Gallik Asidin Sıçanlarda IL-6 Sinyal Yolu Üzerinden Karaciğer Rejenerasyonuna Etkisi

Zainab Ali Yaseen YASEEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2026

Effect of Gallic Acid on Liver Regeneration in Rats via IL-6 Signaling Pathway

Zainab Ali Yaseen YASEEN

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2026

Gallik Asidin Sıçanlarda IL-6 Sinyal Yolu Üzerinden Karaciğer Rejenerasyonuna Etkisi

Zainab Ali Yaseen YASEEN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr**.** Mustafa UYANOĞLU

“ESOGÜ-BAP tarafından FYL-2025-3328 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.”

Ocak 2026

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans **Zainab Ali Yaseen YASEEN**'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Gallik Asidin Sıçanlarda IL-6 Sinyal Yolu Üzerinden Karaciğer Rejenerasyoununa Etkesi " başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr**.** Mustafa UYANOĞLU

İkinci Danışman :-

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye:Prof. Dr**.** Mustafa UYANOĞLU

Üye:Prof.Dr. Mediha CANBEK

Üye:Prof.Dr. Gökhan BAYRAMOĞLU

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

Prof. Dr. Fatma TÜMSEK

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mustafa UYANOĞLU danışmanlığında hazırlamış olduğum "Gallik Asidin Sıçanlarda IL-6 Sinyal Yolu Üzerinden Karaciğer Rejenerasyoununa Etkesi " başlıklı Yüksek Lisans tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim 15 /01/2026.

Zainab Ali Yaseen YASEEN

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIMI BEYAN FORMU

Bu tezi/projeyi hazırlarken aşağıdaki Üretken Yapay Zekâ (ÜYZ) araçlarından destek aldığımı beyan ederim:

Aşağıdaki ÜYZ araçlarını kullandım. (Birden fazla seçenek işaretlenebilir)

☐ Claude
☒ ChatGPT
☐ DeepSeek
☐ Gemini
☐ Copilot
☐ Diğer (Belirtiniz): .....

ÜYZ araçlarını tezimin/projemin aşağıdaki aşamalarında ilgili amaçlar için kullandım. (Birden fazla seçenek işaretlenebilir**.**

☐ Metin oluşturma
☐ Literatür tarama
☐ Çeviri
☒ Düzenleme/dil kontrolü
☐ Veri işleme ve analizi
☐ Veri görselleştirme
☐ Görüntü üretme
☐ Kaynakça düzenleme
☐Diğer (Belirtiniz): ……

Bu çalışmada ÜYZ kullanımı ***Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehber***'e ve akademik dürüstlük ilkelerine uygun şekilde gerçekleştirilmiş olup ÜYZ araçlarından alınan destek etik kurallar ve kaynak gösterme esaslarına uygun biçimde belirtilmiştir.

ÜYZ araçlarının sağladığı bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi, yanlış veya eksik bilgi bulunması halinde tüm sorumluluğun tarafıma ait olduğunu; ayrıca çalışmamla ilgili bu beyana aykırı bir durumun herhangi bir zamanda tespit edilmesi durumunda ortaya çıkabilecek akademik ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi beyan ederim.

Zainab Ali Yaseen YASEEN

25/02/2026

ÖZET

Karaciğer, yüksek yenilenme kapasitesine sahip bir organ olup parsiyel hepatektomi (PHx) sonrasında rejenerasyon süreci çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri aracılığıyla başlatılmaktadır. Özellikle interlökin-6 (IL-6) sinyal yolunun, 2/3 oranında gerçekleştirilen PHx sonrası hepatosit proliferasyonunun erken evresinde önemli bir düzenleyici rol üstlendiği bilinmektedir. Antioksidan özellikleriyle bilinen bir polifenol olan gallik asidin, IL-6 ile ilişkili hücresel sinyal mekanizmaları üzerinden karaciğer yenilenmesi üzerindeki etkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu çalışmada gallik asidin karaciğer rejenerasyon sürecine olan etkileri erkek Wistar albino sıçanlar kullanılarak incelenmiştir.

Deneysel modelde dört farklı grup oluşturulmuştur: SHAM, PHx+serum fizyolojik, PHx+silimarin (100 mg/kg) ve PHx+gallik asit (200 mg/kg). Deney hayvanları ameliyat sonrası 6., 12., 24. ve 48. saatlerde sakrifiye edilmiştir. Rejenerasyonla ilişkili moleküler değişimleri belirlemek amacıyla c-myc ve STAT3 genleri ile bunlara ait protein ekspresyon düzeyleri RT-PCR ve Western blot yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca karaciğer hasarının değerlendirilmesi amacıyla serum ALT düzeyleri ölçülmüştür.

Gallik asit uygulanan grupta c-myc ekspresyonunun özellikle 6. ve 12. saatlerde belirgin şekilde yükseldiği ve erken fazda en yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. STAT3 ekspresyonu erken dönemde gallik asit verilen grupta artış gösterirken, orta fazda silimarin grubunda daha belirgin bulunmuştur. Geç dönemde ise gallik asit grubunda STAT3 düzeylerinin baskılandığı saptanmıştır. Serum ALT düzeyleri incelendiğinde gallik asit ve silimarin uygulanan gruplarda, serum fizyolojik verilen gruba kıyasla daha düşük değerler elde edilmiştir.

Bu bulgular, gallik asidin IL-6 ile ilişkili sinyal yolaklarını etkileyerek karaciğer rejenerasyonunu özellikle erken dönemde destekleyebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer rejenerasyonu, IL-6, gallik asit, c-Myc, STAT3.

SUMMARY

The liver has a remarkable capacity for regeneration, and the regenerative response following partial hepatectomy (PHx) is triggered by various cytokines and growth factors. Among these mediators, interleukin-6 (IL-6) signaling is considered a key factor in initiating hepatocyte proliferation during the early stage after 70% PHx. Gallic acid is a polyphenolic compound widely recognized for its antioxidant and cytoprotective properties. However, its possible role in liver regeneration, particularly through IL-6–associated signaling pathways, has not yet been fully clarified. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of gallic acid on liver regeneration in male Wistar albino rats.

In the experimental design, animals were divided into four groups: SHAM, PHx+saline, PHx+silymarin (100 mg/kg), and PHx+gallic acid (200 mg/kg). The animals were sacrificed at 6, 12, 24, and 48 hours following the surgical procedure. To investigate molecular alterations associated with regeneration, gene and protein expression levels of c-myc and STAT3 were determined using RT-PCR and Western blot techniques. In addition, serum ALT levels were measured as a biochemical indicator of liver injury.

The results showed that c-myc expression markedly increased at the 6th and 12th hours in the gallic acid–treated group, reaching its highest level during the early regenerative phase. STAT3 expression was elevated during the early period in the gallic acid group, while stronger expression was observed in the silymarin group in the intermediate phase. In the later phase, STAT3 expression appeared to be suppressed in the gallic acid group. Moreover, serum ALT levels were lower in both the gallic acid and silymarin groups compared with the saline group.

These findings suggest that gallic acid may promote liver regeneration, particularly in the early phase, possibly through modulation of IL-6–related signaling pathways.

Keywords: Liver regeneration, IL-6 pathway, gallic acid, c-Myc, STAT3.

TEŞEKKÜR

Tezimin tamamlanmasında ve akademik açıdan sağlam bir biçimde sunulmasında büyük katkıları bulunan; değerli bilimsel desteği, sürekli rehberliği ve kıymetli önerileri için danışmanım Prof. Dr. Mustafa UYANOĞLU'na en içten teşekkürlerimi ve derin şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmanın geliştirilmesine sağladıkları katkılar, ayırdıkları değerli zaman ve yapıcı geri bildirimleri için saygıdeğer jüri üyelerine teşekkür ederim.

Öğrenim sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki tüm öğretim üyelerine şükranlarımı sunarım.

Çalışmanın uygulama aşamasında göstermiş oldukları destek ve iş birliği için MST Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca manevi desteğiyle her zaman yanımda olan, özellikle motivasyonumun korunmasında ve çalışmanın ilerlemesinde önemli katkılar sağlayan Yasin ÜNAL'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Sabırları, teşvikleri ve dualarıyla her zaman yanımda olan, en büyük destek kaynağım sevgili aileme; akademik yolculuğum boyunca bana destek veren, katkıları küçük ya da büyük olsun tüm kişi ve kurumlara en içten teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, emeği geçen herkese Yüce Allah'tan sağlık, mutluluk ve başarılar dilerim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vii
SUMMARY viii
TEŞEKKÜR ix
İÇİNDEKİLER x
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xiv
1. **GİRİŞ VE AMAÇ** 1
2. **LİTERATÜR ARAŞTIRMASI** 3
2.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi 3
2.2. Karaciğer Rejenerasyonu 6
2.2.1. Karaciğer Rejenerasyonunda Etkili Hücreler 6
2.2.1.1. Hepatositler 7
2.2.1.2. İmmün hücreler 8
2.2.1.3. Hepatik stellat hücreleri (HSC'ler) 8
2.2.1.4. Safra kanalı epitel hücreleri (BEC'ler) 8
2.2.1.5. Karaciğer progenitör hücreleri (HPC'ler) 9
2.2.1.6. Sinüzoidal endotel hücreleri (SEC'ler) 9
2.2.2. Karaciğer Rejenerasyonunun Aşamaları 9
2.2.3. Karaciğer Rejenerasyonunda Etkili Faktörler ve Sinyal Yolları 10
2.2.3.1. Hepatosit büyüme faktörü (HGF) 11
2.2.3.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) 12
2.2.3.3. Wnt/β-Katenin sinyal yolu 13
2.2.3.4. IL-6/STAT3 sinyal yolu 15
2.2.3.5. TNF-α ve NF-κB sinyal yolu 18
2.2.3.6. TGF-β ve SMAD sinyal yolu 19
2.2.3.7. Hipoksi/HIF-1α sinyal yolu 19

İÇİNDEKİLER

Sayfa

2.3. Gallik Asit ve Karaciğer Rejenerasyonu 20
3. **MATERYAL VE YÖNTEM** 23
3.1. Deneysel Tasarım 23
3.2. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar 24
3.3. Biyokimyasal Analizler 26
3.3.1. Moleküler Biyolojik Analizler 26
3.3.2. RT-PCR Analizi 26
3.3.3. Western Blot Analizi 30
4. **BULGULAR VE TARTIŞMA** 34
4.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi 34
4.1.1. Moleküler Biyolojik Sonuçları ve Analitik Değerlendirmesi 39
4.1.1.1. RT-PCR Analizi Sonuçları ve Değerlendirilmesi 39
4.1.1.2. Western Blot Analizi Sonuçları ve Değerlendirilmesi 46
5. **SONUÇ VE ÖNERİLER** 52
5.1. Gelecek Perspektifi 53
KAYNAKLAR DİZİNİ 54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. Sıçan karaciğerinde anatomik yapılanma (Waynforth ve Flecknell, 1994). 4
2.2. Histolojik yapıda klasik karaciğer lobülü merkezindeki vena sentralis ile üç lobülün birleştiği yerdeki portal triadta safra kanalı, portal ven ve hepatik arterin şematik yerleşimi (Fausto ve Campbell, 2003). 5
2.3. HGF sinyal yolu (Zhang, vd., (2018).) 12
2.4. EGF sinyal yolu (Eitsuka, vd.2016). 13
2.5. Wnt/β-Katenin sinyal yolu (Zhang,vd., (2024). 15
2.6. IL-6/STAT3 sinyal yolu (Jin vd., 2016). 16
2.7. Fenolik asit bileşiklerin genel kimyasal yapısı (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010). 20
4.1 Deney gruplarında saatlere göre ALT (U/L) düzeyleri. (A) 6 saat (B) 12 saat (C) 24 saat ve (D) 48 saat. a: SHAM grubundan farkı, b: GrupII'den farkı, c: GrupIII'ten farkı temsil etmektedir. (1: p<0,05, 2:p<0,01, 3:p<0,001, 4:p<0,0001). 37
4.2. Deney gruplarında saatlere göre STAT3 gen ekspresyon düzeyleri. (A) 6 saat (B) 12 saat (C) 24 saat ve (D) 48 saat. a: SHAM grubundan farkı, b: GrupII'den farkı, c:Grup III'ten farkı temsil etmektedir.(2: p<0.01, 3: p<0.001 ve 4: p<0.0001). 41
4.3. Deney gruplarında saatlere göre c-Myc gen ekspresyon düzeyleri. (A) 6 saat (B) 12 saat (C) 24 saat ve (D) 48 saat. a:SHAM grubundan farkı, b: Grup II'den farkı, c:Grup III'ten farkı temsil etmektedir.(1: p<0.05, 2: p<0.01, 3: p<0.001 ve 4: p<0.0001). 44
4.4. Western Blot analizinde elde edilen β-aktin ve c-Myc proteinlerine ait bant görüntüleri. 47
4.5. Deney gruplarında saatlere göre β-aktin protein ekspresyon düzeyleri. (A) 12 saat (B) 24 saat (C) 48 saat ve a:SHAM grubundan farkı, b: GrupII'den farkı,c:Grup III'ten farkı temsil etmektedir(p<0.0001). 49
4.6. Deney gruplarında saatlere göre c-Myc protein ekspresyon düzeyleri. (A) 12 saat (B) 24 saat (C) 48 saat ve . a:SHAM grubundan farkı, b: GrupII'den farkı,c:Grup III'ten farkı temsil etmektedir.(p<0.0001). 51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1. Karaciğer Rejenerasyonu hazırlık (priming) proliferasyon ve sonlandırma (termination) aşamaları. 10
2.2. Karaciğer rejenerasyonuna etkili sinyal yolları 10
3.1. cDNA Standart Reaksiyon 28
3.2 . RT-PCR cihazına gerilen sıcaklık ve süre değeleri. 28
3.3. Genlere göre tasarlanmış olan primer dizileri ve baz çiftleri. 29
3.4. RT-PCR standart reaksiyon 29
3.5. RT-PCR analizlerinde kullanılan termal döngü protokolü. 30
3.6. Western blot analizinde her bir örnek için gerekli olan çözelti miktarları 31
4.1. Gruplara göre ALT değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları. 34
4.2. Genlerin Ekspresyon Düzeyleri (Mean ± SD). 39
4.4. Protein Ölçüm Sonuçları: 46
4.5. Protein İfade Düzeylerinin İstatistiksel (Mean ± SD) 47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
kg	Kilogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
dk	Dakika
G	Gram / Yerçekimi (bağlama göre değişir)
°C	Santigrat derece
mg	Miligram
PBS	Fosfat tamponlu salin
PH	Parsiyel hepatektomi
ROS	Reaktif oksijen türleri
MDA	Malondialdehit / Mitokondriyal malondialdehit
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit dismutaz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat transaminaz
SLY	Silimarin
GA	Gallik asit
PI3Ks	Fosfatidilinositol 3-kinazlar
HSCs	Hepatik stellat hücreler
AKT	Protein kinaz B
4E-BP1	Ökaryotik başlatıcı faktör 4E-bağlayıcı protein 1
IL-6	İnterlökin-6

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
CCl_4	Karbon tetraklorür
STAT3	Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü 3
TGF	Transforme edici büyüme faktörleri
ECM	Hücre dışı matriks
CLDs	Sitoplazmik lipid damlacıkları
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
LR	Karaciğer rejenerasyonu
FoxM1	Forkhead kutusu proteini M1
Faz I	Sitokrom P450 enzimleri
Faz II	Glutatyon S-transferaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz
OSI	Oksidatif stres indeksi
i.p.	İntraperitoneal

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer, kendini yenileyebilen nadir organlardan biridir. Hasar gördüğünde, kendiliğinden orijinal kütlesine geri dönebilir (Minuk vd., 2003; Fujiyoshi vd., 2011). Hepatositler, genellikle G_0 fazında bulunur (Terui vd., 2005; Fujiyoshi vd., 2011). Ancak hepatositler, ilaçlar, kimyasallar ve karaciğerin bir kısmının cerrahi olarak çıkarılması PHx (parsiyel hepatektomi) gibi stres faktörlerine maruz kaldığında hızla hücre döngüsüne girer. Karaciğerin yeterli düzeyde fonksiyon gösterebilmesi için gerekli minimum kütle geri kazanıldığında, hepatosit bölünmeleri de azalır. Hepatosit proliferasyonu, karaciğerin fonksiyonunun ve yapısal bütünlüğünün yeniden sağlanmasında kritik bir rol oynamaktadır (Michalopoulos vd., 1998; Haga vd., 2005; Ozaki, 2020). Karaciğerin benzersiz rejeneratif kapasitesi, çoğu organizmanın hepatik fonksiyonlarına olan bağımlılığını sürdürülebilir kılmaktadır. Bu bağımlılık, balıklardan memelilere kadar tüm omurgalı organizmalarda gözlemlenmektedir (Fausto vd., 2006; Michalopoulos vd., 2007). Karaciğer fonksiyonunun stabilitesi, vücut homeostazisi için elzemdir ve bu işlevin sürdürülebilmesi için çeşitli rejeneratif mekanizmalar gelişmiştir.

Memelilerde, hepatositler karaciğerin büyük çoğunluğunu oluşturarak homeostatik süreçlerin çoğunu yürütür (Fausto vd., 2006; Michalopoulos vd., 2007). PHx sonrasında ilk gözlemlenen olaylardan bazıları hepatositlerde meydana gelir. Örneğin, sıçanlarda Notch hücre içi alanı (NICD) ve β-katenin, müdahaleden sonraki ilk 15 dakika içinde hepatosit çekirdeklerine göç etmektedir (Monga vd., 2001; Kohler vd., 2004). Ayrıca, hepatosit büyüme faktörü (HGF) reseptörü olan MET ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) de 30 dakika içinde aktive olur (Stolz vd., 1999). Hepatositlerde 100'den fazla genin ekspresyonu, müdahaleden sonraki ilk saat içinde artar (Taub, 1996). Bu gen ifadeleri, yaklaşık 14 gün boyunca epizodik artışlarla devam eder (Apet vd., 2009). İlginç biçimde, hepatositler için mitoinhibitör veya sitotoksik etkiye sahip bazı sinyallerde erken bir artış ve pluripotent kök hücrelerin indüksiyonuyla ilişkili genlerde anlamlı bir ekspresyon gözlenmiştir (Bhave vd., 2011). Hepatositlerin G_1 fazından S fazına geçişi, siklinler ve siklin-bağımlı kinazların aktivasyonu ile ilişkilidir (Mullany vd., 2008).

Proliferasyon gösteren hepatositler, çeşitli büyüme faktörleri sentezler. Bunlar arasında vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), anjiyopoietin-1 ve -2 (karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri için mitojenik etkiye sahip), fibroblast büyüme faktörü 1 ve 2 (FGF1, FGF2) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) yer almaktadır. Hepatositler, karaciğer rejenerasyonu için gerekli olan hücresel kütleyi ve histolojik olarak tamamlanmış doku yapısını yeniden oluşturan histogenezin merkezinde yer alır. IL-6, karaciğer hücrelerinin onarımı ve yenilenmesi sürecinde kritik rol oynayan bir sitokindir. IL-6, özellikle Jak/STAT3 yolu ile hepatositlere mitotik sinyal olarak gider ve karaciğer rejenerasyonunun başlatılmasında önemli bir rol oynar. IL-6, karaciğer rejenerasyonunun başlangıç aşamasında erken gen ifadelerinin %40'ını kontrol eder (Cressman vd., 1996; White vd., 2005; Hunter vd., 2015). Son yapılan çalışmalar, karaciğer dokusundaki bölgesel hasarın Kupffer hücrelerinin yaralı bölgede toplanmasını ve aktive olmasını uyardığını göstermiştir. Bu, karaciğer progenitör hücre benzeri hücrelerin (LPLC'ler) oluşumunu teşvik eder. LPLC'ler tarafından üretilen IL-6, progenitör hücre ile ilişkili genlerin (RRG'ler) ifadesini tetikler ve STAT3'ü aktive ederek karaciğer rejenerasyonunu teşvik eder (Li vd., 2023)

Gallik asit, fenolik asitler sınıfına ait bir organik asittir. Birçok meyve, sebze, gıda ve şifalı bitkide bulunan gallik asit, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip olup, kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterir. Ayrıca, oksidatif stresten kaynaklanan hastalıkların önlenmesinde de rol oynar. Gallik asidin IL-6 aracılı rejeneratif süreçler üzerinde dolaylı bir modülasyon sağladığı; bu etkisiyle karaciğer rejenerasyonuna katkıda bulunabileceği değerlendirilmektedir. Ancak, gallik asidin doğrudan IL-6/STAT3 yolunu aktive ederek rejenerasyonu artırdığına dair veri sınırlıdır. Bu bağlamda, gallik asidin rejeneratif mekanizmalar üzerindeki etkilerinin daha detaylı şekilde incelendiği ileri düzey moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

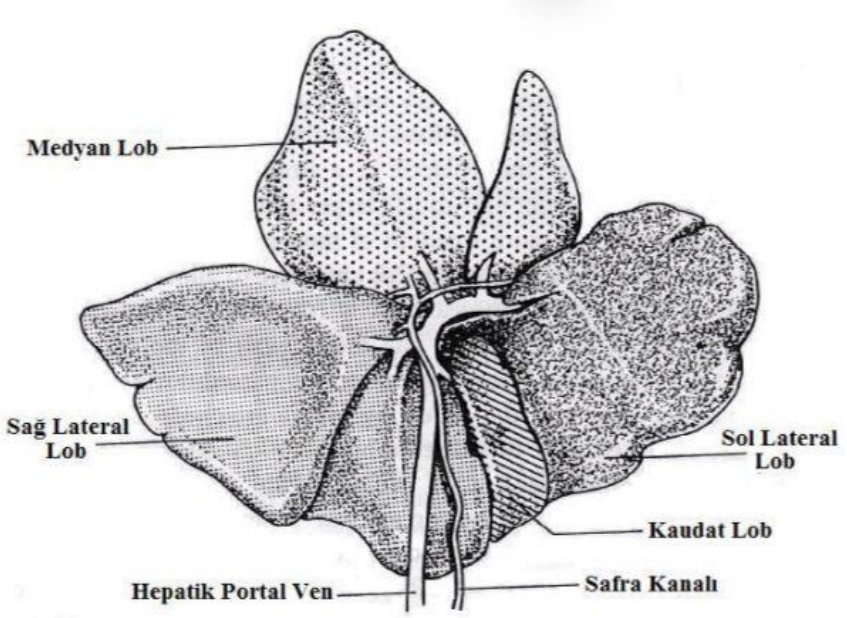
Bu çalışmada, kısmi hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda gallik asidin potansiyel rejeneratif etkileri araştırıldı. Özellikle, PHx operasyonundan sonraki 6, 12, 24 ve 48 saat sonra IL-6 yolunun aktivasyonu incelendi ve gen ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemi ile analiz edildi.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Karaciğer, vücudun en büyük iç organlarından biri olup, metabolik homeostazın sürekliliğini sağlamak amacıyla çok yönlü fonksiyonlara sahiptir. En dikkat çekici özelliklerinden biri ise, büyük ölçekli doku hasarlarına ya da cerrahi parsiyel hepatektomi girişimlerine rağmen kendini yenileyebilme kapasitesine sahip olmasıdır.

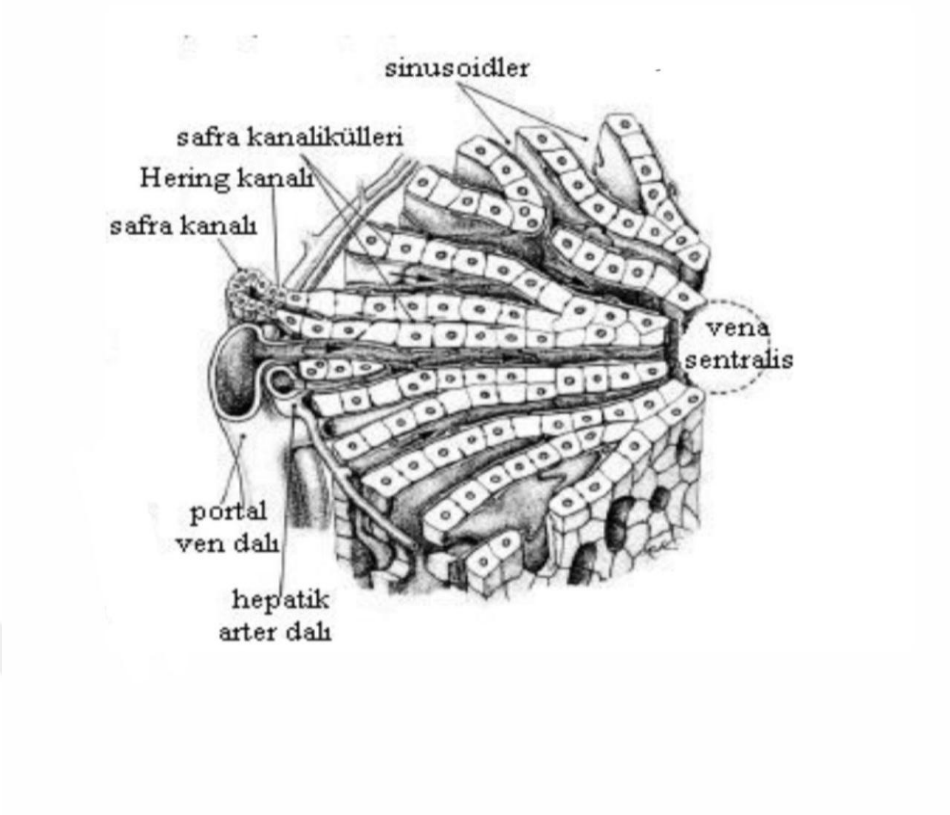
2.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi

Sıçan karaciğeri, diğer memeli türlerine kıyasla belirgin lob yapılarına sahiptir ve bu lobların şekil ve boyutlarında çeşitlilik gözlenmektedir. Bu anatomik farklılıklar, sıçan karaciğerinin topografik ve vasküler mimarisinin özgün bir düzen içerisinde yapılandığını göstermektedir (Gershbein vd., 1954). Sıçanlarda karaciğerVücut ağırlığının yaklaşık %4'ünü oluşturan karaciğer (Palmes ve Spiegel, 2004), sıçanlarda belirgin derecede lobüle bir yapıya sahiptir. Anatomik olarak sağ ve sol medyan loblar, sağ ve sol lateral loblar ile kaudat lobdan meydana gelir. Bu loblar birbirleri üzerine yerleşmiş şekilde konumlanmıştır; yalnızca kaudat lob, mide tarafından diğer loblardan ayrılarak farklı bir anatomik pozisyonda bulunmaktadır. Karaciğer loblarının morfolojik organizasyonu ve topografik yerleşimi Şekil 2.1'de sunulmuştur. Medyan lob, karaciğerin en geniş hacimli bölümünü oluşturmakta olup sol lateral lob ile yakın anatomik komşuluk göstermektedir (Gershbein ve Elias, 1954; Martins ve Neuhaus, 2007).



Şekil 2.1. Sıçan karaciğerinde anatomik yapılanma (Waynforth ve Flecknell, 1994).

Karaciğer, dıştan peritonla kaplanmış olup, elastik liflerden zengin bağ dokusu olan Glisson kapsülüyle çevrilidir. Bu kapsül, karaciğeri lobüllere ayırarak, lobüllerin birleşim yerlerinde bağ dokusunun yoğunlaştığı portal alanlar oluşturur. Karaciğer histolojik yapısımda üç ana lobül türü vardır (Şekil 2.2). Bunlar portal lobül**,** karaciğer asinusu **ve** klasik karaciğer lobülü olarak isimlendirilir**.** Portal lobül**,** safra üretimiyle ilişkilendirilen, üç klasik lobülün merkezlerindeki vena sentralislerin birleşimiyle şekillenen üçgen bir yapıdır**.** Karaciğer asinusu ise, iki komşu klasik lobülün birleşiminden oluşur**.** Klasik lobül, ortasında vena sentralis bulunan ve karaciğer hücrelerinin ışınsal olarak düzenlendiği altıgen bir yapıdır. Bu yapıda, safra kanalları, kan kapillerleri (sinusoidler) ve perisinusoidal aralıkta Ito hücreleri bulunur (Fausto ve Campbell, 2003).



Şekil 2.2. Histolojik yapıda klasik karaciğer lobülü merkezindeki vena sentralis ile üç lobülün birleştiği yerdeki portal triadta safra kanalı, portal ven ve hepatik arterin şematik yerleşimi (Fausto ve Campbell, 2003).

Hepatositlerin kanlanmasındaki farklılıklar doğrultusunda, karaciğer fonksiyonel olarak üç bölgeye ayrılabilir: periportal, sentrilobüler ve sentral zon. Periportal zon, lobülün çevresinde yer alırken, sentral zon, vena sentralis çevresindeki hücrelerden oluşur. Periportal zondaki hepatositler glikoneojenez ve glikojenoliz süreçlerinde aktifken, sentrilobüler zondaki hepatositler glikoliz ve glikojen sentezi süreçlerine katılır. Karaciğerin farklı bölgelerindeki oksijen miktarındaki farklılıklar hücresel yanıtları etkiler. Periportal hepatositler, hücre döngüsünün S fazına daha hızlı ulaşırken, hepatosit proliferasyonu periportal zonda başlar ve yaklaşık 7 gün içinde karaciğer lobülleri yeniden yapılandırılır. Bu süreç, karaciğerin rejenerasyonunu yönlendiren faktörlerin lobüller içindeki etkilerini ortaya koyar (Higgins ve Anderson, 1931).

2.2. Karaciğer Rejenerasyonu

Karaciğer rejenerasyonu, bir dizi hücre tipi ve moleküler sinyal yolunun etkileşimde olduğu karmaşık bir süreçtir. Karaciğer rejenerasyonu, uzun bir süre boyunca PHx veya karaciğer yaralanmasının ardından karaciğer kitlesinin, hepatosit proliferasyonu ile 1-2 hücre döngüsü içinde iyileşeceği düşünülüyordu. Ancak son araştırmalar, karaciğer rejenerasyonunun tipini belirleyen farklı uyaranların olduğunu ortaya koymuştur (Gilgenkrantz, vd., 2018). Bu uyaranların gerek üretilmesi ve gerekse üretilenlerden etkilenerek karmaşık da olsa cevap vermesi gibi önemli işleri rejenerasyon sürecinde fonksiyonel olan hücreler gerçekleştirmektedir.

2.2.1. Karaciğer Rejenerasyonunda Etkili Hücreler

Karaciğer rejenerasyonunun bilinen iki türü bulunmaktadır. Bunlardan ilki, hepatositler ve safra epitel hücrelerinin (BEC'ler) hipertrofisi ve/veya hiperplazisi ile gerçekleşir ki buna modüler rejenerasyon denir. Bu tür rejenerasyon, genellikle rezeksiyon veya akut karaciğer hasarından sonra sağlıklı karaciğerlerde gözlemlenir (López-Luque, vd., 2018). İkincisi ise, progenitör hücre bazlı rejenerasyon olarak adlandırılır ve bu süreç, kalan karaciğer kütlesinin boyutuna bağlı olarak spesifik hepatositlerin yeniden programlanmasını gerektirir. Progenitör hücre bazlı rejenerasyon, genellikle kronik karaciğer hastalıkları ve büyük akut karaciğer hasarlarında görülür (Wirth, vd., 2018).

Sonuç olarak, karaciğerin 2/3'ünün rezeksiyonu karaciğer hücrelerinin anında büyümesine ve hiperplazisine yol açarken, karaciğerin 1/3'ünün rezeksiyonu yalnızca hücre büyümesiyle sonuçlanır. Çeşitli kronik hastalıklar ve majör yaralanmalar, karaciğer rejenerasyonundan sorumlu olan hepatik progenitör hücrelerin (HPC'ler) aktivasyonunu başlatır (Gilgenkrantz, vd., 2018). Bu nedenle, tipik karaciğer rejenerasyonu olgun hepatositler ve karaciğer endotel hücreleri tarafından gerçekleştirilir, alternatif rejenerasyon yöntemi ise hepatik progenitör hücreler tarafından gerçekleştirilir (Wirth, vd., 2018).

Karaciğerin kısmi hepatektomisi, portal basınç artışı gibi hemodinamik değişikliklere yol açar ve bu durum rejenerasyonu tetikleyen bir uyarıcı görevi görür. Bunun sonucunda hepatositler, biliyer epitel hücreleri (BEC'ler), Ito hücreleri, Kupffer hücreleri ve sinüzoid endotel hücreleri (SEC'ler) çoğalmaya başlar (Kiseleva vd., 2021). Hepatositler ilk olarak çoğalırken, BEC'ler bu süreçten yaklaşık 2-3 gün sonra proliferasyona başlar. Karaciğerin yaklaşık %60'lık kısmının yenilenmesi için hepatositler ilk etapta DNA sentez döngüsüne girerek çoğalmaya başlar. Bu süreç, genellikle karaciğerin kaybedilen kısmının yaklaşık 2/3'ünün yeniden yapılandırıldığı bir dönemdir. Zamanla, sadece bazı hepatositler çoğalmaya devam eder ve giderek tam iyileşme sağlanır. Rejenerasyonun aşırı yanıtının önüne geçebilmek için, iyileşme sürecini sonlandıran apoptotik mekanizmalar devreye girer ve hücre ölüm oranı artar (Kholodenko vd., 2017).

Karaciğer rejenerasyonunda fonksiyonel olarak işlev gören hücreleri şu biçimde özetlemek mümkündür:

2.2.1.1. Hepatositler

Karaciğer rejenerasyonunun başlıca hücreleri hepatositlerdir. Fonksiyonel olarak heterojendirler ve karaciğerin üç bölgesinde yer alırlar (Kietzmann, vd., 2017). Yer aldıkları bölgeye göre adlandırılan hepatositlerden bölge 1'de bulunanlar periportal hepatositler olup glukoneogenez ve yağ asidi beta-oksidasyonu ile özelleşmiştir. Hibrit hepatositler olarak da ifade edilen bu hücreler, Hnf4a ve Sox9 gibi transkripsiyon faktörlerini ifade eder, bu da onları hem hepatositlere hem de safra kanalı epitelyum hücrelerine (BEC'ler) dönüştürme yeteneği sağlar ve kronik yaralanmalardan sonra karaciğer kitlesinin iyileşmesine yardımcı olurlar. Bölge 2'de bulunan orta zon hepatositleri, hem glukoneogenez hem de glikoliz gibi iki bölgenin metabolik faaliyetlerine karışan, bölge 1 ve bölge 3'ün arasında yer alan geçiş bölgesi hücreleridir. Perisentral hepatositler de glikoliz, lipogenez ve detoksifikasyonla ilgili 3. bölge hücreleri olup erken progenitör hücre belirteçleri olan Tbx3 ve Axin2'yi ifade eder ve diğer hepatositlerden iki kat daha hızlı çoğalabilirler.

2.2.1.2. İmmün hücreler

Karaciğerin immün hücreleri yerleşik makrofajlar, hepatosit çoğalmasını ve angiogenezi uyaran HGF, IL-6, TNF-α ve Wnts gibi sitokinleri salgılayan Kupffer hücreleri (Preziosi, vd., 2017); rejenerasyonunun ilk saatlerinde Kupffer hücrelerinin sinüzoidlere ulaşması zaman aldığı için bu süreci idare eden monositler (Li, vd., 2017); IFN-γ salgılayarak hepatositlerde antiproliferatif proteinlerin aktivasyonunu teşvik ederek karaciğer rejenerasyonunu engelleyebilen minimal düzeyde aktivasyonına ihtiyaç duyulan Doğal Killer (NK) hücreleri ve orta düzeyde aktivasyonına ihtiyaç olunan Doğal Killer T (NKT) hücreleri (Ridgway, vd., 2014; Li, vd., 2017); bu hücreler, hepatositlerin G_1 evresine geçişini teşvik eden IL-4 salgılanmasını gerçekleştiren Eozinofiller (Goh, vd., 2013), en temel immün hücrelerdir.

2.2.1.3. Hepatik stellat hücreleri (HSC'ler)

Hepatik Stellat Hücreleri diğer adıyla Ito hücreleri, Disse boşluğunda yer alır. Normal koşullarda retinoid depolarlar, ancak karaciğer hasarı durumunda miyofibroblastlara dönüşebilir, ECM bileşenleri ve HGF, TGF-β1 ve IL-6 gibi büyüme faktörlerini salgılarlar, bu da karaciğer rejenerasyonunu etkiler. Ayrıca, kronik karaciğer hastalıklarında hepatositler ve BEC'lere dönüşebilirler, böylece iyileşme sürecini kolaylaştırırlar (Lua, vd., 2016; Senoo, vd., 2017). trombogenezde önemli bir rol oynadıkları gibi karaciğer rejenerasyonunda da yer alır. HGF, platelet kaynaklı büyüme faktörü ve TGF-β gibi büyüme faktörleri salgılarlar. Trombositler, karaciğer yaralanmasından sonra Disse boşluğunda ve sinüzoidlerde birikir ve angiogenezi ve hepatosit çoğalmasını destekler (Kiseleva, vd., 2021).

2.2.1.4. Safra kanalı epitel hücreleri (BEC'ler)

Safra Kanalı Epitel Hücreleri hepatositler zarar gördüğünde karaciğer rejenerasyonunda yer alır, özellikle karaciğer yapısını onarmada rol oynar. BEC'ler,

yaralanma sırasında aktive olur ve farklı büyüme faktörleri salgılarak doku onarımına katılır (Zhu, vd., 2013).

2.2.1.5. Karaciğer progenitör hücreleri (HPC'ler)

Notch ve Wnt yolları gibi çeşitli sitokinler ve sinyal yolları tarafından etkilenen ve özellikle kronik karaciğer yaralanmalarında, çoğalabilerek hepatosit ve BEC'lere dönüşebilen öncül hücrelerdir (Kiseleva, vd., 2021).

2.2.1.6. Sinüzoidal endotel hücreleri (SEC'ler)

Hepatosit çoğalmasını ve angiogenezi tetikleyen IL-6 ve VEGF gibi büyüme faktörlerini üreterek karaciğer rejenerasyonuna katkıda bulunan hücrelerdir (Kiseleva, vd., 2021).

2.2.2. Karaciğer Rejenerasyonunun Aşamaları

Karaciğer rejenerasyonu, organın hasar sonrası yeniden fonksiyonel hale gelmesini sağlamak için karmaşık bir dizi biyolojik aşamadan geçer. Bu süreç, çeşitli hücresel ve moleküler mekanizmaların bir arada çalışmasını içerir. Karaciğerin rejenerasyon aşamaları; hazırlık, proliferasyon ve sonlandırma aşamalarsır. Rejenerasyon aşamalarının detayları Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Karaciğer rejenerasyonu, karmaşık ve düzenlenmiş bir süreçtir. Hazırlık (Priming) aşamasında, karaciğer hasarını takiben Kupffer hücreleri tarafından salgılanan sitokinler (TNF-α, IL-6), hepatositleri hücre döngüsüne girmeye hazırlar ve proliferasyon için gerekli ortamı oluşturur (Michalopoulos ve DeFrances, 1997). İkinci aşama olan Proliferasyon, hepatositlerin ve diğer karaciğer hücrelerinin aktif olarak bölünmesiyle karaciğer kitlesinin hızla artmasını sağlar. Bu süreçte HGF, EGF, ve TGF-α gibi mitojenler hücre proliferasyonunu destekler (Fausto vd., 2006). Son olarak, Sonlandırma (Termination) aşamasında, karaciğer yeterli büyüklüğe ulaştığında, TGF-β ve sitokin sinyalizasyonunun

baskılayıcıları (örneğin SOCS3) hepatosit proliferasyonunu inhibe ederek rejenerasyonun sonlanmasını sağlar (Ding vd., 2014).

Çizelge 2.1. Karaciğer Rejenerasyonu hazırlık (priming) proliferasyon ve sonlandırma (termination) aşamaları.

Aşama	Açıklama	Süre
Hazırlık (Priming)	Karaciğer hasar algılar ve hücre döngüsüne giriş için hazırlanır. Kupffer hücreleri, IL-6 ve TNF-α gibi sinyaller salgılar. Hepatositler G_0 fazından çıkıp G_1'e girer.	İlk birkaç saat
Proliferasyon	Hepatositler ve diğer hücreler (endotel, safra kanalı, stellat hücreleri) bölünerek çoğalır. HGF, EGF, TGF-α gibi büyüme faktörleri aktiftir. Karaciğer kitlesi hızla artar.	24-72 saat
Sonlandırma (Termination)	Hücre bölünmesi yavaşlar, apoptoz ve matriks yeniden düzenlenmesi gerçekleşir. Fazla hücreler temizlenerek normal doku organizasyonu sağlanır.	7-14 ün

2.2.3. Karaciğer Rejenerasyonunda Etkili Faktörler ve Sinyal Yolları

Karaciğerin rejeneratif kapasitesi, çeşitli sinyal iletim yolları tarafından düzenlenir. Bu yollar, hepatosit proliferasyonu, hücre göçü, doku yenilenmesi ve bağışıklık yanıtının kontrolünü sağlar. Her bir sinyal yolu, belirli anahtar moleküller aracılığıyla etkisini gösterir ve rejenerasyonun farklı aşamalarında rol oynar (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Karaciğer rejenerasyonuna etkili sinyal yolları

Sinyal Yolu	Görevi	Anahtar Moleküller	Etkisi
HGF/c-Met Yolu	Hepatosit proliferasyonunu ve göçünü teşvik eder.	HGF (Hepatosit Büyüme Faktörü), c-Met (HGF reseptörü)	Hücre çoğalmasını ve doku yenilenmesini hızlandırır (Zaho, vd.,2022).
EGF/EGFR Yolu	Hücre büyümesini ve diferansiyasyonunu sağlar.	EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), EGFR (reseptör).	Hepatositlerin DNA sentezini uyarır (Taub R, vd. 2010).
Wnt/β-Katenin Yolu	Hücre proliferasyonunu ve doku düzenini kontrol eder.	Wnt proteinleri, β-Katenin, TCF/LEF.	Hücre döngüsünü başlatır, rejenerasyonu destekler (Anan Abu Rmilah. vd.2019).

Çizelge 2.2. Karaciğer rejenerasyonuna etkili sinyal yolları (devam).

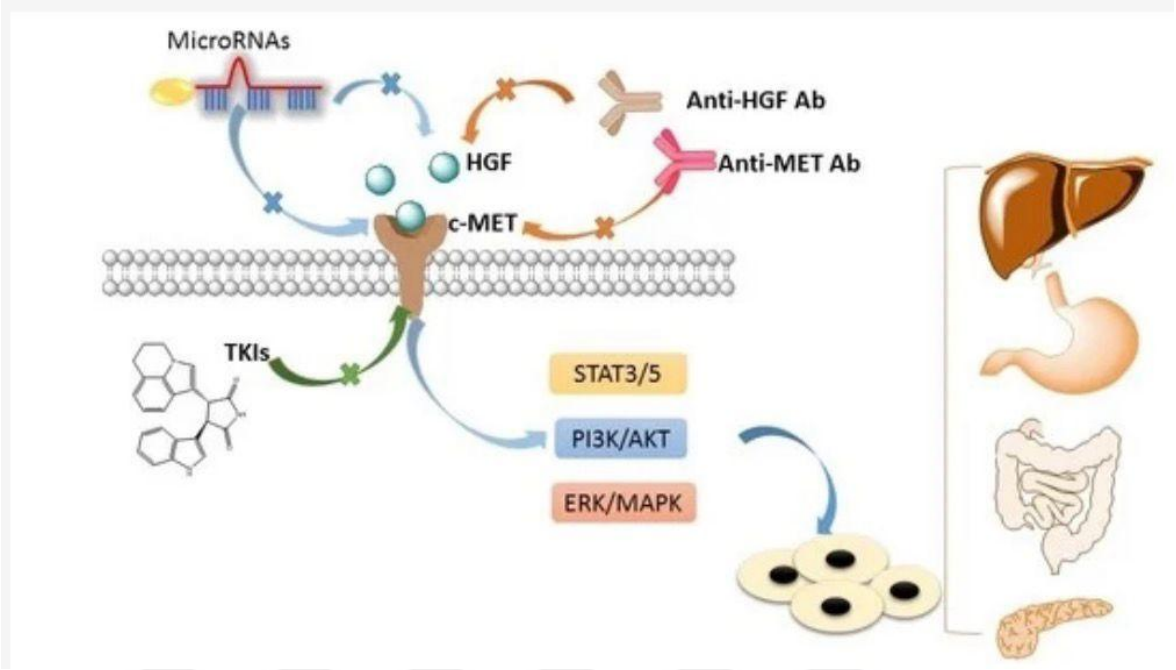
Sinyal Yolu	Görevi	Anahtar Moleküller	Etkisi
IL-6/STAT3 Yolu	İltihaplanma ve hücre yenilenmesini düzenler.	IL-6 (İnterlökin-6), STAT3 (Transkripsiyon faktörü).	Hepatositlerin hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlar (Cressman, vd.2005).
TNF-α/NF-κB Yolu	Bağışıklık yanıtını ve hücre hayatta kalmasını destekler.	TNF-α, NF-κB, IκB.	Antiinflamatuar yanıtı başlatır, rejenerasyonu hızlandırır (Taub R, vd. 2009).
TGF-β/SMAD Yolu	Hücre büyümesini baskılar, rejenerasyonu sonlandırır.	TGF-β (Transformasyon Büyüme Faktörü Beta), SMAD proteinleri.	Aşırı proliferasyonu engeller, doku onarımını düzenler(Xu vd.2016).
Hipoksi/HIF-1α Yolu	Hipoksiye yanıt olarak damar oluşumunu artırır.	HIF-1α (Hipoksiyle İndüklenen Faktör), VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü).	Kan damarlarını uyararak oksijen desteğini artırır(Ju, vd. 2016).

2.2.3.1. Hepatosit büyüme faktörü (HGF)

Karaciğerdeki çeşitli hücreler tarafından üretilen ve MET reseptörüne bağlanarak hücre içi sinyal yollarını aktive eden bir büyüme faktörüdür. Bu etkileşim, hücre proliferasyonu, hareketliliği ve farklılaşması gibi süreçleri düzenler. HGF/MET sinyal yolunun aktivasyonu, aşağıdaki ana yolları tetikler (Şekil 2.3):

- **PI3K/AKT Yolu**: HGF'nin MET reseptörüne bağlanması, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) aktivasyonuna yol açar. PI3K, AKT olarak da bilinen protein kinaz B'yi fosforile eder ve aktive eder. Bu yol, hücre hayatta kalma, büyüme ve proliferasyon süreçlerinde kritik rol oynar (Menakongka ve Suthiphongchai, 2010).
- **MAPK/ERK Yolu**: HGF, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolunu da aktive eder. Bu süreçte, ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK1/2) fosforile olur ve hücre proliferasyonu ile farklılaşmasını teşvik eder.

Bu sinyal yollarının etkinliği, karaciğer rejenerasyonu ve onarımında hayati öneme sahiptir. Özellikle, **HGF/MET** sinyal yolunun bozulması, karaciğerin yenilenme kapasitesini olumsuz etkileyebilir (Borowiak vd., 2004).



Şekil 2.3. HGF sinyal yolu (Zhang, vd., (2018).)

2.2.3.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

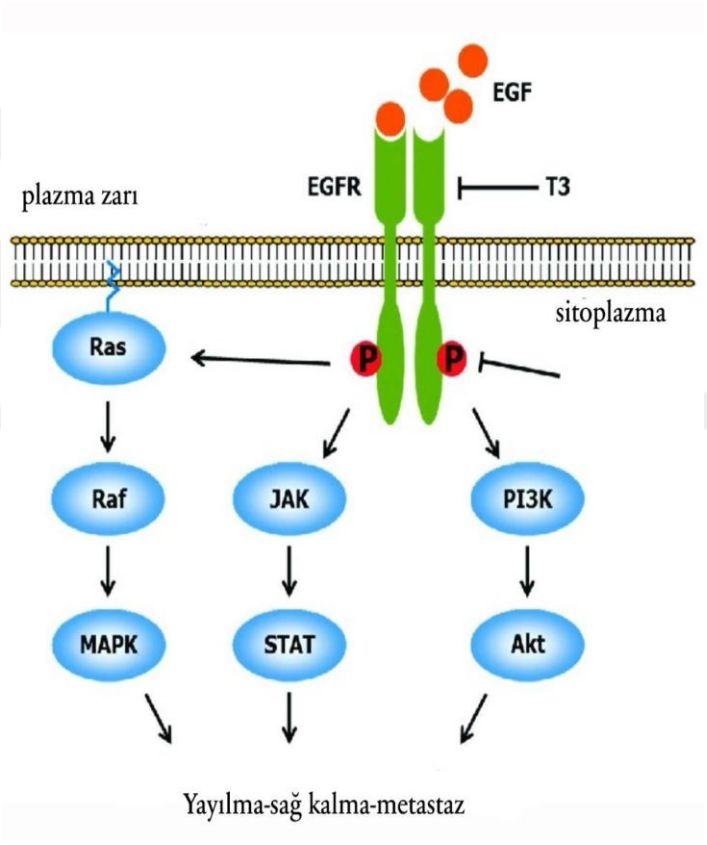
Hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalması süreçlerinde kritik rol oynayan bir büyüme faktörüdür. EGF, hücre yüzeyinde bulunan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ile etkileşerek çeşitli hücre içi sinyal yollarını aktive eder (Wee ve Wang 2017).

EGF/EGFR sinyal yolunun aktivasyonu, başlıca aşağıdaki hücre içi yolları tetikler (Natarajan vd. 2007) (Şekil 2.4).

- **RAS/RAF/MEK/ERK Yolu**: EGF'nin EGFR'ye bağlanması, RAS proteininin aktivasyonuna neden olur. Aktive olan RAS, sırasıyla RAF, MEK ve ERK kinazlarını fosforile eder. Fosforile ERK, nükleusa geçerek hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını düzenleyen genlerin ekspresyonunu artırır.
- **PI3K/AKT Yolu**: EGFR'nin aktivasyonu, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) enziminin aktive olmasına neden olur. PI3K, AKT olarak da bilinen protein kinaz B'yi fosforile

ederek aktive eder. Aktive AKT, hücre hayatta kalma, büyüme ve metabolizma süreçlerinde önemli roller oynar.

Bu sinyal yollarının etkinliği, özellikle karaciğer rejenerasyonu ve onarımında hayati bir öneme sahiptir. EGF/EGFR sinyal yolunun bozulması, karaciğerin yenilenme kapasitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Ayrıca, EGFR'nin aşırı ekspresyonu veya mutasyonları, çeşitli kanser türlerinin gelişiminde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, EGFR sinyal yolunu hedefleyen tedaviler, günümüzde kanser araştırmalarında önemli bir odak noktasıdır (Wee ve Wang 2017).



Şekil 2.4. EGF sinyal yolu (Eitsuka, vd.2016).

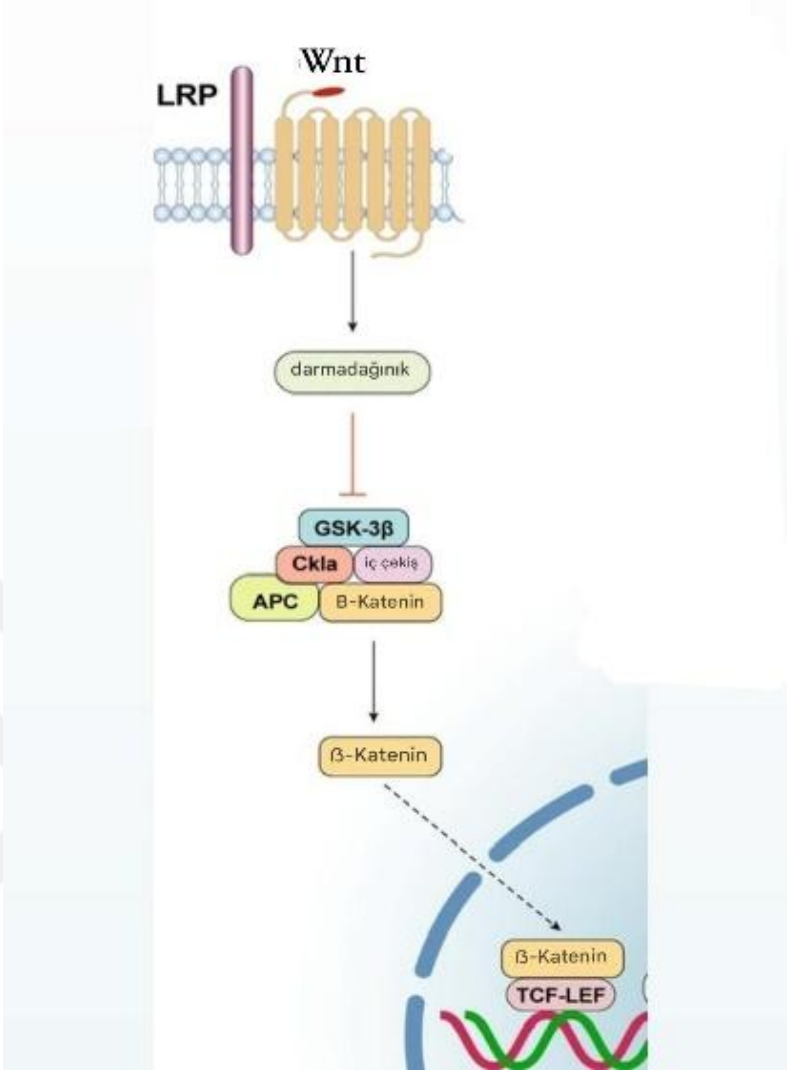
2.2.3.3.Wnt/β-Katenin sinyal yolu

Karaciğer rejenerasyonunda temel bir düzenleyici olarak görev yapar (Monga, 2014). Parsiyel hepatektomi (PHx) sonrası β-katenin düzeyi hızla artar, birkaç saat içinde

nükleusa taşınarak transkripsiyonel kompleks oluşturur ve hücre döngüsünü başlatan **siklin D1**'in ekspresyonunu artırır (Monga vd., 2001; Huang vd., 2016). Fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, β-katenin'in karaciğer rejenerasyonundaki kritik rolünü doğrulamaktadır. Karaciğere özgü β-katenin eksikliği olan farelerde rejenerasyonun belirgin şekilde zayıfladığı; buna karşın, sürekli aktif β-katenin'e sahip farelerde bu sürecin hızlandığı gösterilmiştir (Tan vd., 2006; Nejak-Bowen vd., 2010).

β-Katenin'in aktivasyonu, Wnt sinyallerine bağımlıdır ve endotelyal hücrelerin başlıca Wnt kaynağı olduğu belirlenmiştir (Wang vd., 2015; Preziosi vd., 2018). Wnt/β-Katenin sinyal yolu, yalnızca PHx sonrası değil, toksik hasar sonrası rejenerasyonda da önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, asetaminofen (APAP) kaynaklı karaciğer hasarında β-katenin aktivasyonu erken dönemde başlamakta ve rejenerasyon sürecini desteklemektedir (Apte vd., 2009). Klinik veriler, başarılı rejenerasyon gösteren hastalarda β-katenin aktivitesinin yüksek olduğunu, buna karşılık karaciğer nakli gerektiren hastalarda düşük seviyelerde kaldığını ortaya koymaktadır (Apte vd., 2009; Bhushan vd., 2014).

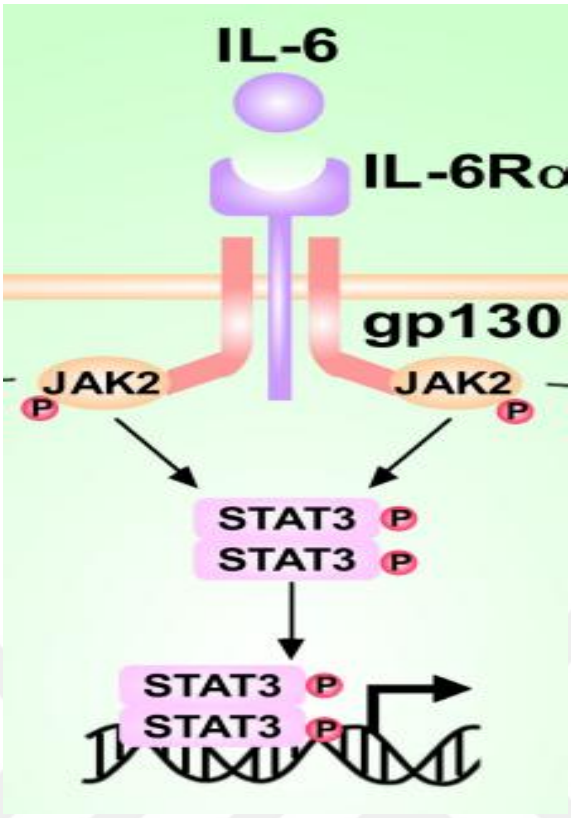
Wnt/β-Katenin sinyal yolunun önemli hedeflerinden biri AXIN2'dir ve bu genin PHx ve farklı toksik hasar modellerinde ifade düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Torre vd., 2011; Zhao vd., 2019; Planas-Paz vd., 2019; Sun vd., 2020). Ayrıca, β-katenin eksikliği olan farelerde hepatosit proliferasyonunun ciddi şekilde azaldığı görülmüştür (Russell vd., 2019). Tüm bu veriler, Wnt/β-Katenin sinyal yolunun karaciğerin yenilenme sürecinde temel bir rol oynadığını ve hasarın etiyolojisinden bağımsız olarak rejenerasyonu desteklediğini göstermektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Wnt/β-Katenin sinyal yolu (Zhang,vd., (2024).

2.2.3.4.IL-6/STAT3 sinyal yolu

IL-6, akut faz yanıtının düzenlenmesinde ve inflamasyonun kontrol altına alınmasında önemli bir sitokindir. Karaciğer hasarı sonrası, Kupffer hücreleri tarafından salınan IL-6, hepatositlerin yüzeyindeki gp130 reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyal iletimi başlatır. Bu etkileşim, JAK kinazlarının aktivasyonu ile devam eder ve STAT3 transkripsiyon faktörünün fosforilasyonu ile sonlanır (Şekil 2.6). Fosforile olmuş STAT3, nükleusa taşınarak rejenerasyonu destekleyen genlerin ekspresyonunu artırır (Schmidt-Arras ve Rose-John, 2016; Tao vd., 2017).



Şekil 2.6. IL-6/STAT3 sinyal yolu (Jin vd., 2016).

IL-6'nın rolü, hepatosit proliferasyonunun uyarılması, hücre ölümünün (apoptoz) engellenmesi ve hücre döngüsünün hızlandırılması gibi temel süreçleri kapsamaktadır. Ayrıca, IL-6 karaciğer rejenerasyonunun erken aşamalarında kritik bir role sahip olup, erken yanıt genlerinin yaklaşık %40'ının ekspresyonunu kontrol etmektedir (Tao vd., 2017**).** IL-6 sinyalinin bağlanmasını takiben JAK aracılı STAT3 fosforilasyonu dakikalar–saatler içerisinde gerçekleşmekte olup, parsiyel hepatektomi sonrası STAT3 aktivasyonunun ilk 1-6 saat içinde belirgin şekilde arttığı, 12-24. saatlerde ise maksimum düzeye ulaştığı bildirilmiştir (Cressman vd., 1996; Taub, 2004; Michalopoulos, 2017). Bu erken STAT3 aktivasyonu, hepatositlerin G_0 fazından G_1 fazına geçişini başlatan anahtar bir olay olarak kabul edilmektedir.

Karaciğerin portal ven çevresindeki hasar, Kupffer hücrelerinin (KCs) hasar bölgesinde toplanmasına ve aktivasyonuna yol açar. Bu aktivasyon, karaciğer progenitör hücre benzeri hücrelerin (LPLC'ler) oluşumunu teşvik eder ve LPLC'ler tarafından üretilen IL-6, rejenerasyonla ilişkili genlerin (RRG'ler) ekspresyonunu artırarak STAT3'ü

aktive eder. Aktive olan STAT3, çekirdekte başta c-Myc olmak üzere cyclin D1, c-Fos ve c-Jun gibi erken proliferatif genlerin transkripsiyonunu başlatır (Haga vd., 2005; Yu vd., 2009). c-Myc ekspresyonunun hepatektomi sonrası 12-24. saatler arasında pik yaptığı ve hepatosit proliferasyonunun başlıca düzenleyicilerinden biri olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2018; Michalopoulos, 2017).

LPC'ler, kemirgenlerde oval hücreler olarak bilinen, hem hepatosit hem de safra kanalı epitelyal hücrelerini oluşturabilen iki potansiyelli hücrelerdir (Michalopoulos, 2013). Ciddi kronik karaciğer hasarı durumunda aktive olabilen bu hücreler, hepatositlere farklılaşarak rejeneratif yanıtı destekler (Min vd., 2016). Zebrafish ve fare modellerinde yapılan çalışmalar**,** LPC aktivasyonu sırasında IL-6/STAT3 yolunun aktive edildiğini ve bu aktivasyonun c-Myc ekspresyonu üzerinden hücre döngüsü ilerlemesini hızlandırdığını ortaya koymuştur (Tao vd., 2017; Kiseleva vd., 2021).

Kupffer hücreleri (KCs), hepatik stellat hücreleri (HSCs) ve makrofajlar IL-6 üretimini artırarak IL-6/JAK/STAT3 sinyal yolunu aktive eder ve rejenerasyonu destekler (Kiseleva vd., 2021). HSC'lerin IL-6 salgılamasıyla aktive olan STAT3'ün, YAP ve c-Myc yolaklarıyla etkileşime girerek proliferatif yanıtı güçlendirdiği bildirilmiştir (Min vd., 2016). Ayrıca PDZ bağlanma motifine sahip transkripsiyonel ko-aktivatörler (TAZ), makrofaj kaynaklı IL-6 üretimini artırarak STAT3/c-Myc eksenini aktive edebilir (Tao vd., 2017).

IL-6 sinyali, vagus siniri aracılığıyla da Kupffer hücrelerinden IL-6 salınımını uyarır. Salınan IL-6, hepatositlerde FoxM1 transkripsiyon faktörünü aktive ederek hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar (Kiseleva vd., 2021). FoxM1 ve c-Myc'in birlikte aktivasyonu, hepatositlerin S fazına geçişini hızlandıran temel moleküler olaylardan biri olarak kabul edilmektedir (Haga vd., 2005; Michalopoulos, 2017). Eksojen melatonin (MLT) ve osteopontin (OPN) gibi moleküllerin de IL-6/STAT3 aktivasyonu üzerinden dolaylı olarak c-Myc ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Min vd., 2016; Tao vd., 2017).

Bahn ve Cheng'e göre, IL-6/STAT3 sinyal yolu prominin-1 ve heme oksijenaz-1 (HO-1) aracılığıyla da aktive edilebilmektedir. Prominin-1, gp130'u lipid salına çekerek STAT3 fosforilasyonunu kolaylaştırırken, HO-1 aracılı STAT3 aktivasyonunun c-Myc ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Schmidt-Arras ve Rose-John,

2016; Bahn ve Cheng, 2019). IL-6/STAT3 yolunun inhibisyonunun parsiyel hepatektomi sonrası rejenerasyonu sınırladığı, buna karşılık bu yolun aktivasyonunun STAT3 ve c-Myc ekspresyonunu artırarak rejenerasyonu hızlandırdığı bilinmektedir (Min vd., 2016; Kiseleva vd., 2021).

Son olarak, IL-6 yolunun klinik önemini destekler şekilde, canlı donör karaciğer nakli yapılan hastalarda yüksek serum IL-6 seviyelerinin, ameliyat sonrası erken dönemde STAT3 aktivasyonu ve buna eşlik eden proliferatif gen ekspresyonu (özellikle c-Myc) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chae vd., 2020).

2.2.3.5.TNF-α ve NF-κB sinyal yolu

Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α), inflamasyon ve immün yanıt süreçlerinde önemli bir rol oynayan bir sitokindir. TNF-α, karaciğer rejenerasyonu sırasında NF-κB sinyal yolunu aktive ederek hücre hayatta kalmasını ve proliferasyonu teşvik eder (Karin vd., 2005). TNF-α, karaciğer hasarı sonrasında Kupffer hücreleri ve makrofajlar tarafından salgılanır (Karin vd., 2005; Bahn ve Cheng, 2019). TNF-α, hepatosit yüzeyindeki TNFR1 ve TNFR2 reseptörlerine bağlanarak sinyal iletimini başlatır (Bahn ve Cheng, 2019). TNFR aracılığıyla IκB kinaz (IKK) kompleksi aktive edilir ve NF-κB inhibitörü (IκB) parçalanarak NF-κB'nin çekirdeğe geçişi sağlanır (Karin vd., 2005; Bahn ve Cheng, 2019). NF-κB, hücre sağkalımı, inflamasyon ve proliferasyonu düzenleyen genlerin ekspresyonunu artırır. Bunlar arasında Cyclin D1, Bcl-XL ve c-Myc gibi genler yer alır (Karin vd., 2005). NF-κB aktivasyonu, Bcl-XL, c-IAP ve A1 gibi anti-apoptotik proteinlerin üretimini artırarak hücre ölümünü önlerken aynı zamanda rejenerasyonu destekler (Karin vd., 2005; Min vd., 2016; Bahn ve Cheng, 2019).

2.2.3.6.TGF-β ve SMAD sinyal yolu

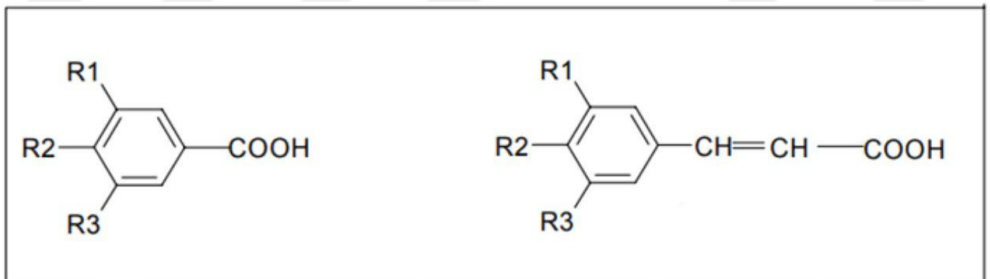
TGF-β (Transforming Growth Factor-beta), karaciğer rejenerasyonu sürecinde hem hücre proliferasyonunu destekleyici hem de proliferasyonu baskılayıcı etkilere sahip olan önemli bir büyüme faktörüdür. TGF-β sinyal yolu, SMAD proteinleri aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenleyerek rejenerasyon sürecinin belirli aşamalarını kontrol eder (Derynck ve Zhang, 2003). Karaciğer hasarının ardından hepatositler, stellat hücreler ve Kupffer hücreleri tarafından TGF-β salgılanır (Fabregat vd., 2016). TGF-β, hücre yüzeyindeki TGF-β R1 ve R2 reseptörlerine bağlanarak SMAD proteinlerinin aktivasyonunu tetikler (Derynck ve Zhang, 2003). Reseptör aracılığıyla fosforile edilen SMAD2 ve SMAD3, SMAD4 ile kompleks oluşturarak çekirdeğe taşınır ve gen ekspresyonunu düzenler (Fabregat vd., 2016). TGF-β/SMAD yolu, hepatosit proliferasyonunu baskılayan p15, p21 ve p57 gibi hücre döngüsü genlerin ekspresyonunu artırır (Derynck ve Zhang, 2003; Dooley vd., 2009). TGF-β, aşırı aktive olduğunda karaciğer fibrozisine neden olabilir ve hepatositlerin apoptoza itebilir (Dooley vd., 2009).

2.2.3.7.Hipoksi/HIF-1α sinyal yolu

Hipoksi, karaciğer rejenerasyonunda önemli bir uyarıcıdır. Doku hasarı sonrası oksijen seviyelerinin azalması, Hypoxia-Inducible Factor-1α (HIF-1α)'nın stabilizasyonuna yol açar. Normoksik koşullarda proteazomal yıkıma uğrayan HIF-1α, hipoksik ortamda bu yıkımdan korunarak aktive olur ve çekirdeğe taşınır (Semenza, 2012). Aktif HIF-1α, VEGF, EPO ve GLUT1 gibi genlerin transkripsiyonunu artırarak anjiyogenez, metabolik adaptasyon ve hücre proliferasyonunu destekler. Bu adaptif yanıtlar, hipoksi koşullarında hepatosit sağkalımını artırır ve rejeneratif süreçleri kolaylaştırır (Nagao, 2019).

2.3. Gallik Asit ve Karaciğer Rejenerasyonu

Fenolik bileşikler, aromatik halkaya doğrudan bağlı hidroksil (-OH) grupları içeren ve bitkilerde yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir (Şekil 2.7). Flavonoidler, tanenler ve fenolik asitler gibi çeşitli alt gruplara ayrılan bu bileşikler; antioksidan, antienflamatuvar ve hepatoprotektif özellikler göstermektedir (Balasundram vd., 2006). Bu özellikleri sayesinde fenolik bileşikler, özellikle oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasara karşı koruyucu rol oynar. Karaciğer gibi yüksek rejeneratif kapasiteye sahip organlarda bu bileşiklerin iyileştirici ve rejeneratif süreçleri destekleyici etkileri literatürde geniş yer bulmaktadır. Bu grup içerisinde öne çıkan bileşiklerden biri olan gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) siyah çay, nar, üzüm, meşe kabuğu gibi çeşitli bitkisel kaynaklarda doğal olarak bulunan bir fenolik asittir. Üç hidroksil grubuna sahip olması, gallik asidin yüksek antioksidan kapasitesine katkıda bulunur. Bu özellik sayesinde serbest radikallerin temizlenmesini sağlamakta, glutatyon gibi endojen antioksidan savunma mekanizmalarını desteklemekte ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesine katkı sunmaktadır (Verma vd., 2019).



Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
p-Hidroksibenzoik	H	OH	H	*p*- Kumarik	H	OH	H
Pirokate şuik	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH_3O	OH	H	Ferulik	CH_3O	OH	H
Siringik	CH_3O	OH	CH_3O	Sinapik	CH_3O	OH	CH_3O
Gallik	OH	OH	OH				

Şekil 2.7. Fenolik asit bileşiklerin genel kimyasal yapısı (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).

Gallik asit üzerine yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda, bu bileşiğin hepatoprotektif etkileri açıkça ortaya konmuştur. Karbon tetraklorür (CCl_4) ile oluşturulan

hepatotoksisite modelinde yapılan bir çalışmada, gallik asit uygulanan sıçan gruplarında serum karaciğer enzim düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığı ve histopatolojik olarak karaciğer dokusunda iyileşme gözlendiği bildirilmiştir (Sedeghi vd., 2015). Benzer şekilde, gallik asidin Nrf2/ARE yolunu aktive ederek antioksidan enzim ekspresyonunu artırdığı ve NF-κB sinyal yolunu inhibe ederek inflamasyonu azalttığı da gösterilmiştir (Yousef vd., 2010). Ayrıca asetaminofen ile oluşturulan başka bir hepatotoksisite modelinde, gallik asit uygulamasının lipid peroksidasyonunu azalttığı ve glutatyon düzeylerini artırdığı rapor edilmiştir (Khan vd., 2014).

Karaciğer, yüksek proliferatif kapasitesi sayesinde hasar sonrası rejenerasyonu etkin bir şekilde gerçekleştirebilen nadir organlardan biridir. Bu süreçte birçok büyüme faktörü, sitokin ve sinyal yolakları koordineli şekilde görev alır. Bu sinyal yollarından biri olan IL-6/STAT3 sinyal yolu, karaciğerin rejeneratif yanıtının başlatılmasında merkezi bir role sahiptir. IL-6, hepatosit proliferasyonunu uyaran başlıca sitokinlerden biridir. Rejenerasyonun erken evresinde Kupffer hücreleri ve diğer bağışıklık hücrelerinden salınan IL-6, JAK/STAT3 yolu üzerinden hepatositleri hücre döngüsüne sokar. Ancak, IL-6'nın kronik olarak yüksek düzeyde ekspresyonu, inflamasyon ve fibrozis gibi olumsuz sonuçlara da neden olabilmektedir (Min vd., 2016; Kiseleva vd., 2021). Fenolik bileşiklerden gallik asidin, bu süreçte hem koruyucu hem de düzenleyici bir role sahip olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, gallik asidin IL-6 seviyelerini modüle ederek inflamasyonun baskılanmasında ve hepatosit hasarının sınırlandırılmasında etkili olduğunu göstermektedir. (Salem, vd. 2023) TAA ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarı modelinde, gallik asit uygulamasının IL-6 ve TNF-α düzeylerini düşürdüğü, antiapoptotik ve antifibrotik etki sağladığı rapor edilmiştir. Bu etkiler, gallik asidin IL-6'nın aşırı aktivasyonunu önleyerek rejenerasyon sürecini destekleyebileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, (Yousef, vd. 2010) tarafından yapılan çalışmada, gallik asidin NF-κB ve Nrf2/ARE sinyal yollarını düzenleyerek inflamatuvar yanıtları baskıladığı ve antioksidan enzim ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Böylece, sadece hücresel düzeydeki hasarı azaltmakla kalmayıp, rejenerasyon için gerekli olan fizyolojik ortamın yeniden kurulmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, IL-6/STAT3 sinyal yolunun karaciğer rejenerasyonundaki kritik rolü açıkça ortaya konmakta, ancak bu yolun dengesiz ya da aşırı aktivasyonunun olumsuz

patofizyolojik sonuçlara yol açabileceği görülmektedir. Gallik asidin, bu sinyal yolunu modüle ederek inflamatuvar yanıtı sınırladığı, oksidatif stresi azalttığı ve böylece karaciğerin rejeneratif kapasitesine katkı sunduğu çeşitli deneysel çalışmalarla desteklenmiştir (Yousef vd., 2010; Min vd., 2016; Kiseleva vd., 2021; Salem vd., 2023). Bu bağlamda, gallik asidin potansiyel terapötik etkileri daha ayrıntılı olarak araştırılmalı ve klinik uygulamalara yönelik değerlendirmelere dahil edilmelidir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Hayvan çalışmalarının tamamı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi HADYEK' dan alınan 996/2024 no'lu etik kurul kararlarındaki önerilere göre yapılan çalışmamızda 220±20 gr ağırlığında erkek Wistar albino ırkı sıçanlar kullanıldı.

3.1. Deneysel Tasarım

Bu çalışmamızda her grupta n=6 olacak şekilde rastgele seçim yöntemiyle dört ana deney grubu oluşturuldu. Ayrıca her ana grup değerlendirme zamanlarına göre dört alt gruba ayrıldı.

SHAM Kontrol Grupları (Grup I): Bu gruptaki hayvanlarda abdominal laparotomi uygulanarak karaciğere ulaşıldı ve karaciğer loblarını birbirine bağlayan zar yapıları cerrahi olarak ayrıldı. Ancak 2/3 parsiyel hepatektomi işlemi uygulanmadı. Karaciğerin ön sağ, orta ve sol loblarının birleşim bölgelerini kapsayacak şekilde cerrahi ipek iplik yerleştirildi. Daha sonra karaciğer tekrar periton altına yerleştirildi ve serum fizyolojik uygulanmasının ardından kesi bölgesi 4/0 cerrahi sütür ile kapatıldı.

- Grup I-1: 6. saat
- Grup I-2: 12. saat
- Grup I-3: 24. saat
- Grup I-4: 48. saat

PHx + Serum Fizyolojik (SF) Kontrol Grupları (Grup II): Bu gruptaki hayvanlara 2/3 parsiyel hepatektomi uygulamasının ardından tek doz serum fizyolojik (0,5 mL, intraperitoneal) verildi.

- Grup II-1: 6. saat

- Grup II-2: 12. saat
- Grup II-3: 24. saat
- Grup II-4: 48. saat

PHx + Silimarin (SLY) Grupları (Grup III): Bu grupta yer alan hayvanlara 2/3 parsiyel hepatektomi sonrasında tek doz silimarin (100 mg/kg, intraperitoneal) uygulandı.

- Grup III-1: 6. saat
- Grup III-2: 12. saat
- Grup III-3: 24. saat
- Grup III-4: 48. saat

PHx + Gallik Asit (GA) Grupları (Grup IV): Bu gruptaki deney hayvanlarına 2/3 parsiyel hepatektomi işleminden sonra tek doz gallik asit (200 mg/kg, intraperitoneal) verildi.

- Grup IV-1: 6. saat
- Grup IV-2: 12. saat
- Grup IV-3: 24. saat
- Grup IV-4: 48. Saat

3.2. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar

Deneysel çalışmaların tamamı steril koşullar altında ve steril cerrahi ekipmanlar kullanılarak yürütüldü. Sıçanlarda görülebilecek diurnal hormonal değişikliklerin deney sonuçlarını etkilemesini önlemek amacıyla tüm cerrahi işlemler sabah saatleri olan 09.00–12.00 arasında gerçekleştirildi. Deney gruplarındaki hayvanlara intramüsküler olarak 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin uygulanarak anestezi sağlandı.

Anestezi altına alınan deney hayvanları sırtüstü pozisyonda, sabit ve ılık sıcaklığa sahip bir diseksiyon platformuna yerleştirildi. Cerrahi girişim öncesinde karın bölgesi %70 etil alkol ve batikon (antiseptik solüsyon) ile temizlenerek steril hale getirildi. Daha sonra karın orta hattında yaklaşık 2–3 cm uzunluğunda bir kesi oluşturularak laparotomi uygulandı. Karaciğerin sağ, orta ve sol lobları, cerrahi teknikler kullanılarak birbirine bağlayan zar yapılarından ayrıldı. Bu loblar, karaciğer dokusunun yaklaşık %68–70'ini oluşturmaktadır. Hepatik arter, portal ven ve safra kanalı gibi kritik vasküler yapılar dikkatle disseke edilmiş ve etraflarından 4/0 ipek sütür geçirilerek ligasyon yapıldı. Ligasyon tamamlandıktan sonra, bağların hemen üst kısmından kesim işlemi gerçekleştirildi.

Cerrahi işlem sonrasında meydana gelebilecek sıvı kaybına bağlı hipovolemik etkilerin önüne geçmek amacıyla karın boşluğuna steril serum fizyolojik verildi. Operasyon tamamlandıktan sonra kas ve deri dokuları ayrı ayrı olacak şekilde sürekli sütür tekniği kullanılarak 4/0 ipek iplikle kapatıldı. Laparotomi bölgesi ayrıca poviiodeks antiseptik solüsyon ile temizlenerek iyileşme sürecine destek sağlandı. Cerrahi işlem uygulanan deney hayvanlarının her biri kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tekli barınmaya uygun polikarbonat şeffaf kafeslere yerleştirildi. Hayvanlar diyetlerinde herhangi bir değişiklik yapılmadan belirlenen süreler boyunca (6, 12, 24 ve 48 saat) yaşamlarını sürdürdü.

Deney gruplarında yer alan tüm hayvanlar cerrahi girişimden 6, 12, 24 ve 48 saat sonra hafif anestezi altında kalpten kan alınması yöntemiyle sakrifiye edildi. Daha sonra orta hat laparotomisi ile gerçekleştirilen diseksiyon sonucunda karaciğer doku örnekleri toplandı. Elde edilen kan örnekleri, MSE Mistral 2000 marka santrifüj cihazı kullanılarak örnekler 4000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi ve serum elde edilmiştir. Elde edilen serum örnekleri Eppendorf tüplerine aktarıldı ve biyokimyasal alanin aminotransferaz (ALT) analizleri için −80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Diseksiyon sırasında alınan karaciğer doku örnekleri ise moleküler biyolojik analizlerde kullanılmak üzere homojenize edilmiş ve aynı şekilde −80 °C'de muhafaza edildi.

3.3. Biyokimyasal Analizler

ALT düzeyi, Biolabo (Maizy, Fransa) firmasına ait ticari kit kullanılarak Crony Airone 200 RA otoanalizöründe belirlendi.

3.3.1. Moleküler Biyolojik Analizler

Bu çalışmada STAT3 ve c-Myc gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Protein düzeyindeki c-Myc ekspresyonu ise β-aktin referans protein kullanılarak Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.3.2. RT-PCR Analizi

IL-6 sinyal yoluna ait STAT3 ve c-Myc gen ifadeleri RT-PCR analizi ile analiz edildi. Bu nedenle öncelikle aşağıdaki protokol sırasına göre RNA izolasyonu yapıldı.

Lizis Buffer (1 örnek için)

Buffer L 500 uL

14,3 M Beta merkaptoetanol 10 µL

- ✓ 10–20 mg materyal üzerine 200 µL Ca/Mg içermeyen PBS eklendi. Ardından 10 µL Proteinaz K (20 mg/ml), 500 µL lizis buffer ve 60 mg zirkonyum bead ilave edilerek homojenizatörde homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen homojenizat yeni bir 2 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
- ✓ Numune oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
- ✓ Daha sonra karışıma 500 µL Buffer P eklendi, vorteks ile iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika daha inkübasyona bırakıldı.

- ✓ Karışımın üzerine 200 µL kloroform:izoamil alkol (49:1) karışımı ilave edildi. Tüp alt-üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi.
- ✓ Ardından karışım 4°C'de 12000 × g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan üst sıvı fazdaki yaklaşık 600 µL süpernatant dikkatlice alınarak yeni bir tüpe transfer edildi.
- ✓ Süpernatant üzerine %96–100 etanolün 1.25 katı (yaklaşık 800 µL) eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı.
- ✓ Hazırlanan lizattan 700 µL kolona aktarıldı ve oda sıcaklığında 12000 × g'de 20 saniye santrifüj edildi. Tüp boşaltıldı ve kolon tekrar tüpün içerisine yerleştirildi. Tüm lizat kolona aktarılıncaya kadar aynı işlem tekrarlandı.
- ✓ Kolon üzerine 700 µL Wash Buffer 1 eklendi ve 12000 × g'de 20 saniye santrifüj edildi. Ardından tüp boşaltılarak kolon tekrar tüpe yerleştirildi.
- ✓ Daha sonra kolona 600 µL Wash Buffer 2 ilave edildi ve 12000 × g'de 20 saniye santrifüj edildi. Tüp boşaltıldı ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi.
- ✓ Aynı işlem tekrar edilerek kolona yeniden 600 µL Wash Buffer 2 eklendi ve 12000 × g'de 20 saniye santrifüj edildi. Tüp boşaltıldı ve kolon tekrar tüpe yerleştirildi.
- ✓ Kolon, kalıntı sıvının uzaklaştırılması amacıyla maksimum hızda 1 dakika daha santrifüj edildi ve ardından 1.5 mL'lik eppendorf tüpünün üzerine yerleştirildi.
- ✓ Kolonun merkezine 65–70°C'de ısıtılmış 50–100 µL nükleaz-free ultra distile su veya DEPC'li su eklendi ve 12000 × g'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA elüe edildi.
- ✓ Elde edilen RNA, cDNA sentezi yapılıncaya kadar −80°C'de muhafaza edildi.

cDNA sentezi aşamasında RNA örneklerinin miktarı Nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları ng/µL biriminde elde edildiğinden, reaksiyonlar 1000 ng RNA esas alınarak hazırlandı. Bu doğrultuda gerekli hesaplamalar Formül 1 kullanılarak yapıldı. Her bir örnek için cDNA standart reaksiyonuna ait hacim hesaplamaları Çizelge 3.1'de gösterildi.

Her bir örnek için;

$$\begin{array}{cc} 1\text{uL} & (\text{cihazda değer})\text{ng} \\ X & 1000\text{ng} \end{array}$$

$$X = 1000 \div \text{cihazda ölçülen değer (µL) biçiminde hesaplama yapıldı}$$

FORMÜL 1

Çizelge 3.1. cDNA Standart Reaksiyon

cDNA Standart Reaksiyon (1 örnek için)	**Hacim**
5X Reaction Buffer	4 µL
Reverse Transcriptase (200 U/µL)	1 µL
Total RNA	1-6 µL
RNase free Water	x µL

Reaksiyonda kullanılacak örnek sayısına göre yukarıda belirtilen birim değerler ilgili örnek sayısı ile çarpılarak toplam hacim hesaplanmıştır. Hazırlanan karışım 1.5 mL'lik eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Elde edilen mix karışımı kuyucuklara eşit miktarda dağıtılmıştır. Her bir örnek için mix karışımının toplam hacmi 20 µL olacak şekilde planlanmıştır. Bu nedenle her örneğe ait RNA miktarı eklenerek toplam hacim 20 µL'ye tamamlanmış, gerekli su miktarı buna göre hesaplanmıştır.

Data sheet'te belirtilen sıcaklık ve süre parametreleri, Çizelge 3.2'de gösterildiği şekilde RT-PCR cihazına girilerek reaksiyon programı oluşturulmuştur.

Çizelge 3.2 . RT-PCR cihazına gerilen sıcaklık ve süre değeleri.

	1. Aşama	**2. Aşama**	**3. Aşama**
Sıcaklık	42°C	80°C	4°C
Süre	120 dk	10 dk	∞

Belirtilen primerler, data sheet'te verilen bilgilere uygun olarak sulandırılmış ve hazırlanan stok çözeltiler 10 µM konsantrasyonda olacak şekilde dilüe edildi (Çizelge 3.3). PT-PCR reaksiyon karışımı ise üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda hazırlanmış olup, kullanılan bileşenler ve hacimleri Çizelge 3.4'te gösterildi.

Çizelge 3.3. Genlere göre tasarlanmış olan primer dizileri ve baz çiftleri.

Primer Adı	Dizi	Bç
Beta Actin Forward	CCAGGAGTACGATGAGTCCG	20
Beta Actin Reverse	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	20
STAT-3 Forward	GGTACAATCCCGCTCGGTG	19
STAT-3 Reverse	AGCTGGTTCCACTGAGCCAT	20
c-Myc Forward	CGAGCTGAAGCGTAGCTTTT	20
c-Myc Reverse	CTCGCCGTTTCCTCAGTAAG	20

Çizelge 3.4. RT-PCR standart reaksiyon

RT-PCR için Kullanılan Madde Miktarları (1 örnek)	**Hacim**
Master Mix	10 µL
cDNA (10 ng/µL)	2 µL
Forward Primer (10µM)	1 µL
Reverse Primer (10µM)	1 µL
Dna free saf su	6 µL
Total Hacim	20 µL
cDNA haricinde komponentler mix biçiminde hazırlanarak kuyulara dağıtıldı. Ardından kuyulara cDNA eklerek PCR kuyuları reaksiyona hazır hale getirildi.	

Gerçek zamanlı PCR analizlerinde kullanılan termal döngü Çizelge 3.5'te sunulduğu gibidir.

Çizelge 3.5. RT-PCR analizlerinde kullanılan termal döngü protokolü.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü	Adım
95	5 dk		Cycling Stage
95	15 sn	x40	
60	30 sn		
72	30 sn		
95	15 sn		Melt Curve Stage
60	15 sn	0,2°C artış ile okuma	
95	15 sn		
60	15 sn		

3.3.3. Western Blot Analizi

Protein konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla Qubit ölçüm karışımı hazırlanmıştır. Ölçümler, Qubit Protein Assay Kit ve Qubit Protein Broad Range Assay Kit kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için çalışma çözeltisi, 199 µL Qubit Protein Buffer ile 1 µL Qubit Protein Reagent karıştırılarak hazırlandı. Ölçüm işlemi sırasında 0,5 mL'lik Qubit ölçüm tüpüne önce 198 µL hazırlandı buffer karışımı eklendı, ardından 2 µL protein örneği ilave edildi. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildikten sonra floresan ölçümü yapıldı.

Ölçüm sonucunda elde edilen değerler, uygulanan dilüsyon katsayısı ile çarpılarak örneklerin nihai protein konsantrasyonu hesaplandı.

Jel Elektroforezine Hazırlık amacıyla İlk olarak örneklerin konsantrasyonları **FORMÜL** 2' e göre ayarlandı.

$$M1.V1 = M2.V2$$

FORMÜL 2

Western blot analizinde her bir örnek için gerekli olan çözelti miktarları Çizelge 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Western blot analizinde her bir örnek için gerekli olan çözelti miktarları

Bir Örnek İçin Gereken Solüsyon Miktarı	
LDS Sample Buffer	2,5 µL
Sample Reducing Agent	1 µL
Örnek	-Hesaplanan miktar (µL)
Distile Su	6,5 µL - (sample)
Toplam	10 µL

Hazırlanan tüpler 70 °C 'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda buz üzerinde ya da +4 °C 'de bir süre bekletildi. Jelde Yürütme İşlemi için Bolt ™% 4-12 Bis-Tris Plus Jel kullanıma hazırlandi. Yürütme işlemi Running Buffer 1X solüsyonu ile gerçekleştirildi. Birinci kuyucuğa marker konuldu. 200 voltta yaklaşık olarak 30-35 dk yürütme işlemi yapıldı.

Proteinlerin membrana transfer işlemi Thermo Fisher Scientific iBlot 2 Dry Blotting System cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Jel, haznesinden çıkarılmadan önce saf su içeren bir kapta yıkanarak ayrılması kolaylaştırıldı. Daha sonra jel köşelerinden spatula yardımıyla dikkatli bir şekilde kaldırıldı ve üst kapak yavaşça çıkarılarak jel ayrıldı. Transfer işlemi, cihazın sandviç tipindeki özel membran aktarım sistemi olan iBlot 2 Transfer Stacks kullanılarak gerçekleştirildi. Transfer sürecinde 20 volt elektrik akımı uygulanarak yaklaşık 7 dakika içerisinde proteinlerin membrana aktarımı tamamlandı.

Transfer aşamasının ardından bloklama solüsyonu hazırlandı. Bu işlem için iBind Flex Solution Kit kullanıldı. Bloklama solüsyonu hazırlanırken 40 mL saf su, 10 mL 5X buffer ve 500 µL 100X additive solüsyon karıştırıldı. Transfer tamamlandıktan sonra jel uzaklaştırıldı ve transfer kağıdı üzerindeki jel görüntüsü kesilerek ayrıldı. Membran, hazırlanan bloklama solüsyonu içerisine yerleştirilerek yaklaşık 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

Antikor inkübasyon işlemi Invitrogen iBind Flex Western System cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem için cihazla uyumlu bloklama, yıkama ve antikor solüsyonları hazırlandı.

Deneyde kullanılan antikorlar aşağıda verilmiştir:

- β-Actin Antibody, Rabbit mAb, A026, ABclonal Technology
- c-Myc Antibody, Rabbit pAb, E-AB-30975, Elabscience
- Sekonder antikor: HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Catalog No: AS014, ABclonal

Protein moleküler ağırlık belirteci olarak Invitrogen SeeBlue Plus2 Prestained Standard kullanıldı.

Bloklama solüsyonu her bir antikor için 2 mL olacak şekilde hazırlandı ve hazırlanacak antikor sayısına bağlı olarak 2,5 mL'lik tüpler veya falcon tüplerine dağıtılmıştır. Ardından gerekli pipetleme işlemleri gerçekleştirildi. Membran işlemi öncesinde iBind Flex Western Device kartı 10 mL bloklama solüsyonu ile ıslatılmıştır. Membranın yerleştirileceği bölgeye aynı solüsyondan 1 mL daha eklendi. Daha sonra membran karta ters yönde yerleştirildi ve silindir yardımıyla üzerinden geçilerek yüzeye düzgün şekilde temas etmesi sağlandı. Membran cihaz içerisinde yaklaşık 3 saat inkübe edildi.

İnkübasyon tamamlandıktan sonra kemilüminesans görüntüleme aşamasına geçilmiş ve ECL solüsyonu hazırlandı . Bu amaçla 1 mL luminol/enhancer solüsyonu ile 1 mL peroksidaz solüsyonu karıştırıldı. Ardından cihazdan çıkarılan membran hazırlanan solüsyon içerisine yerleştirildi.

Sisteme özgü kart üzerinde gerçekleştirilen birincil ve ikincil antikor bağlanma basamakları yaklaşık 2,5 saat içerisinde tamamlandı. Protein bantlarının görüntülenmesi

için kemilüminesans görüntüleme yöntemi kullanıldı . Bu yöntemde luminol temelli kimyasal reaksiyon prensibi esas alındığından, sekonder antikora özgü substrat olarak ECL Western Blotting Substrate tercih edildi.

1:1 oranında hazırlanan ECL solüsyonu içerisinde membran karanlık ortamda yaklaşık 5 dakika inkübe edilmiş ve ardından görüntüleme işlemine geçildi. Membran GenBox Imaging System cihazına yerleştirilmiş ve elde edilen görüntüler bilgisayara bağlı yazılım aracılığıyla kaydedildi.

Deneyde kullanılan protein örnekleri jel kuyularına 50 µg olacak şekilde hesaplanarak yüklenmiş ve elektroforez işlemi bu koşullar altında gerçekleştirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Deney gruplarına ait kan örneklerinden elde edilen serumlarda ALT düzeyleri ölçülerek karaciğer fonksiyonları değerlendirildi. Karaciğer dokularından hazırlanan homojenize örnekler moleküler biyolojik analizlerde kullanılmış ve ilgili genlerin ekspresyon düzeyleri belirlendi Elde edilen veriler, deneysel gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Karaciğer hasarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan biyokimyasal göstergelerden biri serum transaminazlardır. Bu enzimler içerisinde alanin aminotransferaz (ALT), karaciğer dokusuna özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesinde daha duyarlı bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Parsiyel hepatektomi (pHx) sonrasında gallik asidin karaciğer fonksiyonları üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek amacıyla serum ALT düzeyleri analiz edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda her bir gruba ait ortalama değerler ve standart sapmalar hesaplanarak Çizelge 4.1'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Gruplara göre ALT değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları.

Grup	**Mean ± SD**
SHAM	45.02 ± 1.44
Grup II (PHx + SF) (6 saat)	227.50 ± 44.52
Grup II (PHx + SF) (12 saat)	380.47 ± 94.65
Grup II (PHx + SF) (24 saat)	352.00 ± 108.60
Grup II (PHx + SF) (48 saat)	208.30 ± 41.91

Çizelge 4.1. Gruplara göre ALT değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları (devam).

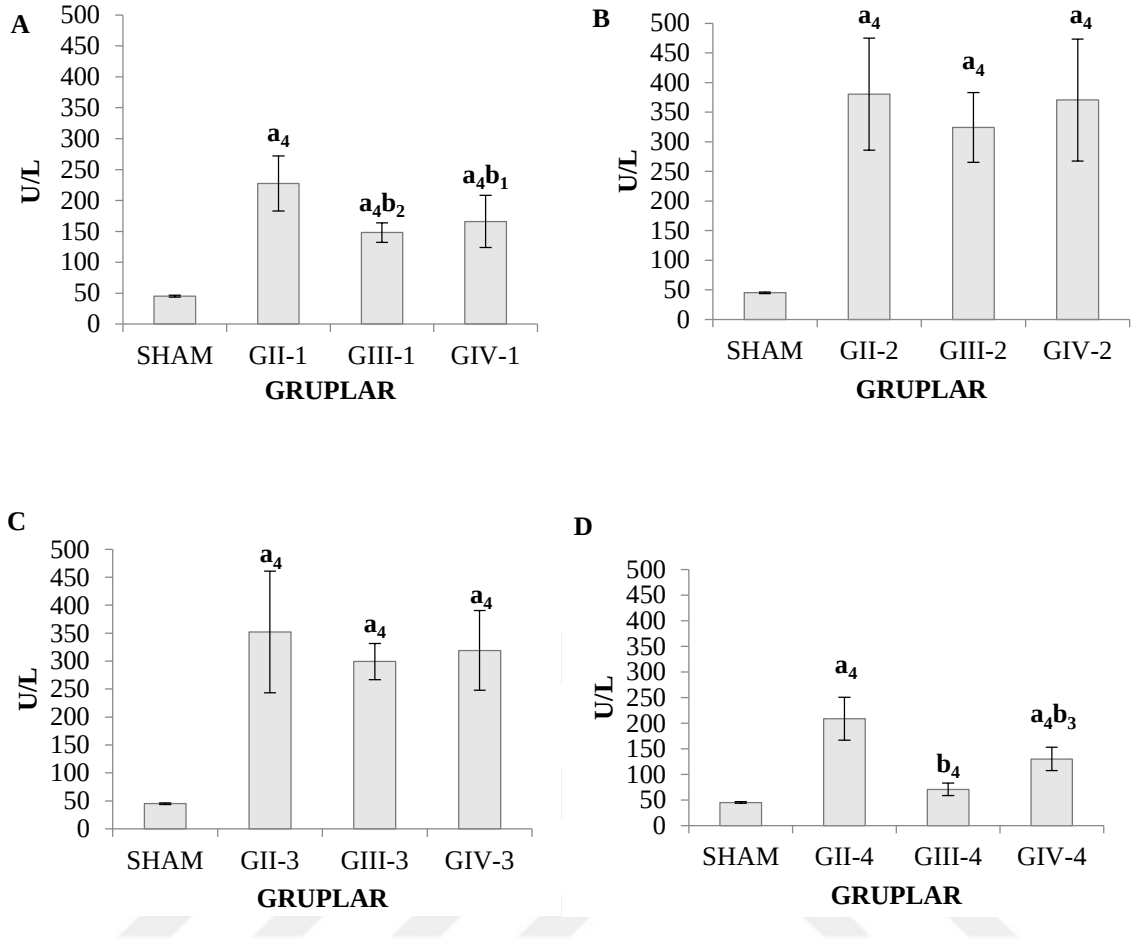
Grup	Mean ± SD
Grup III (PHx + SLY) (6 saat)	148.00 ± 15.66
Grup III (PHx + SLY) (12 saat)	324.21 ± 58.85
Grup III (PHx + SLY) (24 saat)	299.17 ± 32.51
Grup III (PHx +SLY) (48 saat)	70.50 ± 12.21
Grup IV (PHx + GA) (6 saat)	166.00 ± 42.19
Grup IV (PHx + GA) (12 saat)	370.40 ± 103.03
Grup IV (PHx + GA) (24 saat)	318.93 ± 71.29
Grup IV (PHx + GA) (48 saat)	130.00 ± 23.02

Çalışmamızda kısmı hepatektomi sonrası serum ALT düzeylerinin zamana bağlı değişimi değerlendirildiğinde, 6. saatte tüm deney gruplarında SHAM grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğu görülmektedir Şekil 4.1.A . Bu erken dönemde gözlenen ALT yükselmesi, PHx sonrasında hepatoselüler membran bütünlüğünün bozulmaya başladığını ve akut hasar yanıtının aktive olduğunu düşündürmektedir. Özellikle GIII-1 grubunda ALT düzeylerinin GII-1 ve GIV-1 gruplarına göre daha düşük seyretmesi, Gallik asit uygulamasının erken akut fazda karaciğer hücrelerini kısmen koruyucu bir etki gösterebileceğine işaret etmektedir. Buna karşın PHx+SF (GII-1) ve PHx+GA (GIV-1) gruplarında daha belirgin ALT artışı izlenmiş olup, bu gruplarda erken dönemde hepatoselüler stresin daha yüksek olduğu söylenebilir.

PHx sonrası 12. saatlik zaman diliminde serum ALT düzeylerinin tüm deney gruplarında belirgin şekilde yükseldiği ve SHAM grubuna kıyasla anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır $p<0,0001$; Şekil 4.1.B . Bu zaman noktasında gruplar arasında ALT düzeyleri açısından belirgin bir ayrışma gözlenmemesi, uygulanan tedavilerin bu fazda hepatoselüler hasarın şiddeti üzerinde sınırlı bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

24. saatte serum ALT düzeylerinin tüm gruplarda en yüksek değerlere ulaştığı görülmektedir Şekil 4.1.C . Bu bulgu, 24. saatin hepatoselüler hasarın en yoğun olarak izlendiği ve aynı zamanda rejeneratif süreçlerin metabolik açıdan en aktif olduğu dönem olduğunu göstermektedir. Bu zaman noktasında GIV-3 grubunda ALT düzeylerinin GII-3 ve GIII-3 gruplarına kıyasla daha düşük seyretmesi, silimarin bu fazda hücre membran stabilitesini destekleyerek hepatoprotektif bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık GA uygulanan grupta ALT düzeylerinin görece yüksek kalması, bu ajanının geç akut fazda artan metabolik aktiviteyle ilişkili olarak enzim salınımını artırabileceğine işaret etmektedir.

PHx sonrası 48. saatte serum ALT düzeylerinin tüm gruplarda belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir Şekil 4.1.D . Bu düşüş, hepatoselüler bütünlüğün yeniden sağlanmaya başladığını ve toparlanma fazına girildiğini göstermektedir. Özellikle GIII-4 grubunda ALT düzeylerinin SHAM'a daha yakın değerlere gerilemesi, GA grubu geç fazda karaciğer hasarının çözülmesine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın GII-4 grubunda ALT düzeylerinin görece yüksek kalması, taşıyıcıya bağlı olarak iyileşme sürecinin daha yavaş ilerlediğini göstermektedir.



Şekil 4.1 Deney gruplarında saatlere göre ALT (U/L) düzeyleri. (A) 6 saat (B) 12 saat (C) 24 saat ve (D) 48 saat. a: SHAM grubundan farkı, b: GrupII'den farkı, c: GrupIII'ten farkı temsil etmektedir. (1: $p<0,05$, 2:$p<0,01$, 3:$p<0,001$, 4:$p<0,0001$).

Literatürde, PHx sonrası 48-72 saatlik dönemde serum transaminaz düzeylerinin hızla azaldığı ve 3-5 gün içerisinde bazal değerlere yaklaştığı bildirilmiştir (Kohler vd., 2019). Sonuç olarak, çalışmamız, serum ALT düzeylerindeki zamansal değişimin, kısmi hepatektomi sonrası hepatosit hasarının, uygulanan tedavilere bağlı olarak farklı aşamalarda değişen yanıtlarla dinamik bir süreç olduğunu gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, ALT düzeylerinin tek başına karaciğer hasarının derecesini tam olarak yansıtmadığı düşünülmektedir; bu nedenle, biyokimyasal bulgular moleküler ve histopatolojik verilerle birlikte değerlendirilmelidir. Ayrıca, farklı terapötik ajanların karaciğer rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin kapsamlı bir şekilde incelenmesi, karaciğer koruma ve rejenerasyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

Çeşitli çalışmalar, silimarin ve gallik asidin karaciğer hasarına karşı koruyucu etkiler sergilediğini ve bu etkilerin temel olarak antioksidan ve antiinflamatuar özellikleriyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Silimarinin; oksidatif stresin baskılanması, lipid peroksidasyonunun azaltılması ve inflamatuar hücre infiltrasyonunun inhibe edilmesi yoluyla, ilaçlara veya cerrahi girişimlere bağlı gelişen akut karaciğer hasarı modellerinde alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesini anlamlı düzeyde azalttığı bildirilmiştir (Polyak vd., 2013; Federico vd., 2017).

Benzer biçimde, son dönem literatürde gallik asidin belirgin hepatoprotektif özelliklere sahip olduğu vurgulanmaktadır. Gallik asit uygulamasının; lipid peroksidasyonunu baskılaması, endojen antioksidan enzimlerin aktivitesini artırması ve proinflamatuar sitokin üretimini azaltması yoluyla deneysel karaciğer hasarı modellerinde ALT düzeylerinde anlamlı düşüşlere neden olduğu gösterilmiştir (Kang vd., 2019; Zhang vd., 2021). Bu çalışmada, diğer hepatektomi gruplarıyla karşılaştırıldığında, silimarin (GII-3) ve gallik asit (GIV-3) uygulanan gruplarda 24. saatte ALT düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. Bu bulgu, her iki bileşiğin kısmi hepatektomi sonrasında gelişen hepatoselüler hasarı azaltmada potansiyel bir koruyucu role sahip olabileceğini düşündürmektedir. Gözlenen bu iyileşmenin, silimarin ve gallik asidin antiinflamatuar ve antioksidatif özellikleri aracılığıyla hepatosit bütünlüğünü koruması ve rejeneratif süreçleri desteklemesiyle ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir.

Önceki çalışmalarda, deneysel hayvan modellerinde kısmi hepatektomi sonrası ALT düzeylerinin genellikle 48-72 saat içinde azalma eğilimi gösterdiği ve bu durumun hepatik adaptasyon ve rejenerasyon mekanizmalarının aktivasyonunu yansıttığı bildirilmiştir (Furuta vd., 2000; Aoki vd., 2001; Uyanoglu vd., 2008). Bu literatürle uyumlu olarak, çalışmamızda tüm hepatektomi gruplarında 24. saatte ALT düzeylerinde bir düşüş gözlenmiş; bu azalmanın silimarin ve gallik asit uygulanan gruplarda daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.

4.1.1. Moleküler Biyolojik Sonuçları v Analitik Değerlendirmesi

Bu bölümde, RT-PCR ve Western blot yöntemleriyle elde edilen moleküler düzeydeki veriler aktarıldı ve değerlendirildi. Yapılan analizler, parsiyel hepatektomi sonrasında karaciğerde meydana gelen hücresel proliferasyon, büyüme süreçleri ve ilgili sinyal yolaklarındaki değişimlerin incelenmesi amacıyla gerçekleştirildi. RT-PCR ile seçilen genlerin transkripsiyon düzeyleri, Western blot ile ilgili proteinlerin ekspresyon durumları incelendi, böylece gen-protein ilişkileri bütüncül olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, gruplar arasındaki biyolojik farklılıkların ve deneysel protokollerin hücresel yanıtlar üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına temel oluşturdu.

4.1.1.1. RT-PCR Analizi Sonuçları ve Değerlendirilmesi

RT-PCR analizleri kapsamında STAT3 ve c-Myc genlerinin relatif ekspresyon düzeyleri Çizelge (4.2)'de özetlenmiştir. Elde edilen veriler, parsiyel hepatektomi sonrası hücresel proliferasyon ve büyüme süreçlerinde bu genlerin gruplar arasında farklı seviyelerde düzenlendiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, PCR analizleri sonucunda elde edilen ortalama (Mean) ± standart sapma (SD) değerleri, Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Bu çizelge, ölçümlerin istatistiksel dağılımını göstermekte ve gruplar arasındaki karşılaştırmaların güvenilirliğini desteklemektedir.

Çizelge 4.2. Genlerin Ekspresyon Düzeyleri (Mean ± SD).

Grup	STAT3	c-Myc
SHAM	1.08 ± 0.50	1.02 ± 0.23
GII-1	1.04 ± 0.45	0.94 ± 0.38
GII-2	0.52 ± 0.28	0.55 ± 0.14
GII-3	0.48 ± 0.19	0.46 ± 0.21
GII-4	1.3 ± 1.0	0.38 ± 0.25
GIII-1	1.26 ± 0.41	1.46 ± 0.88
GIII-2	2.62 ± 2.65	2.19 ± 1.60
GIII-3	0.50 ± 0.07	1.06 ± 0.27
GIII-4	0.53 ± 0.13	1.43 ± 0.49
GIV-1	0.56 ± 0.22	1.34 ± 1.09

Çizelge 4.2. Genlerin Ekspresyon Düzeyleri (Mean ± SD)(devam).

Grup	STAT3	c-Myc
GIV-2	0.66 ± 0.13	0.50 ± 0.14
GIV-3	0.78 ± 0.14	1.89 ± 2.91
GIV-4	0.61 ± 0.14	3.66 1.43

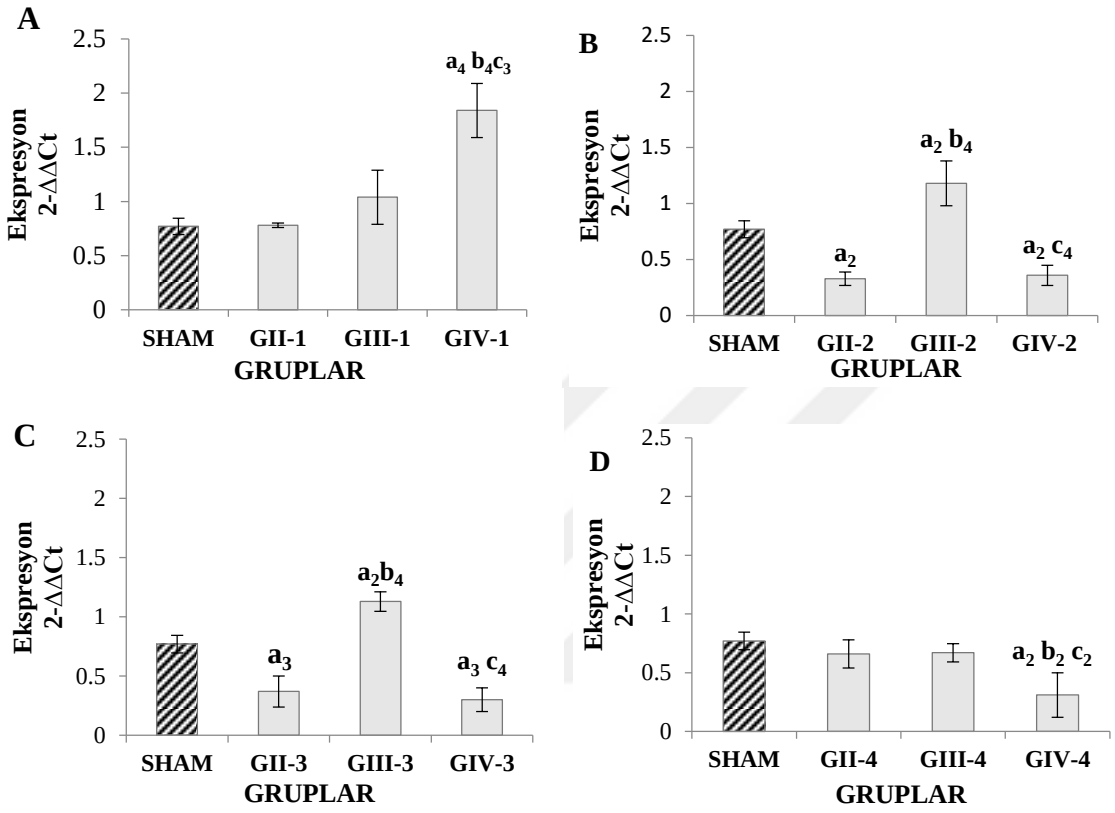
STAT3 gen ekspresyonunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.2'te gösterilmiştir. 6. saatte STAT3 ekspresyon düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılıklar göstermiştir. Bu zaman noktasında Grup IV'ün STAT3 ekspresyonu kontrol grubuna ($p<0.0001$), Grup II'ye ($p<0.001$) ve Grup III'e ($p<0.01$) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Grup III'te STAT3 ekspresyonu kontrol grubuna göre artış eğilimi göstermekle birlikte istatistiksel olarak sınırlı düzeyde kalmıştır. Bu bulgular, erken fazda STAT3 aktivasyonunun özellikle Grup IV'te belirgin şekilde uyarıldığını göstermektedir Şekil 4.2.A.

12. saatte gruplar arasında STAT3 ekspresyonu açısından belirgin farklılıklar izlenmiştir. Grup III'ün STAT3 ekspresyonu, kontrol grubuna ($p<0.01$) ve Grup II'ye ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı derecede artmıştır. Buna karşılık Grup II ve Grup IV'ün STAT3 ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.01$) Şekil 4.2.B. Bu sonuçlar, 12. saatte STAT3 aktivasyonunun Grup III'te baskın hâle geldiğini düşündürmektedir.

24. saatte STAT3 ekspresyonundaki gruplar arası farklılıkların sürdüğü gözlenmiştir. Bu zaman noktasında Grup III'ün STAT3 ekspresyonu, kontrol grubuna ($p<0.01$) ve Grup II'ye ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Buna karşılık Grup II ve Grup IV'ün STAT3 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.001$) Şekil 4.2.C. Bu bulgular, 24. saatte STAT3 aktivasyonunun Grup III'te devam ettiğini göstermektedir.

48. saatte STAT3 ekspresyon düzeylerinde genel olarak düşüş eğilimi gözlenmiştir. Bu zaman noktasında Grup IV'ün STAT3 ekspresyonu, kontrol grubuna ($p<0.01$), Grup II'ye ($p<0.01$) ve Grup III'e ($p<0.01$) kıyasla anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur.

Diğer gruplar arasında belirgin bir farklılık izlenmemiştir (Şekil 4.2.D). Bu sonuçlar, geç fazda STAT3 aktivasyonunun özellikle Grup IV'te baskılandığını göstermektedir.



Şekil 4.2. Deney gruplarında saatlere göre STAT3 gen ekspresyon düzeyleri. (A) 6 saat (B) 12 saat (C) 24 saat ve (D) 48 saat. **a:** SHAM grubundan farkı, b**:** GrupII'den farkı**, c**:Grup III'ten farkı temsil etmektedir.(**2: p**<0.01**, 3: p**<0.001 **ve 4: p**<0.0001**)**.

Güncel çalışmalar, hepatotomi ve parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunun başlatılmasında IL-6/STAT3 sinyal yolunun merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. IL-6'nın gp130 aracılığıyla STAT3'ü fosforile etmesi, hepatositlerin hücre döngüsüne girmesini sağlayarak akut faz yanıtını ve rejeneratif gen ekspresyonunu tetiklemektedir (Cressman vd., 1996; Taub, 2004). Bununla birlikte, STAT3 aktivasyonunun zamansal düzenlenmesi rejenerasyonun başarısı açısından kritik olup, aşırı veya düzensiz aktivasyonun inflamatuvar yanıtı artırarak doku iyileşmesini olumsuz etkileyebileceği bildirilmektedir (Yu vd., 2009).

Literatürde, STAT3'ün erken fazda aktive olmasının rejenerasyonun başlatılması için gerekli olduğu, orta fazda ise proliferatif yanıtın sürdürülmesinde etkili olduğu

belirtilmiştir. Özellikle 24. saatin STAT3 aktivasyonunun zirve yaptığı kritik bir zaman noktası olduğu vurgulanmaktadır (Haga vd., 2005; Michalopoulos, 2017). Geç fazda ise STAT3 aktivasyonunun azalmakla birlikte tamamen ortadan kalkmaması, doku yeniden yapılanması ve hepatik homeostazın sağlanması açısından önemlidir (Klein vd., 2019).

Çalışmamızda, PHx+SF grubu (GII) ile Galik Asit (GA) uygulanan gruplar (GIV) değerlendirildiğinde, STAT3 ekspresyonunun zamana bağlı olarak farklı şekilde modüle edildiği görülmektedir. Erken dönemde, özellikle 6. saatte Grup IV'te STAT3 ekspresyonunun belirgin şekilde artması**,** akut faz yanıtının güçlü biçimde aktive edildiğini düşündürmektedir. Erken fazda (12. saat), Grup IV (gallik asit)'te STAT3 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla baskılanmış olması, GA'nın hepatotomi sonrası gelişen akut inflamatuvar yanıtı sınırlayıcı bir etki gösterdiğini düşündürmektedir. STAT3'ün erken dönemde inflamasyonla ilişkili sinyallerde aktif rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda, bu baskılanma gallik asidin antiinflamatuvar özellikleriyle uyumlu görünmektedir. Bu durum, erken fazda aşırı inflamasyonun kontrol altına alınmasının, daha düzenli bir rejeneratif sürecin başlaması açısından koruyucu bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir.

Orta fazda (24. saat), gallik asit grubunda STAT3 düzeylerinin silimarin grubuna ve SHAM grubuna kıyasla düşük seyretmesi, GA'nın proliferatif yanıtı STAT3 aracılığıyla doğrudan artırmak yerine, rejeneratif süreci dolaylı mekanizmalar üzerinden modüle ettiğini göstermektedir. Bu bulgu, gallik asidin hepatosit proliferasyonundan ziyade hücresel stres yanıtlarının düzenlenmesi ve oksidatif hasarın azaltılması yoluyla iyileşmeye katkı sağladığı görüşünü desteklemektedir.

Geç fazda (48. saat), STAT3 ekspresyonunun genel olarak azalması, rejenerasyon sürecinin proliferatif fazdan onarım ve doku stabilizasyonu fazına geçtiğini göstermektedir. Bu dönemde Grup IV (gallik asit)'te STAT3 düzeylerinin baskılanmış olması, gallik asidin geç fazda STAT3 aracılı antiapoptotik sinyalleri sınırlayarak kontrollü bir doku yeniden yapılanmasını desteklediğini düşündürmektedir. Aşırı veya uzamış STAT3 aktivasyonunun fibrotik süreçleri tetikleyebileceği göz önünde bulundurulduğunda, bu durum gallik asidin rejeneratif yanıtı dengeleyici bir rol üstlendiğine işaret etmektedir.

Silimarin grubunda gözlenen daha yüksek STAT3 aktivasyonu ile karşılaştırıldığında, gallik asidin IL-6/STAT3 yolunu daha sınırlı ve zamana duyarlı biçimde modüle ettiği görülmektedir. Bu farklılık, gallik asidin karaciğer rejenerasyonunu güçlü bir proliferatif uyarım yerine, inflamasyonun kontrolü, oksidatif stresin azaltılması ve hücresel homeostazın korunması üzerinden desteklediğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları gallik asidin hepatotomi sonrası dönemde IL-6/STAT3 sinyal yolunu baskılayıcı ve dengeleyici biçimde düzenlediğini, böylece karaciğer rejenerasyonunu zamana bağlı olarak modüle ettiğini ortaya koymaktadır. Gallik asidin erken fazda inflamatuvar yanıtı sınırladığı, orta fazda rejeneratif süreci stabilize ettiği ve geç fazda kontrollü onarım mekanizmalarını desteklediği söylenebilir. Bu yönüyle gallik asit, karaciğer cerrahisi sonrası iyileşme süreçlerinde rejenerasyonu aşırı uyarımdan koruyan ve fizyolojik sınırlar içinde tutan potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebilir.

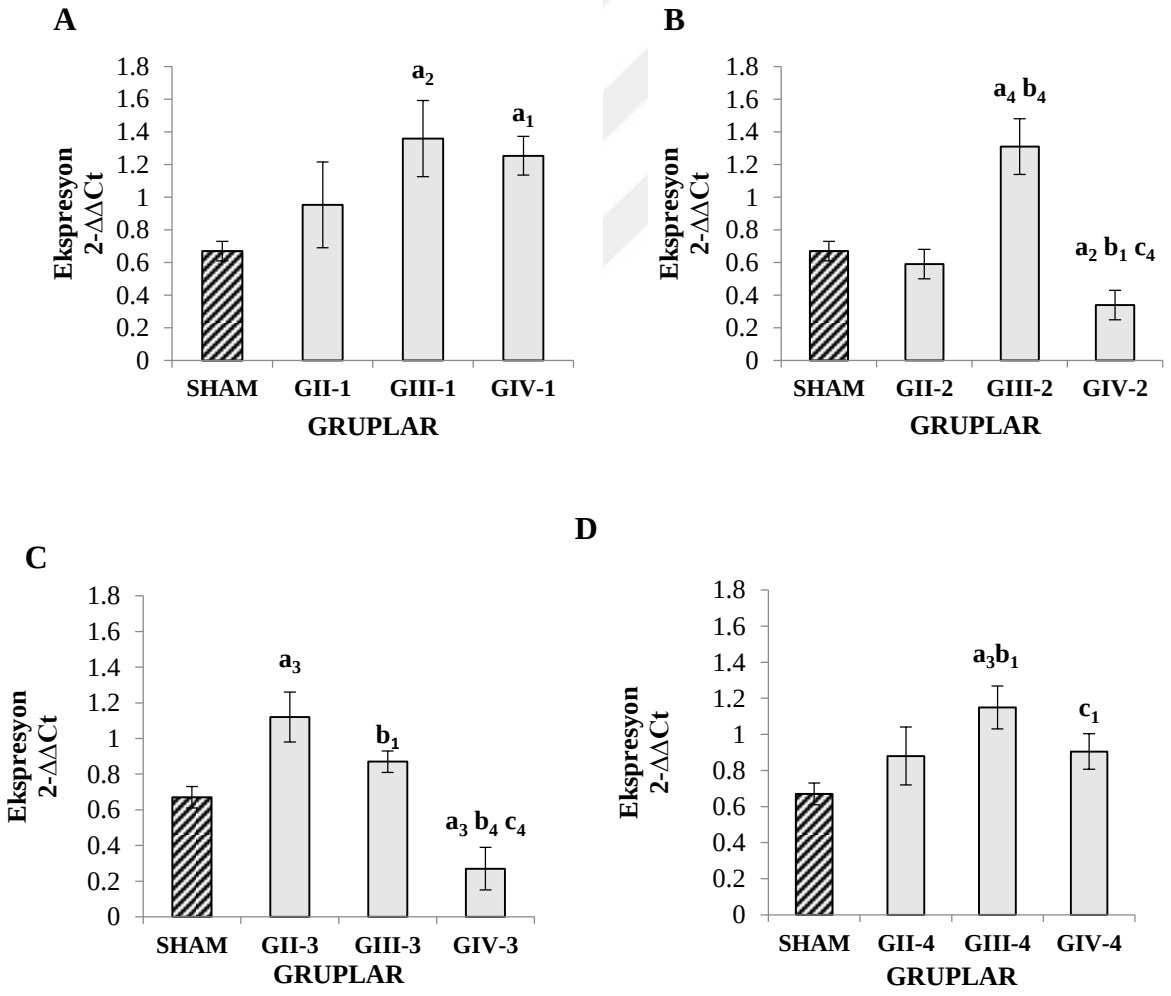
c-Myc gen ekspresyonunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.3'te gösterilmiştir. 6. saatte c-Myc ekspresyonu gruplar arasında anlamlı farklılıklar göstermiştir. Bu zaman noktasında Grup III'ün c-Myc ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olup ($p<0.01$), Grup II'ye kıyasla da daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup IV'te c-Myc ekspresyonu, kontrol grubuna göre artış göstermekle birlikte Grup III'e kıyasla daha düşük düzeyde saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.3.A) . Bu bulgular, erken fazda c-Myc aktivasyonunun özellikle Grup III'te belirginleştiğini göstermektedir.

12.saatte gruplar arasında c-Myc ekspresyon düzeyleri açısından belirgin farklılıklar izlenmiştir. En yüksek c-Myc ekspresyonu Grup III'te saptanmış ve bu artış kontrol grubuna ($p<0.0001$) ve Grup II'ye ($p<0.01$) kıyasla anlamlı bulunmuştur. Buna karşılık Grup IV'ün c-Myc ekspresyonu, kontrol grubuna ($p<0.01$), Grup II'ye ($p<0.05$) ve Grup III'e ($p<0.0001$) göre anlamlı derecede daha düşük düzeyde belirlenmiştir (Şekil 4.3.B) . Bu sonuçlar, 12. saatte c-Myc aktivitesinin Grup III'te maksimum düzeye ulaştığını düşündürmektedir.

24. saatte c-Myc ekspresyonundaki gruplar arası farklılıkların devam ettiği gözlenmiştir. Bu zaman noktasında Grup II'nin c-Myc ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). Ancak Grup III'ün ekspresyon düzeyi, Grup

II'ye göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grup IV'te ise c-Myc ekspresyonu tüm gruplar arasında en düşük düzeyde saptanmış ve hem Grup II'ye hem de Grup III'e kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.0001$) (Şekil 4.3.C). Bu bulgular, 24. saatte c-Myc aktivasyonunun Grup II'de baskın hâle geldiğini göstermektedir.

48.saatte genel olarak c-Myc ekspresyon düzeylerinde önceki zaman noktalarına kıyasla nispi bir azalma eğilimi gözlenmiştir. Bununla birlikte Grup III'ün c-Myc ekspresyonu kontrol grubuna göre hâlen anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Grup IV'ün ekspresyon düzeyi ise Grup III'e kıyasla anlamlı derecede daha düşük saptanmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.3.C). Bu sonuçlar, c-Myc aktivasyonunun geç fazda Grup III'te sürdüğünü, Grup IV'te ise baskılanmaya devam ettiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.3. Deney gruplarında saatlere göre c-Myc gen ekspresyon düzeyleri. (A) 6 saat (B) 12 saat (C) 24 saat ve (D) 48 saat. **a:**SHAM grubundan farkı, **b:** Grup II'den farkı**, c**:Grup III'ten farkı temsil etmektedir.**(1: p**<0.05**, 2: p**<0.01**, 3: p**<0.001 ve **4: p**<0.0001**)**.

2/3 parsiyel hepatektomi (PHx) sonrası karaciğer rejenerasyonunun en erken moleküler yanıtlarından biri, hemen erken yanıt genleri arasında yer alan c-Myc ekspresyonunun hızlı ve geçici indüksiyonudur. c-Myc, hepatositlerde hücre büyümesi, ribozomal biyogenez, metabolik aktivasyon ve hücre döngüsüne giriş için gerekli transkripsiyonel programın başlatılmasında merkezi bir rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (Taub, 2004 ; Fausto vd., 2006). Önceki çalışmalarda, 2/3 PHx sonrasında c-Myc mRNA ve protein düzeylerinin ilk birkaç saat içinde belirgin şekilde arttığı ve bu artışın hepatositlerin G_0 fazından çıkışının temel göstergelerinden biri olduğu bildirilmiştir (Morello, vd., 1990; Michalopoulos, 2007). Bu erken c-Myc aktivasyonu, rejeneratif yanıtın başlatılması için gerekli kabul edilmekte, ancak ekspresyonun süresi ve düzeyi rejenerasyonun fizyolojik sınırlar içinde kalması açısından kritik önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, c-Myc ekspresyonu bakımından PHx uygulanan gruplarda SHAM grubuna kıyasla artış olduğu, ancak GA uygulanan Grup IV'te bu artışın daha dengeli ve kontrollü bir seyir izlediği görüldü. Özellikle 24. ve 48. saatlerde gözlenen c-Myc ekspresyon düzeyleri, hepatositlerin rejeneratif yanıtı başlattığını ancak proliferatif aktivitenin aşırı uyarılmadığını düşündürmektedir. GA uygulamasının, c-Myc aracılı erken transkripsiyonel yanıtı baskılamadan modüle ettiği ve bu sayede rejenerasyon sürecini fizyolojik sınırlar içerisinde yönlendirdiği değerlendirilebilir. c-Myc ekspresyonunun uzamış veya aşırı artış göstermesinin, kontrolsüz hücre proliferasyonu ve hepatokarsinogenez ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Beer, vd., 2004; Murphy, vd., 2008). Bu bağlamda, GA uygulanan Grup IV'te c-Myc düzeylerinin SHAM ve diğer PHx gruplarına kıyasla aşırı yükselmemesi, karaciğer rejenerasyonunun sağlıklı ve kontrollü bir şekilde ilerlediğine işaret edebilir. İlerleyen zaman noktalarında c-Myc ekspresyonunda gözlenecek bir azalma, hepatositlerin proliferatif fazdan çıkıp doku organizasyonu ve fonksiyonel olarak iyileşme sürecine girdiğini destekleyen önemli bir gösterge olacaktır. Sonuç olarak, bu çalışma GA uygulamasının, 2/3 PHx sonrası karaciğer rejenerasyonunda c-myc aracılı erken moleküler yanıtı düzenleyici bir etki gösterebileceğini ve rejeneratif proliferasyonu fizyolojik sınırlar içinde tutarak doku onarımına katkı sağladığını düşündürmektedir.

4.1.1.2. Western Blot Analizi Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Western blot analizleri kapsamında hedef proteinlerin kantitatif olarak değerlendirilebilmesi amacıyla, öncelikle doku örneklerinden toplam protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen protein konsantrasyonları Çizelge 4.3'da sunulmuştur. Bu konsantrasyonlar esas alınarak her bir örnek için eşit miktarda protein jel üzerine yüklenmiş, elde edilen Western blot bant görüntüleri Şekil 4.4'de verildi. c-myc proteinine ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak kullanılan β-aktin referans alınarak normalize edildi. Farklı deney grupları ve zaman aralıkları arasında belirlenen değişimler, parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonu sürecinde c-myc ekspresyonunun hem zamana hem de uygulamaya bağlı olarak düzenlendiğini göstermektedir. Her iki proteine ait ortalama ekspresyon değerleri ile standart sapma sonuçları Çizelge 4.4'te yer almakta olup, gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar bu veriler temel alınarak gerçekleştirildi.

Elde edilen bulgular, RT-PCR analizlerinde mRNA düzeyinde gözlenen değişimlerin protein düzeyine yansıyıp yansımadığının ortaya konulmasına imkân sağlamış; ayrıca deneysel uygulamaların erken dönem rejeneratif sinyal mekanizmaları üzerindeki etkilerinin daha bütüncül bir yaklaşımla değerlendirilmesine katkı sundu.

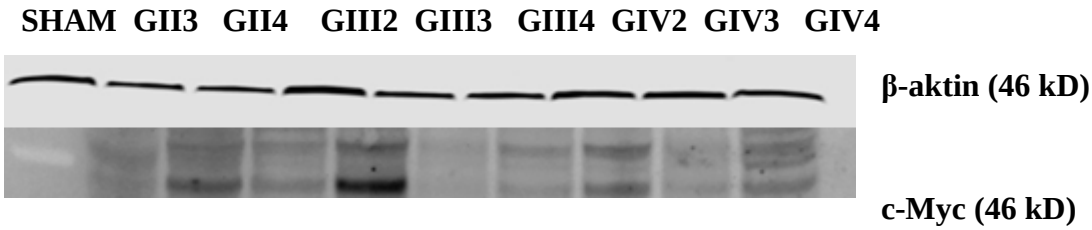
Çizelge 4.3. Protein Ölçüm Sonuçları:

Örnek İsmi	µg / µL
SHAM	42,6
GII-3	34,6
GII-4	34,2
GIII-2	31,0
GIII-3	28,6
GIII-4	28,0
GIV-2	32,4
GIV-3	24,8
GIV-4	28,0

Çizelge 4.4. Protein İfade Düzeylerinin İstatistiksel (Mean ± SD)

GRUP	Mean ± SD	
	β-aktin	**c-Myc**
SHAM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
GII-3	0.74 ± 0.01	0.33 ± 0.02
GII-4	0.74 ± 0.005	1.31 ± 0.01
GIII-2	1.26 ± 0.01	3.73 ± 0.09
GIII-3	0.85 ± 0.005	0.45 ± 0.02
GIII-4	0.87 ± 0.005	1.16 ± 0.011
GIV-2	1.087 ± 0.005	2.92 ± 0.07
GIV-3	0.087 ± 0.005	0.85 ± 0.01
GIV-4	1.00 ± 0.00	1.23 ± 0.005

Görüntüleme Sonuçları



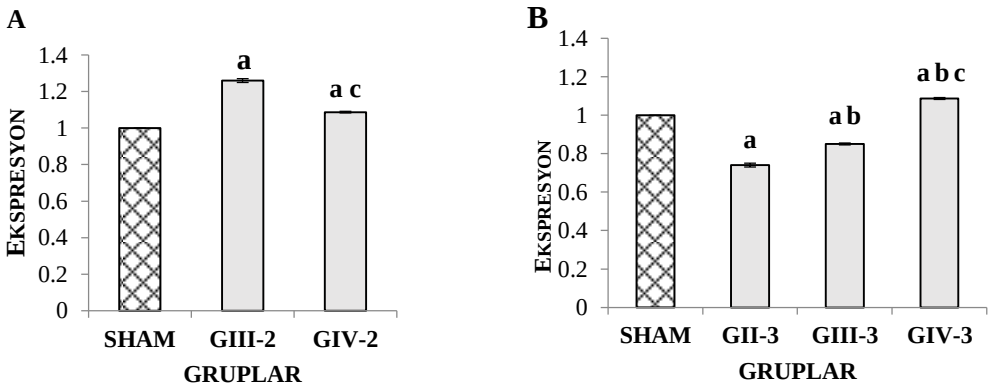
Şekil 4.4. Western Blot analizinde elde edilen β-aktin ve c-Myc proteinlerine ait bant görüntüleri.

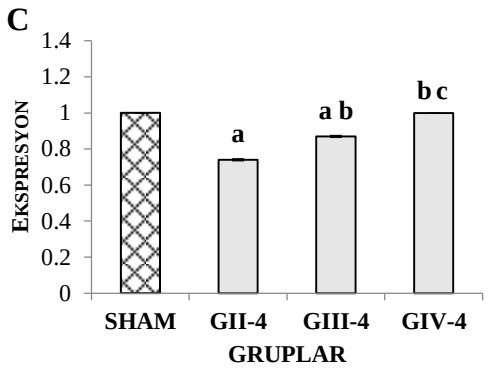
β-aktin ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.5'te gösterilmektedir. 12. saatte β-aktin ekspresyonu GIII-2 ve gallik asit uygulanan GIV-2 grubunda, SHAM grubuna kıyasla ileri derecede anlamlı olarak artmıştır ($p<0,0001$)

(Şekil 4.5.A). GIII-2 ve GIV-2 grupları arasında ekspresyon düzeyleri birbirine oldukça yakın olup, her iki grupta da SHAM grubuna göre belirgin bir yükselme gözlenmiştir. Bu bulgu, erken fazda β-aktinin protein yükleme kontrolü olmasının yanı sıra uygulanan işlemlere yanıt verebileceğini düşündürmektedir.

24. saatte β-aktin düzeyleri incelendiğinde, GIII-3 grubunda ekspresyonun SHAM ve GII-3 gruplarına kıyasla anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir ($p<0,0001$). En yüksek ekspresyon düzeyi gallik asit uygulanan GIV-3 grubunda saptanmış olup, bu artış SHAM, GII-3 ve GIII-3 gruplarının tümüne göre ileri derecede anlamlıdır ($p<0,0001$) (Şekil 4.5.B). Bu sonuçlar, 24. saat fazında β-aktin ekspresyonunun uygulanan maddeye duyarlı şekilde arttığını ve gallik asidin bu artışı belirginleştirdiğini göstermektedir.

48. saatte β-aktin ekspresyonunun SHAM grubuna kıyasla GII-4 grubun $p<0,0001$ düzeyinde anlamlı bulunurken, GIII-4 grubunda artış daha belirgin hale gelmiştir ($p<0,0001$). En yüksek ekspresyon düzeyi yine gallik asit uygulanan GIV-4 grubunda saptanmış ve bu grup SHAM, GII-4 ve GIII-4 gruplarına kıyasla ileri derecede anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,0001$)(Şekil 4.5.C). Bu bulgular, geç fazda β-aktin düzeylerindeki artış eğiliminin devam ettiğini ve gallik asidin bu artışı güçlendiren bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.





Şekil 4.5. Deney gruplarında saatlere göre β-aktin protein ekspresyon düzeyleri. (A) 12 saat (B) 24 saat (C) 48 saat ve a**:**SHAM grubundan farkı, b**:** GrupII'den farkı**,c**:Grup III'ten farkı temsil etmektedir($p<0.0001$)**.**

Bu çalışmada β-aktin protein ekspresyonunun zamana ve uygulanan maddelere bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Özellikle GIII ve gallik asit uygulanan GIV gruplarında**,** 12., 24. ve 48. saatlerde SHAM grubuna kıyasla anlamlı artışlar saptandı. Bu bulgular, B-aktinin yalnızca bir yükleme kontrolü olarak değil, aynı zamanda hücresel yanıtların bir göstergesi olarak da değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir. Gallik asidin antioksidan, anti-inflamatuvar ve hücre içi sinyal yolaklarını modüle edici etkileri daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Literatürde gallik asidin Akt, ERK ve STAT3 gibi sinyal yolakları üzerinden hücresel yanıtları etkileyebildiği ve protein ekspresyon profillerinde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Xia vd., 2013; Lin vd., 2021). Bu mekanizmalar, çalışmamızda gallik asit uygulanan gruplarda gözlenen β-aktin artışını açıklayabilecek olası yollar arasında yer almaktadır.

Öte yandan, β-aktinin klasik bir "housekeeping protein" olmasına rağmen, hücre iskeleti organizasyonu, proliferasyon ve stres yanıtlarında aktif rol oynadığı bilinmektedir. Önceki çalışmalar, β-aktin ekspresyonunun deneysel koşullara ve hücresel duruma bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymuştur (Perrin vd., 2015). Bu bağlamda, çalışmamızda özellikle geç fazda gallik asit uygulanan gruplarda gözlenen artış, hücresel adaptasyon ve yapısal yeniden düzenlenme süreçleriyle ilişkili olabilir.

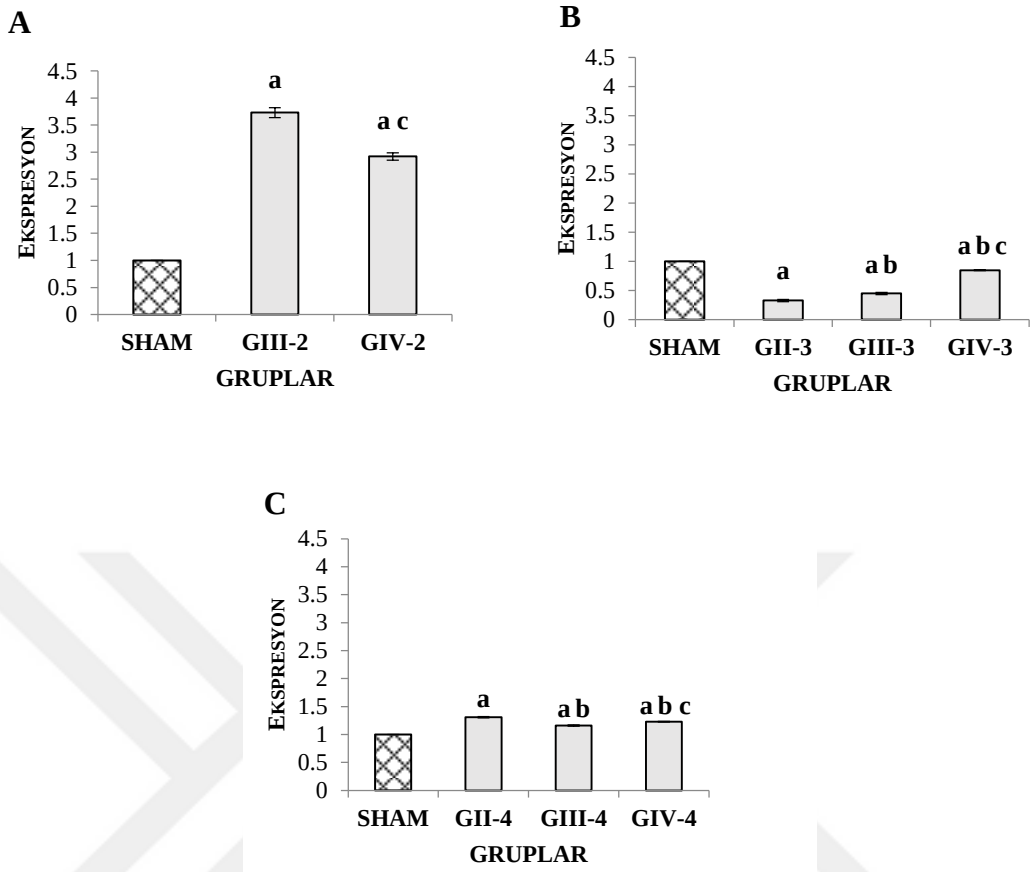
Sonuç olarak, elde edilen bulgular gallik asidin zamana bağlı olarak B-aktin ekspresyonunu artırdığını ve bu proteinin deneysel koşullara duyarlı bir yanıt gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bu durum, Western blot analizlerinde B-aktinin

kullanımının yorumlanmasında dikkatli olunması gerektiğini ve ek doğrulayıcı kontrollerin önemini vurgulamaktadır.

c-Myc protein ekspresyonunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.6'de gösterilmektedir. 12. saatte c-Myc ekspresyonu GIII-2 ve gallik asit uygulanan GIV-2 grubunda, SHAM grubuna kıyasla ileri derecede anlamlı olarak artmıştır ($p<0,0001$). En yüksek ekspresyon düzeyi GIII-2 grubunda saptanmış olup, bu artış GIV-2 grubuna kıyasla da anlamlıdır ($p<0,0001$)(Şekil 4.6.A). Bu bulgular, erken fazda c-Myc aktivasyonunun özellikle GIII grubunda daha belirgin olduğunu göstermektedir.

24.saatte c-Myc ekspresyonunun genel olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu zaman noktasında GII-3 ve GIII-3 gruplarında c-Myc düzeyleri SHAM grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşmüş ($p<0,0001$), buna karşın gallik asit uygulanan GIV-3 grubunda ekspresyonun diğer deney gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 4.6.B). Bu durum, gallik asidin orta fazda c-myc ekspresyonunu baskılanmaya karşı koruyucu bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

48. saatte c-Myc ekspresyonunun tüm deney gruplarında SHAM grubuna kıyasla yeniden arttığı görülmüştür. GII-4 grubunda gözlenen artış anlamlı iken ($p<0,0001$), GIII-4 grubunda ekspresyon düzeyleri nispeten daha düşük kalmıştır. En yüksek c-Myc ekspresyonu bu zaman noktasında gallik asit uygulanan GIV-4 grubunda saptanmış ve bu grup SHAM, GII-4 ve GIII-4 gruplarına kıyasla ileri derecede anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,0001$) (Şekil 4.6.C). Bu bulgular, geç fazda gallik asidin c-Myc ekspresyonunu yeniden artırıcı bir etkiye sahip olabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.6. Deney gruplarında saatlere göre c-Myc protein ekspresyon düzeyleri. (A) 12 saat (B) 24 saat (C) 48 saat ve . a**:**SHAM grubundan farkı, b: GrupII'den farkı**,c**:Grup III'ten farkı temsil etmektedir.($p<0.0001$).

Elde edilen veriler, c-Myc'in karaciğer rejenerasyonunun erken, orta ve geç fazında önemli bir proliferatif düzenleyici olduğunu doğrular niteliktedir (Taub, 2004 ; Fausto vd., 2006). PHx sonrası artan c-Myc düzeyleri, literatürde tanımlanan hücresel uyarılma fazlarıyla uyumludur. Silimarin ve gallik asit uygulamalarının, farklı saatlerde c-Myc ekspresyonunu anlamlı şekilde modüle ettiği gözlenmiştir. Silmarin uygulamasının orta ve geç fazda c-Myc düzeylerini düşürmesi, antioksidan ve antiproliferatif etkilerle açıklanabilir (Surai, 2015; Federico vd., 2017). Gallik asidin erken ve orta fazlarda c-Myc ekspresyonunu artırması veya baskılaması, bileşiğin güçlü antioksidan etkisi ve proliferatif sinyal modülasyonu ile ilişkilendirilebilir (Lu vd., 2006; You ve Park, 2010). Genel olarak, silmarin ve gallik asidin c-Myc yolaklarını farklı zaman aralıklarında düzenleyerek karaciğer rejenerasyonuna katkı sağladığı görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, gallik asidin (GA) parsiyel hepatektomi sonrasında karaciğer rejenerasyon sürecini zamana bağımlı ve düzenleyici bir mekanizma ile etkileyebileceğini ortaya koymaktadır. Bu düzenleyici etkinin ise özellikle STAT3 ve c-Myc aracılı sinyal yolakları üzerinden gerçekleşebileceği değerlendirilmektedir. STAT3 ve c-Myc, hepatosit proliferasyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve doku yenilenmesi süreçlerinde rol alan önemli transkripsiyon faktörleri olmakla birlikte, bu yolakların aşırı ya da uzamış aktivasyonunun rejeneratif süreci olumsuz etkileyebileceği de bilinmektedir. STAT3 gen ekspresyonu incelendiğinde, erken fazda (6. saat) gallik asit uygulanan gruplarda sham grubuna kıyasla kontrollü bir aktivasyon eğilimi gözlenmiş, bu durum GA'nın parsiyel hepatektomi sonrası erken dönemde oluşan sinyal yanıtını düzenleyici yönde etkilediğini düşündürmüştür. 12. saatte STAT3 ekspresyonunun genel olarak arttığı ancak gallik asit grubunda bu artışın sınırlı kaldığı, GA'nın erken proliferatif yanıtı aşırı uyarmaktan ziyade dengelediğini göstermektedir. Bu bulgular, STAT3'ün parsiyel hepatektomi sonrası erken yanıt genlerinden biri olduğunu, gallik asidin ise bu yanıtı kontrollü bir şekilde modüle ettiğini desteklemektedir.

24. ve 48. saatlerde STAT3 ekspresyonunun gallik asit grubunda baskılanmış düzeylerde seyretmesi, rejenerasyon sürecinin proliferatif fazdan onarım ve doku stabilizasyonu fazına geçtiğini göstermektedir. Bu dönemde STAT3 aktivasyonunun sınırlı tutulması, gallik asidin geç fazda aşırı proliferasyon ve olası fibrotik yanıtları engelleyici bir rol üstlendiğini düşündürmektedir. c-Myc gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde, 12. saatte c-Myc düzeylerinin belirgin şekilde arttığı ve bu artışın özellikle deney gruplarında daha güçlü olduğu görülmüştür. c-Myc'in erken fazda artışı, hepatositlerin hücre döngüsüne girişini ve proliferatif yanıtın başlatılmasını destekleyen bir mekanizma olarak değerlendirilebilir. 24. saatte bazı gruplarda c-Myc ekspresyonunun azalması, bu genin geçici ve faza özgü bir düzenleyici olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın, gallik asit uygulanan grupta c-Myc düzeylerinin korunması veya yeniden artış göstermesi, gallik asidin proliferatif sinyallerin sürekliliğini destekleyebileceğine işaret etmektedir. 48. saatte c-Myc ekspresyonunun yeniden yükselmesi, rejenerasyonun geç

fazında hücresel yenilenmenin devam ettiğini göstermektedir. STAT3 ve c-Myc birlikte değerlendirildiğinde, gallik asidin bu iki yolak arasında fonksiyonel bir bağlantıyı güçlendirdiği söylenebilir. Literatürde STAT3'ün c-Myc transkripsiyonunu doğrudan veya dolaylı olarak uyardığı bildirilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda gözlenen STAT3 aktivasyonunun c-Myc ekspresyonundaki artışı desteklemiş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, gallik asidin IL-6 yolunu aktive ettiği göz önüne alındığında, IL-6 üzerinden STAT3 ve c-Myc gibi proliferatif genleri eş zamanlı olarak uyarılması olası görünmektedir. Bu çalışmanın bir diğer önemli sonucu, gallik asidin etkilerinin pozitif kontrol olarak kullanılan diğer ajanlarla karşılaştırıldığında benzer hatta bazı zaman noktalarında daha belirgin olmasıdır. Bu durum, gallik asidin farmakolojik olarak farklı mekanizmalar üzerinden etki gösterebileceğini ve karaciğer rejenerasyonuna katkıda tamamlayıcı bir ajan olabileceğini göstermektedir.

5.1. Gelecek Perspektifi

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, gallik asidin STAT3 ve c-Myc yolakları üzerinden hepatosit proliferasyonunu desteklediğini göstermektedir; ancak bu mekanizmaların tam olarak açıklanabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

- Gallik asidin STAT3 ve c-Myc aktivasyonunu doğrudan mı yoksa PI3K/AKT gibi üst yolaklar aracılığıyla mı gerçekleştirdiğinin aydınlatılması gerekmektedir.
- STAT3 ve c-Myc arasındaki olası zaman bağımlı etkileşimlerin moleküler düzeyde araştırılması önemlidir.
- Gallik asidin farklı dozlarda uygulanmasının bu yolaklar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi, doz-yanıt ilişkisinin ortaya konmasına katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak, gallik asidin parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunu destekleyici etkilerinin, STAT3 ve c-Myc gibi temel proliferasyon yolakları üzerinden gerçekleştiği düşünülmekte olup, bu bulgular gallik asidin terapötik potansiyeline yönelik önemli veriler sunmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Aoki, T., Murakami, M., Niiya, T., Murai, N., Shimizu, Y., Kato, H., & Kusano, M. (2001). Capacity of hepatic regeneration following a second partial hepatectomy in rats. *Hepatology Research, 21*(3), 228–241.

Apte, U., Singh, S., Zeng, G., Cieply, B., Virji, M. A., Wu, T., & Monga, S. P. S. (2009). β-Catenin activation promotes liver regeneration after acetaminophen-induced injury. *American Journal of Pathology, 175*(3), 1056–1065.

Behari, J., vd. (2021). Cell cycle regulation during liver regeneration. *Seminars in Liver Disease, 41*(2), 123–134.

Bhushan, B., Michalopoulos, G. K., & Monga, S. P. S. (2014). Role of Wnt/β-catenin signaling in liver regeneration, hepatotoxicity, and disease. *Hepatology, 60*(1), 358–368.

Borowiak, M., vd. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*(29), 10608–10613.

Chae, M. S., Moon, K. U., Jung, J. H., vd. (2020). Serum interleukin-6 predicts liver regeneration after living donor liver transplantation. *Clinical Transplantation, 34*(2), e13787.

Clevers, H. (2006). Wnt/β-catenin signaling in development and disease. *Cell, 127*(3), 469–480.

Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., DeAngelis, R. A., vd. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6–deficient mice. *Science, 274*(5291), 1379–1383.

Ding, W., vd. (2014). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in liver regeneration. *Journal of Hepatology, 61*(3), 655–666.

Fabris, L., & Strazzabosco, M. (2011). The role of progenitor cells in human liver regeneration. *Seminars in Liver Disease, 31*(1), 22–32.

Fausto, N., & Campbell, J. S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of Development, 120*(1), 117–130.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Fausto, N., Campbell, J. S., & Riehle, K. J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology, 43*, S45–S53.

Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules, 22*(2), 191.

Furuta, K., Kakita, A., Takahashi, T., Tomiya, T., & Fujiwara, K. (2000). Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy. *Hepatology Research, 17*, 223–236.

Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function. *Pharmacology & Therapeutics, 53*(3), 275–354.

Gershbein, L. L., & Elias, H. (1954). Observations on the anatomy of the rat liver. *The Anatomical Record, 120*(1), 85–98.

Gilgenkrantz, H., & Collin de l'Hortet, A. (2018). Understanding liver regeneration: From mechanisms to regenerative medicine. *American Journal of Pathology, 188*(6), 1316–1327.

Goh, Y. P. S., Henderson, N. C., Heredia, J. E., vd. (2013). Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 110*(24), 9914–9919.

Goo Huh, C., vd. (2004). Hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway is required for efficient liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*(13), 4477–4482.

Haga, S., Ogawa, W., Inoue, H., vd. (2005). Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocyte hypertrophy. *Hepatology, 41*(5), 1134–1144.

He, G., & Karin, M. (2011). NF-κB and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Research, 21*(1), 159–168.

He, vd. (2023). Innate immune cell roles in liver regeneration. *Cell Regeneration, 12*, 11.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Higgins, G. M., & Anderson, R. M. (1931). Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of Pathology, 12*, 186–202.

Huang, J., vd. (2016). The Wnt/β-catenin pathway in liver regeneration and tumorigenesis. *Journal of Hepatology*, *64*(3), 638–652.

Jin, K., Li, T., Sánchez-Duffhues, G., Zhou, F., & Zhang, L. (2016). Involvement of inflammation and its related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget, 7*(29), 45645–45665.

Ju, C., vd. (2016). Angiogenesis and liver regeneration. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *13*(4), 239–248.

Kawaguchi, K., vd. (2012). Hepatocyte proliferation and sinusoidal endothelial cell roles in liver regeneration. *Journal of Hepatology.*

Khan, R. A., Khan, M. R., & Sahreen, S. (2014). Protective effects of gallic acid against acetaminophen-induced liver toxicity in mice. *Journal of Food Science, 79*(11), T2221–T2228.

Kietzmann, T. (2017). Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biology, 11*, 622–630.

Kiseleva, E. Y., vd. (2021). Liver sinusoidal endothelial cells and angiogenesis in liver regeneration. *Cells, 10*(2), 304.

Klein, C., vd. (2005). STAT3 signaling promotes survival and proliferation of hepatocytes. *Hepatology*, *41*(3), 470–478.

Klein, C., Wüstefeld, T., Assmus, U., vd. (2019). The IL-6–gp130–STAT3 pathway in liver regeneration and inflammation. *Liver International, 39*(6), 1053–1063.

Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V., & Taub, R. (2017). STAT3 activation in hepatocytes is critical for liver regeneration. *Journal of Hepatology, 66*(6), 1246–1255.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Lin, Y., vd. (2021). Gallic acid suppresses cancer cell proliferation through STAT3 and EGFR pathways. *Oncology Reports.*

Lua, I., Li, Y., Zagory, J. A., Wang, K. S., French, S. W., & Asahina, K. (2016). Characterization of hepatic stellate cells. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *2*(3), 302–315.

Martins, P. N., & Neuhaus, P. (2007). Surgical anatomy of the liver in the rat. *Liver International*, *27*(3), 384–392.

Michalopoulos, G. K. (2017). Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology*, *65*(4), 1384–1392.

Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science*, *276*(5309), 60–66.

Min, M., Peng, L., Yang, Y., vd. (2016). Kupffer cell-derived IL-6 promotes liver regeneration via STAT3 signaling. *Hepatology*, *64*(6), 2063–2077.

Monga, S. P. S. (2014). β-Catenin signaling in liver homeostasis, injury, and tumorigenesis. *Gastroenterology, 148*(7), 1294–1310.

Natarajan, A., vd. (2007). Epidermal growth factor receptor signaling in liver regeneration. *Hepatology*, *45*(2), 412–421.

Nejak-Bowen, K. N., & Monga, S. P. S. (2010). β-Catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer. *Hepatology, 51*(6), 2040–2048.

Palmes, D., & Spiegel, H. U. (2004). Animal models of liver regeneration. *Biomaterials, 25*(9), 1601–1611.

Papa, S., vd. (2009). The NF-κB pathway in liver regeneration and inflammation. *Cell Death & Differentiation, 16*(9), 1231–1240.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Preziosi, M. E., vd. (2018). Endothelial Wnts regulate β-catenin signaling in liver regeneration. *Hepatology, 67*(2), 646–660.

Ridgway, W. M., Fathman, C. G., & Tisch, R. (2014). Regulation of liver regeneration by natural killer and natural killer T cells. *Seminars in Immunopathology, 36*(1), 39–48.

Salem, M. A., El-Sayed, N. S., & Ibrahim, H. M. (2023). Gallic acid attenuates thioacetamide-induced liver injury. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 98*, 104034.

Senoo, H., Mezaki, Y., & Fujiwara, M. (2017). The stellate cell system. *Journal of Gastroenterology, 52*(4), 387–394.

Taub, R. (2004). Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5*(10), 836–847.

Trusolino, L., Bertotti, A., & Comoglio, P. M. (2010). MET signalling in development, organ regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 11*, 834–848.

Uyanoglu, M., vd. (2008). Parsiyel hepatektomi sonrası serum ALT/AST değişimleri ve karaciğer rejenerasyonu. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi, 7*(2), 121–123.

Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C. Y., & Nusse, R. (2015). Self-renewing diploid Axin2^{+} cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature, 524*(7564), 180–185.

Waynforth & Flecknell (1994). *Rat surgical techniques* (kitap)

You & Park (2010). *Gallic acid – ROS*. J Cancer Res Ther

Yousef et al. (2010). *Gallic acid & paracetamol*. Toxicology

Zhang, C., Sun, C., Zhao, Y., Ye, B., & Yu, G. (2024). Signaling pathways of liver regeneration: Biological mechanisms and implications. *iScience, 27*, 108683. https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108683