Sıçan Karaciğerinde Parsiyal Hepatektomi Sonrası Karvakrolün IL-6/STAT3 Yolağına Etkisi

Başak Durmuş

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül 2015

Effect of Carvacrol on IL-6/STAT3 Pathway After Partial Hepatectomy in Rat Liver

Başak Durmuş

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

September 2015

Sıçan Karaciğerinde Parsiyal Hepatektomi Sonrası Karvakrolün IL-6/STAT3 Yolağına Etkisi

Başak Durmuş

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

Danışman: Doç. Dr. Mustafa Uyanoğlu

Eylül 2015

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Başak Durmuş'un DOKTORA tezi olarak hazırladığı "Sıçan Karaciğerinde Parsiyal Hepatektomi Sonrası Karvakrolün IL-6/STAT3 Yolağına Etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Mustafa Uyanoğlu

İkinci Danışman **: -**

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Mustafa Uyanoğlu

Üye : Doç. Dr. Mediha Canbek

Üye : Doç. Dr. Filiz Susuz Alanyalı

Üye : Doç. Dr. Berrin Ayaz Tüylü

Üye : Doç. Dr. Ayşe Pınar Öztopçu Vatan

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU danışmanlığında hazırlamış olduğum "Sıçan Karaciğerinde Parsiyal Hepatektomi Sonrası Karvakrolün IL-6/STAT3 Yolağına Etkisi" başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik 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. 18/09/2015

Başak DURMUŞ

İmza

ÖZET

Karvakrol, Lamiaceae familyasının uçucu yağlarında bulunan bir bileşendir. Antihepatotoksik, hepatoprotektif özelliğinin yanında karaciğer rejenerasyonuna katkısının olduğu bilinmektedir. Karvakrolün, hücre proliferasyonu ve rejenerasyon mekanizması üzerine etkisi ile ilgili yapılan araştırmalar az sayıdadır. Bu nedenle çalışmamızda, sıçanlarda %70 parsiyal hepatektomi (PH) sonrası uyarılan karaciğer rejenerasyonuna IL-6/STAT3 ve MAPK yolakları üzerinden karvakrolün etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda, ağırlıkları 250±30 gr olan 3 aylık erkek *Wistar albino* sıçanlardan her grupta n=6 olacak şekilde 6 grup oluşturulmuştur. Grup I ve II, Sham grupları; Grup III ve IV, 1mL %0,9 NaCl; Grup V ve VI ise 73 $mg.kg^{-1}$ karvakrol verilen gruplardır. Grup III, IV, V ve VI hayvanlarına %68-70 PH yapılmıştır. Cerrahi işlemlerden 24 ve 48 saat sonra diseksiyon yapılmıştır. Serum örneklerinde Alanine Transaminase (ALT) enzim seviyeleri belirlenmiştir. Karaciğer rejenerasyon oranı hesaplanmıştır. Karaciğer kesitlerinde Hematoxylin ve Eosin (H&E) boyama ile histopatolojik analiz ve Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunhistokimya boyama ile proliferasyon değerlendirmeleri yapılmıştır. Karaciğerde, RT-PCR analizi ile IL-6/STAT3 ve MAPK yolaklarındaki bazı genlerin ifade düzeylerine ve Western Blot analizi ile bu genlerin protein ifadelerine bakılmıştır.

Çalışmamızdan elde edilen tüm veriler istatistiksel olarak değerlendirilip gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Buna göre; PH'den 24 ve 48 saat sonra karvakrolün hepatosit çoğalması ve karaciğer rejenerasyonu üzerine olumlu etki gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer Rejenerasyonu, IL-6/STAT3 Yolağı, SOCS3, MAPK Yolağı, PCNA İndeksi.

SUMMARY

Carvacrol is a component in the essential oil of Lamiaceae family. Besides antihepatotoxic and hepatoprotective property is known that the contribution of liver regeneration. The research of related to the effects on cell proliferation and regeneration mechanism of carvacrol are merely. Therefore, in our study, 70% partial hepatectomy (PH) after liver regeneration in rats, induced IL-6/STAT3 and MAPK pathways through carvacrol effect was investigated.

In our study, 6 groups were created to be each group n = 6 with *Wistar albino* male rats weighted 250±30 gr and 3 month old. Group I and II, Sham operated; Group III and IV, 1ml 0.9% NaCl; The Group V and VI are the group that treated with 73 $mg.kg^{-1}$ carvacrol. 68-70% PH was performed to Group III, IV, V, VI animals. Dissection was performed 24 and 48 after surgical procedure. Alanine transaminase (ALT) enzyme levels in serum samples were determined. The liver regeneration rate was calculated. In liver sections, evaluation of histopathological analysis by staining Hematoxylin and Eosin (H&E) and the proliferation by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemical staining was performed. In the liver, certain genes expression in IL-6/STAT3and MAPK pathways with RT-PCR analysis and protein expression of these genes with Western blot analysis were measured.

All data obtained from this study were compared between groups were statistically evaluated. Accordingly; 24 and 48 hours after PH carvacrol on hepatocyte proliferation and liver regeneration was found to show a positive effect.

Key words: Liver Regeneration, IL-6/STAT3 Pathway, SOCS3, MAPK Pathway, PCNA Index

TEŞEKKÜR

Derslerimde ve Doktora tez çalışmalarımda bana danışmanlık eden ve beni yönlendiren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamda benden bilgilerini, deneyimlerini ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Mediha CANBEK, Doç. Dr. Filiz SUSUZ ALANYALI, Doç. Dr. Hakan ŞENTÜRK ve Arş. Gör. Dr. Emre CEYHAN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvarda birlikte çalıştığım ve çalışmalarımda her zaman desteğini gördüğüm sevgili arkadaşım Moleküler Biyolog Dr. Ahmet ÖZEN'e teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca benden desteklerini ve sabırlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını bildiğim ve daima bana güvenen AİLEM'e sevgi dolu teşekkürlerimi sunarım.

Bu Tez, ESOGÜ BAP tarafından ''201319A204'' nolu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……....vi
SUMMARY……vii
TEŞEKKÜR……..viii
İÇİNDEKİLER……...ix
ŞEKİLLER DİZİNİ……xi
ÇİZELGELER DİZİNİ……xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……...xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ……1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI……...4
2.1. Karaciğer Yapısı……4
2.1.1. Sıçan karaciğeri……...8
2.2. Karaciğer Rejenerasyonu ve Moleküler Mekanizması……...…9
2.2.1. Karaciğer rejenerasyonunun aşamaları……...9
2.2.1.1. Başlangıç fazı……10
2.2.1.2. Çoğalma/genişleme fazı……10
2.2.1.3. Lobülün şekillenmesi……11
2.2.1.4. Sonlanma fazı……....11
2.2.2. Karaciğer rejenerasyonunda görevli bazı yolaklar……...12
2.2.2.1. IL-6/STAT3 yolağı……12
2.2.2.2. MAPK yolağı……....18
2.3. Karvakrol……..22
3. MATERYAL VE YÖNTEM……23
3.1. Deney Hayvanları……23
3.2. Deney Grupları……..…23
3.3. Anestezi ve Cerrahi İşlemler……24
3.4. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi……..25
3.4.1. Serum biyokimyası……...25
3.4.2. Histolojik analizler……26
3.4.2.1. İmmunohistokimya boyama……..26

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.4.3. RT-PCR analizi……28
3.4.3.1. Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu……28
3.4.3.2. RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi……29
3.4.3.3. RT-PCR işlemi……30
3.4.4. Western Blot analizi……31
3.4.4.1. Protein izolasyonu……31
3.4.4.2. SDS PAGE ve blotlama tamponları……32
3.4.4.3. Membrana aktarma……35
3.5. İstatistik……38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER……75
6. KAYNAKLAR DİZİNİ……76
EK AÇIKLAMALAR……85
ÖZGEÇMİŞ……87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. İnsan karaciğerinin anatomik ve histolojik yapısı (Burtis ve Ashwood, 2005)..... 7

2.2. Sıçan karaciğeri (Waynforth ve Flecknell, 1994)..... 8

2.3. PH sonrası karaciğer rejenerasyonun aşamaları: 1. Başlama fazı 2. Metabolik ve büyüme faktörleri fazı 3. Sonlanma fazı (Gilgenkrantz ve Collin de l'Hortet, 2011).. 12

2.4. IL-6/STAT3 yolağı ve yolakta görevli proteinler (Taub, 2004)..... 14

2.5. MAPK yolağı ve yolakta görevli proteinler (Anonim, 2015). 20

2.6. Karvakrolün (5-isopropyl-2-methylphenol) kimyasal yapısı (Melo vd., 2010). 22

3.1. SDS-PAGE ve Western Blot aşamalarındaki jel ve membran görüntüleri: A. Transfer öncesi jel, B. Transfer sonrası jel, C. Ponceau S solüsyonu ile membran..... 35

4.1. Gruplara ait serum ALT seviyeleri (Ortalama ± Standart sapma).. 39

4.2. Gruplara ait karaciğer rejenerasyon oranı (Ortalama ± Standart sapma).. 41

4.3. Grup I'e ait hayvanların karaciğer dokusu (H&E)..... 43

4.4. Grup II'ye ait hayvanların karaciğer dokusu (H&E). 43

4.5. Grup III hayvanlarının karaciğer dokusundaki hepatositlerde vakuolizasyon (H&E) 44

4.6. Grup III hayvanlarının karaciğer hepatosit sitoplazmasında vakuolizasyon görünümü (H&E). 44

4.7. Grup IV'e ait hayvanların karaciğer dokusunda vakuolizasyon ve mitotik görünümler (H&E). 45

4.8. Grup V'e ait hayvanların karaciğer dokusunda mitoz bölünmenin çeşitli safhalarındaki hepatositler (H&E). 46

4.9. Grup VI hayvanlarının karaciğer dokusunda yer yer vakuolizasyon ve mitoz bölünmenin olduğu hepatosit görünümleri (H&E) 46

4.10. Gruplara ait PCNA indeksi (Ortalama ± Standart sapma).. 49

4.11. Tüm deney grubu hayvanlarına ait karaciğer kesitlerinde PCNA pozitif ve PCNA negatif hepatosit görünümleri (ölçü barı 10 μm) 50

4.12. Gruplara ait NF-κB gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma) 52

4.13. Gruplara ait IL-6 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma) 54

4.14. Gruplara ait STAT3 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma) 56

4.15. Gruplara ait SOCS3 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma) 58

4.16. Gruplara ait c-Myc gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma)..... 59

4.17. IL-6/STAT3 yolağına ait protein ifadelerinin Westen Blot analizlerinden elde edilen bant görüntüleri. 62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.18. Gruplara ait RAF1 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma) 64
4.19. Gruplara ait MEK1 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma) 65
4.20. Gruplara ait MEK2 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma) 66
4.21. Gruplara ait MAPK4 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma)..... 67
4.22. MAPK yolağına ait protein ifadelerinin Westen Blot analizlerinden elde edilen bant görüntüleri. 68
4.23. Gruplara ait ERK1 gen ifadesi. (Ortalama ± Standart sapma) 69
4.24. Gruplara ait Elk1 gen ifadesi. (Ortalama ± Standart sapma). 71
4.25. Gruplara ait Ets1 gen ifadesi. (Ortalama ± Standart sapma). 72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

4.1. Gruplara ait Serum ALT seviyeleri, karaciğer RO ve PCNA indeksi (Ortalama ± Standart sapma). 51

4.2. IL-6/STAT3 yolağına ait gen ifadelerinin Ortalama ± Standart sapma değerleri. 61

4.3. MAPK yolağına ait gen ifadelerinin Ortalama ± Standart sapma değerleri. 73

4.4. IL-6/STAT3 ve MAPK yolaklarına ait gen ifadelerinin artış ve azalışları. 74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gravity
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
ºC	Santrigrat Derece
pH	Hidrojenin Potansiyeli
rpm	Revolutions Per Minute
sn	Saniye
V	Volt

Kısaltma	Açıklama
ALT	Alanin Transaminaz
AP	Amonyum persülfat
AP-1	Activator protein-1

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltma	Açıklama
C	Karbon
C/EBPβ	CCAAT/enhancer binding protein beta
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
Ets	E-twenty-six-specific sequence
FGF	Fibroblast Growth Factor
G	Boşluk
gp130R	Interleukin-6 Receptor
GTP	Guanozin trifosfat
H	Hidrojen
H&E	Hematoxylin ve Eosin
HCl	Hidroklorik Asit
HGF	Hepatosit Growth Factor
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
IKK	IκB Kinaz
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 Receptor
IκBα	Inhibitor of NF-κB
ip	İntraperitonel
JAK	Janus Kinaz
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KC	Karaciğer

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltma	Açıklama
LD	Letal Doz
LPS	Lipopolisakkarit
M	Mitoz
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MAPKKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1
MEK	MAP kinaz/ERK kinaz
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
NaOH	Sodyum Hidroksit
NC	Nitrocellulose
NF-κB	Nuclear Factor-κB
O	Oksijen
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
Pi3K	Phosphoinositide 3-kinase
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
RO	Rejenerasyon Oranı
S	Sentez
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SF	Serum Fizyolojik

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltma	Açıklama
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF	Transforming Growth Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer, rejenerasyon kapasitesi yüksek ve karmaşık fonksiyonları olan bir organdır. Herhangi bir hasar sonrası karaciğerde mitotik aktivite artar ve karaciğer eski kütlesine yeniden ulaşır (Taub, 2004; da Silva vd., 2013). Karaciğer fonksiyonunun yenilenmesi, karaciğerin yeniden eski hacmine ulaşması ile olur (Miura vd., 2012). Sıçan karaciğeri, parsiyal hepatektomi (PH) sonrası 5-7 günde eski hacmine kavuşur (Taub, 2004; Miura vd., 2012).

Karaciğer loblarının bir kısmının çıkarılması işleminde rejenerasyonun gerçekleşmesi için karaciğer kök hücreleri veya progenitör hücrelerin stok halinde olması gerekmez. Karaciğer rejenerasyonu olgun işlevsel karaciğer hücrelerinin replikasyonu ve çoğalması ile olur (Taub, 2004).

Hepatik rejenerasyon; pankreas, diğer ekstra hepatik organlar, duodenum, bazı bezler ve karaciğerin kendisinden salınan faktörler ile uyarılır (Taub, 2004; Fausto vd., 2006). Rejenerasyon sürecinde; HGF, EGF, TGF-α, FGF gibi büyüme faktörleri; TNF-α, IL-6 gibi sitokinler ve de norepinefrin, insülin, büyüme hormonu, tiroid hormonu, eşey hormonları gibi hormonlar ve transkripsiyon faktörleri önemli rol oynar (Taub, 2004; Fausto vd., 2006; Guo vd., 2012; da Silva vd., 2013). Bu genler, rejenerasyonun farklı zamanlarında birbirleriyle ilişkili olarak çalışır ve herhangi bir gendeki işlev kaybı rejenerasyonu engeller (Fausto vd., 2006).

Bir sinyal molekülü reseptörüne bağlandığında hücre çoğalması, farklılaşması, hareketi, metabolizması, davranışı ve apoptoz gibi önemli hücre içi olayları başlatır (Sümer Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010). Temel hücre içi yolaklar, bir sinyali iletmek veya arttırmak için uyarılan hedef proteinleri içerir. Bir sinyalin artması, hücre çekirdeğini uyarıp gen ifedesini düzenleyebilir. Bu yolaklardan biri de JAK/STAT yolağıdır (Sümer Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010). JAK/STAT yolağı, sitokinler aracılığıyla aktive olur ve hücre proliferasyonunda etkilidir. PH sonrasında rejenerasyonun başlamasında, en önemli sinyal yolaklarından birisi de JAK/STAT üzerinden aktive olan IL-6/STAT3 yolağıdır.

Karaciğer rejenerasyonu, normalde dinlenme halindeki hepatositlerin G_0 fazından çıkıp hücre döngüsüne girmesiyle başlar. PH sonrası, karaciğerde TNF-α ve IL-6 düzeyleri artar (Sudo vd., 2008). TNF-α komşu hücrelerde NF-kB'nin ifade edilmesini sağlar (Taub, 2004; da Silva vd., 2013). NF-kB'nin aktive olmasıyla da IL-6 salınımı artar. IL-6'nın reseptörüne bağlanmasının ardından sitoplazmada sırasıyla JAK'lar ve STAT3 fosforlanır. STAT3, dimerleşerek çekirdeğe girer ve DNA'ya bağlanır. Böylece hepatosit proliferasyonu başlar (Guo vd., 2012; da Silva vd., 2013; Lepiller vd., 2013). Hepatositlerde IL-6 sinyali, SOCS3'ün IL-6/STAT3 aracılı uyarımı sonucu ile düzenlenir (da Silva vd., 2013).

Karaciğer rejenerasyonunda ve hepatosit sağ kalımında önemli yolaklardan birisi de MAPK yolağıdır. Büyüme faktörleri, sitokinler ve hücre dışı sıvıdaki proteinlerin hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanması ile aktive olan bu yolakta görevli proteinler, serin ve treonin protein kinazlardır. Bunlar mitojenik yolaklar ile etkinleşip transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını sağlar (Sümer Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010).

Hücrenin uyarılması ile Ras aktif hale geçer. Ras aktivasyonu, GTPaz'ı aktive eden proteinler tarafından, GTP hidrolizi ile sonlanır. Aktif Ras proteinleri, RAF kinazlara bağlanır ve RAF kinazların hücre zarına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar (Doğan ve Güç, 2004; Cooper ve Hausmann, 2006). RAF, MEK'in; MEK de ERK'in fosforilasyonunu sağlayıp aktive eder (Hancock, 2005; Cooper ve Hausmann, 2006). Aktive olan ERK, çekirdek ve sitoplazmadaki diğer protein kinazları ve transkripsiyon faktörlerini fosforlar. Aktif ERK'in hücre çekirdeğine girip Elk'i fosforillemesi ile acil erken genlerin trankripsiyonu uyarılır (Hancock, 2005; Cooper ve Hausmann, 2006).

Çeşitli nedenlerle hasar görmüş karaciğerin daha çabuk iyileşmesi için ilaç tedavisi gereklidir. Fakat kullanılan ilaçların bazı yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda doğal maddelerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Karaciğerde PH ile çıkarılan parçanın büyüklüğü ve antioksidanlar da rejenerasyona etki eder (Gökçimen vd., 1999).

Karvakrol, Lamiaceae familyasının esansiyel yağlarında fazla miktarda bulunan fenolik monoterpen yapısında bir bileşendir (Baser, 2008; Uyanoglu vd., 2008; Singletary, 2010). Karvakrolün antioksidan, antihepatotoksik ve hepatoprotektif etkilerinin olduğu

bilinmektedir (Baser, 2008; Melo vd., 2010; Melo vd., 2013). Bu çok sayıda yararlı etkilerinin yanı sıra karvakrol, rejenere olan karaciğer üzerine de olumlu etki göstermiştir (Uyanoglu vd., 2008).

Uçucu yağlarda bulunan karvakrolün biyoaktivitesi ile ilgili in vivo ve klinik çalışmaların yetersiz olması nedeniyle moleküler araştırmalara ihtiyaç vardır (Baser, 2008; Singletary, 2010). Karvakrolün, hücre proliferasyonu ve rejenerasyon mekanizması üzerine yapılan araştırmaların az sayıda olması bu alanda yapılacak çalışmalara olan ihtiyacı göstermektedir. Çalışmamızda, sıçanlarda PH sonrası uyarılan karaciğer rejenerasyonuna karvakrolün IL-6/STAT3 ve MAPK yolağı üzerinden etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, RT-PCR yöntemi uygulanarak IL-6, STAT3, NF-κB SOCS3, RAF-1, MEK1, MEK2, ERK1, ERK2, Elk1, c-Myc ve Ets1'in gen ifadeleri ile Western Blot yöntemi uygulanarak da bu genlerin protein ifadelerine bakılmıştır. Ayrıca, karaciğer hücrelerinde beklenilen proliferasyon da PCNA analizi ile ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Karaciğer Yapısı

Karaciğer insanlarda 1200-1500g ağırlığında bir organdır (Akın vd., 1992; Sherlock ve Dooley, 2002; Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005). Çok yumuşak ve esnek bir yapıda olan organ karın boşluğunun sağ üst kısmında, diyaframın altında bulunur ve kaburga kemikleri tarafından korunur. Karaciğer, diyafram tarafından kalp ve akciğer gibi göğüs kafesine ait organlardan ayrılmıştır (Sherlock ve Dooley, 2002; Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005).

Karaciğer ince ve sert bir fibröz zar olan glisson kapsülü ile sarılıdır. Bu bağ doku damar ve sinir kolları ve karaciğer parankimi için destekleyici bir iç yapı sağlar. Ayrıca bu kapsül karaciğerin sağ ve sol loblarını oluşturur. Sağ lobun arka yüzeyinde kaudat lob, alt yüzeyinde kuadrat lob yer alır. Sıçanlarda bunlara ek olarak kuyruk lobu da bulunmaktadır. Lobların her biri de löbüllere ayrılır. Karaciğerin fizyolojik birimleri; silindirik yapıda, çapı 0,8-2mm ve boyu birkaç mm olan bu lobülleridir (Akın vd., 1992; Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005). Karaciğer lobülü vasküler damarlar, biliyer kanallar ve bağ dokusu ile ayrılmış çok yüzlü yapıda bir dokudur. Her lobülün merkezinde bulunan sentral ven hepatik venlere açılır. Lobüller arasında bulunan portal üçlü; hepatik arter ve portal ven ile safra kanallarından oluşmaktadır. Bu bölgelerde karaciğere ulaşan arter ve ven kanı hepatositler arasındaki sinusoidler aracılığıyla sentral vene dökülür. Buradan da hepatik venler sayesinde inferior vena cavaya boşalır. Kan akımı periferden merkeze doğrudur (Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005). Sindirim sisteminden emilen besin maddelerince zengin venöz kanı taşıyan portal ven ve merkezi dolaşımda oksijenlenmiş kanı taşıyan hepatik arter ile karaciğere kan sağlanır (Şekil 2.1) (Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005). Lenfatik damarlar porta hepatis yakınındaki küçük lenf bezleri içerisinde sonlanır (Sherlock ve Dooley, 2002).

Tek tabakalı, parankimal epitel hücreleri sentral venden çıkıp yayılırlar. Karaciğer hücre tabakalarının her iki tarafına da kan taşıyan vasküler kanallar ise sinusoidlerdir

(Şekil 2.1). Sinusoidler sentral ven etrafında zengin, lobüller arası ve vasküler bir ağ oluştururlar. Sinusoidleri endotelyal veya Kupffer hücreleri kaplar. Kupffer hücreleri mononükleer fagositik görev yapan hepatik makrofajlardır. Karaciğerin fagositoz özelliği gösteren hücrelerinden biri de doğal öldürücü (natural killer=NK) hücreleridir. Kısa psödopodları ve granülleri olan bu hücreler karaciğeri çeşitli viral etkenlere karşı korur (Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005).

Endotelyal hücreler ile hepatositler arasında sinusoidler ile çevrelenen doku aralığına Disse aralığı denir (Şekil 2.1). Disse aralığının içerdiği interstisyel sıvı, kan ile hepatosit arasında madde alış verişini sağlar (Akın vd., 1992; Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005). Disse aralığı sinusoidlere desteklik yapan retiküler fibril içerir, ancak bazal lamina içermez (Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005).

Yağ depolayan ito hücreleri ise; karaciğer hasarı sırasında fibrozise neden olan kollajeni sentezleyen fibroblastlara dönüşür. Disse aralığında bulunan ito hücreleri ayrıca kan akışını da düzenler (Burtis ve Ashwood, 2005).

Karaciğer dokusunun yaklaşık %60'ını hepatositler oluşturur. Hepatositler 20-35µm çapında çok köşeli hücreler olup karaciğerin metabolik fonksiyonlarından ve temel biyokimyasal işlemlerinden sorumludurlar. Hepatositlerin sinusoidlere bakan tarafındaki hücre zarı çok sayıda mikrovillus içerir. Bu mikrovilluslar hücrenin atılım ve emilimini arttırır (Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005). Hepatosit yüzeyleri; gelen kana doğru akan sinusoidal yüzey (sinusoid ve disse aralığı), sinusoidal yüzeye bitişik hücreler arası yüzey, kanalikular yüzeydir (Burtis ve Ashwood, 2005).

Hepatositler ışınsal simetriye göre dizilmiş olup hücreler periferden merkeze doğru aldıkları kan ve madde içeriğine göre üç farklı zona ayrılır (Dilek, 2003). Bunlar:

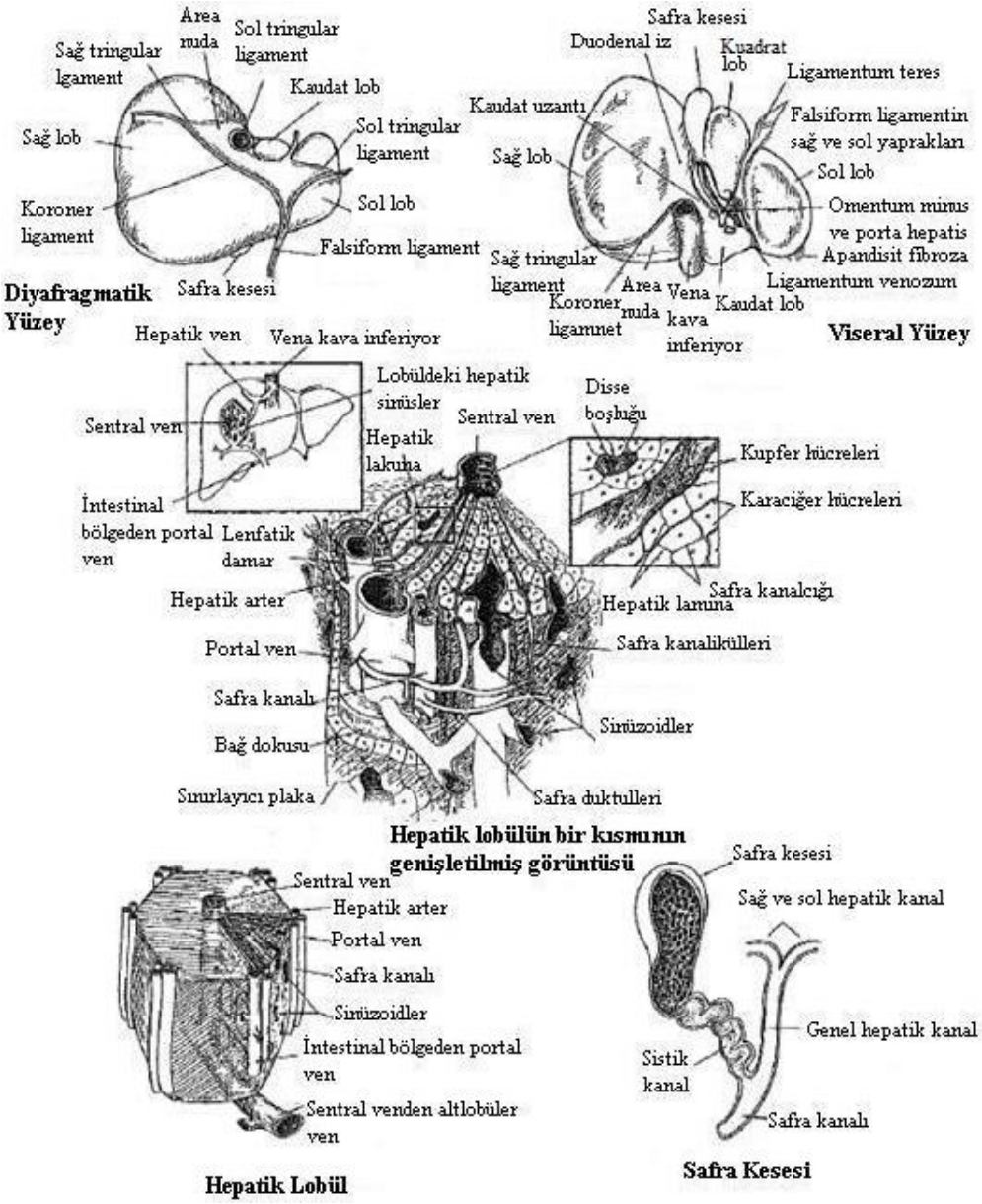
1. Perfierik zon (Zon I): Buradaki hücrelerde granüllü endoplazmik retikulum ve bol kristalı mitokondriler bulunur. Bu hücreler dolaşımda herhangi bir sorun olduğunda en geç ölen ve rejeneratif özelliği en yüksek olan hücre grubudur (Dilek, 2003).

2. Ara zon (Zon II): Sınırları tam olarak belli olmayan bu hücre grubunun metabolik aktivitesi orta düzeydedir (Dilek, 2003).

3. Santral zon (Zon III): Sentral veni çevreleyen hücre grubudur. Hücreler periferik zona göre daha az aktiftir. Buradaki hücreler düz endoplazmik retikulum bakımından zengin, diğer organeller açısından ise fakirdir. Perfüzyon azaldığında nekrozun, fizyolojik ve patolojik yağ birikiminin ilk olarak gözlendiği alandır (Dilek, 2003).

Karaciğerin biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları;

1. Sekresyon fonksiyonu: safra yolu ile bilirubin atılımı ve bilirubin metabolizması, ksenobiyotik metabolizması ve atılımı,
2. Sentez fonksiyonu: albumin, globulin, immunglobulinler, seruloplazmin, transferin, koagulasyon proteinleri, fibronektin, lipoprotein sentezi, karaciğer enzimleri, üre sentezi, kreatin gibi proteinlerin sentezi,
3. Metabolik fonksiyon: amonyak metabolizması, karbonhidrat metabolizması, yağ metabolizması, protein metabolizması,
4. Depolama fonksiyonu: vitaminlerin depolanması, demir depolanması, glikojen depolanması,
5. Sindirim sisteminden kaynaklanan bakterilerin filtre edilmesi,
6. Gastrointestinal yolla safra salgılama,
7. Barsaktan dönen kanın filtrasyonu biçiminde maddeler halinde özetlenebilir (Akın vd., 1992; Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005).



Şekil 2.1. İnsan karaciğerinin anatomik ve histolojik yapısı (Burtis ve Ashwood, 2005).

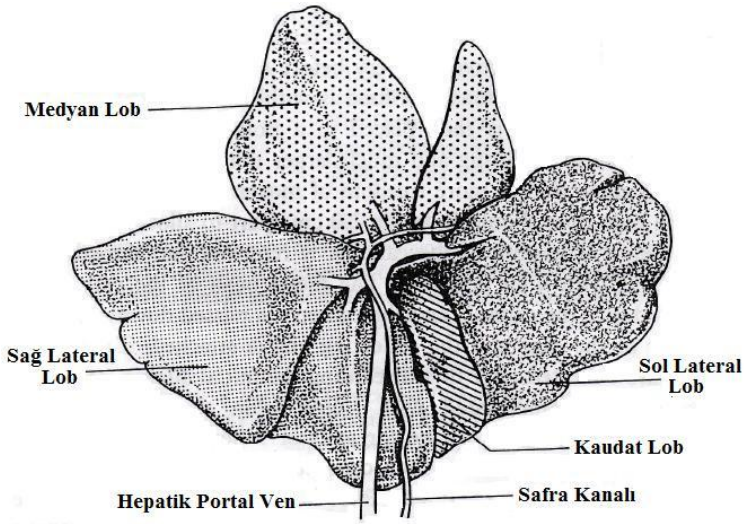
Karaciğer hastalıklarında hepatositlerde oluşan hasarı ve karaciğer hücre nekrozunu belirlemede kullanılan karaciğer enzimlerinin başlıcaları ALT, Aspartat Transaminaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH) ve γ-glutamat transpeptidaz (GGT)'dır (Akın vd., 1992; Sherlock ve Dooley, 2002; Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005).

Aminotransferazlar; aminoasitler ile 2-okzo-asitlerin biribirine çevrilmesini amino gruplarının transferi yolu ile gerçekleştiren enzimlerdir. Her enzimin özgüllüğü, amino

grubu vericisi olarak kullanılan kendi aminoasitinden kaynaklanır. Örneğin; AST enziminin amino grubu vericisi aspartat, ALT enziminin amino grubu vericisi ise alanin aminoasitleridir. AST ve ALT ile katalizlenen bu reaksiyonlarda denge, sırası ile aspartat ve alanin oluşumu yönünde gerçekleşir (Burtis ve Ashwood, 2005). ALT, SGPT (serum glutamik pirüvik transaminaz); AST ise SGOT (serum glutamik oksaloasetik transaminaz) olarak da adlandırılır. ALT, karaciğerde bolca bulunurken, kalpte ve iskelet kasında daha az miktarlarda bulunur. AST ile karşılaştırıldığında ALT miktarı daha azdır. Bu nedenle karaciğerde olan bir hasarı tespit etmede ALT'nin serumdaki artışı AST'den daha belirleyicidir. ALT enzimi hepatositlerde sadece sitosolde bulunur. Serumdaki normal seviyesi 4-13 ünite/100 ml'dir (Akın vd., 1992; Dilek, 2003; Burtis ve Ashwood, 2005).

2.1.1. Sıçan karaciğeri

Karaciğer ağırlığı sıçanlarda, vücut ağırlığının yaklaşık %4'ünü teşkil etmektedir (Palmes ve Spiegel, 2004). Sıçan karaciğeri sağ ve sol medyan, sağ ve sol lateral ve kaudat loblardan oluşan multilobuler bir yapıya sahiptir. Üst üste yığınlar halinde bulunan sıçan karaciğerinde sadece kaudat lob mide sayesinde bu yığından ayrılır. Medyan lob, en büyük lobdur ve sol lateral lob ile ilişkilidir (Şekil 2.2) (Gershbein ve Elias, 1954; Martins ve Neuhaus, 2007). Kaudat lob, portal ven ve inferior vena cavanın sol tarafında ve sol lateral lobun arkasında konumlanmış olup (Martins ve Neuhaus, 2007), iki bölümden oluşmuştur (Gershbein ve Elias, 1954; Martins ve Neuhaus, 2007).



Şekil 2.2. Sıçan karaciğeri (Waynforth ve Flecknell, 1994).

2.2. Karaciğer Rejenerasyonu ve Moleküler Mekanizması

2.2.1. Karaciğer rejenerasyonunun aşamaları

Rejenereasyon, bir doku veya organda meydana gelen hasarın giderilmesi yönünde oluşan hipertrofik ve/veya hiperplazik bir yanıttır (Gökçimen vd., 1999; Taub, 2004). PH sonrası, karaciğerin kalan loblarının genişlemesiyle rejenerasyon sürecine girilir (Fausto vd., 2006) ki bu sırada karaciğer fonksiyonlarını yerine getirmeye devam eder (Taub, 2004).

PH sonrası rejenerasyon işlevsel karaciğer kütlesinin azalmasına ve çıkarılan karaciğer lobunun büyüklüğüne bağlıdır. 2/3'ten daha az olan PH uygulamalarında karaciğer rejenerasyonu daha yavaştır. %90 gibi daha büyük miktarlarda PH uygulamalarında ise akut karaciğer hasarı ve hatta ölüm görülebilir (Palmes ve Spiegel, 2004).

Karaciğer rejenerasyonu, PH hasarından sonra yaklaşık 24 saat içinde hepatositlerin G_0'dan çıkıp G_1/S kontrol noktasına geçişi ile başlar (Taub, 2004; Zimmermann, 2004). Zon I'den zon III'e doğru 36-48 saat içinde proliferasyon gerçekleşir. PH'den 48 saat sonra sinuzoidler ve Disse aralığı yeniden yapılandığı gibi hepatik stellat hücreleri eski popülasyonuna ulaşır, ekstrasellüler matriks proteinleri yeniden sentezlenir (Zimmermann, 2004). PH sonrası MAPK, ERK, JNK gibi birçok yolak ve NF-kB, STAT3, AP-1, C/EBPβ gibi transkripsiyon faktörleri aktive olur (Taub, 2004).

Karaciğer rejenerasyonu genel olarak 4 aşamada gerçekleşir (Taub, 2004; Zimmermann, 2004);

1. Başlangıç fazı,
2. Çoğalma/Genişleme fazı,
3. Lobülün şekillenmesi,
4. Sonlanma fazı,

2.2.1.1. Başlangıç fazı

PH sonrası kanda lipopolisakkarit seviyesi artar. Non-parankimal hücreler aktive olur ve TNF-α ve IL-6 seviyeleri artar. TNF-α ve IL-6, hepatositlerin G_0'dan G_1'e geçişini uyarır. IL-6, IL-6R ve gp130R üçlü kompleksi STAT3'ün uyarılmasını sağlar ve hücre çoğalması gerçekleşir (Taub, 2004; Zimmermann, 2004; Fausto vd., 2006). Bu kompleks MAPK yolağını da aktive eder (Taub, 2004). NF-κB, JNK ve ERK aktivitesi artar (Iimuro ve Fujimoto, 2010). Başlamanın ardından 2 saat içinde; c-Fos, c-Jun, c-Myc aktive olur. PH'den dakikalar sonra JNK/c-Jun yolağı aktive olur. Böylece siklin D1 sayesinde G_0'dan G_1'e geçiş olur (Zimmermann, 2004) (Şekil 2.3).

2.2.1.2. Çoğalma/genişleme fazı

Bu fazda hücre döngüsünün ilerlemesi için büyüme faktörleri ve TGF-α görev alır. Hepatosit büyümesi, parankimal ve non-parankimal hücreler arasındaki etkileşime bağlıdır. Proliferasyon, siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) ile kontrol edilir. Hepatositlerde G_2/M geçişini, hücre döngüsü bağımlı nüklear protein düzenler (Zimmermann, 2004) (Şekil 2.3).

TGF-α, non-parankimal hücrelerde sentezlenir ve replikasyona paralel olarak gerçekleşir (Taub, 2004; Zimmermann, 2004; Gomez vd., 2007). HGF, PH sonrası non-parankimal hücreler tarafından üretilir ve hepatositlerdeki reseptörü üzerine etki ederek rejenerasyonun ilerlemesini sağlar (Taub, 2004; Zimmermann, 2004; Gomez vd., 2007).

VEGF sinuzoidal endoteliyal hücreler ile etkileşim içindedir. HGF'nin artmasını sağlar. Hepatik büyümeye etkisinin mekanizması bilinmemektedir (Taub, 2004). VEGF, anjiyogenezde rol oynar (Tekkesin vd., 2011). EGF, duodenum tarafından üretilir (Taub, 2004). Hepatosit üzerindeki reseptörlerine bağlanarak proliferasyonda önemli bir rol oynar. PH sonrası, EGF uygulaması karaciğeri rejenerasyona yönlendirir (Gomez vd., 2007). EGF reseptörü ve c-Met hepatositlerin hücre döngüsü kontrol noktalarından (G_1/S, G_2/M) geçişini uyarır ve MAPK, STAT3, Pi3K/Akt ve ERK1/2 gibi yolakları aktive eder. c-Met

ERK1/2 aracılığı ile G_2/M geçişini düzenler ve c-Met sinyalinin kaybı ile rejenerasyon potansiyeli düşer (Gilgenkrantz ve Collin de l'Hortet, 2011).

2.2.1.3. Lobülün şekillenmesi

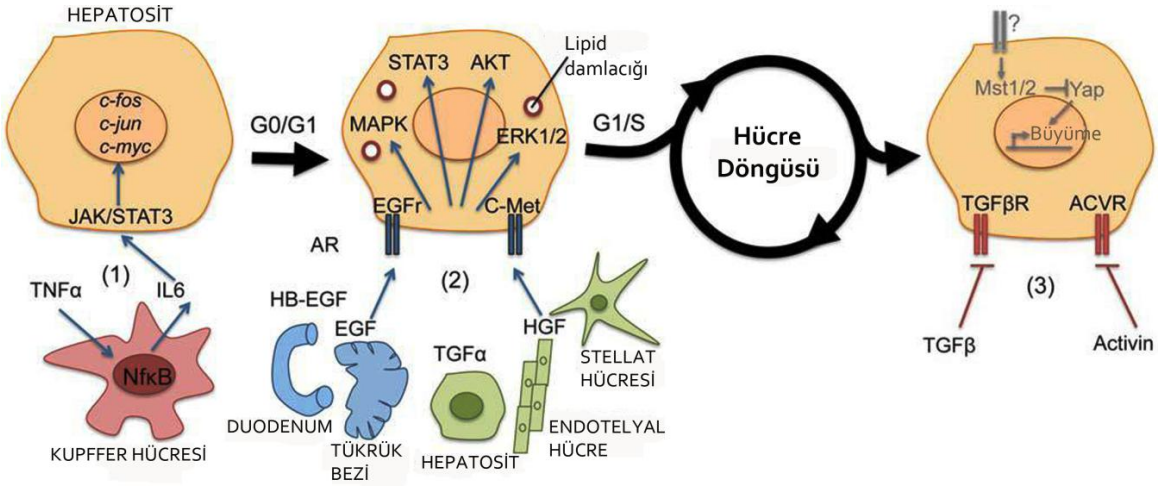
PH sonrası rejenere olan karaciğerde, 10-14 hücrelik hepatosit kümeleri oluşur. PH'den yaklaşık 4 gün sonra hepatositler ile endoteliyal hücreler arasında bağlantı kurulur. Hepatik stellat hücreleri ekstrasellüler matriksi üretir ve karaciğerin yeniden yapılanmasını sağlar (Taub, 2004). Karaciğerin yeniden yapılanmasında Connexin-32 (bir gap junction proteini), Keratin-8 ve plazminojen aktivatörleri de görev alır (Taub, 2004). Keratinler hepatositlerin hayatta kalmasında, strese dirençte, apoptozda ve bütünlüğün korunmasında etkilidir (Zimmermann, 2004). Apoptoz ve sağ kalım arasındaki denge karaciğerin yeniden yapılanmasında çok önemlidir (Zimmermann, 2004) (Şekil 2.3).

2.2.1.4. Sonlanma fazı

Karaciğer rejenere olup belirli bir büyüklüğe geldikten sonra çoğalma yanıtı sonlandırılır. Bu fazda, TGF-β ve aktivinler görev alır. TGF-β ve aktivin, hepatositlerde DNA sentezini inhibe eder ve hepatik organ kütlesini düzenler (Zimmermann, 2004). Ayrıca karaciğer rejenerasyonu sırasında HGF'nin uyarıcı etkilerini düşürür. TGF-β'nın anti-rejeneratif etkisinin hepatositlerde oksidatif stresin uyarımı tarafından ayarlandığı düşünülmektedir (Gomez vd., 2007) (Şekil 2.3).

TGF-β, hepatic stellat hücrelerinde üretilir ve hepatosit proliferasyonunun inhibisyonunda görevlidir. TGF-β'nın aşırı üretimi fibrozis ve apoptoza neden olur (Taub, 2004). Rejenerasyon sırasında hepatositlerde, proTGF-β aktivasyonunu uyarılır. Böylece sonlanma yanıtı geldiğinde hepatositlerde TGF-β/Smad yolağı aktive olur (Taub, 2004; Zimmermann, 2004). TGF-β, hepatositlerde siklin E salınımını durdurur böylece interfazda G_1'den S fazına geçiş durur (Taub, 2004). Ayrıca TGF-β1, hepatosit apoptozunu uyarır. Bu etki de sonlanma yanıtına katkıda bulunabilir (Zimmermann, 2004). SnoN ve Ski, TGF-β/Smad yolağını baskılar. Rejenerasyon sırasında ifadeleri artar. Smad proteinlerine bağlanarak sonlanmayı durdururlar (Taub, 2004; Zimmermann, 2004).

Aktivin A, hepatosit proliferasyonunu inhibe eder; follistatin aktive eder ve kütle artışına katkıda bulunur (Taub, 2004; Zimmermann, 2004). Follistatin hücre farklılaşmasını ve büyümesini düzenler (Gökçimen vd., 1999). Aktivin A, bir otokrin inhibitör olarak hepatositlerde DNA sentezinin başlamasını engeller. Ayrıca karaciğer kütle kaybını ve follistatin ile engellenmiş apoptozun başlamasını uyarır. PH sonrası, Aktivin A reseptörleri 24 saatte azalır, 72 saatte normale döner (Zimmermann, 2004).



Şekil 2.3. PH sonrası karaciğer rejenerasyonun aşamaları: 1. Başlama fazı 2. Metabolik ve büyüme faktörleri fazı 3. Sonlanma fazı (Gilgenkrantz ve Collin de l'Hortet, 2011).

2.2.2. Karaciğer rejenerasyonunda görevli bazı yolaklar

2.2.2.1. IL-6/STAT3 yolağı

Sitokinler, JAK/STAT yolağını aktive eder. JAK'lar tirozin rezidülerini fosforile eden kinazlardır. Bir yüzleri dıştaki sitokin ligandlarına, diğer yüzleri de hücre içine uzanır. Çeşitli sitokinler, farklı JAK proteinlerini aktive ederler. Memelilerde JAK1, JAK2, JAK3 ve Tyk2 olmak üzere 4 farklı JAK molekülü tanımlanmıştır (Kılıçturgay, 2003; Garbers vd., 2015).

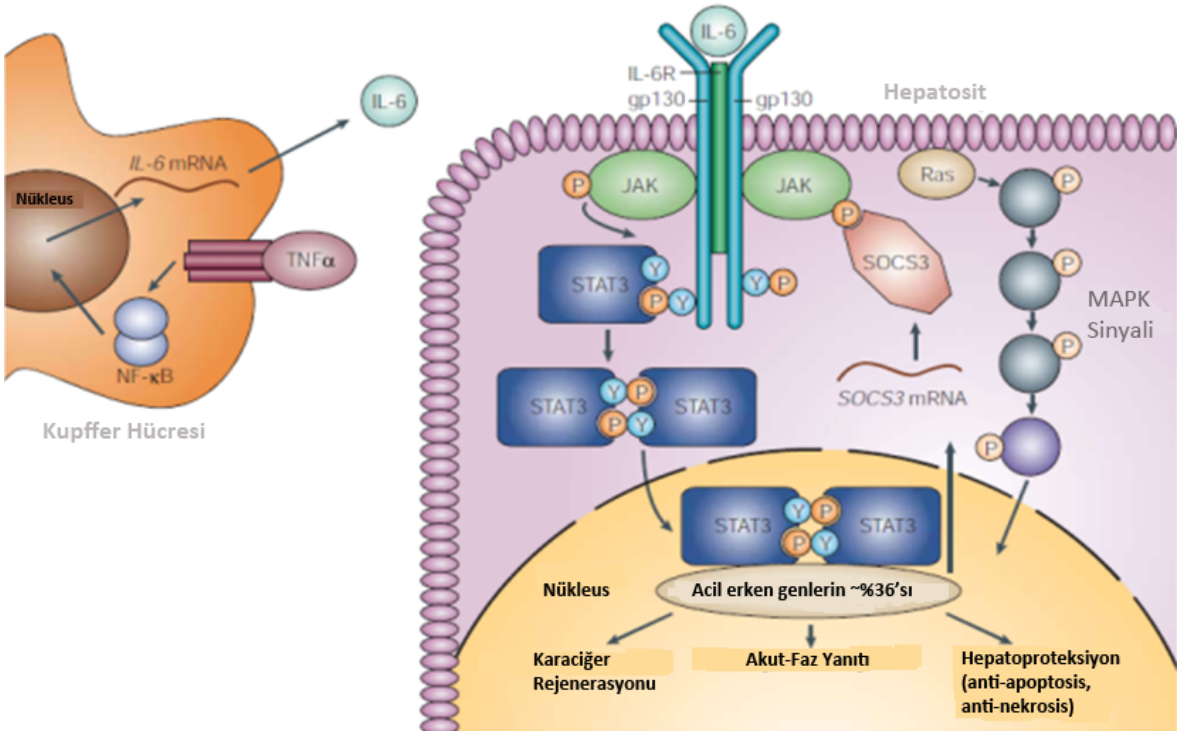
PH sonrasında karaciğerin hücre döngüsüne girmesinde TNF-α ve IL-6 önemli rol oynar. PH'nin ardından non-parankimal hücrelerde TNF-α ifadesi olur ve komşu

hücrelerde TNF-α/TNFR1 bağlanması gerçekleşir. NF-kB aktive olup DNA'ya bağlanır ve IL-6 ifadesi artar. Hepatositlerde IL-6, IL-6R1 reseptörüne bağlandığında JAK1'ler ve reseptörün uzun zincirlerinin tirozinleri JAK1'ler tarafından fosforile olur. JAK1/STAT3 yolağı aktive olur. JAK1 aktivasyonunun ardından gp130 homodimerizasyonu gerçekleşir (Taub, 2004; Gao, 2005; da Silva vd., 2013). STAT3 sitoplazmada yer değiştirip bu reseptör kinaz kompleksinin aktif bölgesine bağlanır ve JAK1'ler ile fosforlanıp aktifleşir. İki STAT3 molekülü, dimerleşip nükleusa geçerek DNA'ya bağlanır ve burada hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Gao, 2005; Guo vd., 2012; da Silva vd., 2013; Lepiller vd., 2013). STAT3 çekirdeğe girdiğinde c-Fos, c-Jun, c-Myc, JunB, siklin D1, survivin, Mcl-1, SOCS, C/EBPβ, p21, Bcl-2, Bcl-xL ve akut faz genleri gibi çoğu hedef genin transkripsiyonunu sağlar (Gao, 2005; Guo vd., 2012; Lepiller vd., 2013). Böylece hepatosit proliferasyonu başlar, apoptoz da önlenmiş olur (da Silva vd., 2013; Lepiller vd., 2013). Hepatositlerde IL-6 sinyali, SOCS3'ün IL-6/STAT3 aracılı uyarımı sonucu negatif feedback ile düzenlenir (da Silva vd., 2013) (Şekil 2.4).

JAK/STAT yolağındaki gen mutasyonları ciddi immunoljik problemlere yol açabilir (Kılıçturgay, 2003). IL-6/STAT3 yolağı, karaciğerin korunmasında ve rejenerasyonunda; birçok apoptotik ve mitojenik proteinin uyarılmasında önemli rol oynar (Gao, 2005). STAT3 hücre döngüsü kontrol noktalarında, DNA tamirinde önemli rol oynadığından; IL-6/STAT3 yolağındaki bir aksaklık veya genlerde oluşabilecek bir mutasyon tümör gelişimine neden olabilir (Isomoto vd., 2007; Reyhani, 2011).

i. NF-κB

NF-κB, B lenfosit hücrelerinde tanımlanmıştır. Karaciğer homeostazisinin korunmasında, immun ve enflamatuar yanıtın oluşmasında görevli önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Ahn ve Aggarwal, 2005; Iimuro ve Fujimoto, 2010). Birçok molekül, nükleusa hızlı sinyal ileten NF-κB yolağını kullanır (Kılıçturgay, 2003). Memelilerde 5 farklı NF-κB ailesi tanımlanmıştır ve bu formlar birçok farklı homodimer veya heterodimer oluştururlar (Ahn ve Aggarwal, 2005; Sudo vd., 2008). NF-κB'nin en yaygın formu p50 ve p65 heterodimerleridir (Sudo vd., 2008).



Şekil 2.4. IL-6/STAT3 yolağı ve yolakta görevli proteinler (Taub, 2004).

NF-κB ailesinin 5 üyesi bulunmaktadır (Burkitt vd., 2015):

1. NF-κB1 (p50/öncüsü p105)
2. NF-κB2 (p52/öncüsü p100)
3. Rel A (p65)
4. Rel B
5. c-Rel

Uyarılmamış bir hücrede NF-κB, sitoplazmada konumlanmıştır. NF-κB, çeşitli sitokin ve mitojenler tarafından aktive olur (Ahn ve Aggarwal, 2005). TNF-α, NF-κB'yi TNFR'nin alt birimleri aracılığıyla aktive eder. TNF aracılı NF-κB aktivasyonu, fosforilasyon ve ubiquitin aracılı protein yıkımı ile inaktifleşen IκBα kinaz ile gerçekleşir. Böylece NF-κB serbest kalır ve sitoplazmadan nükleusa geçerek DNA'ya bağlanır (Ahn ve Aggarwal, 2005; Iimuro ve Fujimoto, 2010). NF-κB birçok genin regülasyonunda görev alır. Örneğin; G_1'den S'e geçiş için gerekli olan siklin D1, anjiyogenez için gerekli olan adhezyon molekülleri ve VEGF NF-κB tarafından düzenlenir (Ahn ve Aggarwal, 2005).

NF-κB aktivasyonun bloke edilmesi; NF-κB yolağında bulunan IκBα, IKK ve p65 proteinlerinin bloke edilmesi ile olur. Bu inhibisyon da; IκBα degredasyonuna aracılık eden proteozom inhibitörleri, IKK fosforilasyonuna aracılık eden kinaz inhibitörleri ile gerçekleşir (Ahn ve Aggarwal, 2005; Iimuro ve Fujimoto, 2010).

ii. IL-6

Sitokinler, hücreler arasında sinyal ileten, düzenleyici moleküllerdir. Farklı dokularda çeşitli hücreler tarafından salgılanıp birçok farklı biyolojik fonksiyonları kontrol ederler. Hücrelerde sentezlendiklerinde otokrin ve parakrin etki gösterirler. Sitokinler, 20-30kDa ağırlığında peptid veya glikoprotein yapısındaki çözünür maddelerdir (Kılıçturgay, 2003).

IL-6, çeşitli fonksiyonları olan multifonksiyonel bir sitokindir (Rees vd., 1999; Gao, 2005). Mononüklear fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreler ile bazı aktive T lenfosit hücreleri tarafından sentezlenirler (Khan, 2008). İmmun yanıt, inflamatuar reaksiyon ve hematopoiezden sorumludur (Rees vd., 1999; Gao, 2005).

IL-6, karaciğer rejenerasyonu sırasında hasara karşı koruyucu rol oynar ve hücre proliferasyonunda görevlidir. IL-6, hepatositleri uyararak çeşitli akut faz proteinlerinin üretilmesini sağlar (Rees vd., 1999; Gao, 2005; Khan, 2008). Rejenerasyon sırasında, IL-6 farklı hücre tipleri üzerinde çeşitli biyolojik aktiviteler gösterir (Scotté vd., 1993).

PH sonrası, TNF-α'nın uyarılmasıyla aktive olan IL-6, rejenerasyonu uyaran önemli bir mitojen ve anti-apoptotik faktördür (Fausto vd., 2006). IL-6 reseptörüne bağlandığında, gp130 homodimerizasyonu veya IL-6R1/gp130 heterodimerizasyonu uyarır (Gao, 2005).

IL-6 seviyesinin artması, otoimmun bozukluklara ve karsinoma gibi hastalıklara yol açar. İnsan IL-6 cDNA'sı; 4 sistein ile 2 disülfit bağı yapan 184 aminoasitlik bir protein kodlar. İnsan ve sıçan IL-6 proteini %58 oranında benzerlik gösterir. İnsanda, IL-6'nın benzer 4 korunmuş sisteini varken; sıçanlarda, buna ek olarak 1 tane de eşleşmemiş sistein bulunmaktadır (Rees vd., 1999).

IL-6 ailesine ait 6 üye vardır: IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), oncostatin M (OSM), cardiotrophin-1 ve İnterlökin-11 (IL-11). Bunlar, benzer şekilde 4 heliks demeti içerir ve sinyal için gp130 proteinini kullanır. Reseptörüne bağlanan sitokin; ya gp130 homodimerizasyonu ya da sitokine özel reseptörler ile gp130 heterodimerizasyonu uyarır (Gao, 2005; Garbers vd., 2015).

iii. STAT3

Çeşitli sitokinler, farklı STAT proteinlerini aktive ederler. Memeli hücrelerinde STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olmak üzere yedi STAT proteini tanımlanmıştır (Kılıçturgay, 2003; Doğan ve Güç, 2004; Reyhani, 2011). IL-6 ve IL-6 ilişkili sitokinler başta olmak üzere, STAT3'ün aktivasyonu fosforilasyon ile sağlanır (Taub, 2004). STAT3, akut faz yanıtı, karaciğer hasarına karşı koruma, karaciğer rejenerasyonu, glukoz homeostazisi ve hepatik lipid metabolizmasında rol oynar (Gao, 2005). STAT3, hepatositlerin çoğalmasından sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür. IL-6'nın hepatosit yüzeyindeki ilgili reseptörüne bağlanması sonucu JAK aracılığıyla STAT3 aktivasyonu gerçekleşir. Aktif STAT3 kompleksinin hücre çekirdeğine girip DNA'ya bağlanmasıyla hücre çoğalması ile ilgili genlerin transkripsiyonu başlar ve karaciğer rejenere olur (Taub, 2004; Gao, 2005).

STAT3 serin 727'den de fosforlanabilir ancak, önemli olan STAT3'ün tirozin 705'ten fosforlanması ile DNA'ya bağlanabilme yeteneği kazanmasıdır. PH sonrası aktive olan STAT ailesi üyelerinin en önemlisi STAT3'tür. Diğer taraftan STAT3:STAT3 homodimerinin DNA'ya bağlanma aktivitesi, STAT1:STAT3 heterodimerinden çok daha yüksektir (Campbell vd., 2001).

STAT proteinlerinde işlevsel bölgeler;

1. Oligomerizasyon bölgesi: STAT tetrameri oluşumunu sağlar.
2. DNA'ya bağlanma bölgesi: DNA'ya bağlanıp ligand uyarısına özgül sinyal oluşumunu sağlar.
3. SH2 (Src Homoloji-2) bölgesi: STAT-reseptör, STAT-JAK ve STAT-STAT bağlanmalarını sağlar.
4. C-terminal ucu: Transkripsiyonel aktivitenin özgünlüğünü ve kontrolünü sağlar.

5. Tirozin aminoasiti: N-ucundan yaklaşık 700 aminoasit uzaklıktadır. Tirozin fosforilasyonu ile aktivite kazanır (Doğan ve Güç, 2004).

STAT3 aktivitesinin kontrolsüz işleyişi tümör gelişimine yol açar (Zimmermann, 2004). Bu, iki mekanizma aracılığıyla olur. Bunlardan biri STAT'ın sürekli aktivasyonudur. Diğeri ise STAT'ın C-ucunun mutasyona uğramasıdır. Devamlı olarak aktif olan STAT proteini antiapoptotik yolları uyararak tümör gelişiminde etkili olabilir. Kontrolsüz STAT3 aktivitesi, VEGF seviyesini arttırarak, tümör anjiyogenezine sebep olmaktadır (Doğan ve Güç, 2004).

STAT'ların aktivasyonu, SOCS uyarılması aracılığıyla karşılıklı olarak düzenlenir. STAT'lar karaciğer hastalıklarının gelişimi ve ilerlemesini kontrol eder. STAT'ların değişimi, insan karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Gao, 2005).

iv. SOCS3

SOCS ailesi proteinleri; karboksil ucunda bulunan SOCS kutusu, merkezi bir SH2 bölgesi ve çeşitli uzunlukta N-terminal bölgesi içerir. SOCS proteinleri normalde hücrede inaktif halde bulunurlar. JAK/STAT yolağının aktivasyonu ile hızlı bir şekilde ifade edilip JAK/STAT mekanizmasını durdururlar. SOCS proteinleri, STAT'ların bağlanacağı yere bağlanarak sitokin sinyalini durdururlar. Ayrıca JAK'ın aktivasyonunu, tirozin kinaz reseptörüne bağlanarak inhibe edip sitokin sinyalini düzenler (Reyhani, 2011).

SOCS3, sitokin sinyali baskılayıcısı olup IL-6 sinyalinin negatif düzenleyicisidir (Guo vd., 2012). SOCS3 geninin promotorunda STAT3'e bağlanan bir bölge bulunmaktadır (Reyhani, 2011). SOCS3, STAT3'ün fosforile olmasını engeller (Mao vd., 2014). STAT3 fosforilasyonu ile SOCS3 ifadesi arasında ters bir ilişki vardır, SOCS3 promotorunun metilasyonu ile SOCS3 geni susturulur. SOCS3 ifadesinin yeniden oluşması, IL-6 aracılı STAT3 fosforilasyonunun süresini ve şiddetini azaltır, hücresel Mcl-1 düzeyleri azalır. Mcl-1 apoptozu baskılar (Isomoto vd., 2007).

Hücre bölünmesi ile ilgili genlerin aktivasyonu da SOCS3 ifadesini aktive eder (Taub, 2004; Elliott, 2008). SOCS fonksiyonundaki bir bozuluk; bazı kanserlere, hematopoietik bozukluklara ve otoimmün hastalıklara yol açar (Elliott, 2008).

v. c-Myc

c-Myc transkripsiyonu, STAT3 veya ERK'in çekirdeğe girip DNA'ya bağlanması ile uyarılır (Gao, 2005; Pazarbaşı vd., 2011). c-Myc proteini, gen ifadesinin transkripsiyonel kontrolünü sağlayan bir DNA bağlanma proteinidir (Zhang ve Liu, 2002). DNA üzerindeki 5'-CACGTG-3' dizisini tanır (Seitz vd., 2011). c-Myc ve Ras birlikte siklin E bağımlı kinaz aktivitesinin oluşmasını sağlar (Zhang ve Liu, 2002).

Myc proteini, transkripsiyon aktivasyonu için gerekli olan N-terminal ile DNA'ya bağlanması ve protein etkileşiminde önemli C-terminal bölgesine sahiptir. Myc molekülü sentezlenince hemen çekirdeğe taşınıp burada Myc-associated factor X (Max) ile bağlanıp transkripsiyonu sağlar. Fakat Max, Myc'nin antagonisti olan Mad ile bağlanarak transkripsiyonu baskılayabilir (Cansız, 2008; Seitz vd., 2011). Myc proteinleri, çeşitli transkripsiyon faktörlerini kodlar ve hücre çoğalması, büyümesi, farklılaşması ve apoptozda önemli görevleri vardır (Cansız, 2008).

2.2.2.2. MAPK yolağı

MAPK yolağı, evrimsel olarak korunmuş bir yolaktır. Hücre gelişim, farklılaşma, çoğalma ve sağ kalımını kontrol eder (Cooper ve Hausmann, 2006). MAP kinazlar, büyüme faktörleri ve diğer sinyal moleküleriyle aktive olan serin ve treonin protein kinazlardır. Mitojenik yolaklar ile etkinleşip çekirdeğe geçer ve transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını sağlar (Sümer Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010). MAPK ailesi dizi benzerliği ve işlev açısından 4 gruba ayrılır (Guégan vd., 2012):

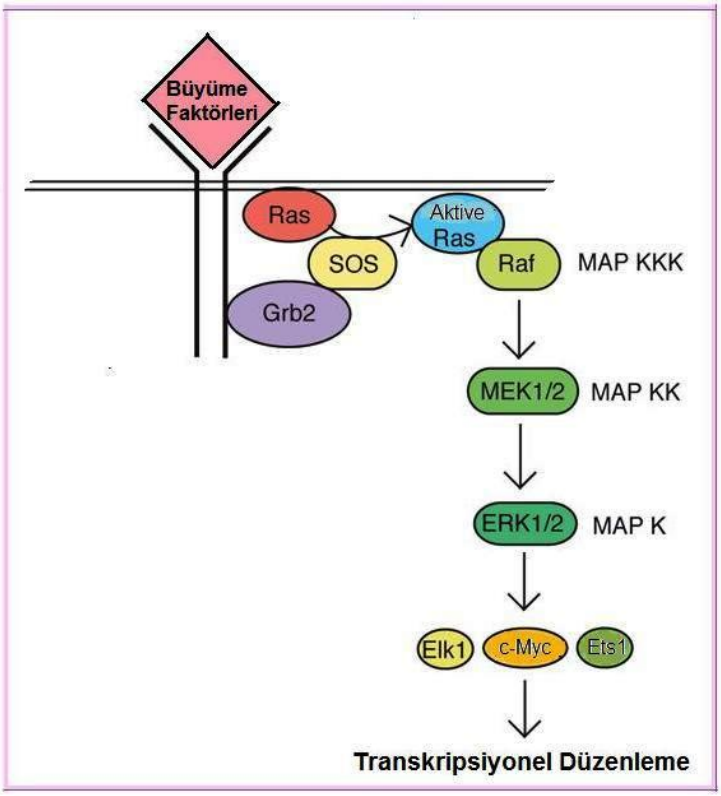
1. ERK1/2 (ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz)
2. P38
3. JNK (c-Jun NH2-terminal kinaz)
4. ERK 5

İlk olarak ERK ailesinin üyeleri tanımlanmıştır. ERK yolağının aktivasyonu GTP bağımlı çalışan bir protein olan Ras tarafından düzenlenir. Bir protoonkogen olan Ras, translasyon sonrası modifikasyondan sonra hücre zarına yerleşir. Normalde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Fakat hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak (Ras-GTP) Ras aktif hale geçer. Ras aktivasyonunda, SOS (son of sevenless) ve Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) adaptör proteinleri rol oynar. Ras aktivasyonu, GTPaz'ı aktive eden proteinler tarafından, GTP hidrolizi ile sonlanmaktadır. Aktif Ras proteinleri, RAF kinazlara bağlanırlar ve RAF kinazların hücre zarına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar (Doğan ve Güç, 2004; Cooper ve Hausmann, 2006) (Şekil 2.5).

Büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstrasellüler matriks proteinleri, hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlandığında Ras ve ardından RAF-1 aktive olur. c-RAF-1, MEK 1 ve 2'nin; MEK 1 ve 2 de ERK 1 ve 2'nin fosforilasyonunu sağlayıp aktive eder. MEK, ERK'i hem treonin-183 hem de tirozin-185'den fosforiller (Hancock, 2005; Cooper ve Hausmann, 2006). Aktive olan ERK, çekirdek ve sitoplazmadaki diğer protein kinazları ve transkripsiyon faktörlerini fosforlar. Aktif ERK'in çekirdeğe girip Elk1'i fosforillemesi ile acil erken genlerin trankripsiyonu uyarılır (Hancock, 2005; Cooper ve Hausmann, 2006) (Şekil 2.5).

MAPK aktivasyonu sonucu çekirdeğe geçen aktif ERK, hücre döngüsü ilerlemesinde görevli transkripsiyon faktörlerini fosforile eder. Ayrıca diğer kinazları da fosforile ederek çekirdeğe geçmelerini ve bunların da başka transkripsiyon faktörlerini fosforile etmelerini sağlar. En önemli transkripsiyon faktörleri arasında bulunan Ets1, Elk1, c-Myc, AP1, c-Fos ve c-Jun bu tip fosforilasyon ile uyarılırlar (Pazarbaşı vd., 2011) (Şekil 2.5). Bu olayların önemli bir sonucu olarak hücrelerde siklin D trankripsiyonu başlar. Siklin D birikimi de G_1 fazındaki hepatositlerde olduğu gibi hücrelerin çoğunda hücre döngüsü ilerlemesini sağlar (Pazarbaşı vd., 2011).

Treonin veya tirozindeki fosforlardan birinin koparılması sonucu MAPK'lar inaktive olur (Cooper ve Hausmann, 2006).



Şekil 2.5. MAPK yolağı ve yolakta görevli proteinler (Anonim, 2015).

i. RAF-1 (MAP kinaz kinaz kinaz)

RAF, hücrenin normal çoğalmasını denetleyen bir protoonkogendir. RAF proteini, amino ucunda bir düzenleyici bölge ve karboksil ucunda kinaz aktivitesinde görevli bölgeden oluşur (Cooper ve Hausmann, 2006). RAF-1, Ras (Rat sarkoma)-GTPaz ile MAPK/ERK yolağı arasında düzenleyici rol oynar. Aktif Ras-GTP kopleksinin oluşması ile RAF, çok sayıda protein ile etkileşime geçer. RAF hücre zarından sitozole taşınır. Burada protein-tirozin ve protein-serin/treonin kinazlar tarafından aktive olur. RAF aktivasyonu da MAP kinaz kinaz aktivasyonunu başlatır (Cooper ve Hausmann, 2006).

ii. MEK (MAP kinaz kinaz)

MEK, MAP kinaz/ERK kinaz'dır. RAF-1'in aktive olması MEK1 (MAP2K1=MAPKK1) ve MEK2 (MAP2K2=MAPKK2)'yi aktive eder. MEK de threonin-glutamin-tirozin dizisindeki treonin ve tirozin aminoasitlerinden fosforillenir. Bu

fosforilasyon sonrası MAP kinaz kinaz ve devamında MAP kinaz aktive olur. MEK1 ve MEK2, ERK'i aktive eder (Cansız, 2008; Sümer Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010).

iii. ERK (MAP kinaz)

MAP kinaz ise sitoplazmadaki diğer protein kinazları ve hücre iskeleti elemanlarını ve/veya çekirdekte transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Böylece hücrenin biyolojik cevabı oluşur (Cansız, 2008). ERK1 (p44 MAPK) ve ERK2 (p42 MAPK), hücre döngüsü proteinlerinin (p21, siklin D1, Cdk1) uyarılmasını sağlayan Elk1, Ets1, c-Fos, c-Jun, c-Myc, p53 gibi transkripsiyon faktörlerini içeren birçok molekülü fosforlar (Zhang ve Liu, 2002; Guégan vd., 2012).

MEK-ERK yolağı G_1/S, G_2/M geçişlerinin ve mitozun düzenlenmesinden sorumludur (Zhang ve Liu, 2002; Guégan vd., 2012).

iv. Elk1

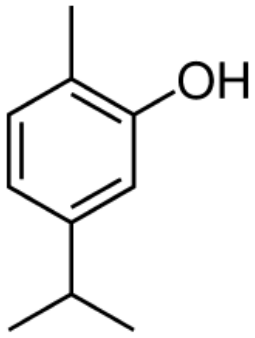
Elk1, Ets proto-onkogen ailesinin bir üyesidir. Aktive ERK'in çekirdeğe geçmesi ile Elk1, SRE (serum response element)-SRF (serum response factor) ile bağlanarak üçlü kompleks oluşturan bir transkripsiyon faktörüdür. Böylece bu üçlü kompleks tarafından tanınan bir düzenleyici dizi ile acil erken genlerin uyarımı sağlanır (Cooper ve Hausmann, 2006).

v. Ets1

Ets1, Ets proto-onkogen ailesinin bir üyesi olup özellikle DNA üzerindeki GGAA/T dizisini tanır (Dittmer, 2003). Ets1, çeşitli hücrelerde sitokin gen ifadesini kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. Hematopoietik hücrelerin farklılaşması, çoğalması, tümör gelişimi, anjiogenez ve apoptozda görev alır (Dittmer, 2003).

2.3. Karvakrol

Karvakrol, Lamiaceae familyasının esansiyel yağlarında fazla miktarda bulunan fenolik monoterpen yapısında bir bileşendir (Baser, 2008; Uyanoglu vd., 2008; Singletary, 2010). Karvakrol, kekiğin uçucu yağında %5-%75 oranında bulunur ve biyolojik aktivitesinden sorumludur (Baser, 2008). Karvakrolün antibakteriyel, antifungal, antimutajenik, antigenotoksik özelliklerinin yanında antihepatotoksik ve hepatoprotektif etkilerinin de olduğu bilinmektedir (Ipek vd., 2005; Baser, 2008; Melo vd., 2010; Melo vd., 2013). Bu çok sayıda yararlı etkilerinin yanı sıra karvakrol, rejenere olan karaciğer üzerine de olumlu etki göstermiştir (Uyanoglu vd., 2008). Karvakrolün antioksidan özelliği yapısında bulunan hidroksil grupları sayesindedir (Kulisic vd., 2004) (Şekil 2.6). Karvakrolün, kapalı formülü $C_{10}H_{14}O$'dur (Şekil 2.6). Sıçanlarda intraperitonel LD50: 73 mg.kg-1'dir (Azırak, 2007).



Şekil 2.6. Karvakrolün (5-isopropyl-2-methylphenol) kimyasal yapısı (Melo vd., 2010).

Karvakrolün yara iyileştirici etkisi, NIH3T3 fibroblast hücreleri ile yapılan çalışmalarda 0,01-100µg/mL karvakrol uygulaması ile ortaya konmuştur. Bu çalışma, 10µg/mL doza kadar olan karvakrolün, fibroblast hücrelerinin çoğalmasını arttırdığını buna karşın 100µg/mL karvakrolün ise fibroblast hücrelerine etki etmediğini göstermiştir (Baser, 2008). Ayrıca karvakrol, akciğer ve serviks kanserlerine karşı 75-200 µg/mL dozda etkili olmuştur (Baser, 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneysel çalışmamız; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Moleküler Biyoloji ve Histoloji Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'nun 335/2013 sayılı izni ile yapılmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Tüm deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilerek deney süresince 12:12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22±2°C) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Bu süre içerisinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslenmiş ve sıçanlara çeşme suyu verilmiştir.

3.2. Deney Grupları

Deneyde, ortalama ağırlıkları 250±30 gr olan *Wistar albino* ırkı 3 aylık erkek sıçanlar kullanılmıştır. Bu deneklerden rastgele seçilerek her grupta n=6 olacak şekilde 24 ve 48 saatlik 6 grup oluşturulmuştur. Bunlar;

GRUP I: Sham kontrol grubu hayvanları olup, PH işlemi gerçekleştirilmeden sadece cerrahi strese maruz bırakılarak 24 saat sonra diseksiyonları yapılmıştır.

GRUP II: Sham kontrol grubu hayvanları olup, PH işlemi gerçekleştirilmeden sadece cerrahi strese maruz bırakılarak 48 saat sonra diseksiyonları yapılmıştır.

GRUP III: PH'den 1 saat önce 1mL %0,9 NaCl (SF) periton içine (intraperitonel) enjekte edilerek 24 saat sonra diseksiyonları yapılmıştır.

GRUP IV: PH'den 1 saat önce 1mL %0,9 NaCl (SF) ip yolla verilerek 48 saat sonra diseksiyonları yapılmıştır.

GRUP V: PH'den 1 saat önce 73 $mg.kg^{-1}$ karvakrol ip yolla verilerek 24 saat sonra diseksiyonları yapılmıştır.

GRUP VI: PH'den 1 saat önce 73 $mg.kg^{-1}$ karvakrol ip yolla verilerek 48 saat sonra diseksiyonları yapılmıştır.

Deneysel çalışmamızda kullanılan %99 saflıktaki karvakrol, Prof. Dr. K.H.C. Başer tarafından, Origanum onites L. bitkisinden buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın gaz kromotografisi/kütle spektrometresi ile analizi yapılarak elde edilmiştir (Ipek vd., 2005).

3.3. Anestezi ve Cerrahi İşlemler

Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarına ait hayvanların anestezisi, kas içine 10 $mg.kg^{-1}$ ksilazin ve 70 $mg.kg^{-1}$ ketamin ile yapılmıştır.

PH yapılan deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edilmiştir. Cerrahi uygulama bölgesinin %70'lik etilalkol ile temizliği yapılmış olup Higgins ve Anderson'un (1931) tekniğiyle PH gerçekleştirilmiştir. Buna göre, deney hayvanının karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi yapılıp karaciğer loplarını birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin yaklaşık %68-70 oranında kütlesini oluşturan öndeki sağ, orta ve sol yan lopları ayrılmıştır. Bu loplara ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından atravmatik ipek iplik geçirilerek bağlanmış ve bağın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilmiştir. Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine karşı karın boşluğuna steril SF verilmiştir. Laporoktomi bölgesi, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 4/0 ipek iplikle dikilerek kapatılıp antiseptik solüsyon ile temizlenmiştir. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik,

polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın gruplara bağlı olarak 24 ve 48 saat boyunca yaşatılmıştır. Süre sonunda deney hayvanları, kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürülüp orta hat kesisi gerçekleştirilerek karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

3.4. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda kalpten alınan kan örnekleri, Eppendorf marka, 5804 R model santrifüj cihazı ile 10dk 3000 rpm devirde santrifüjlenerek serumlar elde edilmiştir. Polietilen tüplere aktarılan serum örnekleri biyokimyasal analizler için -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Tüm gruplarda kalpten kanın alınmasından hemen sonra her bir hayvana ait karaciğer çıkarılıp serum fizyolojik ile hızlı bir şekilde yıkanmıştır. %70 PH işlemi uygulanmış Grup III, IV, V ve VI'daki tüm deney hayvanlarının kalan %30'luk karaciğerlerinin 24-48 saat sonraki ağırlık değişimleri Precisa XB 220A marka ve model, 10-4 hassas terazi ile tartılarak belirlenmiş ve Child vd.nin (1953) aşağıdaki formülü kullanılarak rejenerasyon oranları (RO) hesaplanmıştır.

$$\text{Rejenerasyon Oranı (RO)} = \frac{\text{Otopsi sırasındaki karaciğer ağırlığı} - \text{Hepatektomiden sonra kalan Karaciğerin tahmini ağırlığı}}{\text{Hepatektomi sırasında alınan KC ağırlığı}} \times 100$$

Karaciğer dokusu iki kısma ayrılarak birinci kısım histolojik analizler için %10'luk nötral formaldehit fiksasyon sıvısına alınmıştır. İkinci kısım karaciğer örnekleri ise RT-PCR ve Western Blot analizleri için -80ºC derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4.1. Serum biyokimyası

Karaciğer hücrelerinin olası fonksiyon bozukluğunu tespit etmek amacıyla biyokimyasal olarak serum örneklerinde ALT enziminin seviyesi belirlenmiştir. Ölçümler,

HITACHI-917 oto analizörü ile Human (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden Germany) marka ticari kitler kullanılarak yapılmıştır.

3.4.2. Histolojik analizler

%10'luk nötral formaldehit sıvısına alınan ve kimyasal fiksasyonu tamamlanan tüm karaciğer doku örneklerine histolojik takip işlemleri uygulanmış, parafin blokları hazırlanmıştır. Bu bloklardan mikrotom (Leica RM 2025) kullanılarak 4-5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitlerin bir kısmında ışık mikroskop düzeyde histopatolojik incelemeler yapılmak üzere standart H&E boyama uygulanmıştır.

3.4.2.1. <u>İmmunohistokimya boyama</u>

Kesitlerin diğer bir kısmında ise hepatositlerde çoğalan hücrelerin belirlenmesi için ticari PCNA antikorları kullanılarak immunohistokimya uygulanmıştır. PCNA boyama, abcam ab18197 anti-PCNA antikoru kullanılarak aşağıda belirtilen malzeme ve yöntem kullanılarak yapılmıştır. Her bir hayvana ait immünohistokimya yapılmış karaciğer kesitlerinde hepatosit proliferasyonu incelenmiştir. Mikroskobik olarak PCNA işaretli karaciğer hücrelerinin çekirdekleri kahverengi-kızıl, mitotik aktivite göstermeyen hücreler ise mavi-lacivert renkte görüntülenmiştir. Rastgele seçilmiş farklı kesit alanlarında 1000 adet parankimal karaciğer hücresinde belirlenen PCNA pozitif çekirdekli hücrelerin sayısının % olarak ifadesiyle PCNA indeksi çıkarılmıştır.

- **1L Sodyum sitrat tamponu pH 6.0**

Tri-sodyum sitrat (di-hidrat) 2,9g
Distile su 1000mL'de çözülmüştür.
1M HCl ile pH 6.0'a ayarlanmıştır.
0,5mL Tween 20 eklenmiştir.
(İstenirse 4ºC'de 3 aydan fazla saklanabilir.)

- **Tris-buffer saline (TBS) pH 7.6**

Sodyum klorid 8g

1M Tris HCl pH 7.6 20mL

Distile su ile 1000mL'ye tamamlandı.

- **Diluent ve yıkama solüsyonu TBS Tween (TBS-T)**

1 L TBS'de %0,1 oranında (1mL) Tween 20 çözülmüştür.

- **Membran bloklama ajanı**

5g yağsız süttozu 100mL TBST'de çözülmüştür.

Uygulama basamakları:

1. Mikrotomda 4-5µm kalınlığında kesitler lam üzerine alınmış ve etüvde 60ºC'de 45 dk inkübe edilmiştir.
2. Lamlar 3 defa 5'er dk ksilen ile yıkanmıştır.
3. Lamlar %100'lük alkolde 3 defa 3'er dk yıkanmıştır.
4. Lamlar %95'lik alkolde 2 defa 3'er dk yıkanmıştır.
5. Lamlar %80'lik alkolde 2 defa 3'er dk yıkanmıştır.
6. Lamlar distile suda 5dk yıkanmıştır.
7. Lamlar, 10mM sodyum sitrat tamponunda (pH 6.0) 95-100ºC'de inkübe edilmiştir.
8. Lamlar aynı tampon içerisinde 20dk oda sıcaklığında soğutulmuştur.
9. TBST'de 1dk yıkama yıkanmıştır.
10. Her bir lama 100µL bloklama solüsyonu eklenip 20-30dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
11. Bloklama solüsyonu döküldü. Her bir lama 100µL 1:500 oranında sulandırılmış primer antibody eklenip 45dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
12. Lamlar TBST ile 4 defa 5'er dk yıkanmıştır.
13. Lam üzerine renk güçlendirici (örn: enzim) 30dk uygulanmıştır.
14. Lamlar TBST ile 4 defa 5'er dk yıkanmıştır.
15. Distile su ile 1dk yıkanmıştır.
16. Lamlar %80'lik alkolde 2 defa 1'er dk yıkanmıştır.
17. Lamlar %95'lik alkolde 2 defa 1'er dk yıkanmıştır.
18. Lamlar %100'lük alkolde 3 defa 1'er dk yıkanmıştır.
19. Lamlar 3 defa 1'er dk ksilen ile yıkanmıştır.

20. Lamlar entellan ile kapatılmıştır.

Hazırlanan tüm doku kesitleri Olympus CX31 marka ve model ışık mikroskobunda incelenerek Olympus Camedia marka, C-5060 model compact dijital kamera ile fotograflandırılmıştır.

3.4.3. RT-PCR analizi

NF-κB, IL-6, STAT3, SOCS3, c-Myc, RAF-1, MEK1, MEK2, ERK1, MAPK4, Elk1 ve Ets1 genlerini kodlayan gen bölgelerinin aktivitesi aşağıdaki malzeme ve yöntemler kullanılarak ölçülmüştür.

3.4.3.1. Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu

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

1. 50-100mg karaciğer doku örneği 1mL TRIzol ve Next Advance ZrOB05-RNA 0,5mm RNase-free bilyeler kullanılarak Next Advance Bullet Blender Storm 24 homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir.
2. TRIzol içeren lizatlar oda ısısında nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışmasını sağlamak amacıyla 5dk inkübasyona bırakılmıştır.
3. Ardından 0,2mL kloroform lizatlar üzerine eklenmiştir ve 15sn boyunca elde tüpler titreştirilerek çalkalanmıştır.
4. 2-3dk boyunca lizatlar oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
5. Örnekler 12000xg'de 15 dk +4^{o}C'da santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrası karışım zayıf faz, kırmızı fenol klorofom fazı, ara faz ve renksiz RNA içeren üst faza ayrılmıştır. (Üst fazın hacmi ~600µL'dir.)
7. RNA içeren renksiz üst fazdan RNAaz-free tüplere ~400µL aktarılmıştır.
8. Daha sonra tüplere eşit hacimde %70 etanol ilave edilmiştir.
9. Karışım iyice vortekslenmiştir.

10. Etanol ilave edildikten sonra oluşabilecek çökeltileri dağıtmak için tüpler ters yüz edilmiştir.
11. Örneklerden ≤700µL koleksiyon tüpleri içeren Spin kartuşlara aktarılmıştır.
12. 12000xg'de oda sıcaklığında 15sn santrifüj edilmiştir.
13. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atıldı ve aynı koleksiyon tüpü Spin kartuşa takılmıştır.
14. Bütün örnek işlemden geçinceye kadar 12 ve 13. basamaklar tekrar edilmiştir.
15. Spin kartuşların üzerine 700µL Wash Buffer I ilave edilmiştir. Kartuşlar 12000xg'de oda sıcaklığında 15sn santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı ve aynı koleksiyon tüpü atılmıştır. Spin kartuşa yeni koleksiyon tüpü takılmıştır.
16. Kartuşa etanollü Wash Buffer II'den 500µL ilave edilmiştir.
17. 12000xg'de oda sıcaklığında 15sn santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atılmış ve aynı koleksiyon tüpü Spin kartuşa takılmıştır.
18. 16 ve 17. basamaklar tek seferliğine tekrarlanmıştır.
19. 12000xg'de oda sıcaklığında 1dk membran kuruyuncaya kadar santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılmıştır ve Spin kartuş geri kazanım tüpüne yerleştirilmiştir.
20. 30-100µL RNaz-free su Spin kartuşların merkezine ilave edilmiştir.
21. Örnekler oda sıcaklığında 1dk inkübe edilmiştir.
22. Geri kazanım tüpüne yerleştirilen Spin kartuşlar oda sıcaklığında ≥12000xg'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
23. Arındırılmış RNA'lar hemen kullanım için birkaç saat buz üzerinde ya da uzun süreli saklama için -80^{o}C'da saklanmıştır.

Elde edilen RNA'lar, NanoDrop ND_1000 Spectrophotometer cihazı ile 2µL örnek kullanılarak ölçülmüştür.

3.4.3.2. RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi

RT-PCR işleminde gerekli olan cDNA için RNA örnekleri High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosysems, Cat. No: 4387406) kullanılarak belirtilen protokol çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

1. cDNA için RNA örnekleri konsantrasyonları 2000ng'a eşitlenmiştir. 20µL reaksiyon başına total RNA'nın 2 µg kadarı kullanabilir.
2. Kit parçalarının buz üzerinde çözülmüştür.
3. Aşağıdaki tabloya göre, gerekli sayıda reaksiyonları hazırlamak için gerekli bileşenlerin hacmi hesaplanmıştır.
   - 2X RT Buffer 10µL
   - 20X Enzim Karışımı 1µL
   - RNA Örneği 9µL'ye kadar
   - Nükleaz Free Su 20µL'ye tamamlanmıştır.
   - Reaksiyon Başına Toplam 20 µL
4. RT reaksiyon karışımı plate içine bölünmüştür.
5. Plate'in üzeri optik adheziv film ile kaplanmıştır.
6. Herhangi bir hava kabarcığını ortadan kaldırmak ve içeriğin aşağı inmesini sağlamak için plate kısaca santrifüj edilmiştir.
7. Reverse transkripsiyon reaksiyonunu başlatmak için hazır olana kadar plate buz üzerinde tutulmuştur.
8. 37°C'de 1 saat reaksiyon için inkübe edildi. 5dk 95°C'ye kadar ısıtılarak reaksiyon durduruldu ve 4°C'de tutulmuştur (İnkübasyonun kolaylığı için reaksiyon, bir thermal cycler içinde gerçekleştirilebilir).
9. Elde edilen cDNA, RT-PCR uygulaması için kullanılmıştır (Elde edilen cDNA, -15°C ile -25°C arasında uzun süreli olarak saklanabilir).

3.4.3.3. RT-PCR işlemi

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

1. cDNA örnekleri 100ng olacak şekilde nükleaz free su kullanılarak ayarlandı ve 9µL eklenmiştir.
2. 2X TaqMan Gene Expression Master Mix'ten 10µL eklenmiştir.

3. TaqMan Gene Expression Assay'den 1µL eklenmiştir. Plate'in üzeri optik adheziv film ile kaplanmıştır.
4. RT-PCR işlemi 50°C'de 2dk, 95°C'de 10dk, 95°C'de 15sn, 60°C'de 1dk gerçekleştirilmiştir.

   Gen ifadeleri β-Actin'e göre değerlendirildi. RT-PCR'da Life Technologies marka primerler kullanılmıştır. Kullanılan genlerin ürün kodları aşağıda verilmiştir:

   β-Actin: Rn00667869_m1
   NFκB p65: Rn01399583_m1
   IL-6: Rn01410330_m1
   STAT3: Rn00562562_m1
   SOCS3: Rn00585674_s1
   c-Myc: Rn01519412_g1
   RAF-1: Rn00466507_m1
   MEK1: Rn01444760_m1
   MEK2: Rn00590971_m1
   ERK1: Rn00820922_g1
   MAPK4: Rn01523937_m1
   Elk1: Rn01756649_g1
   Ets1: Rn00561167_m1

3.4.4. Western Blot analizi

NF-κB, IL-6, STAT3, SOCS3, c-Myc, c-RAF/RAF-1, MEK1, MEK2, ERK1, ERK1+ERK2, Elk1 ve Ets1 protein ifadesi aşağıdaki malzeme ve yöntemler kullanılarak ölçülmüştür.

3.4.4.1. <u>Protein izolasyonu</u>

Protein izolasyonu, RIPA Buffer (sc-24948) kit kullanılarak aşağıda belirtilen prosedüre göre yapılmıştır.

1. Doku tartılıp temiz bir traş bıçağı kullanılarak çok küçük parçalara bölünmüştür. Dondurulmuş doku çok ince bir şekilde dilimlenip proteaz inhibitörleri ve/veya fosfataz inhibitörlerini içeren RIPA Buffer içinde eritilmiştir. Dokunun her bir gramı için 3mL soğuk RIPA Buffer kullanılmıştır.
2. Dokunun daha fazla parçalanması ve homojenize edilmesi için yöntem boyunca 4°C sıcaklığı muhafaza eden bir homojenizatör kullanılmıştır. 30dk boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.
3. Homojenat mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. 4°C'de 10dk 10.000xg'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılıp tekrar santrifüj edilmiştir (Daha uzun bir santrifüj yapılması, daha açık/temiz bir lizat elde etmek için gerekli olabilir).

Elde edilen homojenattan The Qubit 2.0 Fluorometer Quantitates cihazı ile total protein miktarı ölçülmüştür. Protein miktarları 60µg/µL'ye eşitlenmiştir.

3.4.4.2. SDS PAGE ve blotlama tamponları

- **2X Elektroforez tamponu**

12g Tris Base, 57,6g Glisin, 4g SDS tartılmıştır ve 2L distile suda çözdürülmüştür. Elektroforez sırasında 1:1 oranında sulandırılmıştır.

- **1M Tris-HCl pH 8,8**

12,114g Tris-HCl tartılmıştır ve 60mL distile suda çözündükten sonra pH 8,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

- **1M Tris-HCl pH 6,8**

12,114g Tris-HCl tartılmıştır ve 60mL distile suda çözündükten sonra pH 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

- **6X Sample buffer**

%60 Gliserol, 300mM Tris-HCl pH 6,8, 12mM EDTA, %12 SDS, 864mM β-Merkaptoetanol ve %0,05 bromfenol blue içermektedir.

10mL için; 6mL Gliserol
3mL 1M Tris-HCl pH 6,8
0,035g EDTA
1,2g SDS
600µL β-Merkaptoetanol
0,005g Bromfenol blue kullanılmıştır.

%40'lık Akrilamid/Bisakrilamid

19,48g akrilamid, 0,52g bisakrilamid 50mL suda çözülmüştür.

- **%10'luk AP**

0,1g AP tartılarak 1mL distile suda çözülmüştür (Taze hazırlanıp kullanılmıştır).

- **%10'luk SDS**

4g SDS tartılarak 40mL distile suda çözülmüştür.

- **Transfer solüsyonu (pH 8,3)**

25mM Tris-Base, 192mM Glisin, %7 Metanol ve %0,07 SDS içerir.

28,826g Glisin, 6,057g Tris-Base, 1,4g SDS tartıldı. 140mL Metanol kullanılmış ve son hacim 2L'ye distile su ile tamamlanmıştır.

- **1M Tris-HCl pH 7,6**

12,114g Tris-HCl tartılmıştır ve 60mL distile suda çözündükten sonra pH 7,6'ya ayarlanmıştır. Son hacim 100mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

- **Tris-buffer saline (TBS) pH 7.6**

Sodyum klorid 8g
1M Tris HCl pH 7.6 20mL
Distile su ile 1000mL'ye tamamlanmıştır.

- **Diluent ve yıkama tamponu TBS Tween (TBS-T)**

1L TBS'de %0,1 oranında (1mL) Tween 20 çözülmüştür.

- **Membran bloklama ajanı**

5g yağsız süttozu 100mL TBST'de çözülmüştür.

i. SDS PAGE

1. Örnekler 90°C'nin üzerinde olan bir sıcaklıkta 5dk denatüre edilmiştir. Denatürasyon sonrası örnekler 10sn 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra örnekler -20°C'de saklanmıştır.
2. **Ayrıştırma Jeli (%12'lik Jel)**

Distile su	3,15mL
1M Tris-HCl pH 8,8	3,75mL
%40 Akrilamid/Bisakrilamid	3mL
%10'luk AP	100µL
%10'luk SDS	100µL
TEMED	6µL

Yukarıdaki malzemeler kullanılarak ayrıştırma jeli hazırlandıktan sonra cam plaklar arasına dökülmüştür. Üzerine 1mL propanol ilave edilmiştir. Jel donduktan sonra propanol dökülmüştür.

3. **Yığma Jeli**

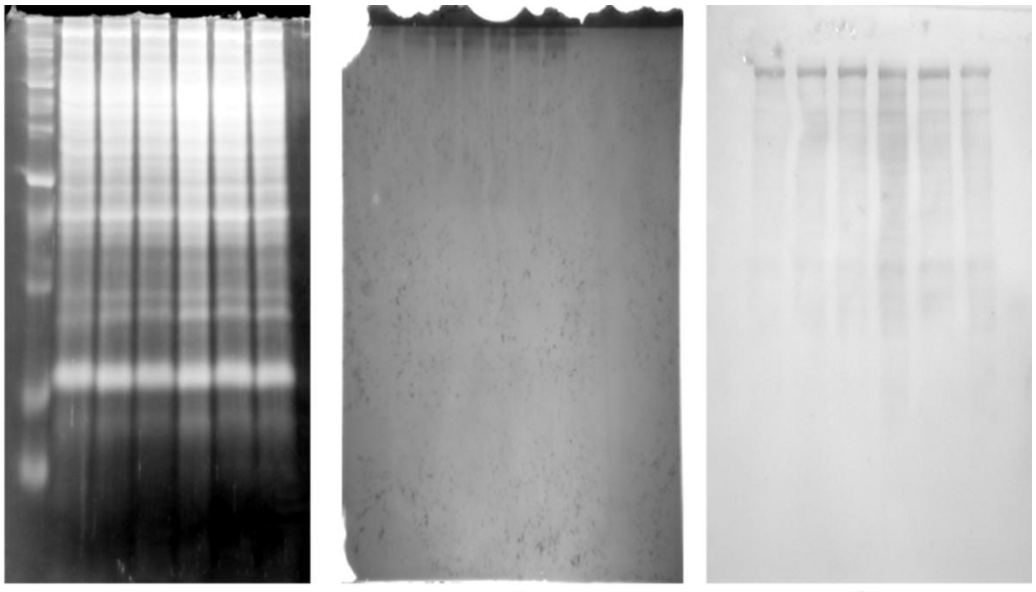
Distile su	2,329mL
1M Tris-HCl pH 8,8	375µL
%40 Akrilamid/Bisakrilamid	281µL
%10'luk AP	30µL
%10'luk SDS	30µL
TEMED	5µL

Yığma jeli de donduktan sonra örnekler kuyucuklara yüklenmiştir.

4. Proteinleri ağırlık markerı olarak Sigma M4038 marker kullanılmıştır.
5. Jel, 100V'da yaklaşık 2 saat 10dk yürütme yapılmıştır. Boyanın jelden çıkmamasına dikkat edilmiştir.
6. Jel, Comassie Brilliant Blue ile boyanarak proteinlerin bantlar halinde ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 3.1A).

3.4.4.3. Membrana aktarma

1. Yürütme işleminden sonra jel, blotlama için 15dk transfer solüsyonunda tutulmuştur.
2. 1 adet membran 8x9cm, 2 adet filtre kağıdı 11x9cm ebatlarında kesilmiştir. (0,45 µm pore size Nitrocellulose Pure Transfer Membrane (sc-3724) kullanılmıştır.)
3. Membran 2dk distile su ile aktive edilmiştir.
4. Membran ve filtre kağıtları transfer solüsyonuna alınıp western kaseti hazırlanmıştır.
5. Transfer için membran 70V'da 3 saat yürütülmüştür.
6. Transfer sonrası jel Comassie Brilliant Blue ile boyanarak proteinlerin jelden membrana geçip geçmediği kontrol edilmiştir (Şekil 3.1B).
7. Transfer sonrası membran Ponceau S solüsyonu (sc-301558) ile boyanmış ve proteinlerin membrana aktarıldığı gözlenmiştir (Şekil 3.1C).
8. Antikorlar ile muamaele işleminden önce membran, Ponceau S boyasının uzaklaştırılması için 0,1 M NaOH veya distile su ile yıkanmıştır.



Şekil 3.1. SDS-PAGE ve Western Blot aşamalarındaki jel ve membran görüntüleri: A. Transfer öncesi jel, B. Transfer sonrası jel, C. Ponceau S solüsyonu ile membran.

Blotlama işlemi, Novex® Chemiluminescent Substrates (WP20005) kiti kullanılarak aşağıda belirtilen prosedüre göre gerçekleştirilmiştir:

1. Transfer sonrası, herhangi bir jel parçasını kaldırmak ve solüsyon içeriklerini gidermek için iki kez 5dk su ile membran yıkanmıştır.
2. 10-60dk oda sıcaklığında bloklama solüsyonu içerisinde çalkalanarak (1 dönüş/sn) ya da arzuya göre, çalkalama yapmadan 4°C'de bir gece bekletilmiştir. Bloklama solüsyonu dikkatlice boşaltılmıştır.
3. Sulandırılmış primer antikor solüsyonu eklenmiştir. 30-60dk çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. Solüsyon dikkatlice boşaltılmıştır. Primer antikorlar 1:500 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

   IL-6/SATA3 yolağına ait kullanılan primer antikorlar (Santa Cruz Bıotechnology, Inc.) aşağıda verilmiştir:
   β-Actin (C4): sc-47778
   NFκB p65 (C-20): sc-372
   IL-6 (M-19): sc-1265
   STAT3 (C-20): sc-482
   SOCS3 (H-103): sc-9023

   Ayrıca MAPK yolağına ait primer antikorlar (Bioss Antibodies) aşağıda verilmiştir:
   c-RAF/RAF-1: bs-1703R
   MEK1: bs-1433R
   MEK2: bs-0223R
   ERK1: bs-1020R
   ERK1+ERK2: bs-0022R
   Elk1: bs-1398R
   c-Myc: bs-4963R
   Ets1: bs-1285R

4. Yıkama solüsyonu membranı aşacak hacimde eklenip 1dk çalkalanarak yıkanmıştır. Solüsyon dikkatlice boşaltılmıştır.

5. Yıkama solüsyonu eklenip çalkalanarak 5dk yıkanmıştır. Solüsyon dikkatlice dökülmüştür. Bu adım 3 kez tekrarlanmıştır.
6. Sulandırılmış sekonder antikor solüsyonu eklenmiştir. 30dk inkübe edilmiştir. Solüsyon dikkatlice boşaltılmıştır. Sekonder antikorlar (Santa Cruz Bıotechnology, Inc.) 1:10000 oranında sulandırılarak kullanılmıştır. Kullanılan sekonder antikorlar aşağıda verilmiştir:
   Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020
   Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004
   Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005
7. Yıkama solüsyonu membranı aşacak hacimde eklenip 1dk çalkalanarak yıkanmıştır. Solüsyon dikkatlice boşaltılmıştır.
8. Yıkama solüsyonu eklenip çalkalanarak 5dk yıkanmıştır. Tampon dikkatlice dökülmüştür. Bu adım 3 kez tekrarlanmıştır.
9. 2dk boyunca suyla membran kısaca durulanmıştır. Daha sonra solüsyon dikkatlice dökülmüştür.
10. PVDF veya NC membranlarda, HRP chemiluminescent substrat reaktifi A ve HRP chemiluminescent substrat reaktifi B eşit hacimde karıştırılır (0,06mL/cm2 membran yüzey alanı kullanılmıştır).
11. Membran temiz plastik bir sayfaya (örn; şeffaf temiz kopya materyali) alınıp antijen ile muamele edilmiştir. Membranın kurumasına izin verilmemiştir.
12. Membran üzerine chemiluminescent substrat çalışma solüsyonu pipetlenmiştir. Sonrasında membran kaplanmıştır.
13. 1 dk boyunca HRP chemiluminescent substratı ile muamele edilmiştir.
14. Filtre kağıdı vb. ile fazla HRP chemiluminescent substratı nazik bir şekilde emdirilmiştir. Fakat membranın kurumasına izin verilmemiştir.
15. Görüntüleme sırasında kurumayı önlemek için membran üzerine temiz bir plastik parça örtülmüştür. Plastik parça örtülürken membran üzerinde kabarcık oluşumu engellenmiştir.
16. Kaset ya da görüntüleme sistemindeki kaplanmış film yerleştirilmiş ve 1 sn'lik yakalama süresi ile birkaç dk sinyal oluşumu ve görüntü gelinceye kadar çekim yapılmıştır.

3.5. İstatistik

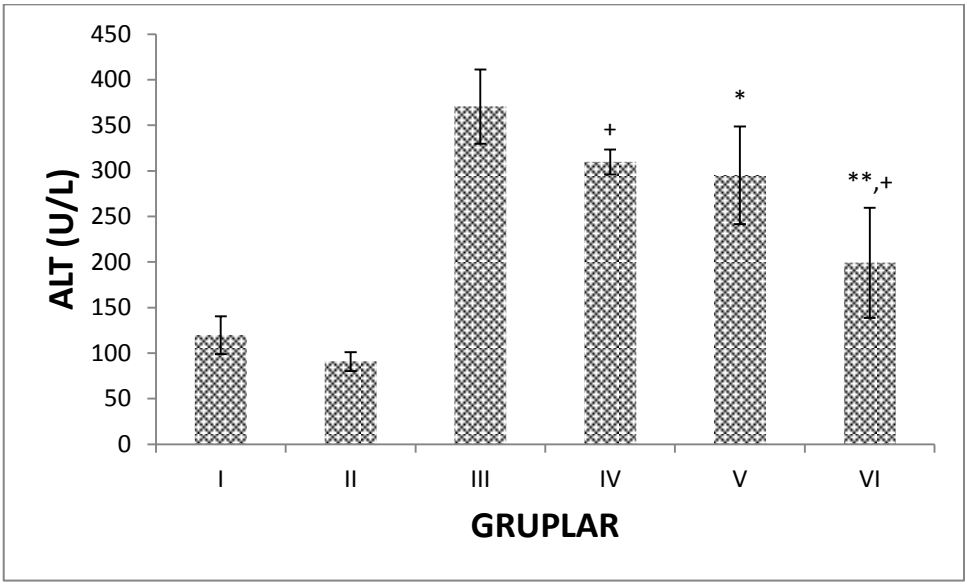
Kan serumunda belirlenen ALT seviyeleri, karaciğer rejenerasyon oranları karaciğer doku kesitlerinin incelenmesinden elde edilen PCNA indeks sonuçları, karaciğer dokularından izole edilen IL-6, STAT3, NF-κB ve SOCS3 transkripsiyon seviyelerinin gruplar arasındaki farklılık durumları, IBM SPSS Statistics 20.0 paket programındaki tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda ise Tukey ve LSD Testi kullanılmıştır.

Tüm istatistik uygulamalar sonucunda ortaya çıkan sayısal değer $P<.05$ olduğunda deney grupları arasındaki farklar anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Gruplara ait deney hayvanlarına ait kan serumlarının biyokimyasal analizlerinden elde edilen ALT seviyeleri, karaciğer rejenerasyon oranları, karaciğer doku kesitlerinin incelenmesinden elde edilen PCNA indeks sonuçları, karaciğer dokularından izole edilen IL-6/STAT3 ve MAPK yolağına ait gen ve protein seviyelerinin gruplar arasındaki farklılık durumları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

ALT seviyeleri, Sham grupları olan Grup I ve II'ye göre, PH yapılan Grup III, IV, V ve VI'da yüksek seviyede bulunmuştur. PH + %0,9 NaCl grupları olan Grup III ve IV'ün ALT seviyesi, diğer gruplardan yüksek bulunmuştur. Grup I ile II; Grup III ile IV ve Grup V ile VI arasında zamana bağlı olarak serum ALT seviyeleri düşüş göstermiştir. İlk 24 saatte, karvakrol uygulaması yapılan Grup V'te, Grup III'e göre daha düşük ALT seviyesi tespit edilmiştir. Aynı şekilde, 48 saat sonunda Grup VI ALT seviyesi, Grup IV'e göre düşük bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Gruplara ait serum ALT seviyeleri (Ortalama ± Standart sapma). *: P<.01 ve **: P<.001 SF'e göre; +: P<.001 Zamana göre anlamlı fark vardır.

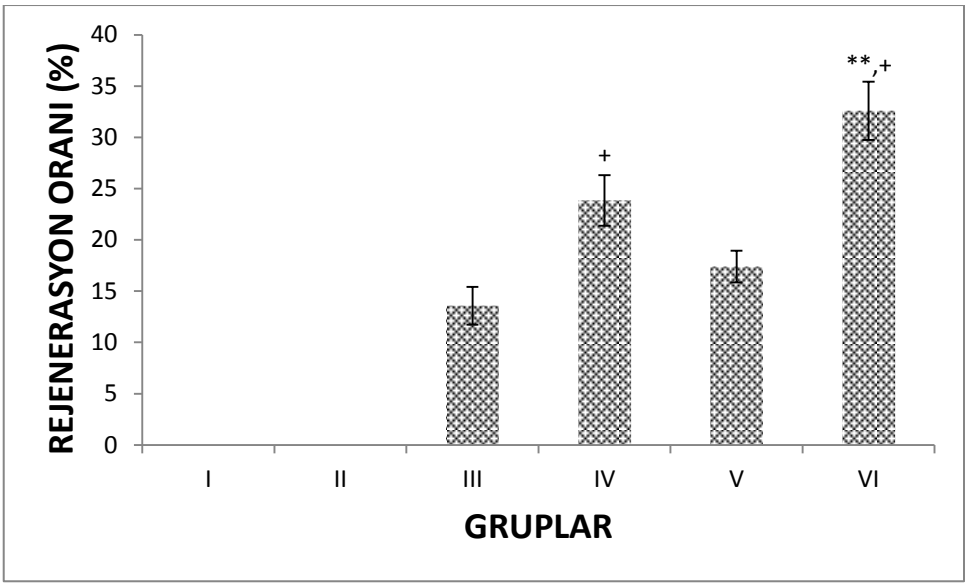
İstatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında Grup III, IV ve V'in serum ALT seviyelerinin Grup I'den çok ileri derecede anlamlı fark gösterdiği bulunmuştur (P<.001). Grup III, IV, V ve VI ise Grup II' den çok ileri derecede anlamlı fark göstermiştir

(P<.001). Ayrıca Grup VI, Grup III, IV ve V'ten istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir (P<.001). Grup I ile VI arasında ve Grup III ile V arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir (P<.01). Grup III ile IV arasında anlamlı fark gözlenirken; Grup I ile II arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.1).

PH sonrası meydana gelen karaciğer hasarı ve fonksiyon yetmezliğinin sonucunda yaşam kaybı meydana gelebilir. Bu nedenle, kan serumdaki ALT seviyesinin tespit edilmesi karaciğerdeki olası hasarın belirlenmesi için önemlidir (Burtis ve Ashwood, 2005). Çalışmamızın bu sonuçları daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, serum ALT seviyeleri açısından benzerlik göstermektedir. Yapılan bu çalışmalarda, PH yapılmış hayvanlarda, Sham grubu hayvanlarına göre serum ALT seviyeleri genellikle artış göstermiştir (Sowa vd., 2008; Yilmaz vd., 2013). Miura vd. (2012) yaptığı çalışmada; %70 PH yapılmış sıçanlarda, ALT seviyelerinin ilk 12 saatte en yüksek düzeye ulaştığını, zamana bağlı olarak giderek azaldığını ve 48. saatte kontrol grubu hayvanlarının ALT seviyesine yaklaştığını bildirmiştir. Greif vd. (2010), %70 PH'den 30 dk önce eritropoetin uyguladıkları sıçanlarda, serum ALT seviyelerinin 48. saat sonunda kontrol grubuna yakın bir değere düştüğünü bildirmiştir. Yapılmış olan benzer çalışmalarda da PH yapılmış hayvan gruplarında, Sham grubu hayvanların serum ALT seviyelerine göre yüksek olduğu ve tedavi sonrasında ALT seviyelerinin düştüğü sonucuna varılmıştır (Uyanoglu vd., 2008; Yao vd., 2009; Seehofer vd., 2010). Slotta vd. (2010) farelere %68 PH'den 24 saat sonra LPS uygulaması yapmış ve bu hayvanların ALT seviyesinin, Sham grubu hayvanlarının ALT seviyesinden yüksek olduğunu; PH gruplarında simvastatinin doza bağlı olarak ALT seviyesini düşürdüğünü göstermişlerdir. Ancak, %70 PH öncesi likopen verilen gruba ait hayvanların ALT seviyesinin, PH yapılan hayvanların ALT seviyesinden yüksek olduğunu rapor etmiş olan araştırma verileri de mevcuttur (Ayan vd., 2011).

Çalışmamız sonuçları, yapılmış bu benzer çalışmaların sonuçlarına göre değerlendirildiğinde, PH'den 24 ve 48 saat sonra PH grupları ve karvakrol uygulanmış gruplarda zamansal olarak tespit edilen serum ALT seviyesindeki azalma, karvakrolün karaciğer fonksiyonları açısından olumlu etkisini ortaya koyar niteliktedir.

Çalışmamızda, karvakrolün %70 PH sonrası rejenerasyon üzerine olan etkileri, karaciğerde gerçekleşen zamana bağlı ağırlık değişimleri ele alınarak incelenmiştir. %70 PH sonrası %30 oranında kalan sıçan karaciğerinde, 24 ve 48 saat sonraki RO tespit edilmiştir. Grup III, IV, V ve VI'daki deney hayvanlarının PH yapılarak alınmış olan karaciğer kısımları ile 24-48 saat sonra yapılan diseksiyonları sırasında alınmış olan karaciğer kısımlarının kütle ağırlıkları kullanılarak RO hesaplanmıştır. PH yapılmış SF (Grup III, IV) ve karvakrol (Grup V, VI) grupları aralarında zamana bağlı olarak RO' nun arttığı gözlenmiştir. Grup V'in RO yüzdesi, Grup III'ten; Grup VI'ün RO yüzdesi ise Grup IV'ten yüksek bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Gruplara ait karaciğer rejenerasyon oranı (Ortalama ± Standart sapma). **: P<.001 SF'e göre; +: P<.001 Zamana göre anlamlı fark vardır.

PH sonrası kalan karaciğerin rejenerasyon oranına göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Buna göre Grup III, Grup IV ve VI'dan çok ileri derecede anlamlı fark göstermiştir (P<.001). Ayrıca Grup IV ile VI arasında da çok ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir (P<.001). Grup IV ile V arasında ileri derecede anlamlı fark bulunmuştur (P<.01). Buna karşın Grup III ile V arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Çizelge 4.1).

Yapılan çalışmalarda, PH yapılan grupların, karaciğer rejenerasyon oranının genellikle zamana bağlı olarak arttığı vurgulanmıştır (Nagasue vd., 1978; Selzner ve

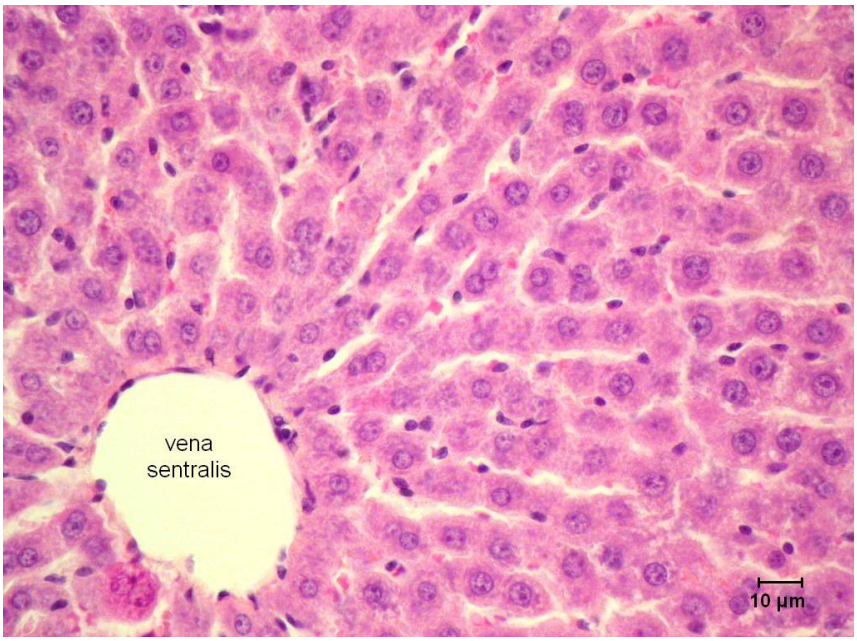
Clavien, 2000; Greif vd., 2010; Ringelhan vd., 2012). Uyanoglu vd. (2008) yaptıkları çalışmanın sonucuna göre, %70 PH yapılan gruplar içinde karvakrol uygulaması yapılan grubun, uygulama yapılmamış gruba göre rejenerasyon oranının daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer bir başka çalışmada ise %70 PH'den 30 dk önce eritropoetin uygulanan grubun rejenerasyon oranının, PH yapılan gruba göre daha fazla artış gösterdiği bildirilmiştir (Greif vd., 2010).

Karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı belirlenerek yapılmış araştırmalarda da zamana bağlı olarak karaciğerde kütlesel artış tespit edilmiştir (Shu vd., 2009; Guo vd., 2012; Miura vd., 2012; Quétier vd., 2013). Guo vd. (2012) bu artışın 30 dk'dan sonra olduğunu, Miura vd. (2012) da, bu artışın 7. günden sonra azaldığını bildirmişlerdir.

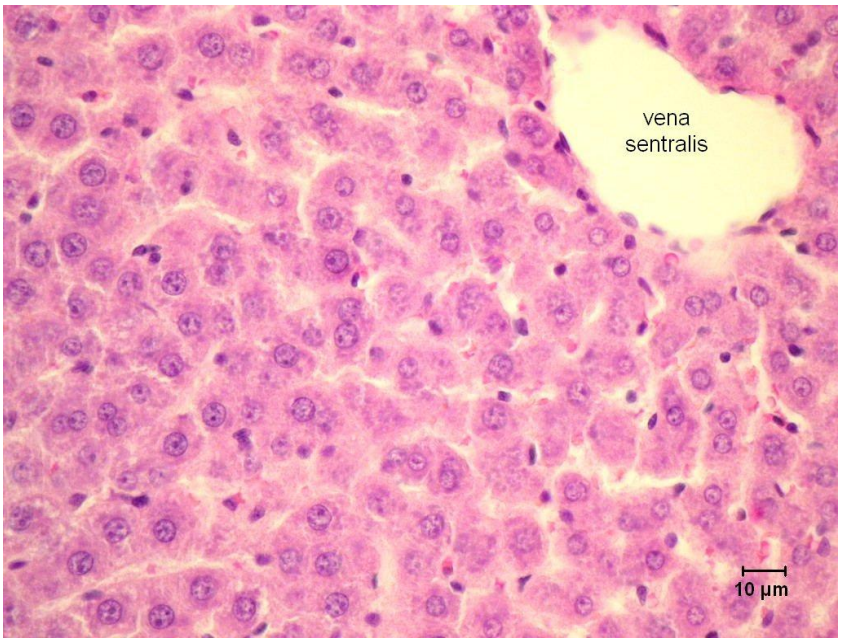
Çalışmamızda, %70 PH'den 1 saat önce karvakrol uygulanan Grup V ve VI hayvanlarının karaciğer rejenerasyon oranı, sırasıyla Grup III ve IV hayvanlarının karaciğer rejenerasyon oranına göre daha yüksek bulunmuştur. Bu gruplardan, aynı süre içinde tespit edilmiş olan rejenerasyon kapasiteleri oransal olarak karşılaştırıldığında, karvakrolün katkısı göz ardı edilemeyecek nitelikte bulunmuştur.

Çalışmamızda Grup I ve II'den oluşan Sham gruplarına ait sıçanların H&E boyanmış karaciğer doku kesitleri incelendiğinde histolojik olarak herhangi bir doku hasarına rastlanmamış olup, klasik karaciğer lobül yapısının korunduğu görülmüştür (Şekil 4.3-4).

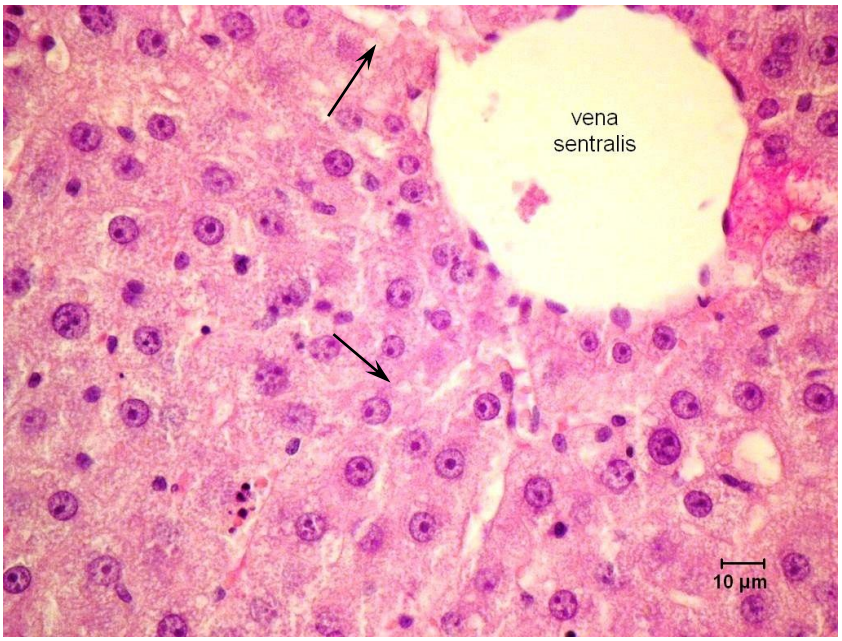
PH uygulanmış olan Grup III ve IV'e ait hayvanların karaciğer kesitlerinde klasik karaciğer lobül yapısının korunduğu ancak, hepatositlerde yoğun bir şekilde vakuolizasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5-7). Grup IV'e ait hayvanların karaciğer kesitlerindeki hepatositlerde mitozun çeşitli safhalarının olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



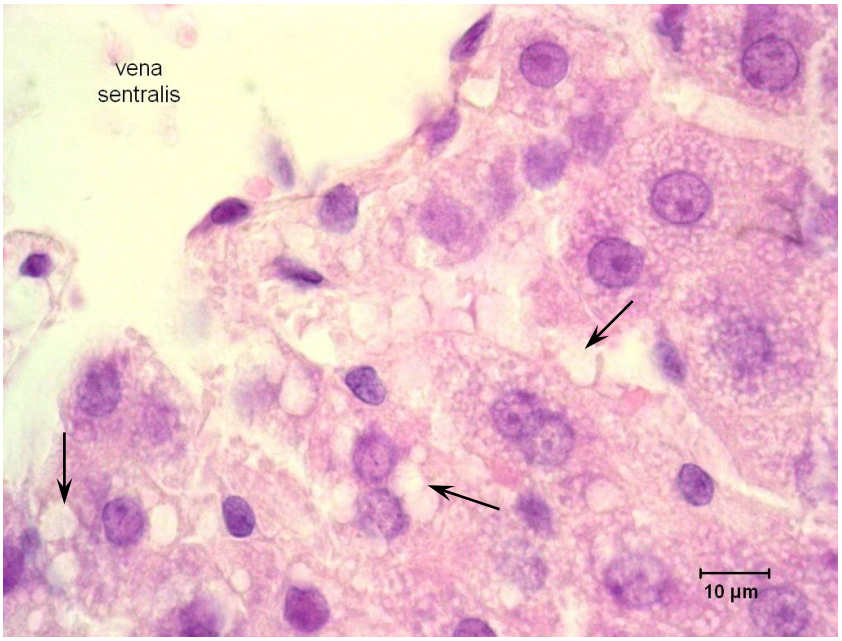
Şekil 4.3. Grup I'e ait hayvanların karaciğer dokusu (H&E).



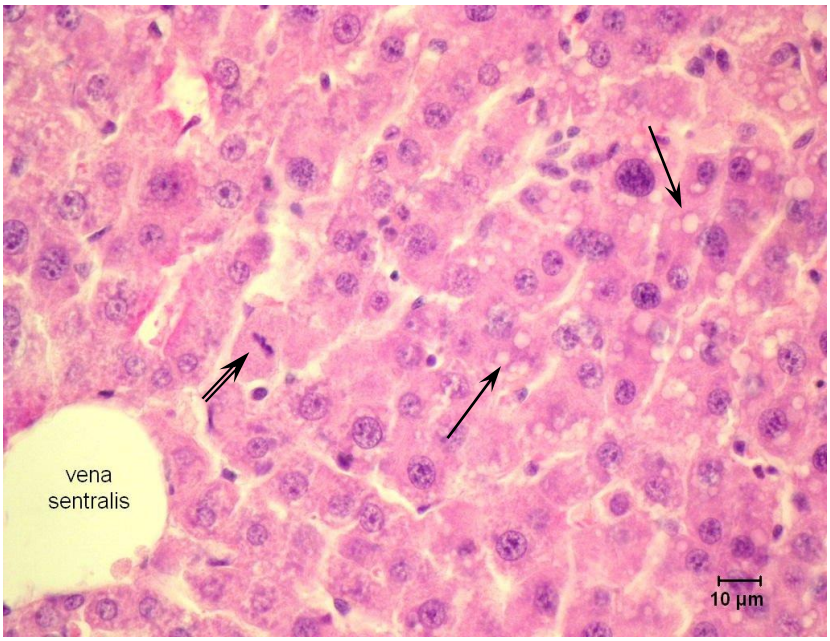
Şekil 4.4. Grup II'ye ait hayvanların karaciğer dokusu (H&E).



Şekil 4.5. Grup III hayvanlarının karaciğer dokusundaki hepatositlerde vakuolizasyon (↗) (H&E).

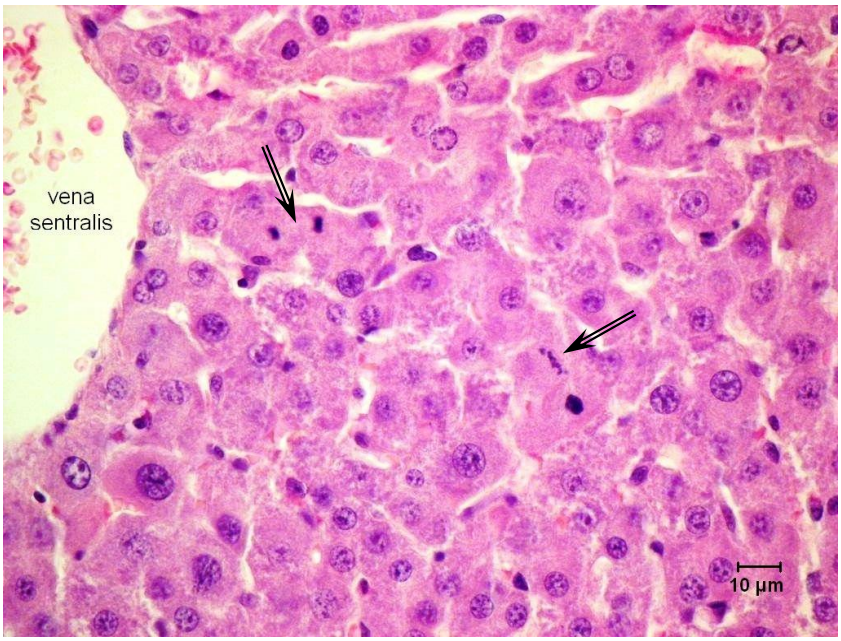


Şekil 4.6. Grup III hayvanlarının karaciğer hepatosit sitoplazmasında vakuolizasyon görünümü (↗) (H&E).

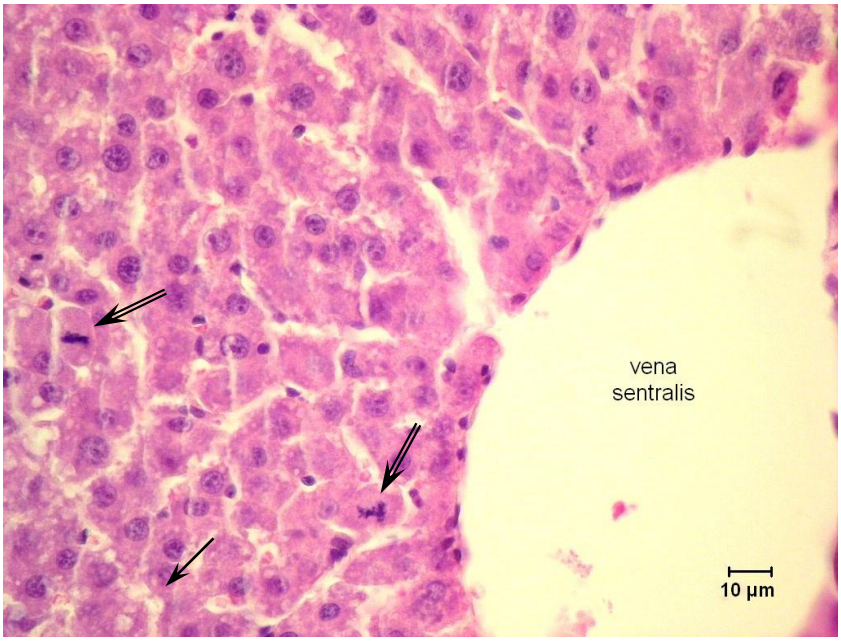


Şekil 4.7. Grup IV'e ait hayvanların karaciğer dokusunda vakuolizasyon (↗) ve mitotik görünümler (↗↗) (H&E).

Karvakrol uygulanmış olan Grup V ve VI'ya ait hayvanların karaciğer kesitlerinde, göreceli olarak mitozun çeşitli safhalarındaki hepatositlere daha sık rastlanmıştır (Şekil 4.8-9). Klasik karaciğer lobül yapısının korunduğu bu gruplarda vakuolizasyonun nispeten daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Grup V'e ait hayvanların karaciğer dokusunda mitoz bölünmenin çeşitli safhalarındaki hepatositler (↗) (H&E).



Şekil 4.9. Grup VI hayvanlarının karaciğer dokusunda yer yer vakuolizasyon (↗) ve mitoz bölünmenin olduğu hepatosit görünümleri (↗) (H&E).

Çalışmamızda, %70 PH'den 1 saat önce karvakrol uygulanan Grup V ve VI hayvanlarının karaciğer rejenerasyon oranındaki artış, histolojik kesit incelemeleri sırasında gözlenmiş olan mitoz bölünmenin çeşitli aşamalarındaki hepatositlerin varlığıyla destek bulmuştur. Benzer biçimde, PH sonrası rejenere olan karaciğerde mitoz bölünmenin farklı safhalarında gözlenen hepatositlere sıkça rastlanıldığı belirtilmiştir (Coelho vd., 2007; Greif vd., 2010). Çalışmamızın Grup V ve VI hayvanlarının karaciğer kesitleri incelendiğinde, mitozun çeşitli safhalarındaki hepatositlere Grup III ve IV hayvanlarının karaciğer kesitlerine göre nispeten daha fazla rastlanmıştır. Ancak, sadece mitoz bölünme safhalarının yeterli bir veri parametresi olamayacağı düşünülmüştür.

Normal bir mitoz bölünmenin olması için öncelikle DNA'nın iki katına çıkması gerekmektedir. Hepatositelerde PH'den sonraki 12. saatte DNA sentezinin başladığı, 24. saatte en üst seviyeye ulaştığı, fakat non-parankimal hücrelerde ise bunun daha geç olduğu rapor edilmiştir (Taub, 2004). DNA sentezinin kesintisiz bir şekilde devamlılığının sağlanması, S fazında DNA polimeraz enzimine bağlanan PCNA isimli kayan kıskaç proteininin gerekliliğinden söz edilmiştir (Cooper ve Hausmann, 2006). Bu özel proteinin hücrelerde interfazın G_1 fazında sentezlenmeye başladığı, S fazında da en yüksek seviyeye ulaştığı belirtilmiştir (Karahan vd., 2008). Bu nedenle, karaciğer rejenerasyonu açısından PCNA indeksi belirlenmesinin çalışmamızın sonuçları açısından daha yeterli ve önemli bir veri olabileceği düşünülmüştür.

PCNA ile immunohistokimyasal olarak boyanmış karaciğer kesitlerini ışık mikroskop düzeyde incelenmiştir. Tüm grupların karaciğer parankimal hücrelerinde kızıl-kahverengi görünümlü çekirdekleriyle ayırdedilen PCNA pozitif hücrelere rastlanmıştır (Şekil 4.11). Grup I ve II'den oluşan Sham grubu hayvanlarının karaciğer kesitlerinde bu tip hepatositlerin miktarı oldukça az sayıda belirlenmiştir. Grup III ve IV'den oluşan SF gruplarında ise PCNA pozitif hücrelerin sayısında artış olduğu tespit edilmiştir. Ancak, PH yapılarak karvakrol uygulanan Grup V ve VI'da PCNA pozitif hücrelerin yoğun olduğu ayrıca, mitozun çeşitli safhalarındaki hepatositlerin de bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11). Histolojik kesit incelemeleri sırasında ortaya çıkarılan PCNA indeksleri açısından Şekil 4.10 ve Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere Sham grupları ile SF ve karvakrol grupları arasında zamana bağlı olarak artış olduğu tespit edilmiştir. Buna göre; Grup I ve II arasında anlamlı fark gözlenmezken, her iki grubun da diğer gruplardan istatistiksel olarak

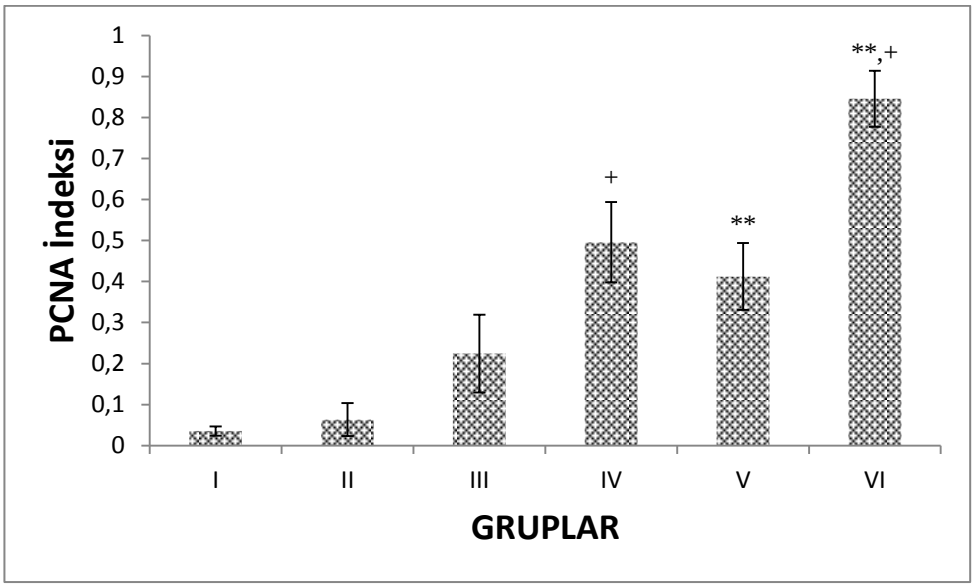
çok ileri derecede anlamlı fark gösterdiği tespit edilmiştir (P<.001). Grup III, Grup V'ten; Grup IV ise Grup VI'dan çok ileri derecede anlamlı farklı bulunmuştur (P<.001). Ayrıca PH yapılan, karvakrol ve SF grupları arasında zamana bağlı olarak çok ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir (P<.001).

Gultekin vd. (2013) 24. ve 48. saatlerde Sham grubu hayvanlarının hepatositlerinde, çalışmamız sonuçlarına paralel olarak, PCNA pozitif hücreler tespit etmişlerdir. PH sonrası, PCNA indeksinin 48. saatte en yüksek olduğu ve ardından zamanla azaldığı bildirilmiştir (Hosoya vd., 2013). PH sonrası, PCNA indeksinin zamana bağlı olarak artış gösterdiği çok çeşitli çalışmalarla da desteklenmiştir (Gultekin vd., 2013; Kremer vd., 2014; Tachibana vd., 2014). Ringelhan vd. (2012) ise çalışmalarında western blot yöntemini kullanarak PCNA'nın 2/3 PH sonrası zamana bağımlı şekilde arttığını rapor etmişlerdir.

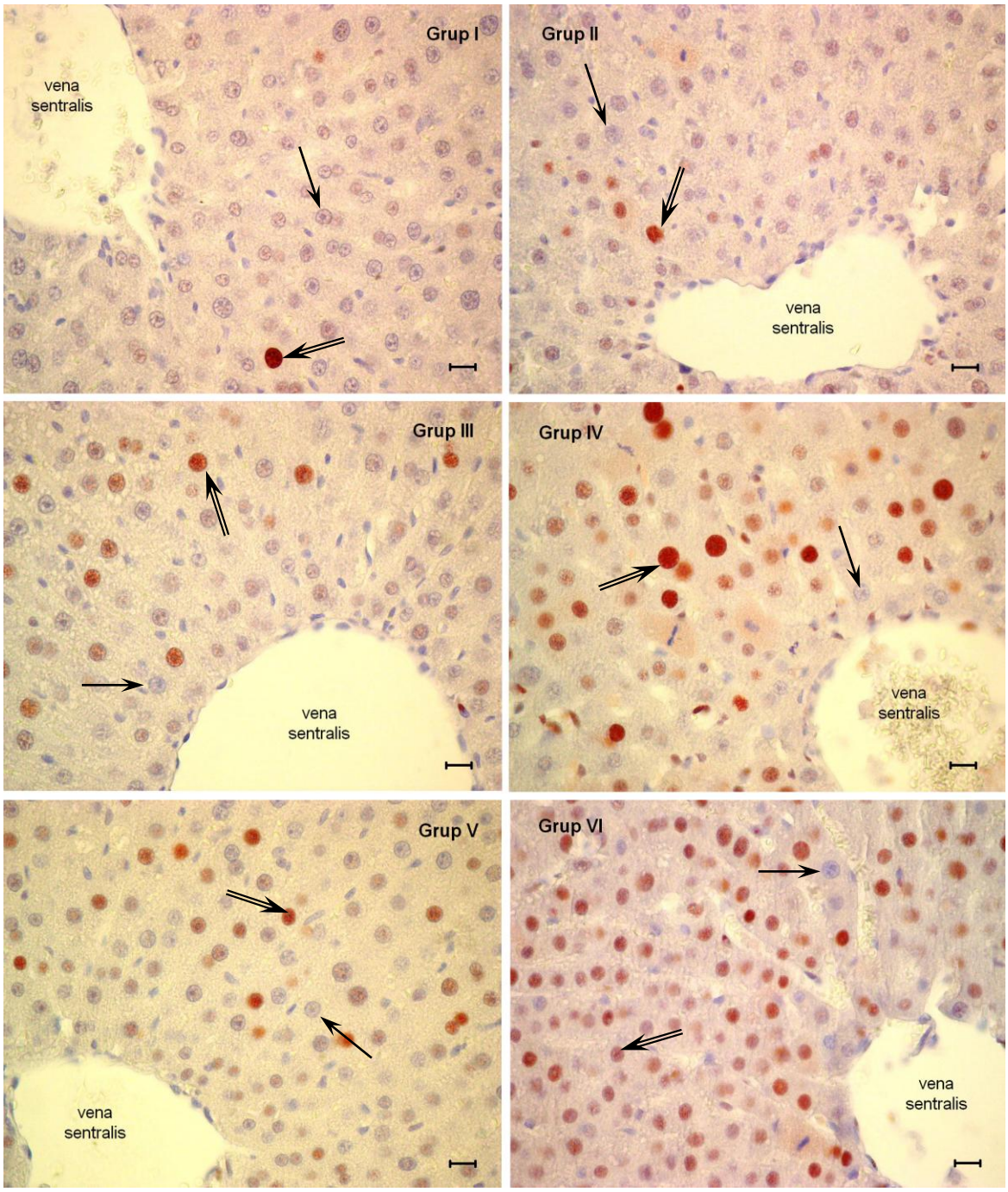
Çalışmamızda, aynı saatlerde karvakrol uygulanan gruplara ait hayvanların karaciğer kesitlerinde saptanmış olan PCNA pozitif hücrelerin sayısı daha yüksek bulunmuştur. 24 ve 48'er saatlik aynı süre sonunda tespit edilmiş olan PCNA pozitif hücre sayılarındaki artışın, karvakrolün rejenerasyon sürecindeki olumlu etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir. Araştırmalarında, %70 PH yaptıkları iki grup deney hayvanından bir gruba tedavi amaçlı bisiklol uygulamış olan Yao vd. (2009), PCNA pozitif hücre sayısının bisiklol uygulanmış grupta arttığını, çalışmamıza paralel şekilde PH'den 48 saat sonra hepatositlerde gözledikleri vakuolizasyon oluşumlarının da oldukça azaldığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda ise tüm deney gruplarında, histolojik olarak klasik lobül yapısının korunduğu görülürken, PH yapılmış hayvanlarının yer aldığı gruplarda vakuolizasyon haricinde herhangi bir doku hasarına rastlanmamıştır. PH yapılarak gerçekleştirilmiş benzer bazı çalışmalarda da histopatolojik olarak vakuolizasyonun olduğu vurgulanmıştır (Shu vd., 2009; Yao vd., 2009; Greif vd., 2010; Liu vd., 2011). Bunun yanında, çalışmamızda karvakrol uygulanan Grup V ve VI hayvanlarının hepatositlerinde tespit edilmiş olan vakuolizasyonun, Grup III ve IV hayvanlarında tespit edilenlerden göreceli olarak daha az olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızın histolojik değerlendirilmeleri sırasında rastlamadığımız ancak, PH'nin verdiği hasara bağlı olarak dokuda yoğun bir şekilde nüklear infiltrasyon olduğunu vurgulayan araştırmalar da bulunmaktadır (Benko vd., 2010; Slotta vd., 2010). Bu patolojik olgunun yanısıra, Tachibana vd. (2014), IL-6 geni susturulmuş farelerde PH'den 24 ve 48 saat sonra dokuda nekroz olduğunu fakat yabanıl tip hayvanlarda ise PH'den sonra nekroz olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde başka araştırıcılar da PH sonrası nekroz (Benko vd., 2010; Gultekin vd., 2013) ve hepatik steatozis (Coelho vd., 2007; Shu vd., 2009; Benko vd., 2010) tespit etmişlerdir.



Şekil 4.10. Gruplara ait PCNA indeksi (Ortalama ± Standart sapma). **: P<.001 SF'e göre; +: P<.001 Zamana göre anlamlı fark vardır.



Şekil 4.11. Tüm deney grubu hayvanlarına ait karaciğer kesitlerinde PCNA pozitif (⇗) ve PCNA negatif (↗) hepatosit görünümleri (ölçü barı 10 µm).

Çizelge 4.1. Gruplara ait Serum ALT seviyeleri, karaciğer RO ve PCNA indeksi (Ortalama ± Standart sapma).

GRUP			ALT (U/L)	RO (%)	PCNA
Sham	I	24 s	119,83±20,68	---	0,03±0,01
	II	48 s	90,83±10,32	---	0,06±0,04
SF	III	24 s	370,50±40,86	13,58±1,84	0,22±0,09
	IV	48 s	309,67±13,82^{+}	23,84±2,46^{+}	0,49±0,09^{+}
Karvakrol	V	24 s	370,50±40,86*	17,39±1,53	0,41±0,08**
	VI	48 s	309,67±13,82$^{**,+}$	32,57±2,84$^{**,+}$	0,84±0,06$^{**,+}$

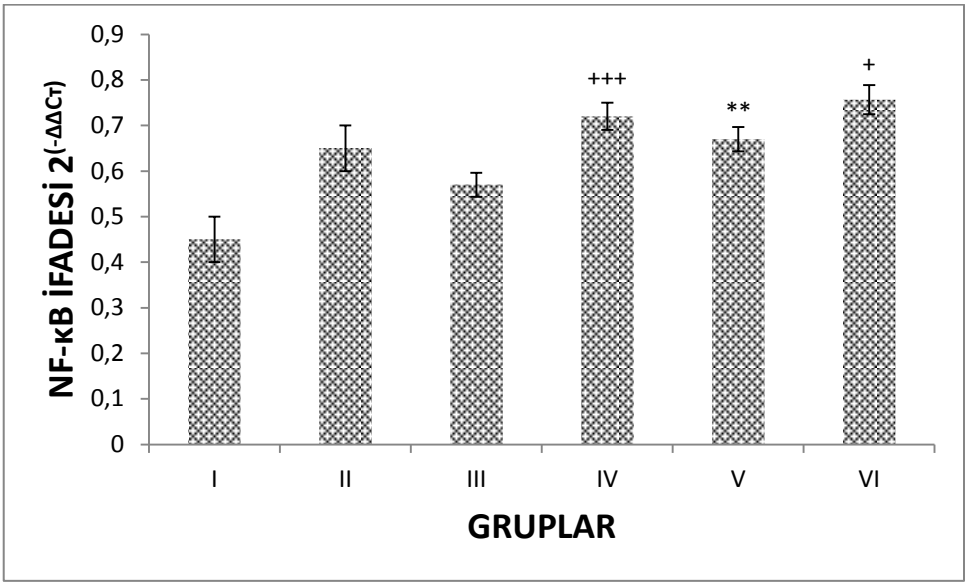
***: P<.01 ve **: P<.001 SF'e göre; +: P<.001 Zamana göre anlamlı fark vardır.**

Tüm çalışma grubu hayvanlarına ait RT-PCR ve Westen Blot analizlerinden elde edilen NF-κB, IL-6, STAT3, SOCS3, c-Myc gen ve protein ifadeleri gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2/3 oranında PH uygulamasının araştırıcılar tarafından çok yaygın olarak kullanıldığı, PH sonrasında LPS miktarının arttığı ve buna bağlı olarak TNF-α ile IL-6 ifadelerinin de arttığı bilinmektedir (Taub, 2004). Rejenerasyon sürecinde JAK/STAT, NF-κB, IL-6 gibi birçok yolağın aktive olduğunu (Li vd., 2014) özellikle NF-κB'nin, PH sonrası apoptozun önlenmesinde, karciğer fonksiyonunun korunmasında ve sitokinlerin ifade edilmesinde önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (Takahashi vd., 2002). Bunlara ek olarak c-Myc'nin direkt olarak STAT3 tarafından aktive olduğu da bilinmektedir (Debonera vd., 2001). Bu bilgiler ışığında başta NF-κB olmak üzere IL-6, STAT3, SOCS3, c-Myc gen ve protein ifadelerinin belirlenmesi, mevcut çalışmamızın temel parametrelerini oluşturmuştur.

NF-κB gen ifadesi tüm gruplarda zamana bağlı olarak artış göstermiştir. NF-κB gen ifadesi bakımından PH yapılan Grup III ve IV'te, Grup I ve II'ye göre artış gözlenmiştir. Grup I'de, Grup V'ten; Grup II'de, Grup VI'dan düşük NF-κB gen ifadesi görülmüştür. NF-κB ifadesi, karvakrol uygulanan Grup V'te Grup III'e göre yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde karvakrol uygulanan Grup VI'nın gen ifadesi Grup IV'e göre artış göstermiştir (Şekil 4.12). Elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, NF-κB gen ifadesi bakımından gruplar arasında anlamlı farklar gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Grup I'in gen ifadesi, Grup II, IV, V ve VI'dan; Grup III'ün gen ifadesi ise Grup IV ve VI'dan çok ileri derecede anlamlı fark göstermiştir (P<.001). Grup III'ün NF-κB gen ifadesi, Grup I ve V'ten; Grup II ise Grup VI'dan ileri derecede anlamlı fark göstermiştir (P<.01). Grup II'nin NF-κB gen ifadesi, Grup III ve IV'ten anlamlı derecede farklı bulunmuştur (P<.05). Grup IV ile Grup VI arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. PH sonrası, karvakrol uygulanan Grup V ve VI'da NF-κB ifadesi açısından zamana bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (P<.05).



Şekil 4.12. Gruplara ait NF-κB gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

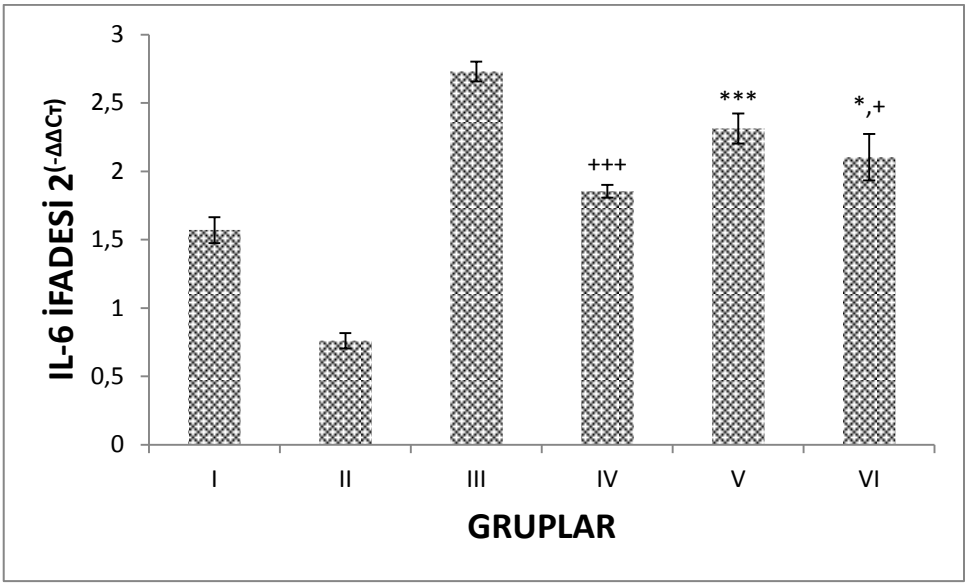
Western Blot analizlerimize göre IL-6/STAT3 yolağına ait proteinlerden NF-κB'nin Sham, SF ve karvakrol gruplarında 24. saatte düşük olan protein ifadesinin zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür. Grup III'te Grup V'ten; Grup IV'te, Grup VI'dan yüksek NF-κB protein ifadesine rastlanmıştır (Şekil 4.17).

Literatür bilgisine bakıldığında, NF-κB ifadesinin PH'den sonraki 30. dk içinde (Sánchez vd., 2004; Michalopoulos, 2013) başlayıp 14. güne kadar devam ettiği bildirilmiştir (Sánchez vd., 2004). 2/3 PH sonrası NF-κB aktivasyonunun 1-6 saat ve 24-36 saat arasında belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Wuestefeld vd., 2003). Yapılan bir çalışmada, farelerin safra kanalı bağlanmış ve bu işlemden sonraki 3. ve 14. günde

intravenöz olarak LPS verilmiştir. 3. gün LPS grubunda yüksek seviyede belirlenmiş olan NF-κB ifadesi 14. günde düşük bulunmuştur (Iida vd., 2010). Bazı araştırıcılar, PH sonrasında NF-κB ifadesini 30. dk'da gözlemiş, 2. saatte bu ifadenin en üst düzeye ulaştığını ve daha az bir yoğunlukta 4 saat boyunca sürdüğünü ifade etmişlerdir (Tiberio vd., 2008). Kupffer hücreleri ile ilgili bir çalışmada %68 PH yapılan deney hayvanlarında, NF-κB ifadesinin 5. güne kadar artış gösterdiği ve devamında giderek azaldığı; Kupffer hücrelerinin harabiyetinde de ifade durumunun değişmediği öne sürülmüştür (Abshagen vd., 2007). Yang vd. (2005) ratlarda portal dalı bağlamış ve farklı zamanlarda NF-κB ifadesini incelemiştir. Buna göre, bağlama yapılan ve yapılmayan gruplarda NF-κB ifadesi zamanla artarak 48 saatte en üst düzeye ulaşmış ve 7. günde normale dönmüştür.

NF-κB ifadesi bakımından yapılan çalışmaların bulgularıyla benzerlikler taşıyan çalışmamızın bulguları, genel olarak değerlendirildiğinde, karvakrolün bu yolak üzerinde olumlu etkiler ortaya koyduğu dikkate değer bulunmuştur.

IL-6 gen ifadesi; Grup I ve II'den oluşan Sham gruplarında, Grup III ve IV'den oluşan SF ve karvakrol uygulanan Grup V ve VI'da zamana bağlı olarak düşüş göstermiştir. Grup I ve II'de IL-6 gen ifadesi düşük bulunurken PH yapılan Grup III, IV, V ve VI'da artış gözlenmiştir. Grup III'ün gen ifadesi, tüm gruplardan yüksek bulunmuştur. Karvakrol uygulanan Grup V'in IL-6 gen ifadesi, Grup III'ün seviyesine göre düşüş göstermiştir. Grup VI'nın IL-6 gen ifadesi ise Grup IV'ten yüksek bulundu (Şekil 4.13). Çalışmamızda, IL-6 gen ifadesi bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Buna göre tüm grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür ($P<.05$). Grup II ile III arasında istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark ($P<.001$) gözlenirken; Grup II, Grup V ve VI'dan ileri derecede anlamlı fark ($P<.01$) göstermiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.13. Gruplara ait IL-6 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

Western Blot analizlerine göre Sham, SF ve karvakrol gruplarında 24. saatte düşük olan IL-6 protein ifadesinin zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür. Grup V'te, Grup III'ten yüksek; Grup VI'da, Grup IV'ten düşük IL-6 protein ifadesi tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

IL-6 ifadesinin, PH'den 1 saat sonra arttığı bildirilmiştir (Fausto vd., 2006; Iimuro ve Fujimoto, 2010; Quétier vd., 2013). Ringelhan vd. (2012) RelA/p65 mutant farelerde 2/3 PH sonrası IL-6 ifadesinin ilk 1 saat içinde yükseldiğini, 4. saate doğru azaldığını rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada da PH sonrası IL-6 ifadesi ilk 3 saatte en üst seviyedeyken, zamana bağlı olarak 24 saate doğru düşüş gözlenmiştir (Moreno-Carranza vd., 2013). Hosoya vd. (2013) ise yaptıkları çalışmada 6. saatten 24. saate doğru zamana bağlı olarak IL-6 ifadesinin azaldığını bildirmişlerdir. Sowa vd. (2008) ise sıçanlarda PH sonrası IL-6 ifadesinin ilk 24 saatte artış gösterdiğini, 48. saatte azaldığını bildirmişlerdir.

Sözü edilen bu araştırmaların sonuçları ile mevcut çalışmamızın IL-6 gen ifadesi sonuçları arasında benzerlikler bulunmaktadır. Benzer bulgulara Kremer vd. (2014) %70 PH yapılmış sıçanlarda LPS'nin IL-6 ifadesine olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında da rastlanılmıştır. Onların çalışmasında ip yolla verdikleri LPS'nin, IL-6 ifadesini ilk 24 saat

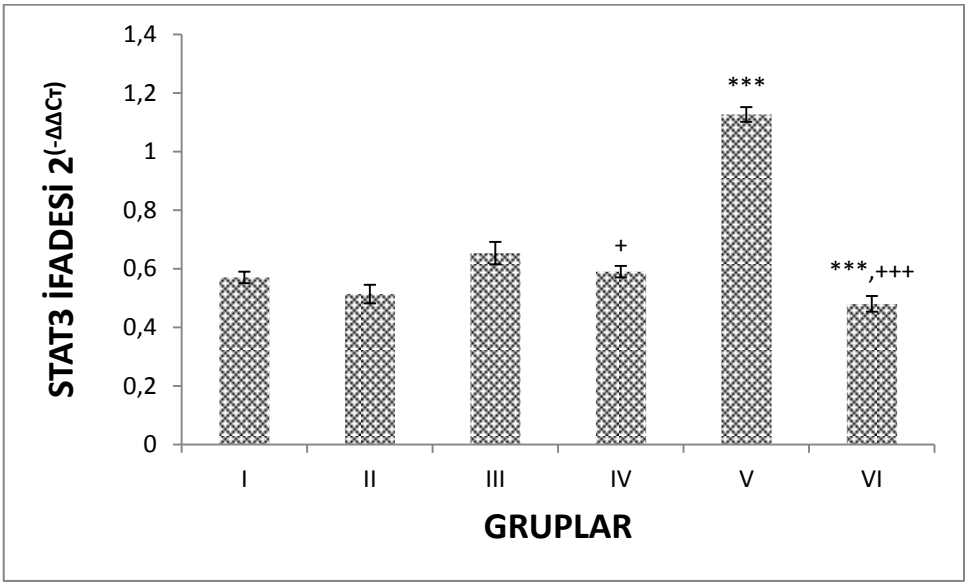
içerisinde en üst seviyeye yükselttiğini ve 48. saate doğru ise azalttığı bulgusuna ulaşılmıştır. Başka bir çalışmada da PH yapılan hayvanlarda yüksek seviyede belirledikleri IL-6 ifadesinin, curcumin uygulamasından sonraki 24. saatte azaldığı bulgusuna varılmıştır (Seehofer vd., 2010)

Çalışmamızda, Grup V hayvanlarının IL-6 ifadesinin, Grup III'den düşük olması, 24 saat içinde karvakrolün yolak üzerine etkisinin olumlu yönde olduğunu göstermekte ancak, Grup VI hayvanlarının IL-6 ifadesinin, Grup IV'den yüksek bulunmuş olması, 48 saat içindeki böyle bir değişikliğin şaşırtıcı olmasına sebep olmuştur. Gen ifadesi bakımından durum böyle iken bazı araştırıcılar da serumda tespit ettikleri IL-6 seviyesinin 24. saatte yüksek olduğunu ve sonrasında zamanla azaldığını belirtmiştir (Shimizu vd., 2009; Lai vd., 2013). %70 PH yapılan bir başka araştırmanın sonuçlarına göre ise 72. saat sonunda serumda belirlenen IL-6'nın, PH yapılan gruplar ve karvakrol uygulanmış grupların her ikisinde de aynı seviyede olduğu bildirilmiştir (Uyanoglu vd., 2008).

PH sonrası, karaciğerde TNF-α ve IL-6 seviyelerinin arttığı (Sudo vd., 2008), TNF-α'nın komşu hücrelerde NF-κB'nin ifade edilmesini sağladığı (Taub, 2004; da Silva vd., 2013), NF-κB'nin aktive olmasıyla da IL-6 salınımının arttığı ve reseptöre bağlanmasının ardından sitoplazmada sırasıyla JAK'ların ve STAT3'ün fosforlandığı (da Silva vd., 2013) bilinmektedir. Buna paralel olarak STAT3'ün bu şekilde 30 dk içinde pSTAT3 biçiminde aktive olduğu, 3 saat sonunda aktivitesinin en yüksek seviyeye ulaştığı ve 5 saatten fazla devam ettiği de belirtilmektedir (Michalopoulos ve DeFrances, 1997). Kremer vd. (2014) Smad3 geni susturulmuş ve %70 PH yapılmış farelere 18. saatte LPS uygulayarak, PH'den 24 saat sonra hem yabanıl tip hem de mutant farelerde pSTAT3 ifadesinin daha yoğun olduğu bulgusuna ulaşmışlardır. Yapılan çalışmalarda PH sonrası, STAT3 ifadesinin 24. saate kadar zamanla arttığı buna karşın pSTAT3'ün ise zamana bağlı azaldığı vurgulanmıştır (Hosoya vd., 2013; Tachibana vd., 2014). Bazı araştırıcılar PH sonrası STAT3 fosforilasyonunun 8. saatte yüksek (Lonati vd., 2013; Quétier vd., 2013), 24. saatte düşük olduğunu rapor etmişlerdir (Lonati vd., 2013).

Çalışmamızın sonuçlarına göre STAT3 gen ifadesi; Grup II'de, Grup I'e göre; Grup IV'te, Grup III'e göre ve karvakrol gruplarının her ikisinde de zamana bağlı olarak düşüş göstermiştir. Grup V, tüm gruplardan yüksek bulunurken; Grup VI, tüm gruplardan düşük

bulunmuştur. Grup II'nin STAT3 gen ifadesinin, VI'dan; Grup IV'ün STAT3gen ifadesinin ise Grup VI'dan yüksek olduğu gözlenmiştir. Grup I'in gen ifadesi Grup III'den düşük; Grup III'ün ifadesi Grup V'ten düşük bulunmuştur (Şekil 4.14). Bu bulgular doğrultusunda STAT3 gen ifadesi bakımından istatistiksel değerlendirme yapıldığında, Grup V'in STAT3 gen ifadesi, tüm gruplardan çok ileri derecede anlamlı fark göstermiştir (P<.001). Grup III'ün, Grup II ve VI'dan çok ileri derecede anlamlı fark gösterdiği tespit edilmiştir (P<.001). Grup IV ile Grup VI arasında da çok ileri derecede anlamlı fark bulunmuştur (P<.001). Grup I'in STAT3 gen ifadesi, Grup III ve VI'dan; Grup II'nin STAT3 gen ifadesi Grup IV'ten ileri derecede anlamlı farklılık göstermiştir (P<.01). Sham grupları ve SF uygulanmış gruplar arasında zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (P<.05). STAT3 gen ifadesi bakımından, Grup II ile VI arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Çizelge 4.2).

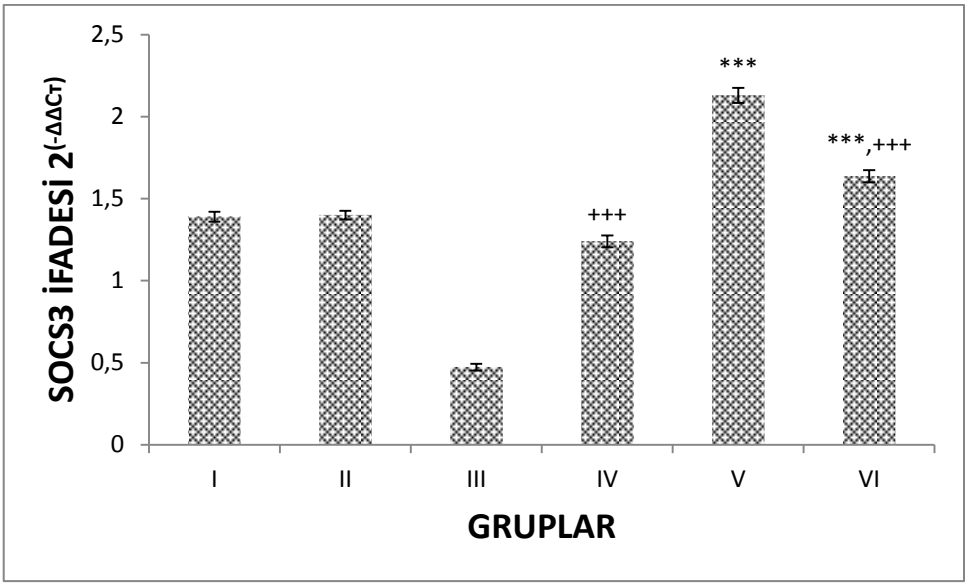


Şekil 4.14. Gruplara ait STAT3 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

Çalışmamızda, STAT3 protein ifadesinin Sham, SF ve karvakrol gruplarında 24. saatte düşük olduğu ancak zamana bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Grup III'te Grup V'ten; Grup IV'te, Grup VI'dan düşük NF-κB protein ifadesi belirlenmiştir (Şekil 4.17).

Literatürler incelendiğinde, STAT3'ün PH'den 1saat sonra aktive olduğu ve bu aktivasyonun 8 saatten fazla sürdüğü bilinmektedir (Michalopoulos, 2013). PH'den 1 saat sonra STAT3 ifadesinin en yüksek olduğu ve zamanla azaldığı (Wuestefeld vd., 2003); %65 PH yapılan sıçanlarda STAT3 ifadesinin 2. saatte en yüksek değere ulaştığı ve 4. saatte düşüş gösterdiği (Tiberio vd., 2008); PH sonrası STAT3'ün benzer şekilde hem hepatositlerde hem de karaciğer dokusunda 2. ve 6. saat sonunda zamana bağlı arttığı (Li vd., 2014) dikkat çekmektedir. Sowa vd. (2008) araştırma makalelerinde %70 PH sonrası STAT3 ifadesinin zamanla azaldığına, 48 saat sonunda en düşük seviyeye ulaştığına yer vermişlerdir. Yaptığımız araştırmanın sonuçları daha önce yapılmış çalışmaların sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir. Araştırmamızdaki karvakrol gruplarından özellikle 48. saatteki STAT3 gen ifadesinin azalmış seviyede tespit edilmiş olması ilgi çekicidir. Çünkü, her ne kadar literatür bilgileriyle desteklenmiş olsa da 24. saate göre 48. saatte STAT3 ifadesinin azalması beklenen bir sonuç olmamıştır. Bu nedenle, hepatositlerde IL-6 sinyalinin, SOCS3'ün IL-6/STAT3 aracılı uyarımı ile düzenleniyor (da Silva vd., 2013) olması çalışmamızın SOCS3 verileriyle bir bütün olarak tartışılmasını gerektirmiştir.

RT-PCR sonuçlarına göre, SOCS3 gen ifadesi, Grup I ve II'de, Grup III ve IV'e göre yüksek bulunmuştur. Karvakrol uygulaması yapılan Grup V ve Grup VI'nın gen ifadelerinin diğer gruplardan yüksek olduğu gözlenmiştir. Grup II'de Grup I'e göre; Grup IV'te Grup III'e göre zamana bağlı olarak SOCS3 gen ifadesinin artışı gözlenmiştir. Buna karşın Grup VI, Grup V'e göre zamana bağlı olarak düşüş göstermiştir (Şekil 4.15). SOCS3 gen ifadelerine göre, Grup I ve II'de, Grup III, IV, V ve VI'dan istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($P<.05$). Ancak, Grup I ve II arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. PH yapılan grupların hepsi, aralarında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermiştir ($P<.05$) (Çizelge 4.2).

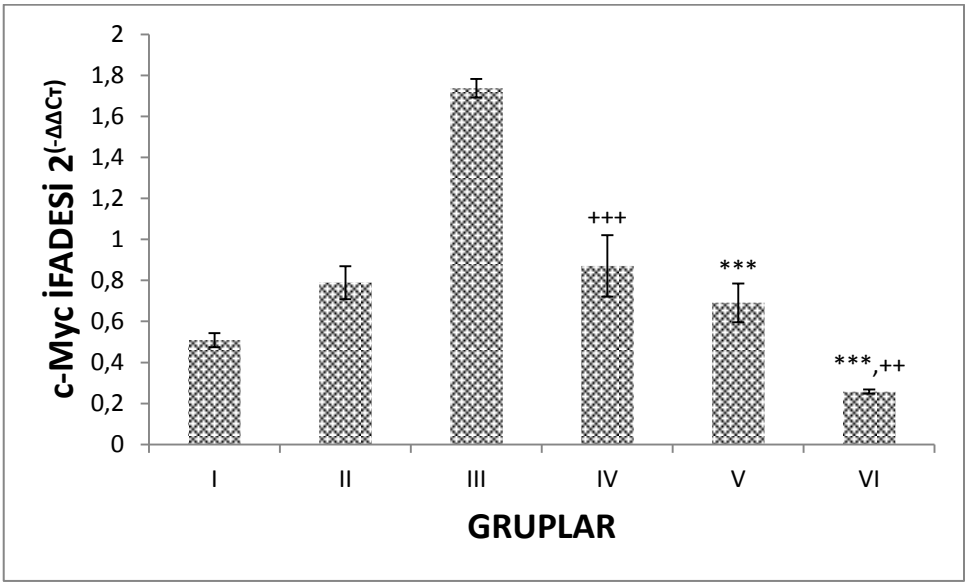


Şekil 4.15. Gruplara ait SOCS3 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

Western Blot sonuçlarımızda, SOCS3'ün Sham, SF ve karvakrol gruplarında 24. saatte düşük olan protein ifadesinin zamana bağlı olarak arttığı saptanmıştır. Grup V'te, Grup III'ten; Grup IV'te, Grup VI'dan yüksek IL-6 protein ifadesi tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

SOCS3 ifadesinin, PH sonrası artmaya başladığı, 6 saat sonunda en yüksek seviyeye ulaştığı ve zamanla azaldığı rapor edilmiştir (Wuestefeld vd., 2003; Dierssen vd., 2008). Farelerde 2/3 PH sonrası faklı zamanlarda SOCS3'ün CpG adalarının metilasyonunun 24. saatte yüksek olduğu ancak 48. saatte düştüğü rapor edilmiştir (Guo vd., 2012). LPS enjeksiyonu yapılmış sıçanlarda PH'den sonra SOCS3 ifadesinin ilk 24 saat içerisinde en üst düzeye yükseldiği, 48. saate doğru ise azaldığı gözlenmiştir (Kremer vd., 2014). Quétier vd. (2013) 2/3 PH yapılan farelerde, PH sonrası 8. saatte SOCS3 ifadesinin en yüksek olduğunu ve bu ifadenin 12. saatte düştüğünü tespit etmişlerdir. Aynı şekilde Hosoya vd. (2013) %70 PH sonrası SOCS3 ifadesinin 6. saatte en üst seviyeye ulaştığını, sonra 12. saate kadar azaldığını ve bundan sonra sabit kaldığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde başka çalışmalarda da SOCS3 ifadesinin zamanla azaldığı vurgulanmıştır (Lonati vd., 2013; Moreno-Carranza vd., 2013).

Çalışmamızın sonuçlarına göre c-Myc gen ifadesi; Grup II'de, Grup I'e göre zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Buna karşılık PH yapılan SF ve karvakrol uygulanmış gruplarda zamana bağlı olarak düşüş göstermiştir. Grup III, tüm gruplardan yüksek bulunurken Grup VI, tüm gruplardan düşük bulunmuştur. Grup V'in c-Myc gen ifadesi, Grup III'ün; Grup VI'nın c-Myc gen ifadesi, Grup IV'ün seviyesine göre düşüş göstermiştir (Şekil 4.16). İstatistiksel olarak; Grup III'ün c-Myc gen ifadesi, tüm gruplardan çok ileri derecede anlamlı fark göstermiştir (P <.001). Grup I'de, Grup IV'ten; Grup II'de VI'dan istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir (P <.001). Grup VI'nın, Grup IV ve V'ten çok ileri derecede anlamlı fark gösterdiği tespit edilmiştir (P<.001). Grup I'in c-Myc gen ifadesi, Grup II ve VI'dan ileri derecede anlamlı farklılık göstermiştir (P<.01). Grup V ise Grup I ve IV'ten anlamlı farklılık göstermiştir (P<.05) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.16. Gruplara ait c-Myc gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

c-Myc'nin Sham, SF ve karvakrol gruplarında 24. saatte yüksek olan protein ifadesinin zamana bağlı olarak düştüğü gözlenmiştir. Grup III'te Grup V'ten yüksek; Grup VI'da, Grup IV'ten düşük c-Myc protein ifadesine rastlanmıştır (Şekil 4.17).

Çalışmamıza paralel olarak Li vd. (2014) yaptıkları çalışmada, mikroarray and RT-PCR analizleri sonucunda, %70 PH sonrası 24. saatte en yüksek seviyede olan c-Myc RNA ifadesinin 48 saat sonunda düştüğünü bildirmişlerdir. Benzer şekilde, PH sonrası Myc'nin hem hepatositlerde hem de karaciğer dokusunda 2. ve 6. saat sonunda zamana bağlı azaldığı belirtilmiştir (Li vd., 2014). Li vd. (2002) yaptıkları çalışmada, PH sonrası 16. saatte yüksek olan c-Myc ifadesinin 24. saatte azaldığını vurgulamışlardır. Bazı çalışmalarda, farelerde PH'den 4 saat sonra c-Myc ifadesinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Su vd., 2002). Literatür bilgilerine göre PH sonrası, gp-130 yoksun farelerde c-Myc geni 6 saat içinde aktive olmuştur. Aynı çalışmada kontrol hayvanlarında bulunduğu gibi PH sonrası c-Myc'nin bazal ifadesi ve uyarılması gp-130 yoksun hayvanlarda azalmıştır (Wuestefeld vd., 2003). Buna karşın bazı çalışmalarda, ratlarda karaciğer nakli sonrası c-Myc RNA ifadesinin 48 saat sonunda arttığı vurgulanmıştır (Debonera vd., 2001). Pajaud vd. (2015) yabanıl tip farelerde %70 PH sonrası 24. saatte düşük olan c-Myc RNA ifadesinin 48 saat sonunda arttığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, ratlarda pankreatektomi sonrası 3, 24, 48 ve 72. saatlerde ölçülen c-Myc gen ifadesinin zamana bağlı olarak arttığı vurgulanmıştır (Silverman vd., 1990). %70 PH yapılmış yabanıl tip farelere göre TNFR-1 KO farelerde, c-Myc gen ifadesi artmış ve 24 saat boyunca sürmüştür (Shimizu vd., 2009). Chang vd. (2014) 2/3 PH sonrası karaciğer örneklerinde yaptıkları mikroarray analizi sonucunda, c-Myc gen ifadesinin 30. saatte en yüksek seviyeye ulaştığını, sonra düştüğünü ve 72. saate doğru tekrar yükseldiğini rapor etmişlerdir.

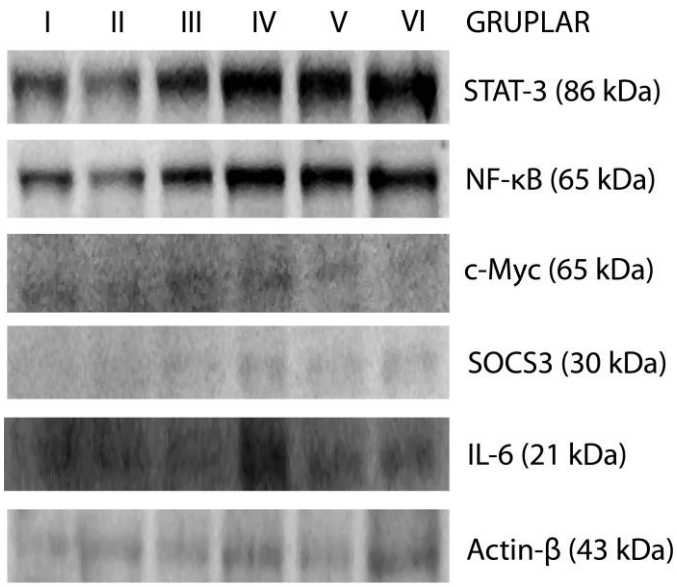
Çizelge 4.2. IL-6/STAT3 yolağına ait gen ifadelerinin Ortalama ± Standart sapma değerleri.

	Sham		SF		Karvakrol	
	I	II	III	IV	V	VI
	24 s	48 s	24 s	48 s	24 s	48 s
NF-κB	0,45±0,05	0,65±0,05	0,57±0,02	0,72±0,03^{+++}	0,67±0,02**	0,75±0,03^{+}
IL-6	1,57±0,09	0,76±0,05	2,73±0,07	1,85±0,04^{+++}	2,31±0,11***	2,10±0,17$^{*,+}$
STAT3	0,57±0,02	0,51±0,03	0,65±0,03	0,59±0,02^{+}	1,12±0,02***	0,48±0,02$^{***,+++}$
SOCS3	1,39±0,03	1,40±0,02	0,47±0,02	1,24±0,03^{+++}	2,13±0,04***	1,63±0,03$^{***,+++}$
c-Myc	0,50±0,03	0,79±0,08	1,73±0,04	0,88±0,15^{+++}	0,70±0,09***	0,25±0,01$^{***,++}$

*****: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.**

Çalışmamızın temel parametrelerinden NF-κB, IL-6, STAT3, SOCS3 ve c-Myc'nin gen ifadeleri, paylaşılmış olan literatür bilgileriyle yoğurulduğunda bu beş faktörün birbirine bağımlı olduğu bir kez daha ortaya konmuştur. Hepatositlerde IL-6 sinyali, SOCS3'ün IL-6/STAT3 aracılı uyarımı ile düzenlenir (da Silva vd., 2013). NF-κB'nin aktive olmasıyla salınımı artan IL-6, hücre içinde STAT3 fosforlanmasını sağlayarak çekirdeğe girmesinin ardından DNA'ya bağlı biçimde hepatosit proliferasyonunu başlatmaktadır (Guo vd., 2012; da Silva vd., 2013; Lepiller vd., 2013). c-Myc, STAT3'ün hedefi olup hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar (Debonera vd., 2001; Pazarbaşı vd., 2011). Çalışmamızın 24 saatlik Sham, PH ve karvakrol gruplarında sırasıyla gen ifadesinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer bulguya SOCS3 gen ifadesinde de rastlanılmıştır. Ancak, 48 saatlik verilere bakıldığında, karvakrol grubunda SOCS3'ün gerçekten de süre sonunda görevini tamamlamış olduğunu düşündüğümüz STAT3'ü baskılarcasına artış gösterdiği dikkate değer bulunmuştur. Bu bulgu literatüre aykırı gibi görünse de çalışmamızın 24. saatine göre 48. saatinde SOCS3 ifadesinde bir azalışın olduğu da gözden kaçmamıştır. Çalışmamızın karvakrol grubunda bu azalışın sadece SOCS3 ile sınırlı olmadığı hem IL-6 hem de STAT3 ile c-Myc gen ifadelerinde de oluşu dikkate değer bulunmuştur. Diğer taraftan NF-κB ifadesinde gruplar arasında aynı saatlerde artış tespit ettiğimiz çalışmamızda, karvakrolün PH grubuna göre ifadeyi artırması olumlu yönde bir gelişme olmuştur. Bir çalışmada PH sonrası NF-κB ifadesinin 1-6 saat ve 24-36 saat

arasında belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Wuestefeld vd., 2003). Çalışmamızda 48. saate gelindiğinde de artış olması, karaciğer rejenerasyonu ve iyileşmesi yönünde karvakrolün moleküler mekanizmaya vermiş olduğu katkıyı düşündürmektedir. Karvakrolün bu katkısı sadece NF-κB verileri ile destek bulmamış, zamana göre analiz etmeye ve yorumlamaya çalıştığımız IL-6, STAT3 ve SOCS3'ün ifadeleri ile de destek bulmuştur.

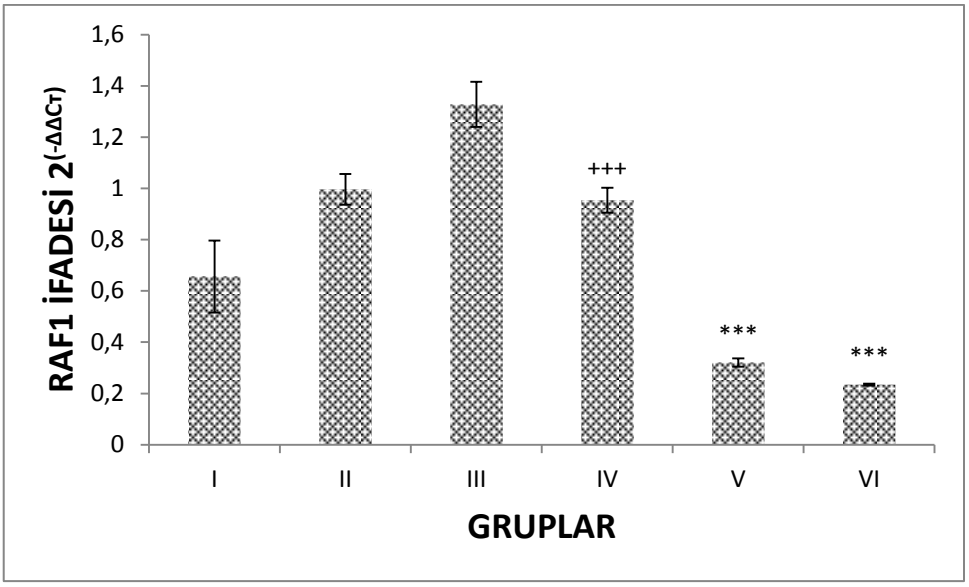


Şekil 4.17. IL-6/STAT3 yolağına ait protein ifadelerinin Westen Blot analizlerinden elde edilen bant görüntüleri.

Karaciğerde mekanik stres; hepatik fibrozis, siroz, parsiyal hepatektomi ve karaciğer naklinde artabilir. Mekanik stres uyarımlı ERK1/2 aktivasyonun karaciğer rejenerasyonunda önemli rol oynadığını bilinmektedir. Upstream ve downstream sinyal olaylarını tanımlamak üzere yapılmış çalışmalar, MAPK'ların mekanik ve oksidatif stres bağımlı düzenlenmesinin anlaşılması yanında hepatosit fonksiyonunun düzenlenmesinin anlaşılmasını da sağlar (Kim vd., 2005). Bu yüzden çalışmamızda MAPK yolağındaki moleküllerin durumları da incelenmiştir. Tüm grupların hayvanlarına ait RT-PCR analizlerinden elde edilen RAF1, MEK1, MEK2, MAPK4, ERK1, Elk1 ve Ets1 gen ifadeleri; Westen Blot analizlerinden elde edilen c-RAF/RAF-1, MEK1, MEK2, ERK1, ERK1+ERK2, Elk1 ve Ets1 protein ifadeleri gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Hormonlar, büyüme ve farklılaşma faktörleri MAPK sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu RAS aktivasyonu ile baslar ve sırasıyla RAF, MEK ve ERK proteinleri ile ilerler. RAS, membrana bağlı bir G proteini olup kinaz reseptörünü aktive eder. Hücrenin uyarılması ile aktive olan RAS proteinleri RAF kinazlara kuvvetli biçimde bağlanırlar. Ayrıca, RAF kinazların hücre zarına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar. Ardından, MAPK sinyal yolağı aktivasyonunu takiben ERK1 ve ERK2 aktive olur. Uyarı, çekirdekte c-Jun ve c-Fos transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna neden olur. Böylece hücrenin, hayat döngüsünde S fazına girmesi sağlanır (Cansız, 2008).

RAF-1 gen ifadeleri bakımından çalışmamızda Grup III, tüm gruplardan yüksek bulunurken Grup VI, tüm gruplardan düşük bulunmuştur. Grup II'de, Grup I'e göre zamana bağlı olarak artış gözlenmiştir. Fakat PH grupları kıyaslandığında Grup III ve V'te ilk 24 saatte yüksek olan RAF-1 gen ifadesi, Grup IV ve VI'da 48 saat sonunda düşüş göstermiştir. Grup V'in RAF-1 gen ifadesi, Grup III'ün; Grup VI'nın RAF-1 gen ifadesi, Grup IV'ün seviyesine göre düşüş göstermiştir (Şekil 4.18). Elde ettiğimiz RAF-1 gen ifadelerine göre; Grup I ve Grup III, birbirlerinden ve tüm gruplardan istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark göstermiştir ($P<.001$). Grup V ve VI'nın RAF-1 gen ifadelerinde diğer gruplara göre istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark bulunmuştur ($P<.001$). Benzer şekilde Grup II ve IV'ün RAF-1 gen ifadeleri de diğer gruplardan istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı farklılık göstermiştir ($P<.001$). PH ile birlikte karvakrol uygulaması yapılan Grup V ve VI arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($P<.05$) (Çizelge 4.3).



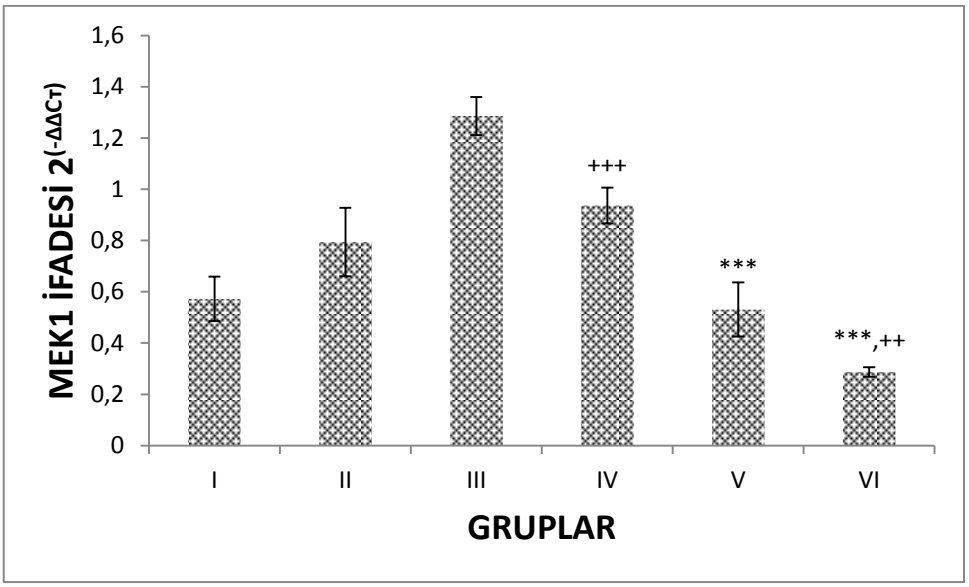
Şekil 4.18. Gruplara ait RAF1 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). *:** P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır**.**

Western Blot analizlerimizin sunucuna göre, Sham ve SF gruplarında 24. saatte düşük olan MAPK yolağı proteinlerden RAF1 protein ifadesinin zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür. Buna karşın Grup V'te 24. saatte yüksek olan RAF1 protein ifadesi 48. saat sonunda azalmıştır. Grup III'e göre Grup V'te ve Grup VI'ya göre de Grup IV'de yüksek RAF1 protein ifadesi tespit edilmiştir (Şekil 4.22).

Literatür taramaları yapıldığında konumuzla uyumlu çalışmanın çok az sayıda olduğu görülmüştür. Silverman vd. (1989) PH sonrası c- RAF mRNA'sının 24. saate kadar arttığını, sonraki süreçte ise azaldığını rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, ratlarda pankreatektomi sonrası 3, 24, 48 ve 72. saatlerde ölçülen c- RAF1 gen ifadesinin zamana bağlı olarak arttığı vurgulanmıştır (Silverman vd., 1990).

RT-PCR sonuçlarımıza göre, MEK1 gen ifadeleri bakımından Grup III, tüm gruplardan yüksek seviyede iken; Grup VI, tüm gruplardan düşük seviyede bulunmuştur. Grup II'de, Grup I'e göre zamana bağlı olarak artış tespit edilmiştir. Buna karşılık Grup III ve Grup V'te ilk 24 saatte yüksek olan MEK1 gen ifadesi, Grup IV ve VI'da 48 saat sonunda düşüş göstermiştir. Grup V'in MEK1 gen ifadesinde, Grup III'e göre; Grup VI'nın MEK1 gen ifadesinde de Grup IV'e göre düşüş görülmüştür. Grup V, Grup I'den;

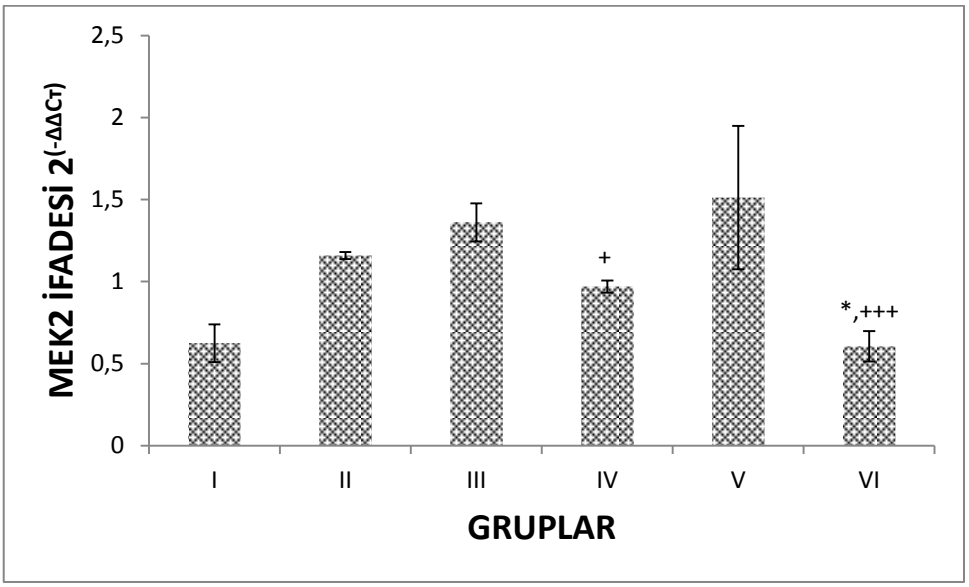
Grup VI ise Grup II'den düşük seviyede belirlenmiştir (Şekil 4.19). Çalışmamızda, Grup III'ün MEK1 gen ifadesi diğer gruplardan istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark sergilemiştir (P<.001). Grup IV'ün MEK1 ifadesi, Grup I ve Grup V'in ifadesinden çok ileri derecede anlamlı fark göstermiştir (P<.001). Grup VI'nın MEK1 gen ifadesinin ise Grup II ve Grup IV'ün gen ifadesinden çok ileri derecede anlamlı fark gösterdiği tespit edilmiştir (P<.001). Grup I ile II ve Grup V ile VI arasında ileri derecede anlamlı fark olduğu görülmüştür (P<.01). Benzer şekilde Grup I ile VI ve Grup II ile V arasında ileri derecede anlamlı fark olduğu görülmüştür (P<.01) (Çizelge 4.3).



Şekil 4.19. Gruplara ait MEK1 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

Deney gruplarımıza ait MEK2 gen ifadesi sonuçlarının Grup V'te en yüksek, Grup VI'da ise en düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, PH yapılan Grup III ve V'te 24. saatte yüksek olan MEK2 gen ifadesi, Grup IV ve VI'da 48. saat sonunda düşüş göstermiştir. Sham grupları kıyaslandığında, 48. saatte daha yüksek MEK2 gen ifadesi gözlenmiştir. Grup III'ün Grup I ve II'den yüksek; Grup IV'ün de Grup II'den düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.20). İstatistik sonuçlarımız doğrultusunda, Grup I ve VI'nın MEK2 gen ifadesinin Grup III ve V'ten çok ileri derecede anlamlı fark gösterdiği bulunmuştur (P<.001). Grup II'nin ifadesinde Grup I ve VI'nın ifadesine göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir (P<.01). MEK2 gen ifadesi, Grup IV ile V arasında

istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark sergilemiştir (P<.01). Grup IV'ün MEK2 gen ifadesinde ise Grup III ve VI'dan istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (P<.05). Grup II ile V arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (P<.05) (Çizelge 4.3).

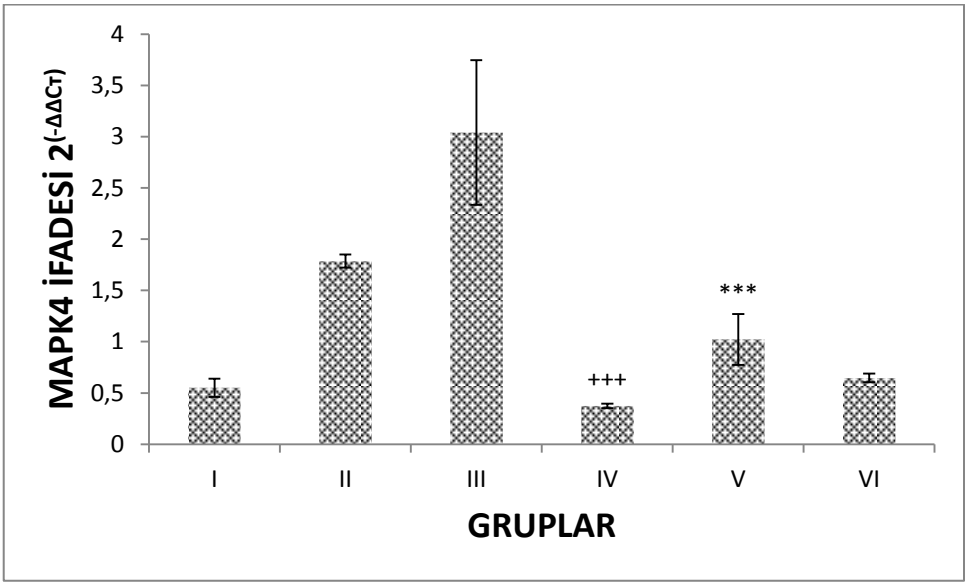


Şekil 4.20. Gruplara ait MEK2 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

Western Blot analizlerine göre; Sham ve karvakrol gruplarında 24. saatte yüksek olan MEK1 ve MEK2 ifadesinin 48. saat sonunda düştüğü görülmüştür. Fakat bunun aksine Grup III'te 24. saatte düşük olan protein ifadelerinin Grup IV'te arttığı saptanmıştır. Her iki MEK protein ifadesi de Grup V ve VI'da, sırasıyla Grup III ve IV'e göre azalma ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.22).

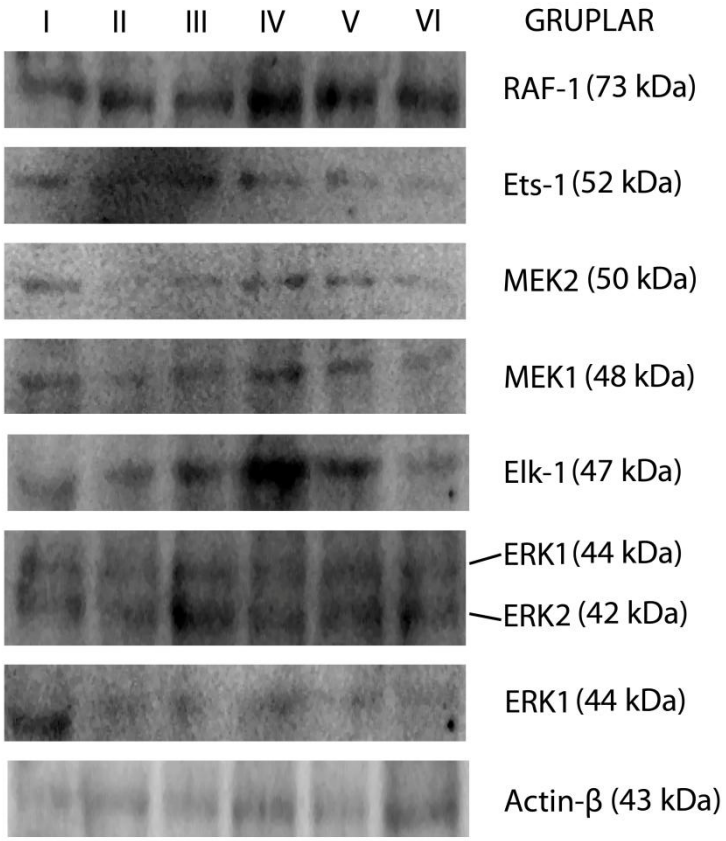
MAPK4 gen ifadeleri bakımından en yüksek değer Grup III'de iken; en düşük değer Grup IV'te gözlenmiştir. Grup II'de Grup I'e göre zamana bağlı olarak artış bulgularına rastlanmıştır. Buna karşın Grup III ve V'te yüksek olan MAPK4 gen ifadesi sırasıyla Grup IV ve VI'da zamana bağlı olarak düşüş göstermiştir. Grup III, Grup V'ten yüksek iken; Grup IV, Grup VI'ten düşük seviyede bulunmuştur. Grup I'de, Grup V ve VI'dan düşük; Grup II'de, Grup V ve VI'dan yüksek bulgulara rastlanmıştır (Şekil 4.21). MAPK4 gen ifadesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup II, Grup I, IV ve VI'dan farklı iken (P<.001); Grup III tüm gruplardan farklı bulundu (P<.001). Grup V'te ise Grup

II ve IV'e göre istatistiksel fark gözlenmiştir (P<.05). Grup IV ile VI ve Grup V ile VI arasında fark tespit edilmemiştir (P<.05) (Çizelge 4.3).



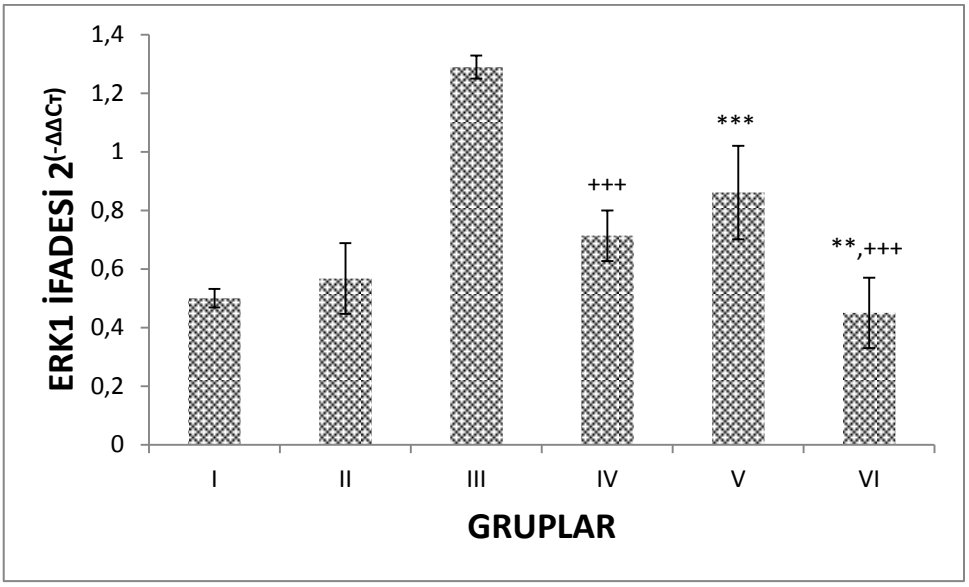
Şekil 4.21. Gruplara ait MAPK4 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

Shimizu vd. (2009), %70 PH yapılmış yabanıl tip farelere göre TNFR-1 KO farelerde, MAPKKK3 gen ifadesinin arttığını ve 24 saat boyunca sürdüğünü bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada MAPKKKK3, MAPKKK4 (MEKK4) ve MAPK8 gen ifadesinin PH sonrasında 12-24 saat arası; MAPKKKK4 gen ifadesinin ise 24 saat sonra da artış gösterdiğini söylemişlerdir (Shimizu vd., 2009). Araştırıcılar aynı çalışmalarında MAPKKK3 gen ifadesinin PH'den 3 saat sonra yavaş yavaş azalmaya başladığını; MAPKK3 gen ifadesinin ise PH sonrasında 0-24 saat arası azaldığını bildirmişlerdir (Shimizu vd., 2009). Makino vd. (2011) yaptıkları çalışmada farelerde %90 PH'den 3 saat sonra MAPK9, MAPKK4 ve MAPKKK3 ifadesinin azaldığını vurgulamışlardır. Aynı çaılşmada MAPKKK3'ün tercihen ERK2/ERK1'i aktive ettiği bildirilmiştir. Bazı araştırıcılar, MKK4'ün baskılanmasının, MKK7 gibi diğer MAPK ailesi üyeleri aktive ettiğini ve böylece Elk1 ifadesi arttığından hepatosit rejenerasyonunun da arttığını rapor etmişlerdir (Wuestefeld vd., 2013). Aynı çalışmada MKK4'ün baskılanmasının p-RAF1 ifadesini arttırdığını; RAF1 ve MEK2 ifadesini azalttığını vurgulamışlardır (Wuestefeld vd., 2013).



Şekil 4.22. MAPK yolağına ait protein ifadelerinin Westen Blot analizlerinden elde edilen bant görüntüleri.

Bulgularımız, gruplarımıza ait ERK1 gen ifadesinin Grup III'te en yüksek, Grup VI'da ise en düşük olduğunu göstermiştir. ERK1 gen ifadesinin, Grup II'de Grup I'e göre zamana bağlı olarak arttığını göstermiştir. Fakat PH yapılan SF grupları olan Grup IV'te Grup III'e göre zamana bağlı olarak azalma tespit edilmiştir. Benzer şekilde ERK1 gen ifadesi, PH yapılan karvakrol grupları olan Grup VI'da Grup V'e göre zamana bağlı olarak azalma görülmüştür. Grup V ve Grup VI, sırasıyla Grup III ve Grup IV'ten düşük bulunmuştur (Şekil 4.23). İstatistiksel değerlendirmelerimize göre, Grup III'ün ERK1 gen ifadesi tüm gruplardan çok ileri derecede anlamlı fark göstermiştir ($P<.001$). ERK1 gen ifadesi bakımından Grup V ile Grup VI arasında istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark saptanmıştır ($P<.001$). Grup V'in gen ifadesi, Grup I ve II'den istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark sergilemiştir ($P<.01$). Grup IV ile Grup VI arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark bulunmuştur ($P <.01$). Grup I ile Grup IV arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P<.05$). (Çizelge 4.3).



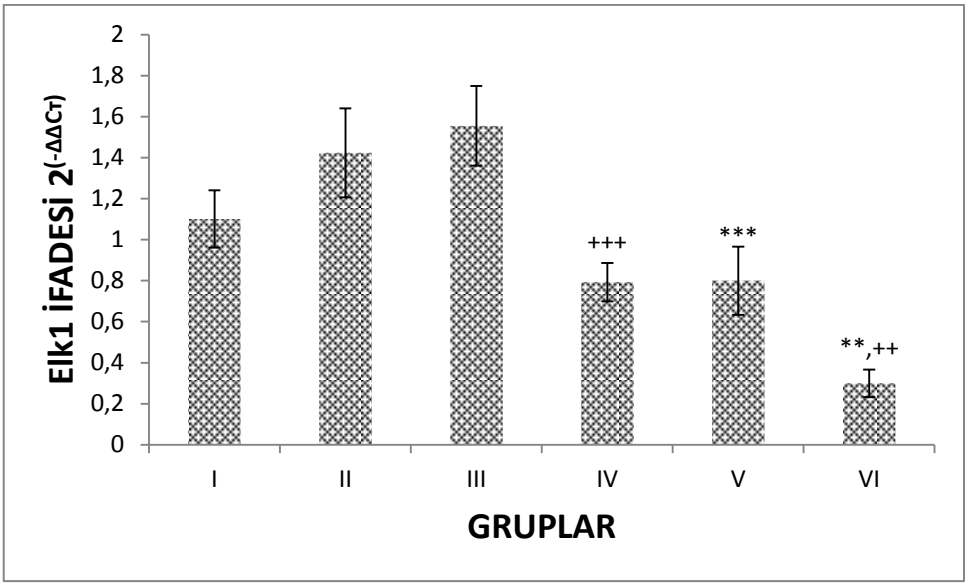
Şekil 4.23. Gruplara ait ERK1 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

ERK1 ve ERK1+ERK2 protein ifadelerinin Western Blot bulguları Sham, SF ve karvakrol gruplarında 24. saatte yüksek olduğu ve 48. saat sonunda zamana bağlı olarak azaldığı yönünde olmuştur. ERK1 protein ifadesi, Grup V'te Grup III'e göre; Grup VI'da Grup IV'e göre artış belirlenmiştir. Ancak ERK2 protein ifadesinde ise Grup V'te Grup III'e göre azalma; Grup VI'da Grup IV'e göre artma tespit edilmiştir (Bkz Şekil 4.22).

Yoshiya vd. (2014) yaptıkları çalışmada, farelerde %70 PH sonrası 1, 3, 6, 12, 24. saatlerde ERK1/2 protein ifadesinin yaklaşık olarak aynı seviyede olduğunu rapor etmişledir. Ancak PH'den 24 saat önce ve PH sonrası i.p. olarak verilen F13A maddesinin ERK1/2 fosforilasyonunu 3. saatte sadece PH yapılan gruba göre 2 kat arttığını bildirmişlerdir (Yoshiya vd., 2014). Başka bir çalışmada ise farelerde %70 PH'den 12 sonra ERK fosforilasyonu DMSO ve CBZ grupları arasında fark göstermemiş; ERK protein ifadesi, p-ERK ifadesinden fazla bulunmuştur (Kawaguchi vd., 2013). Hamano vd. (2014), 2/3 PH sonrası ERK1/2 protein ifadesi p-ERK1/2 ifadesinden daha yoğun bulunmuştur. Aynı çalışmada, kontrol grubu farelerinde p-ERK1/2 / ERK1/2 oranı PH'den 24, 36, 48 saat sonra zamana bağlı olarak artmıştır (Hamano vd., 2014). ERK1/2 fosforilasyonu kontrol grubu farelerinde PH'den 24 saat sonra saptanmış ve 48. saate kadar sürmüştür; fakat PH'den 24 saat sonra yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde ERK1/2

fosforilasyonu görülememiştir (Hamano vd., 2014). Bazı araştırıcılar, yabanıl tip ve transgenik farelerde 2/3 PH'den 8 sonra ERK protein ifadesinin, p-ERK ifadesinden fazla olduğunu bildirmişlerdir (Quétier vd., 2013). Buna ek olarak; PH'den 8 sonra transgenik farelere göre, yabanıl tip farelerde ERK fosforilasyonun daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır (Quétier vd., 2013). Pajaud vd. (2015) yaptıkları çalışmada yabanıl tip farelerde ERK1/2 aktivasyonu 2-6 saat, 24-36 saat, 44-48 saat olmak üzere 3 ayrı zaman aralığında artış göstermiştir. Aynı araştırıcılar, Gstp1/2 geni susturulmuş farelerde ise sadece 2-6 saat arası ERK1/2 aktivasyonu olduğunu, diğer saatlerde aktivasyon olmadığını belirtmişlerdir (Pajaud vd., 2015). Yapılan başka bir çalışmada, ERK protein ifadesinin eritropoietin uygulaması yapılmış sıçanlarda %70 PH'den 48 saat sonra, salin grubu sıçanlarına göre önemli derecede arttığı savunulmuştur (Greif vd., 2010).

RT-PCR sonuçlarımıza göre, Elk1 gen ifadesinin Grup II'de Grup I'e göre arttığı saptanmıştır. En yüksek Elk1 gen ifadesi Grup III'te; en düşük ifade ise Grup VI'da görülmüştür. Grup I ve II, Grup IV, V ve VI'dan yüksek seviyelerde gözlendi. PH yapılan, SF uygulaması yapılmış gruplarda 24. saatte yüksek seviyede olan Elk1 gen ifadesi 48. saat sonunda düşüş göstermiştir. Benzer şekilde, Grup V'e göre zamana bağlı azalma Grup VI'da da gözlenmiştir. Ayrıca Grup III, Grup V'ten; Grup IV ise Grup VI'dan daha yüksek Elk1gen ifadesi vermiştir (Şekil 4.24). Grup IV ve V'in Elk1gen ifadesi istatistiksel olarak, Grup II ve III'ün ifadesinden farklı bulunmuştur ($P<.001$). Grup VI'nın Elk1gen ifadesinin ise Grup I, II ve III'ün ifadesinden istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir ($P<.001$). Grup I, Grup III'ten; Grup VI ise, Grup IV ve V'ten farklı bulundu ($P<.01$). Grup I'de ise, Grup II, IV ve V'ten anlamlı fark gözlenmiştir ($P<.05$) (Çizelge 4.3).



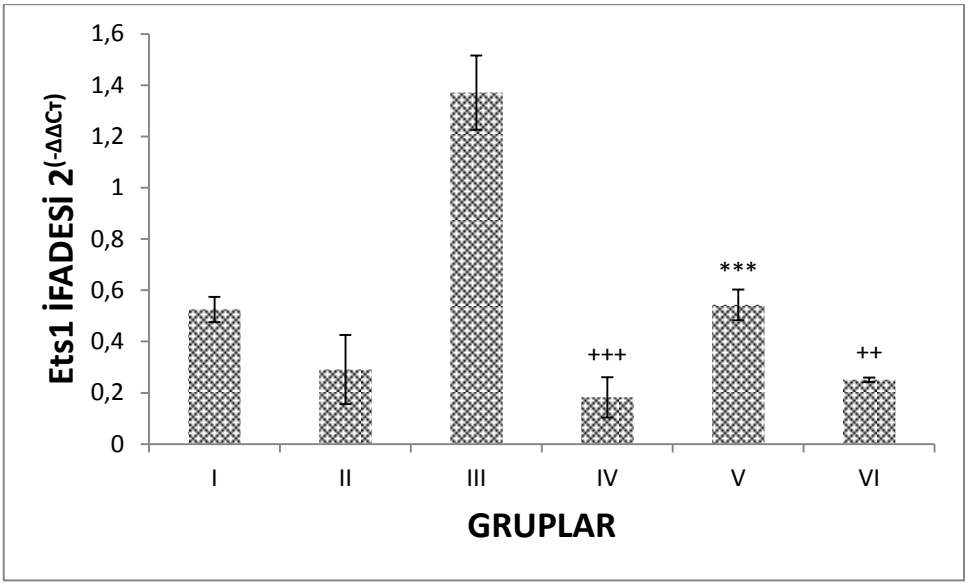
Şekil 4.24. Gruplara ait Elk1 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

Elk1 protein ifadesi sonuçlarına göre Sham ve karvakrol gruplarında 48. saate doğru bir azalma olduğu saptanmıştır. Ancak bunun aksine SF gruplarında, 24. saatte düşük olan Elk1 protein ifadelerinde 48. saate doğru bir artma olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Elk1 protein ifadesi Grup V'te, Grup III'ten; Grup IV'te, Grup VI'dan daha yüksek seviyede bulunmuştur (Bkz Şekil 4.22).

Bazı araştırıcılar, 2/3 PH sonrası karaciğer örneklerinde yaptıkları mikroarray analizi sonucunda, Elk gen ifadesinin 24. satte en yüksek seviyeye ulaştığını, sonra düştüğünü ve 72. saate doğru tekrar yükseldiğini rapor etmişlerdir (Chang vd., 2014; Guo vd., 2014).

Bulgularımız doğrultusunda Ets1gen ifadesi Grup III'te en yüksek; Grup IV'te en düşük değere ulaşmıştır. Sham gruplarında, PH yapılan SF ve karvakrol uygulaması yapılmış gruplarda 24. saatte yüksek olan Ets1 gen ifadesinin 48. saat sonunda azaldığı görülmüştür. Grup V'te, Grup III'ten düşük; Grup VI'da ise Grup IV'ten yüksek Ets1 gen ifadesi tespit edilmiştir. Ayrıca Grup V, Grup I ve II'den yüksek; Grup IV, Grup I ve II'den düşük değer sergilemiştir (Şekil 4.25). Çalışmamızda, Grup III'ün Ets1 gen ifadesinde diğer gruplardan (P<.001); Grup IV'ün ifadesinde ise Grup I ve V'in

ifadesinden istatistiksel olarak fark tespit edilmiştir (P<.001). Ets1gen ifadesi Grup V'de, Grup II ve VI'dan farklı bulunmuştur (P<.01). Grup I ile VI arasında da istatistiksel olarak fark gözlenmiştir (P<.01). Grup II, Grup I ve V'ten fark belirlenmiştir (P<.05). PH sonrası 48. saat grupları olan Grup IV ile VI arasında Ets1 gen ifadesi bakımından istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir (P<.05) (Çizelge 4.3).



Şekil 4.25. Gruplara ait Ets1 gen ifadesi (Ortalama ± Standart sapma). ***: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.

Ets1 protein ifadesi sonuçlarına göre Sham ve karvakrol gruplarında 48. saate doğru bir azalma olduğu saptanmıştır. Ancak bunun aksine SF gruplarında, 24. saatte düşük olan Ets1 protein ifadesinde 48. saate doğru bir artma olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Ets1 protein ifadesi Grup V'te, Grup III'ten; Grup IV'te, Grup VI'dan daha yüksek seviyede bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.22).

Terada vd. (2005) yaptıkları çalışmada 1 saat iskemi ve 3, 6, 12, 24, 48, 72 saat reperfüzyon sonrası, Ets1 mRNA ifadesinin 3-12 saat arası; protein ifadesinin ise 6-24 saat arası artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna karşın Tanaka vd. (2004) 1 saat iskemi ve 6, 12, 24, 48, 72 saat reperfüzyon sonrası Ets-1 mRNA ve protein ifadesinin 6 ile 24 saat arası artış gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Çizelge 4.3. MAPK yolağına ait gen ifadelerinin Ortalama ± Standart sapma değerleri.

	Sham		SF		Karvakrol	
	I	II	III	IV	V	VI
	24 s	48 s	24 s	48 s	24 s	48 s
RAF-1	0,65±0,14	0,99±0,059	1,33±0,09	0,95±0,05^{+++}	0,32±0,01***	0,23±0,003***
MEK1	0,57±0,08	0,80±0,13	1,28±0,07	0,93±0,07^{+++}	0,53±0,10***	0,28±0,02$^{***,++}$
MEK2	0,62±0,11	1,15±0,02	1,36±0,11	0,97±0,03^{+}	1,51±0,43	0,60±0,09$^{*,+++}$
ERK1	0,50±0,03	0,56±0,12	1,29±0,04	0,71±0,08^{+++}	0,87±0,16***	0,45±0,12$^{**,+++}$
MAPK4	0,55±0,09	1,78±0,06	3,04±0,70	0,37±0,02^{+++}	1,02±0,24***	0,65±0,04
Elk1	1,10±0,13	1,42±0,21	1,55±0,20	0,80±0,09^{+++}	0,80±0,16***	0,30±0,06$^{**,++}$
Ets1	0,52±0,05	0,30±0,13	1,37±0,14	0,18±0,07^{+++}	0,54±0,06***	0,25±0,008^{++}

*****: P<.001 SF'e göre; +++: P<.001 Zamana göre; **P<.01 SF'e göre; ++: P<.01 Zamana göre; *: P<.05 SF'e göre; +: P<.05 Zamana göre anlamlı fark vardır.**

Literatür bilgilerine bakıldığında, STAT3, SOCS3 ve c-Myc gen ifadelerinin PH sonrası ilk 4 saat içinde arttığı ve ardından zamana bağlı olarak 72. saat sonunda azaldığı gözlenmiştir (Lonati vd., 2013). Buna karşılık aynı çalışmada IL-6 gen ifadesinin ise PH sonrası ilk 24 saat içinde arttığı ve ardından zamana bağlı olarak 72. saat sonunda azaldığı gözlenmiştir (Lonati vd., 2013). Iimuro ve Fujimoto (2010), PH'den sonra ilk 24 saat içinde NF-κB'nin DNA'ya bağlanma aktivitesinin arttığını vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada ise 24. saatte yüksek olan ERK gen ifadesinin 30. saatte düştüğü, 36. saatte tekrar attığı bildirilmiştir (Xu vd., 2012). Aynı çalışmada, Elk1 gen ifadesinin ise 24-30 saat arası zamana bağlı olarak arttığı, ardından azaldığı tespit edilmiştir (Xu vd., 2012). Bu araştırmalara paralel olarak, çalışmamızda RT-PCR analizlerinden elde edilen IL-6/STAT3 ve MAPK yolağına ait söz konusu genlerin Akitn-β'ya göre artış-azalışları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. IL-6/STAT3 ve MAPK yolaklarına ait gen ifadelerinin artış ve azalışları.

Grup / Gen	I	II	III	IV	V	VI
NF-κB	-0,55	-0,35	-0,43	-0,28	-0,33	-0,2433
IL-6	0,57	-0,24	1,73	0,8533	1,3133	1,1033
STAT3	-0,43	-0,4867	-0,3467	-0,41	0,1267	-0,52
SOCS3	0,39	0,4	-0,5267	0,24	1,13	0,6367
c-Myc	-0,49132	-0,21122	0,737073	-0,12927	-0,30921	-0,74208
Raf1	-0,3438	-0,00328	0,32769	-0,04632	-0,6794	-0,76521
MEK1	-0,42771	-0,2062	0,285821	-0,06352	-0,46901	-0,71321
MEK2	-0,37564	0,158404	0,360766	-0,0302	0,511948	-0,39542
MAPK4	-0,44893	0,785639	2,041027	-0,62613	0,0229	-0,353
ERK1	-0,50021	-0,43264	0,289209	-0,28642	-0,1391	-0,55022
Elk1	0,100812	0,423553	0,554754	-0,20712	-0,20023	-0,70034
Ets1	-0,47464	-0,709	0,370763	-0,81782	-0,4568	-0,74869

Kırmızı: ifadesi artan genler, Yeşil: ifadesi azalan genler

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıçanlarda parsiyal hepatektomi sonrası uyarılan karaciğer rejenerasyonuna karvakrolün IL-6/STAT3 ve MAPK yolakları üzerinden etkisi araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre ip olarak letal dozda uygulanmasına rağmen karvakrol, PH sonrası rejenerasyonu pozitif yönde etkilemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, %70 PH'den 1 saat önce ip olarak tek doz uygulanmış olan karvakrolün sıçan karaciğerinde rejenerasyonu artırarak/hızlandırarak fonksiyonel yetmezliği ortadan kaldırdığı düşüncesine varılmıştır. Üstelik bu düşüncemiz histopatolojik değerlendirmelerimiz yanında IL-6/STAT3 yolağında görevli NF-κB, IL-6, STAT3, SOCS3 ve c-Myc'nin gen ve protein ifadeleri ile desteklenmiştir. Karvakrol, bu yolaktaki olumlu etkisini, MAPK yolağındaki gen ve protein ifadeleri üzerine de göstermiştir. Karvakrolün bu rejeneratif etkisinin tamamlayıcı tıp uygulamaları açısından önemli olabileceğini, çalışmamıza ek olarak karvakrolün aynı deneysel modelde, bu yolak üzerinden farklı zaman ve dozlardaki etkilerinin de araştırılmasının katkı sağlayabileceği görüşündeyiz.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Abshagen, K., Eipel, C., Kalff, J. C., Menger, M. D.Vollmar, B., 2007, Loss of NF-kB Activation in Kupffer Cell-Depleted Mice Impairs Liver, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 292, G1570-G1577.

Ahn, K. S.Aggarwal, B. B., 2005, Transcription Factor NF-kB A Sensor for Smoke and Stress Signals, Annals New York Academy of Sciences, 1056, 218-233.

Akın, G., Pekgöz, E.Gökhun, İ. H., 1992, Karaciğer: Yapısı, Metabolik Fonksiyonları, Fizyopatolojisi, Patobiyokimyası, Tertip Matbaası, s.127.

Anonim, 2015, Riken Bioresource Center DNA Bank, http://dna.brc.riken.jp/index.html, Erişim Tarihi: 02.11.2015.

Ayan, F., Aytaç, E., Saygılı, S., Genç, H., Karaca, Ç. vd., 2011, Effects of Lycopene on Oxidative Stress and Remnant Liver Histology after Partial Hepatectomy in Rats, The Turkish Journal of Gastroenterology, 408-413.

Azırak, S., 2007, Thymol ve Carvacrol'ün In Vıvo Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 95.

Baser, K. H. C., 2008, Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils, Current Pharmaceutical Design, 14 (29), 3106-3120.

Benko, T., Best, J., de Groot, H., Frede, S., Baba, H. A. vd., 2010, Glycine Pretreatment Ameliorates Liver Injury After Partial Hepatectomy in the Rat, Journal of Investigative Surgery, 23, 12-20.

Burkitt, M. D., Hanedi, A. F., Duckworth, C. A., Williams, J. M., Tang, J. M. vd., 2015, NF-κB1, NF-κB2 and c-Rel differentially regulate susceptibility to colitis-associated adenoma development in C57BL/6 mice, Journal of Pathology, 236, 326-336.

Burtis, C. A.Ashwood, E. R., 2005, Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, Palme Yayıncılık, s.1091.

Campbell, J. S., Prichard, L., Schaper, F., Schmitz, J., Stephenson-Famy, A. vd., 2001, Expression of Suppressors of Cytokine Signaling During Liver Regeneration, J Clin Invest., 107 (10), 1285-1292.

Cansız, C., 2008, Overin Seröz Adenokarsinomları ve Seröz Borderline Tümörlerinde Ras/Raf/Mek/Mapk Yolağındaki Moleküler Değişikliklerin İmmünhistokimyasal Olarak Araştırılması, Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, 75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chang, C., Zhao, W., Yang, J., Li, M., Zhou, M. vd., 2014, Study on Activity of The Signaling Pathways Regulating Hepatocyte Differentiation during Rat Liver Regeneration, Animal Cells and Systems, 18 (6), 416–424.

Child, C. G., Barr, D., Holswade, G. R.Harisson, C. S., 1953, Liver Regeneration Following Portacaval Transposition in Dogs, Anals of Surgery, 138 (4), 600-608.

Coelho, M. C. M., Tannuri, U., Tannuri, A. C. A., Mello, E. S.Dos Santos, N. A. S. R., 2007, Expression of Interleukin 6 and Apoptosis-Related Genes in Suckling and Weaning Rat Models of Hepatectomy and Liver Regeneration, Journal of Pediatric Surgery, 42, 613-619.

Cooper, G. M.Hausmann, R. E., 2006, Hüce Moleküler Yaklaşım, İzmir Tıp Kitabevi, s.180-187.

da Silva, C. G., tuder, P., kroch, M., ahiou, J., inussi, D. C. vd., 2013, A20 Promotes Liver Regeneration by Decreasing SOCS3 Expression to Enhance IL-6/STAT3 Proliferative Signals, Hepatology, 57 (5), 2014-2025.

Debonera, F., Aldeguer, X., Shen, X., Gelman, A. E., Gao, F. vd., 2001, Activation of Interleukin-6/STAT3 and Liver Regeneration following Transplantation, Journal of Surgical Research, 96, 289-295.

Dierssen, U., Beraza, N., Lutz, H. H., Liedtke, C., Ernst, M. vd., 2008, Molecular Dissection of gp130-Dependent Pathways in Hepatocytes during Liver Regeneration, J Biol Chem, 283 (15), 9886-9895.

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

Dittmer, J., 2003, The Biology of the Ets1 Proto-Oncogene, BioMed Central, 2 (29), 1-21.

Doğan, A. L.Güç, D., 2004, Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser, Hacettepe Tıp Dergisi, 35, 34-42.

Elliott, J., 2008, SOCS3 in Liver Regeneration and Hepatocarcinoma, Mol Interv, 8 (1), 19-21.

Fausto, N., Campbell, J. S.Riehle, K. J., 2006, Liver Regeneration, Hepatology, 43, 45-53.

Gao, B., 2005, Cytokines, STATs and Liver Disease, Cellular & Molecular Immunology, 2 (2), 92-100.

Garbers, C., Aparicio-Siegmund, S.Rose-John, S., 2015, The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition, Current Opinion in Immunology, 34, 75-82.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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., 2011, New Insights into Liver Regeneration, Clin Res Hepatol Gastroenterol, 35 (10), 623-629.

Gomez, D., Homer-Vanniasinkam, S., Graham, A. M.Prasad, K. R., 2007, Role of Ischaemic Preconditioning in Liver Regeneration following Major Liver Resection and Transplantation, World Journal of Gastroenterology, 13 (5), 657-670.

Gökçimen, A., Öztürk, Ö.Karagöz, E., 1999, Rejenerasyon, T Klin Tıp Bilimleri, 19, 169-183.

Greif, F., Ben-Ari, Z., Taya, R., Pappo, O., Kurtzwald, E. vd., 2010, Dual Effect of Erythropoietin on Liver Protection and Regeneration after Subtotal Hepatectomy in Rats, Liver Transplantation, 16, 631-638.

Guégan, J. P., Frémin, C.Baffet, G., 2012, The MAPK MEK1/2-ERK1/2 Pathway and Its Implication in Hepatocyte Cell Cycle Control, Int J Hepatol, 2012, 328372.

Gultekin, F. A., Cakmak, C. K., Turkcu, U. O., Yurdakan, G., Demir, F. E. O. vd., 2013, Effects of Ozone Oxidative Preconditioning on Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Rats, Journal of Investigative Surgery, 26, 242-252.

Guo, G., Xia, J., Bao, J., Sun, H.-Q., Shi, Y.-J. vd., 2012, Expression of SOCS3 Throughout Liver Regeneration is not Regulated by DNA Methylation, Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 11 (4), 401-406.

Guo, X. Q., Li, M. H., Xu, T. T., Chang, C. F., Wang, G. P. vd., 2014, Study on the Activity of PI3K/AKT, Death Receptor and 14-3-3 Mediated Signaling Pathways Regulating Hepatocyte Apoptosis during Rat Liver Regeneration, Journal of Life Sciences Research, 1 (4), 93-101.

Hamano, M., Ezaki, H., Kiso, S., Furuta, K., Egawa, M. vd., 2014, Lipid Overloading during Liver Regeneration Causes Delayed Hepatocyte DNA Replication by Increasing ER Stress in Mice with Simple Hepatic Steatosis, J Gastroenterol. , 49 (2), 305-316.

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

Higgins, G. M.Anderson, R. M., 1931, Experimental Pathology of Liver. I. Restoration of Liver White Rat following Partial Surgical Removal, Arch Pathol, 12, 186-202.

Hosoya, S., Ikejima, K., Takeda, K., Arai, K., Ishikawa, S. vd., 2013, Innate Immune Responses Involving Natural Killer and Natural Killer T Cells Promote Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 304, G293–G299.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Iida, A., Yoshidome, H., Shida, T., Takano, S., Takeuchi, D. vd., 2010, Hepatocyte Nuclear Factor-Kappa B (NF-kB) Activation is Protective but is Decreased in The Cholestatic Liver with Endotoxemia, Surgery, 148, 477-489.

Iimuro, Y.Fujimoto, J., 2010, TLRs, NF-kB, JNK and Liver Regeneration, Gastroenterology Research and Practice, 2010, 1-7.

Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B. A., Kurkcuoglu, M. vd., 2005, Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test, Food Chemistry, 93, 551-556.

Isomoto, H., Mott, J. L., Kobayashi, S., Werneburg, N. W., Bronk, S. F. vd., 2007, Sustained IL-6/STAT-3 Signaling in Cholangiocarcinoma Cells due to SOCS-3 Epigenetic Silencing, Gastroenterology, 132 (1), 384-396.

Karahan, S., Çavuşoğlu, K., Atmaca, H. T.Yalçın, E., 2008, Albino Farelerde İyonlaştırıcı Radyasyonun Hepatosit Morfolojisi ve Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri, Erciyes Üniv Vet Fak Derg, 5 (2), 61-66.

Kawaguchi, T., Kodama, T., Hikita, H., Tanaka, S., Shigekawa, M. vd., 2013, Carbamazepine Promotes Liver Regeneration and Survival in Mice, J Hepatol, 59 (6), 1239-45.

Khan, M. M., 2008, Immunopharmacology, Springer US, Chapter 2: Role of Cytokines.

Kılıçturgay, K., 2003, İmmünoloji, Nobel&Güneş Kitabevi, s.113-118.

Kim, S. K., Woodcroft, K. J., Oh, S. J., Abdelmegeed, M. A.Novak, R. F., 2005, Role of Mechanical and Redox Stress in Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Primary Cultured Rat Hepatocytes, Biochem Pharmacol, 70 (12), 1785-95.

Kremer, M., Son, G., Zhang, K., Moore, S. M., Norris, A. vd., 2014, Smad3 Signaling in The Regenerating Liver: Implications for The Regulation of IL-6 Expression, Transpl. Int, 27 (7), 748-758.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V.Milos, M., 2004, Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil Analytical, Nutritional and Clinical Methods, Food Chemistry, 85, 633-640.

Lai, H.-S., Lin, W.-H., Lai, S.-L., Lin, H.-Y., Hsu, W.-M. vd., 2013, Interleukin-6 Mediates Angiotensinogen Gene Expression during Liver Regeneration, PLoS ONE, 8 (7), 1-8.

Lepiller, Q., Abbas, W., Kumar, A., Tripathy, M. K.Herbein, G., 2013, HCMV Activates the IL-6-JAK-STAT3 Axis in HepG2 Cells and Primary Human Hepatocytes, PLoS ONE, 8 (3), 1-15.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Li, M., Zhou, X., Mei, J., Geng, X., Zhou, Y. vd., 2014, Study on the activity of the signaling pathways regulating hepatocytes from G0 phase into G1 phase during rat liver regeneration, Cell Mol Biol Lett, 19 (2), 181-200.

Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V.Taub, R., 2002, STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration, J Biol Chem, 277 (32), 28411-7.

Liu, A., Dirsch, O., Fang, H., Dong, W., Jin, H. vd., 2011, HMGB1 Translocation and Expression is Caused by Warm Ischemia Reperfusion Injury, but not by Partial Hepatectomy in Rats, Experimental and Molecular Pathology, 91, 502-508.

Lonati, C., Carlin, A., Leonardi, P., Valenza, F., Bosari, S. vd., 2013, Modulatory Effects of NDP-MSH in The Regenerating Liver After Partial Hepatectomy in Rats, Peptides, 50, 145-152.

Makino, H., Shimada, H., Morioka, D., Kunisaki, C., Morita, T. vd., 2011, Analysis of Gene Expression Profiles in Fatal Hepatic Failure after Hepatectomy in Mice, Journal of Surgical Research, 169 (1), 36-43.

Mao, S. A., Glorioso, J. M.Nyberg, S. L., 2014, Liver Regeneration, Translational Research, 163, 352-362.

Martins, P. N. A.Neuhaus, P., 2007, Surgical Anatomy of The Liver, Hepatic Vasculature and Bile Ducts in The Rat, Liver International, 27 (3), 384-392.

Melo, F. H. C., Moura, B. A., de Sousa, D. P., de Vasconcelos, S. M. M., Macedo, D. S. vd., 2010, Antidepressant-Like Effect of Carvacrol (5-Isopropyl-2-Methylphenol) in Mice: Involvement of Dopaminergic System, Fundamental & Clinical Pharmacolog, 25, 362-367.

Melo, F. H. C., Venancio, E. T., de Sousa, D. P., de Franca Fonteles, M. M., de Vasconcelos, S. M. M. vd., 2013, Anxiolytic-Like Effect of Carvacrol (5-Isopropyl-2-Methylphenol) in Mice: Involvement with GABAergic Transmission, Fundamental & Clinical Pharmacolog, 24, 437-443.

Michalopoulos, G. K., 2013, Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis, Compr Physiol, 3, 485-513.

Michalopoulos, G. K.DeFrances, M. C., 1997, Liver Regeneration, Science, 276, 60-66.

Miura, Y., Washizawa, N., Urita, Y., Imai, T.Kaneko, H., 2012, Evaluation of Remnant Liver Function using 13C-Breath Tests in a Rat Model of 70% Partial Hepatectomy, Hepato-Gastroenterology, 59, 311-316.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Moreno-Carranza, B., Goya-Arce, M., Vega, C., Adán, N., Triebel, J. vd., 2013, Prolactin Promotes Normal Liver Growth, Survival, and Regeneration in Rodents: Effects on Hepatic IL-6, Suppressor of Cytokine Signaling-3, and Angiogenesis., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 305 (7), R720-R726.

Nagasue, N., Kobayashi, M., Iwaki, A., Yukaya, H., Kanashima, R. vd., 1978, Effect of 5-Fluorouracil on Liver Regeneration and Metabolism after Partial Hepatectomy in the Rat, Cancer, 41, 435-443.

Pajaud, J., Ribault, C., Ben Mosbah, I., Rauch, C., Henderson, C. vd., 2015, Glutathione transferases P1/P2 regulate the timing of signaling pathway activations and cell cycle progression during mouse liver regeneration., Cell Death Dis., 15 (6), 1-13.

Palmes, D.Spiegel, H.-U., 2004, Animal Models of Liver Regeneration, Biomaterials, 24, 1601-1611.

Pazarbaşı, A., Kasap, M.Kasap, H., 2011, Kanser Yolakları, Arşiv, 20 (187), 187-229.

Quétier, I., Brezillon, N., Duriez, M., Massinet, H., Giang, E. vd., 2013, Hepatitis B Virus HBx Protein Impairs Liver Regeneration through Enhanced Expression of IL-6 in Transgenic Mice, Journal of Hepatology, 59, 285-291.

Rees, G. S., Ball, C., Ward, H. L., Gee, C. K., Tarrant, G. vd., 1999, Rat Interleukin 6: Expression in Recombinant Escherichia coli, Purification and development of a Novel ELISA., Cytokine, 11 (2), 95-103.

Reyhani, B., 2011, Sitokin Sinyal Baskılayıcı (SOCS) Genlerinin İfadesinin Metilprednizolon ve Vitamin-D3 Uygulanmış Kronik Miyeloblastik Lösemi (K-562) Hücrelerinde Araştırılması, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 71.

Ringelhan, M., Schmid, R. M.Geisler, F., 2012, The NF-kB Subunit RelA/p65 is Dispensable for Successful Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice, PLoS ONE, 7 (10), 1-11.

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

Scotté, M., Daveau, M., Hiron, M., Ténière, P.Lebreton, J.-P., 1993, Absence of Expression of Interleukin-6 (IL-6) mRNA in Regenerating Rat Liver, Federation of European Biochemical Societies Letters, 315 (2), 159-162.

Seehofer, D., Schirmeier, A., Bengmark, S., Cho, S.-Y. R., Koch, M. vd., 2010, Curcumin Attenuates Oxidative Stress and Inflammatory Response in the Early Phase after Partial Hepatectomy with Simultaneous Intraabdominal Infection in Rats, Journal of Surgical Research, 159 (497), 502.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Seitz, V., Butzhammer, P., Hirsch, B., Hecht, J., Gütgemann, I. vd., 2011, Deep Sequencing of MYC DNA-Binding Sites in Burkitt Lymphoma, PLoS ONE, 6 (11), 1-2.

Selzner, M.Clavien, P.-A., 2000, Failure of Regeneration of The Steatotic Rat Liver: Distruption at Two Different Levels in The Regeneration Pathway, Hepatology, 31, 35-42.

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

Shimizu, T., Togo, S., Kumamoto, T., Makino, H., Morita, T. vd., 2009, Gene Expression during Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice Lacking Type 1 Tumor Necrosis Factor Receptor, Journal of Surgical Research, 152, 178-188.

Shu, R. Z., Zhang, F., Wang, F., Feng, D. C., Li, X. H. vd., 2009, Adiponectin Deficiency Impairs Liver Regeneration through Attenuating STAT3 Phosphorylation in Mice, Laboratory Investigation, 89 (9), 1043-1052.

Silverman, A. J., Zurlo, J., Watson, M. A.J.D., Y., 1989, Expression of c-raf-1 and A-raf-1 during regeneration of rat liver following surgical partial hepatectomy, Molecular Carcinogenesis, 2 (2), 63-67.

Silverman, J. A., Kuhlmann, E. T., Zurlo, J., Yager, J. D.Longnecker, D. S., 1990, Expression of c-myc, c-raf-I, and c-Ki-ras in Azaserine-Induced Pancreatic Carcinomas and Growing Pancreas in Rats, Molecular Carcinogenesis, 3, 379-386.

Singletary, K., 2010, Oregano Overview of the Literature on Health Benefits, Nutrition Today, 45 (3), 129-138.

Slotta, J. E., Laschke, M. W., Schilling, M. K., Menger, M. D., Jeppsson, B. vd., 2010, Simvastatin Attenuates Hepatic Sensitization to Lipopolysaccharide after Partial Hepatectomy, Journal of Surgical Research, 162, 184-192.

Sowa, J.-P., Best, J., Benko, T., Bockhorn, M., Gu, Y. vd., 2008, Extent of Liver Resection Modulates The Activation of Transcription Factors and The Production of Cytokines Involved in Liver Regeneration, World Journal of Gastroenterology, 14 (46), 7093-7100.

Su, A. I., Guidotti, L. G., Pezacki, J. P., Chisari, F. V.Schultz, P. G., 2002, Gene Expression during Priming Phase of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice, Proc Natl Acad Sci 99 (17), 11181-11186.

Sudo, K., Yamada, Y., Saito, K., Shimizu, S., Ohashi, H. vd., 2008, TNF-α and IL-6 Signals from the Bone Marrow Derived Cells are Necessary for Normal Murine Liver Regeneration, Biochimica et Biophysica Acta, 1782, 671-679.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sümer Turanlıgil, N. C.Uyanıkgil, Y., 2010, Hücre İçi Sinyal Yoakları ve Klinik Yansımaları, Arşiv, 19 (180), 180-191.

Tachibana, S., Zhang, X., Ito, K., Ota, Y., Cameron, A. M. vd., 2014, Interleukin-6 is required for cell cycle arrest and activation of DNA repair enzymes after partial hepatectomy in mice, Cell & Bioscience, 4 (6), 1-10.

Takahashi, Y., Ganster, R. W., Shao, L., Kaizu, T., Wu, T. vd., 2002, Role of NF-kB on Liver Cold Ischemia-Reperfusion Injury, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol, 283, 11175-1184.

Tanaka, H., Terada, Y., Kobayashi, T., Okado, T., Inoshita, S. vd., 2004, Expression and Function of Ets-1 during Experimental Acute Renal Failure in Rats, J Am Soc Nephrol, 15, 3083–3092.

Taub, R., 2004, Liver Regeneration: from Myth to Mechanism, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5, 836-847.

Tekkesin, N., Taga, Y., Sav, A., Almaata, I.İbrisim, D., 2011, Induction of HGF and VEGF in Hepatic Regeneration after Hepatotoxin-Induced Cirrhosis in Mice, Hepato-Gastroenterology, 58, 971-979.

Terada, Y., Tanaka, H.Sasaki, S., 2005, Wnt-4 and Ets-1 Signaling Pathways for Regeneration after Acute Renal Failure, Kidney International 68, 1969.

Tiberio, G. A. M., Tiberio, L., Benetti, A., Cervi, E., Montani, N. vd., 2008, IL-6 Promotes Compensatory Liver Regeneration in Cirrhotic Rat after Partial Hepatectomy, Cytokine, 42, 372-378.

Uyanoglu, M., Canbek, M., Aral, E.Baser, K. H. C., 2008, Effects of Carvacrol upon The Liver of Rats Undergoing Partial Hepatectomy, Phytomedicine, 15, 226-229.

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

Wuestefeld, T., Klein, C., Streetz, K. L., Betz, U., Lauber, J. vd., 2003, Interleukin-6/Glycoprotein 130-Dependent Pathways are Protective during Liver Regeneration, The Journal of Biological Chemistry, 278 (13), 11281-11288.

Wuestefeld, T., Pesic, P., Rudalska, R., Dauch, D., Longerich, T. vd., 2013, A Direct In Vivo RNAi Screen IdentifiesMKK4 as a Key Regulator of Liver Regeneration, Cell, 153, 389-401.

Xu, C., Yang, Y., Yang, J., Chen, X.Wang, G., 2012, Analysis of The Role of The Integrin Signaling Pathway In Hepatocytes during Rat Liver Regeneraiıon, 17, 274-288.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yang, W. J., Zhang, Q. Y., Yu, Z. P., Song, Q. T., Liang, H. P. vd., 2005, Effects of Nuclear Factor-KappaB on Rat Hepatocyte Regeneration and Apoptosis after 70% Portal Branch Ligation., World J Gastroenterol, 11 (43), 6775-6779.

Yao, X.-M., Zhao, J., Li, Y.Li, Y., 2009, Effects of Bicyclol on Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Rats, Digestive Diseases and Sciences, 54, 774-781.

Yilmaz, İ., Karaman, A., Vardi, N., Cetin, A.Erdemli, E., 2013, Effects of Organic Apricot on Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Rats, Transplantation Proceedings, 45, 2455-2460.

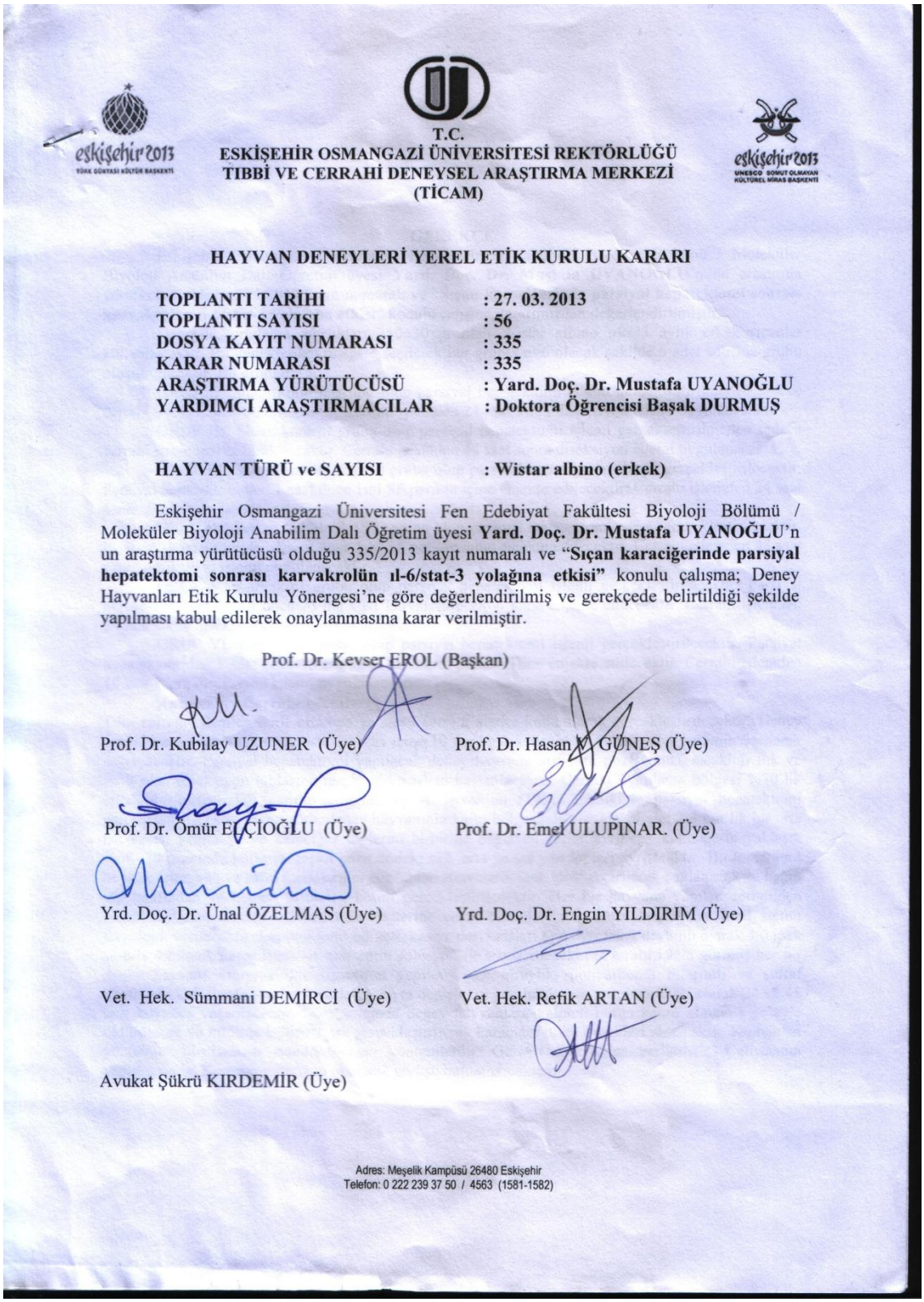
Yoshiya, S., Shirabe, K., Imai, D., Toshima, T., Yamashita, Y. vd., 2014, Blockade of The Apelin–APJ System Promotes Mouse Liver Regeneration by Activating Kupffer Cells after Partial Hepatectomy, J Gastroenterol, 50 (5), 573-582.

Zhang, W.Liu, H. T., 2002, MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells, Cell Research 12 (1), 9-18.

Zimmermann, A., 2004, Regulation of Liver Regeneration, Nephrology Dialysis Transplantataion, 19 (4), iv6-iv10.

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklamalar-A. Etik Kurul Raporu



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIBBİ VE CERRAHİ DENEYSEL ARAŞTIRMA MERKEZİ
(TİCAM)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	**: 27. 03. 2013**
TOPLANTI SAYISI	**: 56**
DOSYA KAYIT NUMARASI	**: 335**
KARAR NUMARASI	**: 335**
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	**: Yard. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU**
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	**: Doktora Öğrencisi Başak DURMUŞ**

HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI **: Wistar albino (erkek)**

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Yard. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU**'n un araştırma yürütücüsü olduğu 335/2013 kayıt numaralı ve "**Sıçan karaciğerinde parsiyal hepatektomi sonrası karvakrolün ıl-6/stat-3 yolağına etkisi"** konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Ömür ELÇİOĞLU (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sümmani DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

Adres: Meşelik Kampüsü 26480 Eskişehir
Telefon: 0 222 239 37 50 / 4563 (1581-1582)

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIBBİ VE CERRAHİ DENEYSEL ARAŞTIRMA MERKEZİ
(TİCAM)

GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Yard. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU**'n un araştırma yürütücüsü olduğu 335/2013 kayıt numaralı ve "**Sıçan karaciğerinde parsiyal hepatektomi sonrası karvakrolün ıl-6/stat-3 yolağına etkisi"** konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Deneyde, ortalama ağırlıkları 250±30 gr olan Wistar albino ırkı 3 aylık erkek sıçanlar kullanılacaktır. Bu deneklerden rastgele seçilerek her grupta n=6 olacak şekilde 6 adet çalışma grubu oluşturulacaktır. Bu gruplar;

GRUP I: Sham kontrol grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilmeden sadece cerrahi strese maruz bırakılacaktır. Cerrahi işlemden 24 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP II: Sham kontrol grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilmeden sadece cerrahi strese maruz bırakılacaktır. Cerrahi işlemden 48 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP III: Serum fizyolojik (SF) grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Parsiyal hepatektomiden 1 saat önce 1ml SF periton içine enjekte edilecektir. Cerrahi işlemden 24 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP IV: Serum fizyolojik (SF) grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Parsiyal hepatektomiden 1 saat önce 1ml SF periton içine enjekte edilecektir. Cerrahi işlemden 48 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP V: Karvakrol grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Parsiyal hepatektomiden 1 saat önce 73 mg.kg-1 karvakrol periton içine enjekte edilecektir. Cerrahi işlemden 24 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

GRUP VI: Karvakrol grubu olup parsiyal hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Parsiyal hepatektomiden 1 saat önce 73 mg.kg-1 karvakrol periton içine enjekte edilecektir. Cerrahi işlemden 48 saat sonra diseksiyon işlemi uygulanacaktır.

Anestezi ve Cerrahi İşlemler:

Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilecektir. Deney gruplarına ait hayvanların anestezisi, kas içine 10 mg.kg-1 ksilazin ve 70 mg.kg-1 ketamin verilerek sağlanacaktır. Parsiyal hepatektomi yapılacak deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edilip işlem başlatılacaktır. Cerrahi uygulama bölgesi %70'lik etilalkol ile temizliği yapılıp Higgins ve Anderson'un (1931) tekniğiyle parsiyal hepatektomi gerçekleştirilecektir. Buna göre, deney hayvanının karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi yapılacak ve karaciğer loplarını birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin yaklaşık %68- 70 oranında kütlesini teşkil eden öndeki sağ, orta ve sol yan lopları ayrılacaktır. Bu loplara ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından atravmatik ipek iplik geçirilerek bağlanacak ve bağın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilecektir. Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verilecektir. Laporoktomi bölgesi, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 4/0 ipek sütürle dikilerek kapatılacak ve antiseptik solüsyon ile temizlenecektir. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın gruplara bağlı olarak 24 ve 48 saat boyunca yaşatılacaktır. Süre sonunda deney hayvanları, kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürülecek ve midline laporoktomi gerçekleştirilerek karaciğer doku örnekleri alınacaktır. Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.

Adres: Meşelik Kampüsü 26480 Eskişehir
Telefon: 0 222 239 37 50 / 4563 (1581-1582)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Başak DURMUŞ
Doğum Yeri-Tarihi: İSKENDERUN/HATAY-13.06.1984
Uyruğu: T.C.

Eğitimi:

2004-2008: Dicle Üniversitesi, Fen–Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Lisans.

2008-2011: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans.

2011- : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora.

SCI Makaleler

The examination of protective effects of gallic acid against damage of oxidative stress during induced-experimental renal ischemia-reperfusion in experiment, Canbek M, Bayramoglu G, Senturk H, Oztopcu Vatan AP, Uyanoglu M, Ceyhan E, Ozen A, Durmus B, Kartkaya K, Kanbak G. Bratisl Lek Listy. 2014;115(9):557-62.