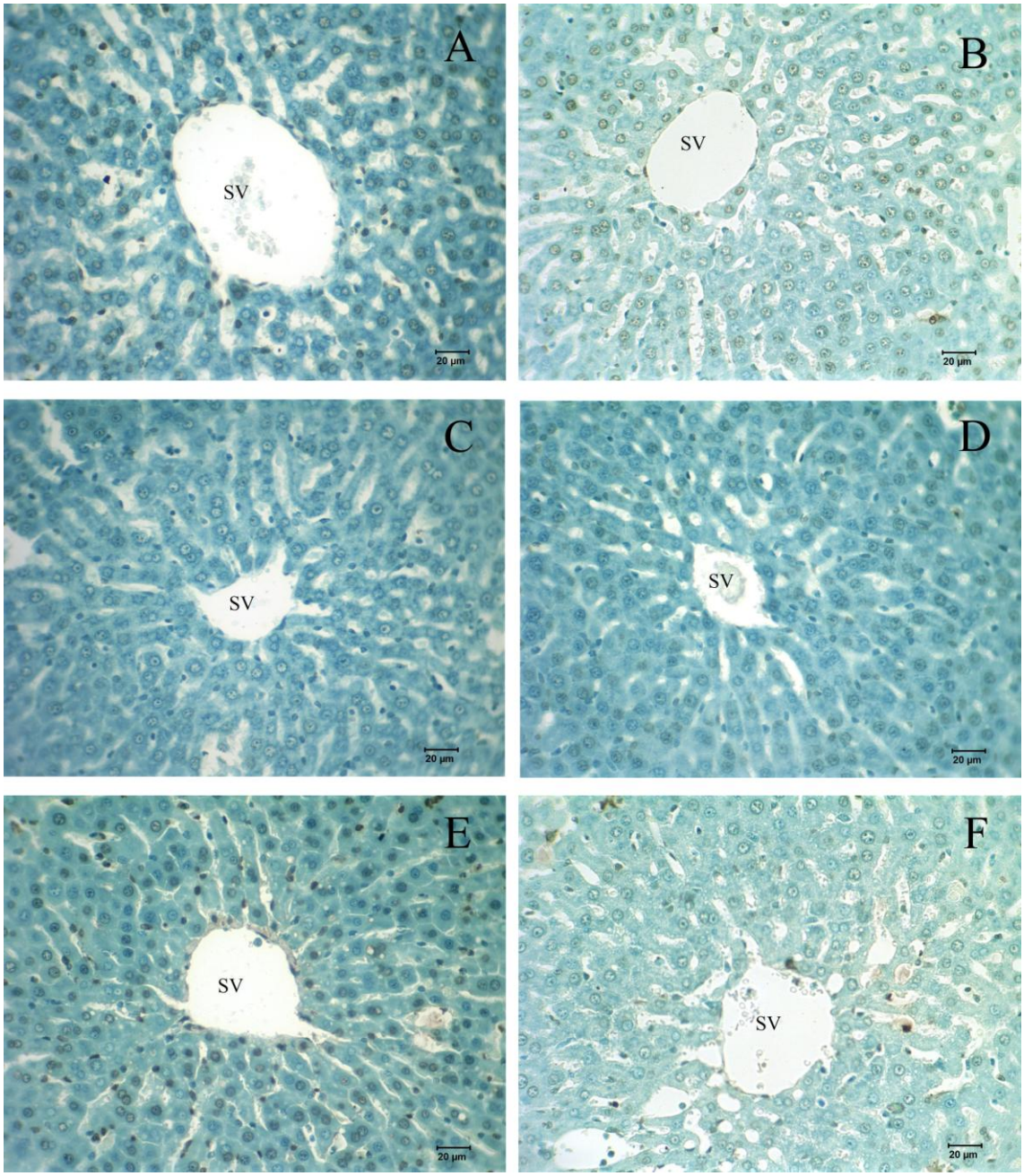
Şekil 4.3 TUNEL testi ile apoptotik indeks tayini. Bulgular medyan değerleri olarak verilmiştir. χ^2 = 50,834; standart sapma = 5; *+ P < 0,01 Grup ve zamana göre anlamlı farklıdır (n=7).

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz TUNEL kesitlerini incelediğimizde; Grup I hayvanlarına ait karaciğer kesitlerinde normal histolojik yapının korunduğu (Şekil 4.4A ve Şekil 4.5A) ve yer yer apoptotik cisimciklerin varlığı göze çarpmaktadır (Şekil 4.7A). Grup II hayvanlarına ait kesitler incelendiğinde ise yine histolojik yapının korunduğu gözlenmektedir (Şekil 4.4A ve Şekil 4.5A). Ancak bu gruba ait kesitlerde apoptotik cisimciklerin (Şekil 4.7B) sayısı Grup I'e oranla düşük seviyede iken mitotik aktivitenin (Şekil 4.6B) başladığı gözlenmektedir. Parsiyal hepatektomi sonrası yapılan incelemelerde Grup III'e ait hayvanların karaciğer kesitlerinde histolojik bütünlüğün korunduğu gözlenmekle beraber (Şekil 4.4C ve Şekil 4.5C) hepatositlerde vakuolizasyona rastlanmıştır (Şekil 4.6C). Ayrıca Grup III'e ait karaciğer kesitlerinde Grup II'ye göre mitotik aktivitenin arttığı da bulgularımız arasındadır. Diğer bir parsiyal hepatektomi grubu olan ve sadece SF verilen gruplardan Grup IV'te ise histolojik yapı korunmuş (Şekil 4.4D ve Şekil 4.5D) ancak hepatositlerde yoğun

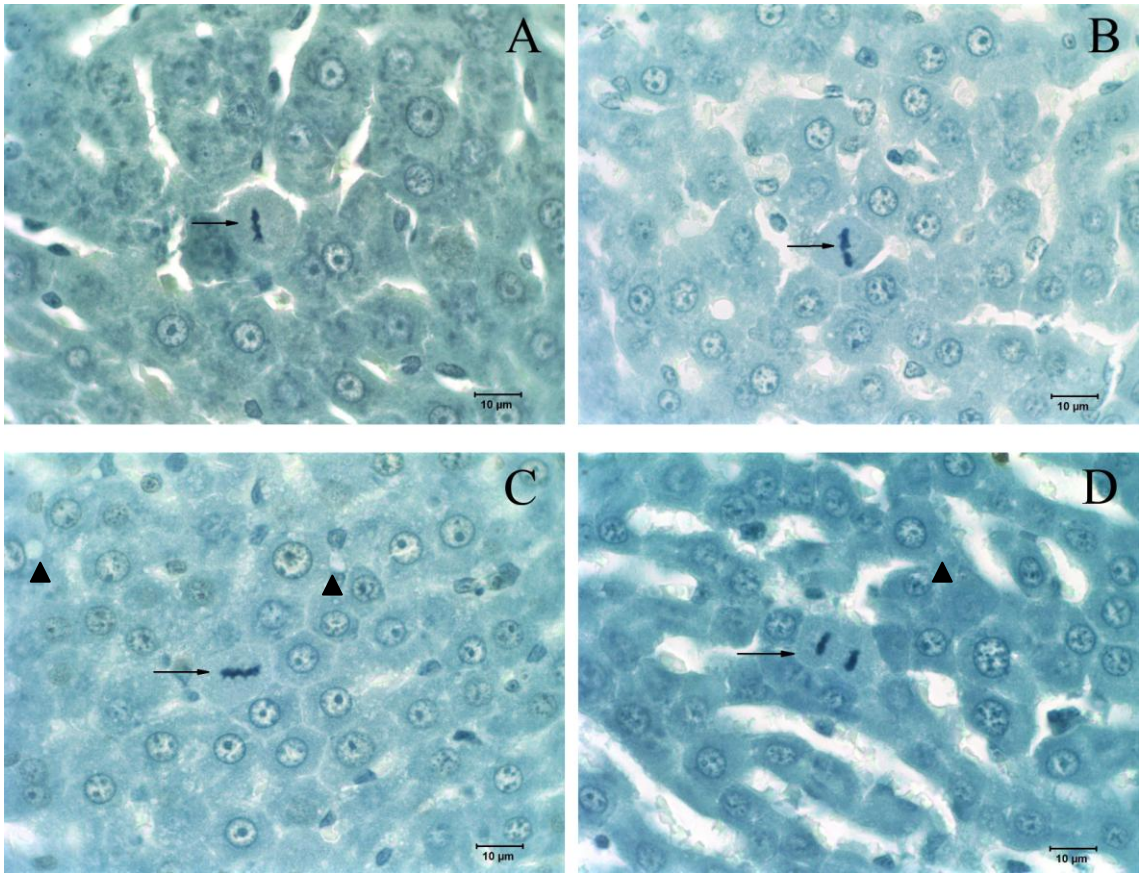
vakuolizasyon gözlenmiştir (Şekil 4.6D). Yine bu grupta Grup III'e göre mitotik aktivitenin yoğunluğu olduğu görülmüştür (Şekil 4.6D). Parsiyal hepatektomi sonrası B_2O_3 uygulanan Grup V'e ait örneklerde ise histolojik bütünlüğün korunduğu gözlendi (Şekil 4.4E ve Şekil 4.5E). Bu gruba ait kesitlerde apoptotik etkinin başladığı ve TUNEL pozitif apoptotik cisimciklerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7C). Ayrıca hepatositlerde yoğun vakuolizasyon da dikkat çeken bulgular arasında idi (Şekil 4.7C). Grup VI'ya ait kesitler incelendiğinde ise yine histolojik yapının korunduğu gözlenmektedir (Şekil 4.4F ve Şekil 4.5F). Bu grup karaciğer kesitlerinde apoptotik cisimciklerin yoğunluğu göze çarpmaktadır. Özellikle de parsiyal hepatektomi uygulamasından 6 saat sonra B_2O_3'ün apoptotik cisimciklerin sayısında artışa neden olduğu görülmektedir. Yine bu gruba ait karaciğer kesitlerinde vakuolizasyon da gözlenmektedir (Şekil 4.7D).



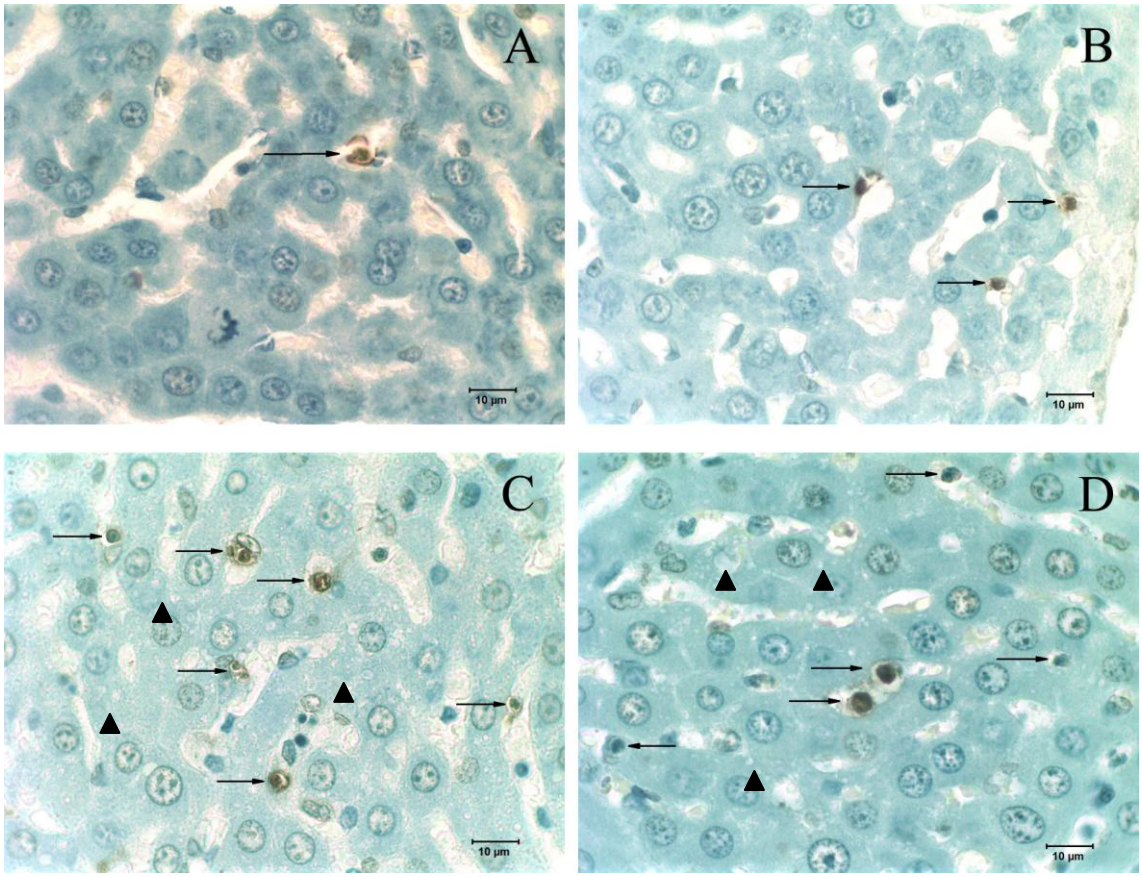
Şekil 4.4 TUNEL kesitlerinde portal alan (PA) çevresindeki hepatositler. Karaciğer kesitlerindeki hepatositlerin ve portal alandaki histolojik yapının korunduğu gözlenmiştir. A) Grup I, B) Grup II, C) Grup III, D) Grup IV, E) Grup V ve F) Grup VI hayvanlarına ait karaciğer kesitleridir.



Şekil 4.5 TUNEL kesitlerinde sentral ven (SV) çevresindeki hepatositler. Karaciğer kesitlerindeki hepatositlerin ve portal alandaki histolojik yapının korunduğu gözlenmiştir. A) Grup I, B) Grup II, C) Grup III, D) Grup IV, E) Grup V ve F) Grup VI hayvanlarına ait karaciğer kesitleridir.



Şekil 4.6 TUNEL kesitlerinde mitotik aktivite. A) Grup I, B) Grup II, C) Grup III ve D) Grup IV hayvanlarına ait karaciğer kesitleridir. Mitotik aktivite okla (↑), vakuolizasyon ise ok başı (▲) ile gösterilmektedir.



Şekil 4.7 TUNEL kesitlerinde TUNEL pozitif hepatositler. A) Grup I, B) Grup II, C) Grup V ve D) Grup VI hayvanlarına ait karaciğer kesitleridir. TUNEL pozitif hepatositler okla (↑), vakuolizasyon ise ok başı (▲) ile gösterilmektedir.

4.3 RT-PCR bulguları

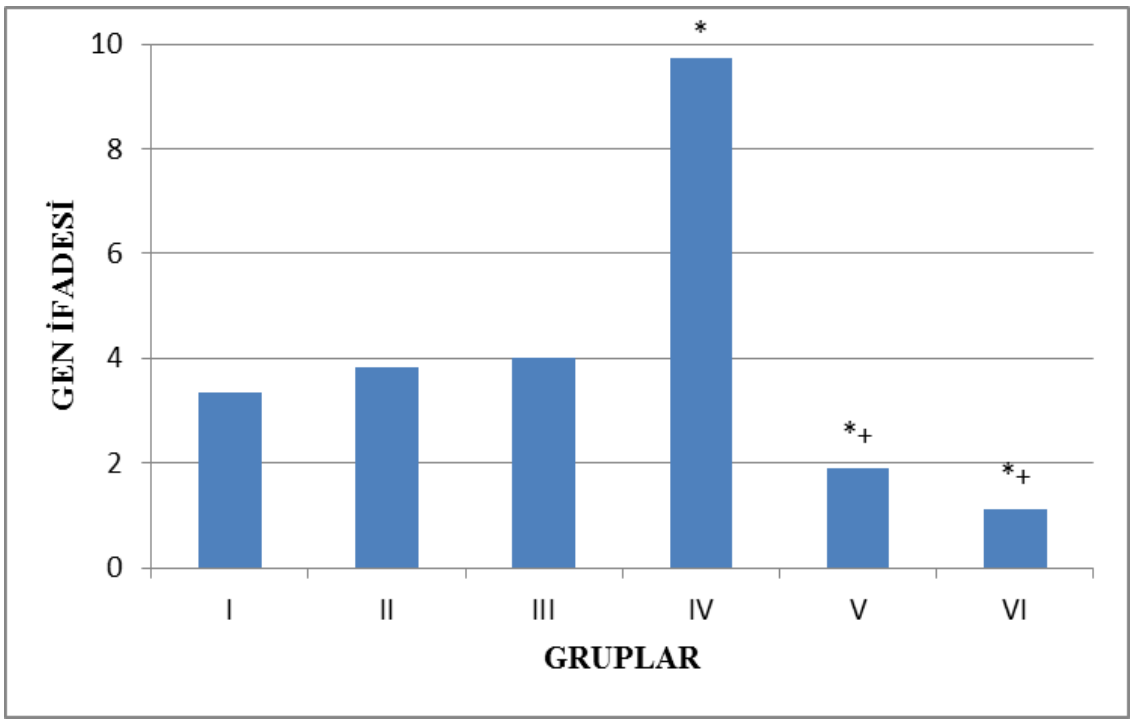
Çalışmamızda elde edilen RT-PCR bulgularına göre gruplar arasında NF-κB gen ifadesi bakımında anlamlı fark bulundu. Grup V ve VI'da NF-κB gen ifadesi düşükken, Grup III ve IV'te yüksek gözlendi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 NF-κB gen ifadesi.

GRUPLAR	NF-κB
I	3,343
II	3,837
III	4,005
IV	9,743*
V	1,905*+
VI	1,115*+

$\chi 2 = 15{,}69$; standart sapma = 5; *P < 0.05 Grup ve +P < 0.05 zamana göre anlamlı farklıdır (n=7)

NF-κB gen ifadesinin Grup I ve II'de zamana bağlı bir şekilde artış gösterdiği saptandı. Parsiyal hepatektomi işlemi yapılmış olan gruplardan Grup III ve IV'te de Grup I ve II' ye göre NF-κB gen ifadesinin zamana bağlı yükseldiği görüldü. Deney grupları olan ve parsiyal hepatektomiden hemen sonra B_2O_3 enjeksiyonu yapılan Grup V ve VI'da ise NF-κB gen ifadesinin Grup III ve IV'e göre düşük seviyede olduğu görülmüştür. Bu gruplara göre NF-κB ifadesinin Grup I'e göre ilk üç saatte arttığı ve 6. saatte ifadenin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 NF-κB gen ifadesi. Bulgular medyan değerleri olarak verilmiştir. χ^2 = 15,69; standart sapma = 5; *P < 0,05 Grup ve +P < 0,05 zamana göre anlamlı farklıdır (n=7).

İstatistiksel olarak NF-κB bulgularında gruplar arasında anlamlı farklar gözlenmiştir (P < 0,05). NF-κB gen ifadesinde Grup II'de sadece Grup IV ve VI'dan anlamlı fark gözlenmiştir (P < 0,05). Grup IV ve VI arasında ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir (P < 0,01). Ancak Grup I ile Grup III ve V arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca Grup V ve VI arasında ve de Grup III ve IV arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir.

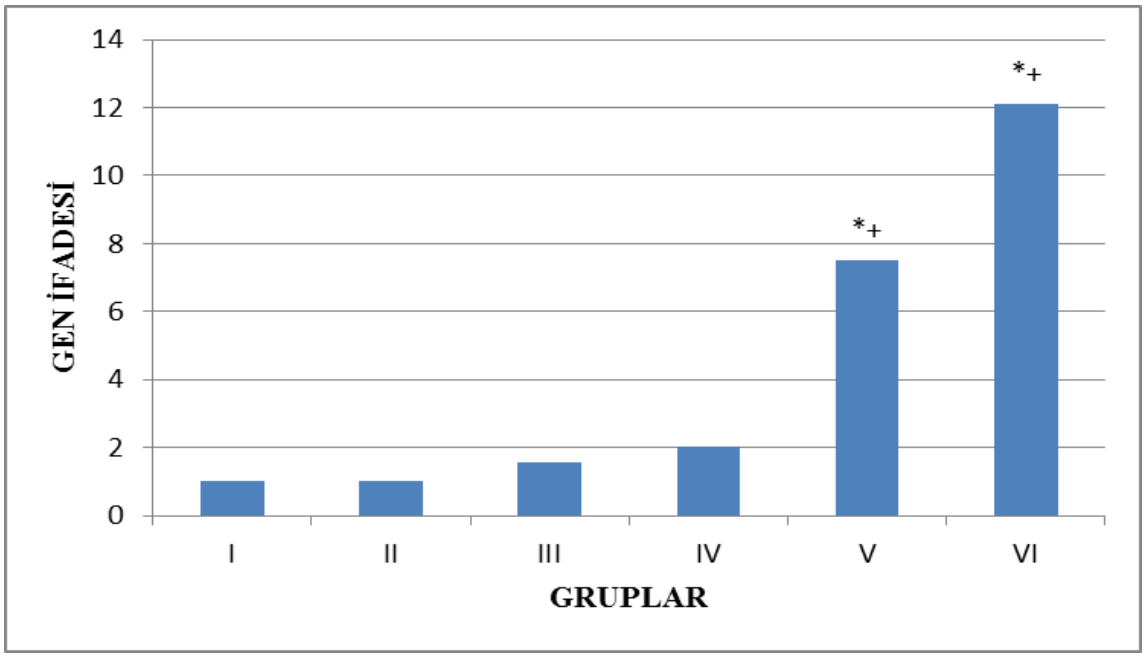
Çalışmamızda elde edilen kaspaz-3 bulgularına göre gruplar arası ifade seviyeleri karşılaştırıldı. Grup VI'da en yüksek ifade seviyesi gözlenmiş olup en düşük ifade Grup I'de gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

Parsiyal hepatektomi işlemi uygulanmış gruplardan Grup III ve IV'te kaspaz-3 ifadesinin zamanla arttığı, ancak B_2O_3 uygulanan Grup V ve VI'da ifadenin ilk 3 saatten itibaren Grup III ve IV'e göre yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Çizelge 4.4 Kaspaz 3 gen ifadesi.

GRUPLAR	KASPAZ 3
I	1,000
II	1,000
III	1,566
IV	2,046
V	7,501 *+
VI	12,114 *+

$\chi 2 = 11{,}733$; standart sapma = 5;
*+P < 0,05 Grup ve zamana göre
(n=7)



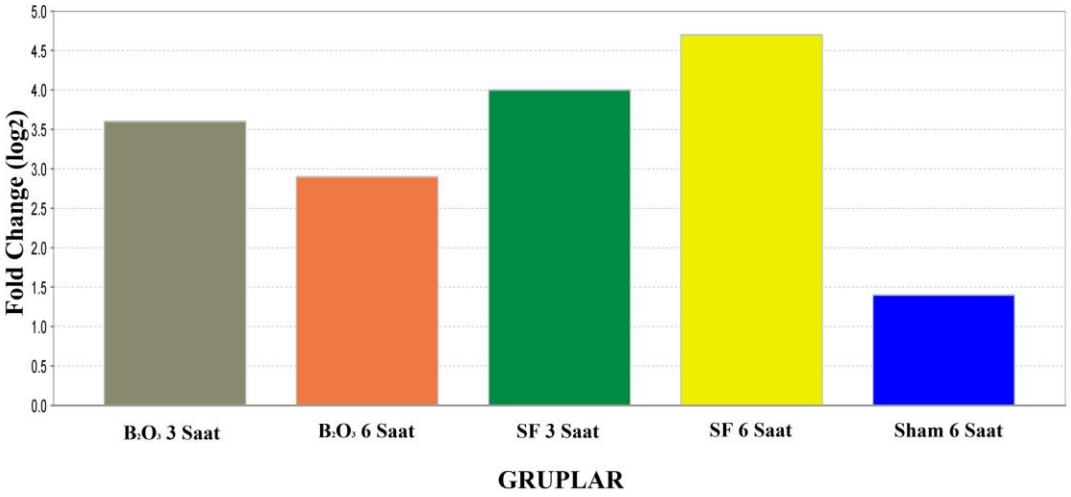
Şekil 4.9 Kaspaz-3 gen ifadesi. Bulgular medyan değerleri olarak verilmiştir. $\chi^2 = 11{,}733$; standart sapma = 5; *+ P < 0,05 grup ve zamana göre anlamlı farklıdır (n=7).

Elde edilen veriler ışında yapılan istatistiksel değerlendirmede gruplar arası anlamlı farklılar gözlenmiştir ($P < 0,05$). Yapılan inceleme sonucunda Grup I'in yalnızca Grup V'ten anlamlı farklı olduğu gözlenmiştir ($P < 0,05$). Grup II ise sadece Grup VI'dan anlamlı farklılık göstermiştir ($P < 0,05$). Ayrıca Grup I ve II arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca Grup III ve IV arasında ve de Grup V ve VI arasında anlamlı fark görülmektedir.

4.4 Quantitative RT-PCR ile protein miktar bulguları

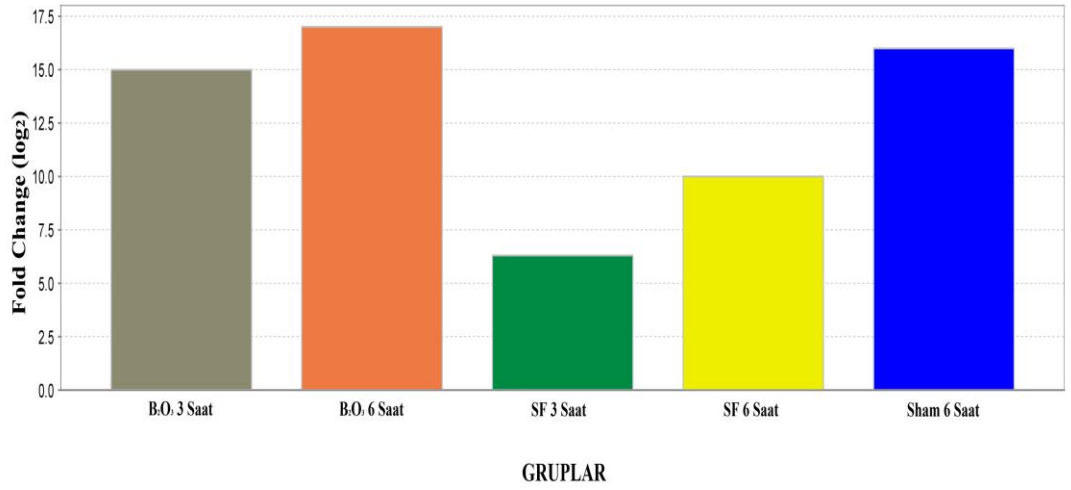
Çalışmamızda elde edilen Quantitative PCR (QPCR) bulgularında NF-κB protein ifadesinin Grup I'e göre gruplar arası karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen verilerde Grup I'e göre Grup II' de NF-κB protein ifadesi artış göstermiştir. Grup III ve IV'te ise cerrahi işlem uygulanmış olan hayvanlarda NF-κB ifadesinde 6. saate kadar bir arttığı gözlenmiştir. Cerrahi işlem gören Grup V ve VI'da ise NF-κB protein ifadesi gözlenmiş ancak Grup III ve IV'e oranla ifadenin düşük kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

Kaspaz-3 protein ifadesi Grup I'e göre karşılaştırıldığında diğer gruplarda artış göstermektedir. Cerrahi işlem uygulanan Grup III ve IV'te kaspaz-3 aktivasyonu 6. saatte artmış, ancak Grup II'ye göre düşük bir seviyede kaldığı gözlenmektedir. Cerrahi işlem uygulanan Grup III'te gözlenen kaspaz-3 ifadesi, Grup V ile karşılaştırıldığında ifadenin düşük olduğu gözlenmektedir. Grup IV ise kaspaz-3 ifadesi bakımından Grup VI'dan düşük görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.10 NF-κB protein ifadesi grafiği (n=7).

Parsiyal hepatektomi yapılan ve işlemden hemen sonra intraperitonel olarak B_2O_3 enjeksiyonu yapılan Grup V ve VI'da kaspaz-3 ifadesinin zamana bağlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Kaspaz 3 protein ifadesi grafiği (n=7).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer; metabolik fonksiyonların düzenlenmesi, mineral, bazı vitaminlerin ve glukozun depolanması gibi birçok işleve sahip bir organdır. Bu nedenle karaciğerde oluşan fonksiyon kaybı canlılar için hayati önem taşımaktadır.

Karaciğer, herhangi bir etken karşısında kendini yenileyebilme yeteneğine sahip eşsiz bir organdır. Birçok nedenden dolayı karaciğerde bir hasar gerçekleşebilir. Bunlardan mekanizması en iyi bilineni parsiyal hepatektomidir (Helling, 2006). Parsiyal hepatektomiden sonra gerçekleşen karaciğer hasarından kaynaklanan nedenlerden dolayı ölüm gerçekleşebilir (Iwatsuki and Starzl, 1988).

Karaciğer hasarı hepatosit fonksiyon kaybından kaynaklanmaktadır. Bu hasar, parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonu ya da nekroz veya apoptoz ile karakterize olan hepatosit kaybı ile gerçekleşir (Helling, 2006). Genel olarak karaciğerde hepatosit kaybı apoptoz ile gerçekleşmektedir. Apoptoz parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer hücre kaybında önemli rol oynamaktadır (Takeda et al., 2002). Bazı çalışmalarda parsiyal hepatektomi sonrası ilk 1 saat içerisinde apoptozun arttığı ve parsiyal hepatektomi yapıldıktan 60-96 saat sonra bile apoptozun gözlendiği bildirilmiştir (Lee et al., 1999; Sakamoto et al., 1999).

Karaciğerde apoptoz birçok nedenden dolayı gerçekleşebilir. Bu etkenler bazı elementler gibi birçok faktörü içermektedir (Suzuki and Tsukamoto, 2005). Son yıllarda bor ve bileşikleri de bu maddeler arasında yerini almaya başlamıştır. Özellikle kanser tedavisine yeni bir yaklaşım getiren Bor Nötron Yakalama Terapisi ile bor ve bor bileşiklerinin bu alanda kullanımı önem kazanmaktadır (Onrat ve Konuk, 2004). Bu tedavi karaciğerde gerçekleşen kanserleşmede de önemli rol oynamaktadır (Garabalino et al., 2011).

Bor; hücre zarı fonksiyonlarında, enzim reaksiyonlarında, mineral ve hormonal metabolizmada görev yapan eser elementlerden biridir (Bakirdere et al., 2010). Çok hücreli canlılar için bor, önemli bir bileşiktir (Nielsen, 2002). İnsanlarda ve hayvanlarda bor alınımının fizyolojisi hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Birincil kaynak olarak bor, sebze ve meyvelerden temin edilmektedir. Dokulardaki bor konsantrasyonu genellikle böbrekler tarafından düzenlenir (Tanaka and Fujiwara, 2008).

Bor, bazı hasar ve enfeksiyonlara karşı yanıt oluşturan bir yapıya sahiptir. Ayrıca inflamasyon yanıtı oluşumu ile ilgili sitokinlerin baskılanmasında da önemli rol oynamaktadır (Durick et al., 2004; Nielsen, 2008). Bor ve bileşiklerinin biyoaktif etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar borun eser bir element olduğu ortaya konmuştur. Borik asidin farklı konsantrasyonları ve bazı bor bileşiklerinin çeşitli kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkili olduğu rapor edilmiştir (Nielsen, 2002; Barranco and Eckhert, 2004; Barranco and Eckhert, 2006; Nielsen, 2008).

Çalışmamızda bor bileşiklerinden B_2O_3 bileşiğinin %70 parsiyal hepatektomi sonrası sıçan karaciğerinde gerçekleşen apoptotik etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda öncelikle parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer ağırlığında gerçekleşen ağırlık değişimleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular kapsamında %70 parsiyal hepatektomi sonrası in vivo ortamda, kalan karaciğerde 3 ve 6 saat sonraki ağırlık değişimleri tespit edilmiştir. %70 parsiyal hepatektomi yapıldıktan sonra B_2O_3 bileşiği 3. saatte karaciğerde belirgin bir ağırlık değişimine neden olduğu görülmektedir. Bu değişimin 6. saate kadar devam ettiği gözlenmiştir. Grup V ve VI'da B_2O_3 ile %70 parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer ağırlığında azalma gözlenmiştir.

Özellikle karaciğerde parsiyal hepatektomi sonrası ağırlık değişimi zamana bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 6 saat içerisinde karaciğer ağırlık azalışı gözlenmektedir (Grasl-Kraupp et al., 1994).

Çalışmamızda karaciğerde apoptoz morfolojisini incelediğimiz TUNEL kesitlerinde tespit edilen apoptotik cisimcikler üzerinden apoptotik indeks oluşturulmuştur. Apoptotik indeks verilerimiz incelendiğinde tüm gruplarda apoptoz varlığı saptanmış, ancak Grup V ve VI'da apoptozun daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda herhangi bir etken ile apoptoz indüklenebildiği gösterilmiştir (Helling, 2006). Özellikle ağır metallerden elementlere kadar birçok apoptoz indükleyicisi tespit edilmiştir (Suzuki and Tsukamoto, 2005; Hossain et al., 2009). Deneysel modelimize yakın çalışmalar da bunlardan birkaçıdır.

Suzuki ve Tsukomoto (2005) yaptıkları çalışmada manganez ile apoptozu indüklemişlerdir. İlk yarım saat içerisinde apoptotik etkinin başladığını ve parsiyal hepatektomiden 4 saat sonra apoptotik cisimciklerin yoğun bir şekilde görüldüğünü tespit etmişlerdir. Benzer bir şekilde Kobayashi ve ark. (2002) da zamana bağlı olarak parsiyal hepatektomi sonrası bir kemoterapik bir ilaç olan methotrexate ile apoptozu indüklemişlerdir. Çalışmalarında %70 parsiyal hepatektomi sonrası metatroksat ile apoptoz en erken 2 saat içerisinde gözlenmeye başlamış ve en yüksek 4. saatte gözlenmiştir. Ozeki ve Tsukamoto (1999) ise aynı modelde retinoik asit ile apoptozu indüklemişler ve ilk 4 saat içerisinde apoptozun görüldüğünü, 8. saatte ise apoptozun yoğun bir şekilde karaciğer kesitlerinde rastlandığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde Iwao ve Tsukamoto (1999) da quercetin ile yaptıkları çalışmada 2-12 saat içerisinde apoptoza rastlamışlardır. Habeebu ve ark. (1998) fare karaciğerinde kadmiyum ile apoptozu indüklemişler ve ilk 1,5 saat içerisinde apoptotik cisimcikleri gözlemlemiş ve 9. saatte apoptotik cisimciklerin yüksek yoğunlukta gözlendiğini bildirmişlerdir.

Bor ve bor bileşikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle in vitro ortamlar kullanılmış ve bor bileşiklerinin apoptotik etkileri doz ve zamana bağlı bir şekilde incelenmiştir. Meijer ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada düşük konsantrasyondaki elementel borun 72. saatte apoptozu indüklediğini tespit etmişlerdir. Kullandıkları

melonoma hücre hatlarında 72. saatte bor ile apoptozu indüklemişler ve sadece %1 gibi bir oranda nekroza rastlamışlardır. Elde ettikleri bulgularıyla borun özellikle premitotik evrede etki gösterdiği vurgulanmıştır. Benzer şekilde Barranco ve Eckhert (2004; 2006) yaptıkları çalışmalarda prostat kanserine neden olan hücre hatlarında borik asidin antiproliferatif etkilerini incelemişlerdir. Araştırıcıların bulgularına göre borik asidin yüksek dozları apopotik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Barranco and Eckhert, 2004; Barranco and Eckhert, 2006). Scorei ve ark. (2008) ise düşük dozlardaki kalsiyum fruktoborat ile kanser hücre hatlarında apoptozu indüklediklerini vurgulamaktadırlar. Ayrıca araştırıcılar kalsiyum fruktoborat ve borik asit ile proliferasyonunun doza bağlı bir şekilde inhibe edildiğini vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada ise glioma hücre hatlarına uygulanan bor fenilalanin ile Bor Nötron Yakalama Terapisi kullanılarak apoptoz indüklenmiş ve 12 saatlik tedavinin ardından bütün hücre hatlarında apoptotik morfolojiye rastlanıştır (Wang et al., 2010). Ayrıca araştırıcılar tedavi sonrası proapoptotik etkinin ve hücre çoğalmasındaki inhibisyonun yoğun olarak gözlendiğini bildirmişlerdir.

Yapılan in vivo çalışmalarda ise genellikle kanser tedavisinde kullanılan Bor Nötron Yakalama Terapisi ile apoptozun indüklenmesi hedeflenmiştir (Cardoso et al., 2007; Garabalino et al., 2011). Cardoso ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada karaciğer metastazında bor bileşiklerinin etkilerini incelemişlerdir. Ayrıca parsiyal hepatektomi ile indükledikleri karaciğer rejenerasyonunda bor bileşiklerinin etkilerini inceleyen araştırıcılar yüksek yoğunluktaki borun apoptozu tetiklediği vurgulamışlardır. Garabalino ve ark. (2011) ise karaciğer metastazında bor bileşiklerinin konsantrasyona bağlı bir şekilde kanser tedavisinde kullanılabileceğini vurgulamaktadırlar.

NF-κB parsiyal hepatektomiden hemen sonra aktive olan bir faktördür (Sánchez et al., 2004). Hücre çoğalmasında görevli olan NF-κB, kontrolsüz hücre çoğalmasında da önemli bir role sahiptir. Özellikle kanser hücre hatları üzerine yapılan çalışmalarda NF-κB'nin proliferasyondaki rolü üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Shishodia et al., 2005). Ayrıca NF-κB, parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonu sırasında

karaciğer fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak baskılanabilmektedir (Laurent et al., 2005). NF-κB'nin baskılanması parsiyal hepatektomi sonrası karaciğerde görülen apoptoza işaret edilmektedir (Takahashi et al., 2002).

Çalışmalarımızda elde ettiğimiz bulgularda parsiyal hepatektomi sonrası karaciğerde NF-κB'nin aktive olduğu gözlenmektedir. Parsiyal hepatektomi yapılmış Grup III ve IV'te zamana bağlı olarak NF-κB aktivasyonunun arttığı görülmektedir. Cerrahi stres yaratılan Grup I ve II' de de NF-κB aktivasyonu gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular Sham gruplarında da NF-κB aktivasyonu olabileceğini göstermektedir. Çalışmamız sonunda parsiyal hepatektomi yapılmış sıçanlara uygulanan B_2O_3'ün karaciğer rejenerasyonu sırasında zamana bağlı olarak NF-κB aktivasyonunu baskıladığı görülmektedir. Grup III ve IV'te parsiyal hepatektomi sonrası NF-κB ifadesinin zamana bağlı bir şekilde arttığı gözlenmektedir.

Bulgularımıza göre B_2O_3'ün NF-κB transkripsiyonunu ve translasyonunu baskıladığı görülmektedir. Grup VI'da, Grup IV'e göre düşük seviyede kalan NF-κB aktivasyonu Grup I'e göre yüksek seviyede kalmıştır. Zamana bağlı olarak B_2O_3 parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer dokusunda belirgin bir şekilde NF-κB aktivasyonunu baskılamıştır. Özellikle parsiyal hepatektomi grupları olan Grup III ve IV'te zamana bağlı olarak NF-κB seviyesinde gözlenen artış, Grup V ve VI'da düşüş olarak gözlenmiştir.

Sakuda ve ark. (2002) NF-κB'nin parsiyal hepatektomiden hemen sonra aktive olduğunu; kontrol ve Sham gruplarında da NF-κB aktivasyonunun görülebileceğini bildirmişlerdir. Zamana bağlı bir şekilde NF-κB aktivasyonunun arttığı yapılan çalışmalarla da vurgulanmaktadır (Sánchez et al., 2004). Sánchez ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada parsiyal hepatektomi sonrası NF-κB aktivasyonunu incelemişler ve parsiyal hepatektomiden 30 dakika sonra aktivitenin başladığını ve 2 saate kadar aktivitede artışlar gözlendiğini bildirmişlerdir. Araştırıcılar elde ettikleri bulgularda bu

sürecin 14 güne kadar devam ettiğini gözlemlemişlerdir. Yapılan bazı çalışmalarda herhangi bir etken ile oluşturulan karaciğer hasarında NF-κB aktivasyonunun ilk 3 saatte arttığı ve 6. saatten sonra aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir (Takahashi et al., 2002).

Çoğalma sürecinde olan hücrelerde apoptozun aktive edilmesi ile gerçekleştirilen deney modellerinde NF-κB aktivasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar bulgularımızla benzerlik göstermektedir. Li ve ark. (2002) gastrik adenokarsinom hücre hatlarına uyguladıkları JTE-522 maddesi ile zamana bağlı olarak NF-κB aktivasyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Deneylerinde NF-κB aktivasyonunun 6 saatte azaldığını vurgulamışlardır. Shishodia ve ark. (2005) ise lenfoma hücrelerinde curcumin ile apoptozu indüklemişler ve elde ettikleri bulgularda curcuminin 3 saat sonra NF-κB aktivasyonunun baskılandığını gözlemlemişlerdir.

Bu şekilde yapılan çalışmalar olmasına karşın deneysel modelimize benzer nitelikte bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bor bileşiklerinin NF-κB inaktivasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada borik asidin NF-κB aktivasyonunu azalttığı vurgulanmaktadır (Durick et al., 2004). Yapılan çalışmada hücre hatları üzerine ilave edilen borik asidin NF-κB aktivasyonunu baskıladığı ifade edilmektedir.

Hücre çoğalmasının inhibisyonunda kaspaz aktivitesi son derece önemlidir. Apoptoz yolaklarında en önemli faktör kaspaz-3 aktivasyonudur. Kaspaz-3 kontrolsüz hücre çoğalmalarında proliferasyonun baskılanmasında önemli rol oynamaktadır.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında zamana bağlı olarak kaspaz-3 aktivasyonunun artış gösterdiği gözlenmiştir. Özellikle de parsiyal hepatektomi sonrası kaspaz-3 aktivasyonunun gerçekleştiği görülmektedir. Buna göre en yüksek kaspaz-3

aktivasyonu Grup VI'da gözlenmiştir. Gen ifadesi düşük de olsa Grup II'de kaspaz-3 aktivasyonu Grup VI'ya yakın bir aktiviteye sahiptir.

Çalışmamız sonuçlarına göre B_2O_3, kaspaz-3 transkripsiyonunu ve translasyonunu uyarmıştır. Grup VI'da, Grup IV'e göre kaspaz-3 miktarı artış göstermiştir. Parsiyal hepatektomi sonrası uygulanan B_2O_3'ün zamana bağlı olarak kaspaz-3 aktivasyonunu arttığı gözlenmiştir. Grup III ve IV'te de zamana bağlı olarak kaspaz-3 miktarında artış gözlenmektedir.

Edinilen bu bulgular yapılan bazı çalışmalarla örtüşmektedir. Bu çalışmalarda parsiyal hepatektomi sonrası kaspaz-3 aktivasyonunun gerçekleşebileceği gösterilmektedir (Suzuki and Tsukamoto, 2005; Tang et al., 2007). Tang ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada glycyrrhizin (anti-inflamatuar ve anti-oksidant) ile parsiyal hepatektomi sonrası apoptozu indüklemişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre araştırıcılar Sham gruplarında da, glycyrrhizin gruplarına nazaran az seviyede de olsa, kaspaz-3 aktivasyonuna rastlamışlardır. Başka bir çalışmada ise Suzuki ve Tsukamoto (2005) parsiyal hepatektomiden 30 dakika sonra kaspaz-3 aktivitesini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar edindikleri bulgularda kaspaz-3 aktivitesinin kontrol gruplarında bile gözlendiğini ve parsiyal hepatektomiden 2 saat sonra aktivitenin en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Manganez ile yapılan çalışmada kaspaz-3 aktivitesi ilk 1 saat içerisinde artış göstermiş ve 8 saate kadar aktivite devam etmiştir (Suzuki and Tsukamoto, 2005).

Scorei ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada meme kanseri hücre hatları üzerine borik asit ve kalsiyum fruktoboratın etkilerini incelemişlerdir. Araştırıcılar doz artışının kaspaz-3 aktivasyonunda etkili olduğunu vurgulamaktadırlar. Özellikle de kalsiyum fruktoboratın kaspaz-3 aktivasyonunda önemli rol oynadığı belirtilmektedir.

Karaciğer rejenerasyonunun başlangıç fazında hepatositlerin büyüme faktörlerine karşı tam olarak yanıt vermesinden önceki evre olduğu için bu model seçilmiştir (Ozeki and Tsukamoto, 1999; Kobayashi et al., 2002). Karaciğer, parsiyal hepatektomiden 4-6 saat sonra tam anlamıyla rejenerasyon sürecine girmektedir (Suzuki and Tsukamoto, 2004). Seçilen bu modelde çoğalma sürecine giren hepatositler üzerine B_2O_3'ün apoptotik etkileri incelenmiştir. Elde edilen verilerimize göre B_2O_3 parsiyal hepatektomi sonrası apoptozu indüklemiştir. Ayrıca yapılan incelemeler sonucu hücre çoğalmasına karşı NF-κB aktivasyonu baskılanmış ve kaspaz-3 aktivasyonu sağlanmıştır.

Sonuç olarak deneysel modelimizden elde edilen bilgiler ışığında B_2O_3 bileşiğinin sublethal dozda zamana bağlı bir şekilde apoptozu indüklediği görülmüştür.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Abu Ali, H.; Dembitsky, V.M. and Srebnik, M., 2005, Contemporary Aspects of Boron: Chemistry and Biological Applications, Elsevier Science, 630 p.

Acarkan, N., 2002, Bor Ürün Çeşitleri ve Kullanım Alanları, I.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 1-5.

Ahn, K.S. and Aggaarwal, B.B., 2005, Transcription Factor NF-kB A Sensor for Smoke and Stress Signals, Ann.N.Y.Acad.Sci., 1056, 218-233.

Akgüç, N.; Çöl, B.; Güneş, H.; Yözdemir, D.; Şahin, N. ve Aslantürk, A., 2009, Bazı Bakterilerin Bor Konsantrasyonuna Bağlı Büyüme Hızlarının Belirlenmesi, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 399-403.

Akın, G.; Pekgöz, E. ve Gökhun, İ.H., 1992, Karaciğer: Yapısı, Metabolik Fonksiyonları, Fizyopatolojisi, Patobiyokimyası, TERTİP MATBAASI, 127 s.

Akşit, H. ve Bildik, A., 2008, Apoptozis, YYÜ VET FAK DERG, 19, 1, 55-63.

Alberts, B., Johson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P., 2002, Hücrenin Moleküler Biyolojisi, (Çev. N. Buyru; N. Dalay; M. Özgüç; M. Öztürk ve M. Sakızlı),TÜBA, 1547 s.

Altun, F., 2009, Bor Kimyasalları Kullanım Alanlarında Değişimler, Gelişen Alanlar, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 381-386.

Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E., 2008, Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, Tıp Araştırmaları Dergisi, 6, 2, 93-104.

Anderson, D.L.; Cunningham, W.C., and Lindstrom, T.R., 1994, Concentration and intakes of H, B, S, Na, Cl ve NaCl in foods, Journal of Food Composition and Analysis, 7, 1/2, 59-82.

Bakirdere, S.; Örenay, S., and Korkmaz, M., 2010, Effect of Boron on Human Health, The Open Mineral Processing Journal, 3, 54-59.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Barranco, W.T. and Eckhert, C.D., 2004, Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation, Cancer Letters, 216, 1, 21-29.

Barranco, W.T. and Eckhert, C.D., 2006, Cellular changes in boric acid-trated DU-145 prostate cancer cells, Br J Cancer, 94, 6, 884-890.

Burtis, C.A. ve Ashwood, E.R., 2005, Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, (Çev. D. Aslan),Palme Yayıncılık, 1091 s.

Cardoso, J.E.; Trivillin, V.A.; Heber, E.M.; Nigg, D.W.; Calzetta, O.; Blaumann, H.; Longhino, J.; Itoiz, M.E.; Bumaschny, E.; Pozzi, E., and Schwint, A.E., 2007, Effect of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) on normal liver regeneration: towards a novel therapy for liver metastases, Int J Radiat Biol, 83, 10, 699-706.

Çöl, B.; Akgüç, N.; Güneş, H.; Karakaya, R.; Şahin, N. ve Aslantürk, A., 2009, Bor Toleransı Yüksek Bazı Bakterilerin Enzim İçeriklerinin Tespiti, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 333-336.

Cooper, G.M. ve Hausman, R.E., 2006, Hücre Moleküler Yaklaşım, (Çev. M. Sakızlı ve N. Atabey),İzmir Tıp Kitabevi, 714 s.

Dilek, O.N., 2003, Karaciğer, Afyon Kocatepe Üniversitesi, 791 s.

Durick, K.; Tomita, M.; Santoro, T.; Hunt, C.; and Bradley, D., 2004, Evidence That Boron Down-Regulates Inflammation Through The NF-(Kappa)B Pathway, The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, (19):5, A1705-.

Flemming, W., 1885, Ueber die bildung von richtungsfiguren in säugethiereiern beim untergang graaf'scher follikel, Arch.Anat.Physiol., Jahrgang 1885, 221-244.

Garabalino, M.A.; Hughes, A.M.; Molinari, A.J.; Heber, E.M.; Pozzi, E.C.C.; Cardoso, J.E.; Colombo, L.L.; Nievas, S.; Nigg, D.W.; Aromando, R.F.; Itoiz, M.E.; Trivillin, V.A., and Schwint, A.E., 2011, Boron neutron capture therapy (BNCT) for the treatment of liver metastases: biodistribution studies of boron compounds in an experimental model, Radiat Environ Biophys, 50, 1, 199-207.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Gershbein, L.L. and Elias, H., 1954, Observation on the Anatomy of the Rat Liver, The Anatomical Record, 120, 1, 85-98.

Geyikoğlu, F.; Türkez, H., and Çolak, S., 2009, Effects of Boric Acid On Aluminum-Mediated Ionic Changes In Rat Serum, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 547-553.

Goldbach, H.; Rerkasem, B.; Wimmer, M.A.; Brown, P.H.; Thellier, M. and Bell, R.W., 2002, Boron in plant and animal nutrition, Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, 426 p.

Grasl-Kraupp, B.; Bursch, W.; Ruttkat-Nedecky, B.; Wagner, A.; Lauer, B., and Schulte-Hermann, R., 1994, Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver, Applied Biological Sciences, 91, 9995-9999.

Güneş, H.V., 2006, Moleküler Hücre Biyolojisi, Kaan Kitabevi, 493 s.

Habashi, F., 2009, Boron: Its History and Its Position in the Periodic Table, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 355-363.

Habeebu, S.M.S.; Liu, J., and Klaassen, C.D., 1998, Cadmium-Induced Apoptosis in Mouse Liver, TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, 149, 203-209.

Hancock, J.T., 2005, Cell Signalling: Second Edition, Oxford University Press, 296 p.

Helling, T.S., 2006, Liver failure following partial hepatectomy, HPB (Oxford), 8, 3, 165-174.

Hermann, M. and Kalden, J.R., 2003, Apoptosis and Autoimmunity, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaG, Weinheim, 387 p.

Higgins, G.M. and Anderson, R.M., 1931, Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver white rat following partial surgical removal, Arch Pathol., 12, 186-202.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Hossain, S.; Liu, H.N.; Nguyen, M.; Shore, G., and Almazan, G., 2009, Cadmium exposure induces mitochondria-dependent apoptosis in oligodendrocytes, Neurotoxicology, 30, 4, 544-554.

Huang, X.-J.; Choi, Y.-K.; Im, H.-S.; Yarimaga, O.; Yoon, E., and Kim, H.-S., 2006, Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques, Sensors, 6, 756-782.

Hunt, C.D. and Meacham, S.L., 2001, Aluminum, boron, calcium, copper, iron, magnesium, manganese, sodium and zinc: Concentrations in common western foods and estimated daily intakes by infants; todler; and male and female adolescents, adults, and seniors in the United States, Journal of hte American Dietetic Association, 101, 9, 1058-1060.

Hutchins, J.B. and Barger, S.W., 1998, Why Neurons die: cell death in the nervous system, Anat Rec, 253, 3, 79-90.

Iwao, K. and Tsukamoto, I., 1999, Quercetin inhibited DNA synthesis and induced apoptosis associated with increase in c-fos mRNA level and the upregulation of p21WAF1CIP1 mRNA and protein expression during liver regeneration after partial hepatectomy, Biochim.Biophys.Acta, 1427, 1, 112-120.

Iwatsuki, S. and Starzl, T.E., 1988, Personalexperience with 411 hepatic resectitions, Ann Surg, 208, 421-434.

Izmerov, N.F.; Santotsky, I.V. and Sidorov, K.K., 1982, Toxicometric Parameters of Industrial Toxic Chemicals Under Single Exposure, Centre of International Projects, 160 p.

Kahyaoğlu, M.; Darcan, C. ve Ergene, E., 2009, Bor Bileşiklerinin Mikrobiyal Etkileri ve Kullanım Alanları, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 209-213.

Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H., and Currie, A.R., 1972, Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics, Br.J.Cancer, 26, 239-257.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Klug, W.S. ve Cummings, M.R., 2003, Genetik Kavramlar, (Çev. C. Öner),Palme Yayıncılık, 816 s.

Kobayashi, K.; Terada, C., and Tsukamoto, I., 2002, Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy, Eur.J.Pharmacol., 438, 1-2, 19-24.

Koçtürk, S. ve Vatansever, H.S., 2011, I. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Matbaası, 270 s.

Kıhç, A.M., 2004, Bor Madeninin Türkiye Aksından Önemi ve Gelecekteki Yeri, II.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 31-41.

Kılıç, A.M.; Kılıç, Ö.; Andaç, İ. ve Çelik, A.G., 2009, Türkiye Bor Madenciliği, Dünya Bor Piyasasındaki Durumu ve Ekonomik Açıdan Önemi, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 23-34.

Kılınç, E.; Mordoğan, H. ve Tanrıverdi, M., 2001, Bor Minerallerinin Önemi, Potansiyeli, Üretimi ve Ekonomisi, 4.Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, 226-235.

Laurent, S.; Horsmans, Y.; Stärkel, P.; Leclercq, I.; Sempoux, C., and Lambotte, L., 2005, Disrupted NF-kB activation after partial hepatectomy does not impair hepatocyte proliferation in rats, World J Gastroenterol, 11, 46, 7345-7350.

Lawen, A., 2003, Apoptosis-an introduction, BioEssays, 25, 888-896.

Lee, F.Y.J.; Li, Y.B.; Zhu, H.; Yang, S.Q.; Lin, H.Z.; Trush, M., and Diehl, A.M., 1999, Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating rat liver, Hepatology, 29, 3, 677-687.

Li, H.-L.; Chen, D.-D.; Li, X.-H.; Zhang, H.-W.; Lü, Y.-Q.; Ye, C.-L., and Ren, X.-D., 2002, Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: roelof reactive oxygen species, World J Gastroenterol, 8, 3, 431-435.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Lockshin, R.A. and Williams, C.M., 1964, Programmed cell death – II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths, Journal of Insect Physiology, 10, 4, 643-649.

Martins, P.N.A. and Neuhaus, P., 2007, Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat, Liver International, 27, 3, 384-392.

Meacham, S., 2009, What Do We Know About Boron in Relation to Human Health?, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 533-545.

Meijer, A.E.; Jernberg, A.R.; Heiden, T.; Stenerlow, B.; Persson, L.M.; Tilly, N.; Lind, B.K., and Edgren, M.R., 2005, Dose and time dependent apoptotic response in a human melanoma cell line exposed to accelerated boron ions at four different LET, Int J Radiat Biol, 81, 4,

Merdan, R., 2009, Bor ve Türevlerinin Ahşap Ürünlerin Mukavemetine Etkisinin Araştırılması, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 637-642.

Moseman, R.F., 1994, Chemical Disposition of boron in Animal and Humans, Enviromental Health Perspectives, 102, 7, 113-117.

Nielsen, F.H., 2002, The Nutritional Importance and Pharmacological Potential of Boron for Higher Animals and Human, 37-49 p.

Nielsen, F.H., 2008, Is boron nutritionally relevant?, Nutrition Reviews, 66, 4, 183-191.

Öktem, S.; Özhan, M.H. ve Özol, D., 2001, Apotozisin Önemi, Toraks Dergisi, 2, 1, 91-95.

Onrat, S.T. ve Konuk, M., 2004, Bnct (Boron Neutron Capture Therapy) ile Kanser Tedavisi, II.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 549-551.

Ozeki, A. and Tsukamoto, I., 1999, Retinoic acid repressed the expression of c-fos and c-jun and induced apoptosis in regenerating rat liver after partial hepatectomy, Biochim.Biophys.Acta, 1450, 3, 308-319.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Özen, A.; Canbek, M.; Uyanoğlu, M.; Arslan, N. ve Çiçek, A., 2009, İndikatör Bir Canlı Olan *Limnodrilus hoffmeisteri* Üzerinde Ağır Metal ve Bor Bileşiklerinin Toksik Etkilerinin İncelenmesi, IV.Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitapçığı, 421-427.

Patrick, R.S. and McGee, J.O., 1980, Biopsy Pathology of the Liver, Chapman and Hall Ltd., 335 p.

Plümpe, J.; Malek, N.P.; Bock, C.-T.; Manns, M.P., and Trautwein, C., 2000, NF-kB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration, Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol, 278, G173-G183.

Porter, I.A. and Brodie, J., 1969, Boric Acid Preservation of Urine Samples., British Medical Journal, 2, 353-355.

Rainey, C. and Nyquist, L., 1998, Multicountry estimation of dietary boron intake, Biological Trace Element Research, 66, 1-3, 79-86.

Sakamoto, T.; Liu, Z.; Murase, N.; Ezure, T.; Yokomuro, S.; Poli, V., and Demetris, J.A., 1999, Mitosis and Apoptosis in the Liver of Interleukin-6-Deficient Mice After Partial Hepatectomy, Hepatology, 29, 2, 403-411.

Sakuda, S.; Tamura, S.; Yamada, A.; Miyagawa, J.; Yamamoto, K.; Kiso, S.; Ito, N.; Higashiyama, S.; Taniguchi, N.; Kawata, S., and Matsuzawa, Y., 2002, NF-kappaB activation in non-parenchymal liver cells after partial hepatectomy in rats: possible involvement in expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, J Hepatol, 36, 4, 527-533.

Sánchez, A.; Factor, V.M.; Shroeder, I.S.; Nagy, P., and Thorgeirsson, S.S., 2004, Activation of NF-kB and STAT3 in Rat Oval Cells During 2-Acetylaminofluorene/Partial Hepatectomy Induced Liver Regeneration, Hepatology, 39, 2, 376-385.

Sarıhan, E., 2006, Bor sektör profili, İstanbul Ticaret Odası Raporu İstanbul, 37 s.

Saunders, J.W., 1966, Death in embriyonic systems, Science, 154, 3749, 604-612.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Scorei, R.; Ciubar, R.; Coifrangeanu, C.M.; Mitran, V.; Cimpean, A., and Iordachescu, D., 2008, Comparative Effetcs of Boric Acid and Calcium Fructoborate on Breast Cancer Cells, Biological Trace Element Research, 122, 197-205.

Sherlock, S. and Dooley, J., 2002, Diseases of the Liver and Biliary System Eleventh Edition, Blackwell Science, 706 p.

Shishodia, S.; Amin, H.M.; Lai, R., and Aggaarwal, B.B., 2005, Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma, Biocchemical Pharmacology, 70, 700-713.

Sluyser, M., 1996, Apoptosis in Normal Development and Cancer, Taylor and Francis Ltd., 275 p.

Suzuki, T. and Tsukamoto, I., 2004, Apoptosis induced by 5-(N,N-hexamethylene)-amiloride in regenerating liver after partial hepatectomy, Eur.J.Pharmacol., 503, 1-3, 1-7.

Suzuki, T. and Tsukamoto, I., 2005, Manganese-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy, Eur.J.Pharmacol., 525, 1-3, 48-53.

Takahashi, Y.; Ganster, R.W.; Gambotto, A.; Shao, L.; Kaizu, T.; Wu, T.; Yagnik, G.P.; Nakao, A.; Tsoulfas, G.; Ishikawa, T.; Okuda, T.; Geller, D.A., and Murase, N., 2002, Role of NF-kB on liver cold ischemia-reperfusion injury, Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol, 283, 1175-1184.

Takeda, K.; Togo, S.; Kunihiro, O.; Fujii, Y.; Kurosawa, H.; Tanaka, K.; Endo, I.; Takimoto, A.; Sekido, H.; Hara, M., and Shimada, H., 2002, Clinicohistological features of liver failure after excessive hepatectomy, Hepato-Gastroenterology, 49, 44, 354-358.

Tanaka, M. and Fujiwara, T., 2008, Physiological roles and transprot mechanisms of boron: perspectives from plants , Pfugers Arch - Eur J Physiol, 456, 671-677.

Tang, B.; Qiao, H.; Meng, F., and Sun, X., 2007, Glycyrrhizin attenuates endotoxin-induced acute liver injury after partial hepatectomy in rats, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40, 1637-1646.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Uyanoğlu, M., 2006, Parsiyal Hepatektomi Yapılmış Sıçanlarda Karvakrolün Karaciğer Üzerine Etkileri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 89 s.

Wang, P.; Zhen, H.; Jiang, X.; Zhang, W.; Cheng, X.; Guo, G.; Mao, X., and Zhang, X., 2010, Boron neutron capture therapy induces apoptosis of glioma cells through Bcl-2/Bax, BMC Cancer, 10, 661-670.

Waynforth, H.B. and Flecknell, P.A., 1994, Experimental and Surgical Technique in the Rat, ACADEMIC PRESS, 375 p.

Yiğitbaşıoğlu, H., 2004, Türkiye İçin Önemli Bir Maden: Bor, Coğrafi Bilimler Dergisi, 2, 2, 13-25.

Yıldırım, A.; Bardakçı, F.; Karataş, M. ve Tanyolaç, B., 2007, Moleküler Biyoloji, Nobel Yayın Dağıtım, 613 s.

7. EKLER

7.1 Ek1: Etik Kurul Raporu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 05. 04. 2012
TOPLANTI SAYISI : 46
DOSYA KAYIT NUMARASI : 271
KARAR NUMARASI : 271
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Doç. Dr. Mediha CANBEK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Doktora Öğrencisi Ahmet ÖZEN

HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Wistar albino (erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü/Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Mediha CANBEK '**in araştırma yürütücüsü olduğu 271/2012 kayıt numaralı ve "**Sıçan karaciğerinde parsiyal hepatektomi sonrası borik anhidrit (B_2O_3) ile apoptozun indüklenmesi"** konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Ömür ELÇİOĞLU (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sümmani DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü/Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Mediha CANBEK '**in araştırma yürütücüsü olduğu 271/2012 kayıt numaralı ve "**Sıçan karaciğerinde parsiyal hepatektomi sonrası borik anhidrit (B_2O_3) ile apoptozun indüklenmesi"** konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Çalışmada ortalama ağırlıkları 250±30 gr olan 42 adet Wistar albino ırkı 3 aylık erkek sıçanlar kullanılacaktır. Bu deneklerden rastgele yolla 6 adet çalışma grubu oluşturulacaktır.

GRUP I: Sham kontrol grubu (n=7) olup herhangi bir cerrahi işlem yapılmadan sadece cerrahi strese maruz bırakılacaktır. Cerrahi işlemden 3 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP II: Sham kontrol grubu (n=7) olup herhangi bir cerrahi işlem yapılmadan sadece cerrahi strese maruz bırakılacaktır. Cerrahi işlemden 6 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP III: Serum fizyolojik (n=7, SF) grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Parsiyal hepatektominin hemen ardından 1ml SF intraperitonel olarak enjekte edilecektir. Cerrahi işlemden 3 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP IV: Serum fizyolojik (n=7, SF) grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Parsiyal hepatektominin hemen ardından 1ml SF intraperitonel olarak enjekte edilecektir. Cerrahi işlemden 6 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP V: B2O3 (n=7) grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Parsiyal hepatektominin hemen ardından 1,8 g/kg B2O3 intraperitonel olarak enjekte edilecektir. Cerrahi işlemden 3 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP VI: B2O3 (n=7) grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Parsiyal hepatektominin hemen ardından 1,8 g/kg B2O3 intraperitonel olarak enjekte edilecektir. Cerrahi işlemden 6 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

1.Hepatektomi İşlemi: Parsiyal hepatektomi yapılacak deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edilip işlem başlatılacaktır. Cerrahi uygulama bölgesi %70'lik etilalkol ile temizliği yapılıp Higgins ve Anderson' un (1931) tekniğiyle parsiyal hepatektomi gerçekleştirilecektir. Buna göre, deney hayvanının karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi ile laporoktomi yapılacak ve karaciğer loplarını birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin yaklaşık %68- 70 oranında kütlesini teşkil eden öndeki sağ orta ve sol yan lopları ayrılacaktır. Bu loplara ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanacak ve bağın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilecektir. Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verilecektir. Sonra, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 4/0 ipek sütürle dikilerek laporoktomi bölgesi kapatılacaktır ve poviiodeks antiseptik solüsyon ile laporoktomi bölgesi temizlenecektir. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın gruplara bağlı olarak 3 ve 6 saat boyunca yaşatılacaktır.

2.Anestezi: Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilecektir. Deney gruplarına ait hayvanlar intramuskular olarak 10 mg.kg-1 ksilazin ve 70 mg.kg-1 ketamin anestezisi altında, intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürülecek ve midline laporoktomi gerçekleştirilerek karaciğer doku örnekleri alınacaktır.

Parsiyel hepatektominin de ketamin + ksilazin anestezisi altında yapılacağı belirtilmelidir. Hayvanların hayatına son verilme işlemi de aynı anestezi altında elisamguinasyon şeklinde yapılmalıdır.

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ahmet ÖZEN

Doğum Yeri-Tarihi: Eskişehir, 02.06.1985

Uyruğu: T.C.

Eğitimi

2004-2008 : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen–Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü.

2008- : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Programı

Yayınları

Uyanoglu, M.; Canbek, M.; Ceyhan, E.; Senturk, H.; Bayramoglu, G.; Gunduz, O.; **Ozen, A.**; Turgak, O., Preventing Organ Injury With Carvacrol After Renal Ischemia/Reperfusion, Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(1), pp. 72-80, 4 January, 2011

Canbek, M:; **Ozen, A.**; Yerli, N.; Uyanoglu, M.; Arslan,N., Histopathology of the Tissue of a Tubicid Worm (Limnodrilus homeisteri) Exposed to Cadmium, Çankaya University Journal of Science and Engineering 9, (1), 69-73, 2012