PARSİYAL HEPATEKTOMİ YAPILMIŞ SIÇANLARDA KARVAKROLÜN KARACİĞER ÜZERİNE ETKİLERİ

Mustafa UYANOĞLU

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ Anabilim Dalı

ŞUBAT 2006

EFFECTS OF CARVACROL UPON THE LIVER OF RATS UNDERGOING PARTIAL HEPATECTOMY

Mustafa UYANOĞLU

Ph.D. THESIS

Department of BIOLOGY

FEBRUARY 2006

PARSİYAL HEPATEKTOMİ YAPILMIŞ SIÇANLARDA KARVAKROLÜN KARACİĞER ÜZERİNE ETKİLERİ

Mustafa UYANOĞLU

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

DANIŞMAN: **Yrd.Doç.Dr. Mediha CANBEK**
Prof.Dr. Erinç ARAL

Şubat 2006

Mustafa UYANOĞLU' nun **DOKTORA** tezi olarak hazırladığı "**Parsiyal hepatektomi yapılmış sıçanlarda karvakrolün karaciğer üzerine etkileri**" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye : Yrd.Doç.Dr. Mediha CANBEK

Üye : Prof.Dr. Erinç ARAL

Üye : Prof.Dr. Ahmet ÖZATA

Üye : Prof.Dr. M. Turan AKAY

Üye : Prof.Dr. K. Hüsnü Can BAŞER

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

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doğada bulunan çok sayıda bitkisel materyal halk tarafından çeşitli hastalıklarda ilaç olarak kullanılmaktadır. Bunlardan birisi de kekik bitkisidir. *Origanum* (kekik)' dan elde edilen uçucu yağların insan sağlığı üzerine çeşitli etkileri bilimsel olarak ortaya konmuştur. Ancak, uçucu yağların vücudun önemli organlarından birisi olan karaciğer üzerine in vivo olarak etkisi ile ilgili araştırmalar bulunmamaktadır. Araştırmamızda kekikten saflaştırılan karvakrol isimli uçucu yağın, parsiyal hepatektomi yapılan sıçanlarda karaciğer rejenerasyonu üzerine etkisi araştırıldı. Ayrıca, araştırmamızda karaciğer rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri bilinen silymarinin etkisi karvakrol ile karşılaştırılarak incelendi. Deneyimizde sağlıklı Wistar albino sıçanlar kullanılarak 7 deney grubu oluşturuldu. Grup 1 kontrol grubu iken, Grup 2, 3 ve 4 hayvanlarına laparotomiden 60 dakika önce sırasıyla tek doz serum fizyolojik, karvakrol ve silymarin enjeksiyonu; Grup 5, 6 ve 7 hayvanlarına yine laparotomiden 60 dakika önce sırasıyla tek doz serum fizyolojik, karvakrol ve silymarin enjeksiyonu ile %68- 70 parsiyal hepatektomi yapıldı. Cerrahi işlemlerden 72 saat sonra karaciğerlerin hepatektomi öncesi ve sonrasında yaş ağırlıkları alınarak rejenerasyon oranları hesaplandı. Karaciğer kesitlerinin bir bölümüne Hematoksilin & Eosin (H&E) boyası uygulanarak histolojik değerlendirmeler yapıldı ve mitotik indeks çıkarıldı. Kesitlere ayrıca Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ve Interleukin-6 (IL-6) immunohistokimyasal boyaları uygulandı. Kan ve kemik iliği örneklerinde hücreler sayıldı. Serum örneklerinde biyokimyasal olarak aspartate transaminase (AST) ve alanine transaminase (ALT) karaciğer enzimleri ile; ELISA testi yardımıyla Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) ve Interleukin-6 (IL-6) sitokinlerinin seviyeleri belirlendi.

Serum örneklerindeki analiz sonuçları ve kesitlerden elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilerek gruplar arasında karşılaştırmalar yapıldı. Araştırmamızda intraperitoneal olarak verilen karvakrol ve silymarinin karaciğer rejenerasyon oranını artırdığı ayrıca, uygulamış olduğumuz dozda karvakrolün karaciğer histolojik yapısında toksik bir etki oluşturmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Parsiyal hepatektomi, karaciğer rejenerasyonu, karvakrol, silymarin, sıçan

SUMMARY

There is a large quantity of naturally occurring herbal materials that are traditionally used by people for their curative properties regarding various diseases. *Origanum* (kekik) is one of these herbs. There are several studies reporting various effects of volatile oils upon human health extracted from kekik. However, no study has so far investigated their effects on the liver. The present study aims to investigate possible effects of purified carvacrol obtained from kekik upon the regenerative feature of the liver subsequent to partial hepatectomy in rats. The carvacrol was tested in comparison with silymarin, known for its positive effects upon liver regeneration. Therefore, Wistar Albino rats were divided into seven groups. Group 1 was chosen as the main control group, while Groups 2, 3 and 4 were chosen as the study groups. Each of the study groups was given a single dosage of injection of physiological fluid, carvacrol and silymarin respectively, 60 minutes prior to laparotomy. None of the livers of the rats in these study groups was dissected. As to partial hepatectomy groups, they underwent the same injection applications as the aforementioned study groups, in addition to 68-70% of liver dissection. The rats were slaughtered 72 hours after partial hepatectomy. Regeneration rates were calculated in consideration of wet weight before and after hepatectomy. Sections of the liver that had been dyed with Hematoxyline & Eosin (H&E) were histologically evaluated and a mitotic index was established for this. Different sections of the same liver tissues were immunohistochemically dyed with Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Interleukin-6 (IL-6). Cell count of blood and bone marrow was performed. Aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels were biochemically determined in serum samples. Tumour Necrosis Factor-α (TNF-α) and IL-6 levels were also determined using the ELISA test.

Results of analysis of serum samples and data obtained from the sections were evaluated statistically and a comparison was achieved between the rat groups involved in the study. It was concluded that intraperitonally administered carvacrol and silymarin increased the rate of regeneration of the liver. It was also conlcluded that the dosage given in the present study did not have a toxic effect upon histological structure of the liver.

Keywords: Partial hepatectomy, liver regeneration, carvacrol, silymarin, rat

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın oluşmasını, yönlendirmesini ve sonuçlanmasını sağlayıp her konuda emeğini esirgemeyen danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Mediha CANBEK' e en içten saygılarımla teşekkür ederim. Benzer şekilde çalışmamın şekillenmesinde, doğru biçimde denetlenmesinde ve fikir geliştirmemde yardımlarını esirgemeyen ikinci danışman hocam Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD öğretim üyesi Prof.Dr. Erinç ARAL' a teşekkür etmeyi kendime görev bilirim.

Araştırma tezimin gerçekleştirilmesinde, çalışma ortamı ve laboratuvarların uygun olarak düzenlenerek gerekli tüm teknik ve kimyasal maddeyi temin için maddi proje desteği veren Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü ile ilgili bölümlerine teşekkür ederim. Aynı şekilde, çalışma ortamı ve imkanı sağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölüm Başkanlığı ile değerli Bölüm Başkanımız Prof.Dr. Yalçın ŞAHİN' e teşekkürü bir borç kabul ederim.

Doktora tezimin deneysel aşamalarında yardımcı olarak hem fikirlerinden hem de tecrübelerinden faydalandığım Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji ABD öğretim üyesi Doç.Dr. Nilüfer ERKASAP ile Genel Cerrahi ABD öğretim üyesi Doç.Dr. Serdar ERKASAP' a ayrıca, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD öğretim üyesi Doç.Dr. Tülay KÖKEN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Halk sağlığı açısından önemli olabileceğini düşündüğümüz bir kimyasal maddeyi tanıtıp bize danışmanlık yaparak yol gösteren Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Hüsnü Can BAŞER' e teşekkür eder doktora tezimin deneysel uygulamalarında bana zaman ve emek konusunda desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş.Grv. Gökhan BAYRAMOĞLU ve Arş.Grv. Hakan ŞENTÜRK' e minnet duygularımı arz ederim.

Çalışmalarım sırasında uzun süre ihmal ettiğim, buna rağmen büyük manevi destek ve mütavazi bir yaklaşım sergileyen çok değerli aileme ve yakınlarıma sevgi dolusu teşekkürlerimi iletirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **iv**
SUMMARY ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Karaciğer Lobülü ve Kök Hücreler 6
2.2. Karaciğer Rejenerasyonunda Etkili Moleküler Faktörler 10
2.3. Karaciğer Rejenerasyonunun Mekanizması 15
2.4. Karaciğer Hastalıklarında Kullanılan Bazı Alternatif Tıp Uygulamaları 20

3. MATERYAL VE METOD **24**
3.1. Deney Hayvanları 24
3.2. Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları 24
3.3. Deney Grupları 25
3.4. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar 26
3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi 26
3.5.1. Kan ve kemik iliği 27
3.5.2. Karaciğer dokusu 28
3.5.2.1. Karaciğer rejenerasyon oranı 28
3.5.2.2. Karaciğer doku takibi ve immunohistokimyasal uygulamalar 28
3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler 31

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4. SONUÇLAR 32
4.1. Kan ve Kemik İliği 32
4.2. Karaciğer Dokusu 37
4.2.1. Histolojik değerlendirme 37
4.2.2. Karaciğer rejenerasyon oranı, mitotik indeks ve PCNA indeksi 42

5. TARTIŞMA 52

6. KAYNAKLAR DİZİNİ 61

ÖZGEÇMİŞ 73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1 Parsiyal hepatektomi oranına göre sıçan karaciğer anatomisi. Gri: kalan fonksiyonel karaciğer lobları, beyaz: Fonksiyonel olmayan karaciğer lobları (Palmes and Spiegel, 2004)..... 5

2.2 Karaciğerde histolojik olarak altıgen yapıda görülen lobüller ve lobül yapısı (Fausto and Campbell, 2003)..... 8

2.3 Karaciğer rejenerasyonunun başlama ve hücre döngüsünden oluşmuş ilerleme fazları (Fausto, 2000). 15

2.4 Mitojenik sinyal ve karaciğer rejenerasyonu ile ilişkili olaylar zinciri (Fausto, 2000)..... 17

2.5 Parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda gen aktivitesi zinciri (Fausto, 2000). 18

2.6 Karvakrolün açık kimyasal formülü (Yanishlieva, et al., 1999; Stammati, et al., 1999; Carvalho, et al., 2003; Zeytinoglu, et al., 2003)..... 22

4.1 Deney gruplarına ait serum AST seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği. 33

4.2 Deney gruplarına ait serum ALT seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği. 34

4.3 Deney gruplarına ait serum TNF-α seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği..... 34

4.4 Deney gruplarına ait serum IL-6 seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği. 35

4.5 Deney gruplarına ait kan dokusundaki RBC, WBC sayıları ile Hb miktarlarının ortalama ve standart hata grafiği. 36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.6 Deney gruplarına ait kemik iliği hücre sayılarının ortalama ve standart hata grafiği. 37

4.7 Kontrol grubu (Grup 1) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde vena sentralis çevresindeki bir ve iki çekirdekli hepatositler. 38

4.8 Serum fizyolojik grubu (Grup 2) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde Kupffer hücreleri ve sinusoidlerde endotel hücreleri. 39

4.9 Karvakrol grubu (Grup 3) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde sentral zondaki eozinofilik sitoplazmalı hepatositler. 39

4.10 Silymarin grubu (Grup 4) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde normal görünümlü hepatositler. 40

4.11 Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 5) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler ile hepatositlerde yaygın vakuolizasyon. 40

4.12 Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 5) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde sinusoidal konjesyon. 41

4.13 Karvakrol + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 6) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler. 41

4.14 Silymarin + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 7) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler 42

4.15 Kontrol grubuna ait hayvanların karaciğer kesitinde çok az sayıda PCNA pozitif hepatosit. 44

4.16 Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 5) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde çok sayıda PCNA pozitif hepatositler ile mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler. 44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.17 Karvakrol + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 6) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde PCNA pozitif ve PCNA negatif hepatositler. 45

4.18 Silymarin + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 7) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde PCNA pozitif hepatositler ile mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler. 45

4.19 Deney gruplarına ait karaciğer rejenerasyon oranlarının ortalama ve standart hata grafiği. 46

4.20 Deney gruplarına ait karaciğer kesitlerindeki hepatosit mitotik indekslerinin ortalama ve standart hata grafiği. 47

4.21 Deney gruplarına ait karaciğer kesitlerindeki hepatosit PCNA indekslerinin ortalama ve standart hata grafiği. 47

4.22 Deney gruplarına ait karaciğer kesitlerinde IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri varlığının ortalama skor değerleri grafiği. 48

4.23 Kontrol grubuna ait hayvanların karaciğer kesitlerinde IL-6 için negatif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri. 49

4.24 Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 5) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri. 49

4.25 Karvakrol + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 6) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri. 50

4.26 Karvakrol + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 6) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde büyük büyütmelerde detaylı olarak gözlenen IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri..... 50

4.27 Silymarin + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 7) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri. 51

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.28 Silymarin + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 7) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde büyük büyütmelerde detaylı olarak gözlenen IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücresi ve sinusoidlerdeki endotel hücreleri. 51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1 Karaciğer rejenerasyonunda etkili faktörler (Ankoma-Sey, 1999). 10

4.1 Deney gruplarına ait AST, ALT, TNF-α ve IL-6 serum seviyelerinin ortalama değerleri ± standart hataları (P<0.05 anlamlı fark vardır). 33

4.2 Deney gruplarına ait kan dokusundaki kırmızı (RBC), beyaz (WBC) kan hücrelerinin sayıları ve hemoglobin (Hb) miktarı ile kemik iliği hücre sayılarının ortalama değerleri ± standart hataları (P<0.05 anlamlı fark vardır). 36

4.3 Deney gruplarına ait karaciğer dokularında R.O., mitotik indeks ve PCNA indeksi ortalamaları ± standart hataları ile IL-6 skorlarının ortalama değerleri (P<0.05 anlamlı fark vardır). 46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
^{o}C	Celcius degree (santigrat derece)
mL	mililiter (mililitre)
mg	miligram
kg^{-1}	1 / kilogram
n	denek sayısı
cm	cantimeter (santimetre)
rpm	revolition per minute (devir/dakika)
L	Liter (litre)
U	Unit
Pg	pikogram
K/µL	10^3/µL = 10^9/L = litredeki 10^9 adet hücre
M/µL	10^6/µL = 10^{12}/L = litredeki 10^{12} adet hücre
dL	deciliter (desilitre) = 10^{-1} litre
µ	micrometer (mikrometre=mikron) = 10^{-6}metre

Kısaltmalar	Açıklama
H&E	Hematoksilin ve Eosin
GS	Glutamin sentetaz
DNA	deoxyribonucleic acid (deoksiribonükleikasit)
Bkz.	Bakınız
HGF	Hepatocyte Growth Factor
TGF-α	Transforming Growth Factor-alfa
EGF	Epidermal Growth Factor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alfa
IGF	Insulin- like Growth Factor
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
IL-1	Interleukin-1
SOR	Serbest oksijen radikalleri
mRNA	messenger ribonucleic acid (haberci ribonükleik asit)
$STAT_3$	Signal Transducers Activators of Transcription 3
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
AP-1	Nuclear Adaptor Protein complex-1
C/EBPβ	Enhancer Binding Protein beta
IEG_S	The immediate early genes (acil erken faz genleri)
IκB	Inhibitor Kappa B
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
BrdU	5-bromo2'-deoxy-uridine
TBAM	Anadolu Üniversitesi Tıbbi Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi
PMNL	Polimorf nüklear lökosit
AST	Aspartate transaminase
ALT	Alanine transaminase
ELISA	Enzyme-Linked Immunoassay
RO	Rejenerasyon Oranı
PBS	Phosphate Buffer Saline (fosfat tuzu tamponu)
RBC	Red Blood Cell (kırmızı kan hücresi=alyuvar=eritrosit)
WBC	White Blood Cell (beyaz kan hücresi=akyuvar=lökosit)
Hb	Hemoglobin
LD_{50}	Lethal Dose 50 (deneklerin yarısında öldürücü doz)

1. GİRİŞ

Karaciğer vücudun en önemli organlarından birisidir. Karaciğerde meydana gelebilecek herhangi bir fonksiyon bozukluğu vücuttaki tüm sistemleri etkiler. Kimyasal maddeler, ilaçlar, alkol, kazalar, karaciğer tümörleri, viral kökenli karaciğer hastalıkları, karaciğere doğrudan etkili organların bozukluğundan kaynaklanan hasarlar ve cerrahi girişimler gibi çok sayıda etken karaciğer dokusunun zarar görmesine neden olabilir.

Karaciğer kendisini onarabilme yeteneği ile vücuttaki diğer organlardan daha avantajlıdır. Karaciğer çeşitli nedenlerle zarar görmesi karşısında, fonksiyonel kütlesini tamamlama yönünde proliferasyon ve replikasyona başlayabilir (Fausto, 2000; Başoğlu, et al., 2000). Karaciğer loblarının bir kısmının cerrahi olarak çıkarılması (parsiyal hepatektomi) ve hepatositlerin virüs ya da kimyasallardan zarar görmesi gibi durumlarda hepatosit replikasyonunun arttığı görülür. Karaciğerin, önemli doku kaybı gibi durumlarda kendisini birkaç hafta içinde onarabilecek hücreler arası eşsiz bir etkileşim ve karmaşık bir mediatör ağı bulunur. İnsan ve hayvanlarda deneysel olarak parsiyal hepatektomiden sonra rejenerasyonun ve karaciğerin yeniden yapılanması için endokrin, parakrin ve otokrin etkileşimler gerekir (Tang, et al., 1997; Andıran vd., 2000). Sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonra, gen ekspresyonu başlar ve hepatik rejenerasyonu düzenleyici, biyolojik olarak aktif maddeler serbest bırakılır. Bu maddelerin birbirleriyle olan ilişki ve bağlantıları son derece hassas ve karmaşık bir denge oluşturur. Karaciğerin iyileşme sürecinde bu denge kendiliğinden korunur.

Tıbbi olarak, hasar görmüş karaciğerin daha çabuk iyileştirilmesi için çeşitli ilaç uygulamaları yapılır. Ancak, bir çok kimyasal ilaç tedavisinde olduğu gibi yan etkiler kaçınılmazdır. Bu nedenle, son yıllarda doğal maddelerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu maddelerin büyük çoğunluğunu doğadaki bitkiler oluşturur ve bunlar normal olarak halk tarafından kullanılır. Örneğin, karaciğer sağlığı için kullanılan ve bilimsel olarak yararları kanıtlanmış bir madde olan silymarin, *Silybum marianum* bitkisinden elde edilir. Silymarinin karaciğer rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkileri bilinmektedir. Kekik bitkisinin suyu da karaciğer sağlığı için halk tarafından tüketilmektedir. Kekik bitkisinde timol ve karvakrol bol miktarda bulunan uçucu yağlardır. Bunlar ile yapılmış

in vivo çalışmaların sonuçlarına göre antioksidan ve antibiyotik özellikleri ortaya konmuştur. Ancak, bu uçucu yağlardan karvakrolün karaciğeri koruyucu ve iyileştirici etkileri konusunda araştırmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle araştırmamızda karvakrol ve silymarinin sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonra, karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerinin in vivo olarak karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır.

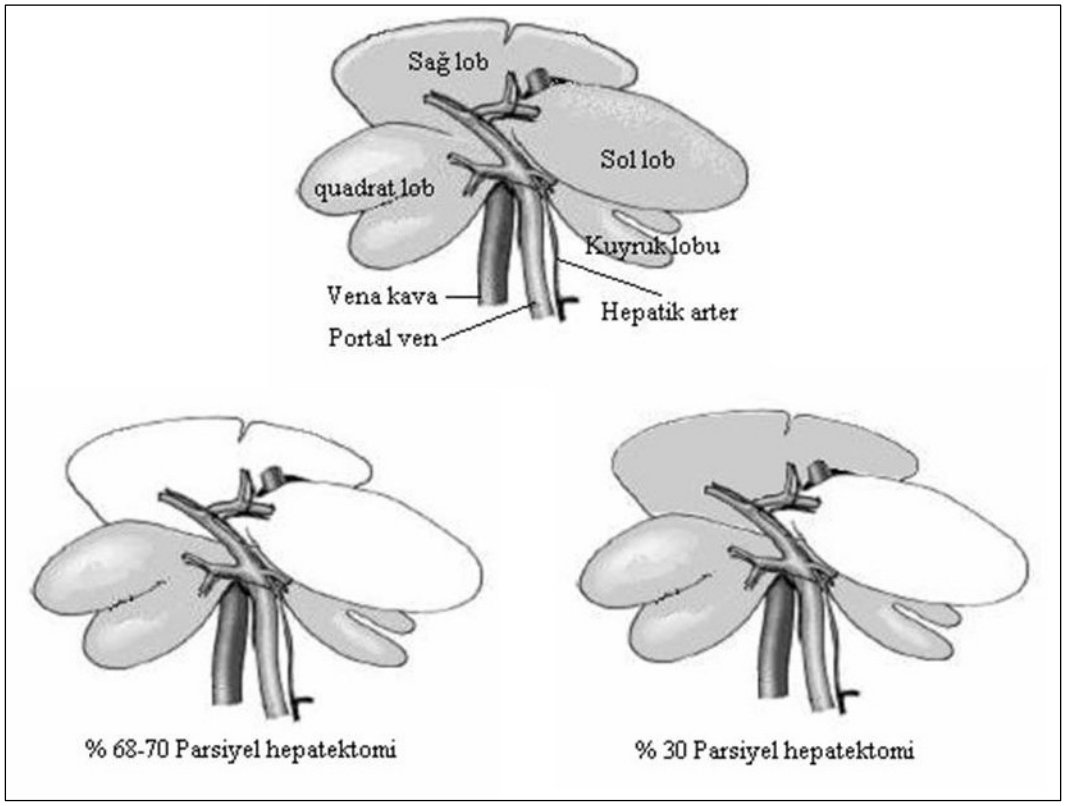
2. GENEL BİLGİLER

Çeşitli nedenlere bağlı olarak karaciğer loblarında eksilme olmasının sistemik etkileri bulunmaktadır. Çünkü karaciğerin, her zaman vücudun metabolik aktivitesine cevap verebilecek büyüklükte olması gerekmektedir. Karaciğerin restorasyonu sürecinde, karaciğer ağırlığı vücut ağırlığı ile istatistiksel olarak orantılı gelişmektedir (Higgins and Anderson, 1931; Borowiak, et al., 2004). Örneğin karaciğer ağırlığı sıçanlarda, vücut ağırlığının %4' ünü teşkil etmektedir (Palmes and Spiegel, 2004).

Parsiyal hepatektomiden sonra karaciğerin fonksiyonel kapasitesi kadar kendi büyüklüğünün de önemli olması, rejenerasyonu başlatıcı ve durdurucu etkenler arasında çok iyi bir dengenin oluşmasına neden olmaktadır. Rejenerasyon sürecinde karaciğer kütlesi, vücudun fonksiyonel olarak istediğinden daha büyük miktara ulaşırsa vücut kendi ihtiyacına göre karaciğer kütlesini azaltmaktadır (Kay and Fausto, 1997; Fausto, 2000; Hou, et al., 2003). Karaciğerdeki kütlesel fazlalık, Andreeff, et al., (2000) tarafından "programlanmış hücre ölümü" olarak tanımlanan apoptozis ile azaltılmaktadır. Karaciğer doku naklinde (transplantasyon), vücudun fonsiyonel ihtiyacından daha fazla karaciğer nakledilirse benzer şekilde bir restorasyon gerekmektedir. Ayrıca ilaç etkisi ile karaciğerde oluşan hiperplazi ve hipertrofide, etkenin uzaklaştırılması durumunda, ihtiyaçtan daha fazla olan karaciğer, büyüme uyarısının geri çekilmesiyle kütlesel azalmayı gerçekleştirir (Fausto, 2000; Galun and Axelrod, 2002). Karaciğer transplantasyonunda alıcıya (donör) küçük bir karaciğer parçasının nakli ya da vericiden büyük bir karaciğer parçasının alınması karaciğer yetmezliğine neden olur. Parsiyal hepatektomi yapılan sıçanlarla ilgili elde edilen bu bulgunun, ortalama vücut ağırlığına göre, alınan karaciğer kütlesinin miktarının ne kadar önemli olduğu hakkında bilgi vermektedir (Mimuro, et al., 2002). Palmes and Spiegel' in (2004) yaptıkları çalışmada, karaciğerinin %90' ı alınan tüm sıçanlar, akut organ yetmezliği nedeniyle ölmüşlerdir. Gaub and Iversen (1984) ise yaptıkları araştırmada, böyle bir durumda mortalitenin ancak farklı uygulamalarla düşürülebileceğini gözlemişlerdir. Sinuzoidlerdeki fonksiyonel yetersizliğin bir diğer sebebi, kütlede değişme olmadan hücre ve dokuların nekroz olmasıdır. Kay and Fausto' ya (1997) göre toksik ajanlar ve virüsler tarafından meydana getirilen akut karaciğer

yetmezliği ile aşırı hücre ölümlerinde meydana gelen kütlesel hepatik nekroz, karaciğerdeki fonksiyonel yetersizliğin diğer bir sebebidir. Kütlesel hepatik nekroza, endotel hücrelerinin yıkımıyla endotoksinler tarafından oluşturulan intrasinusoidal fibrin neden olmaktadır (Mochida, et al., 1990; Aoki, et al., 2001).

Düzenli karaciğer büyümesi ile ilgili çalışmalar, hayvanlarda parsiyal hepatektomi ya da kimyasal hasara maruz bırakma biçimindedir. Deneysel olarak parsiyal hepatektomi, karaciğerin yaklaşık %67-70' inin çıkartılması şeklinde uygulanmaktadır (Borowiak, et al., 2004). Sıçanlarda karaciğerin, kütlesel olarak 2/3' lük parçasının alınmasının, rejeneratif uyarı anlamında optimum bir oran olduğu ve bu oranın alt ya da üst değerlerinde yapılacak bir parsiyal hepatektominin rejenerasyonu yavaşlatabildiği yayınlanmıştır (Palmes and Spiegel, 2004). İnsanlarda da tümörlerin çıkartılması ya da transplantasyon için parsiyal veya lobar kesimler yapılmaktadır (Kay and Fausto, 1997). Deneysel olarak sıçan karaciğerinde yapılan çalışmalarda %30 parsiyal hepatektomi için sadece sol yan lob kesimi yapılırken (Aoki, et al., 2001), %67-70 (2/3) için Higgins ve Anderson tekniğiyle öndeki iki lob kesilmektedir (Higgins and Anderson, 1931; Palmes and Spiegel, 2004)(Şekil 2.1). Araştırmalara göre, %70-90 parsiyal hepatektomiden sonra kalan karaciğerin orjinal hacmi sıçanlarda 10-14 (Aoki, et al., 2001), insanlarda da 21 gün içinde geri kazanılmaktadır (Andıran vd., 2000; Gaglio, et al., 2002; Fausto and Campbell, 2003). Ayrıca, %70 karaciğer kütlesinin alınmasından sonra geriye kalan karaciğer ağırlığı, cerrahiden sonraki ilk 48-72 saat içinde iki katına yükselmektedir (Ebrenfried, et al., 1997; Li, et al., 1999; Shimizu, et al., 2001). Deneysel parsiyal hepatektomi çalışmalarında karaciğer ağırlık ölçümlerinin yapılması, rejenerasyon oranının belirlenmesi açısından önemlidir (Altun ve Özalpan, 1998; Aoki, et al., 2001; Hou, et al., 2003). Sıçanlarda parsiyal hepatektomi ile alınan loblar tekrar oluşup gelişemez ancak, kalan loblar hücresel hiperplazi ile büyüme göstererek fonksiyonel doku boyutuna gelir (Higgins and Anderson, 1931; Palmes and Spiegel, 2004; Fernandez, et al., 2004). Kütlesel büyüklüğe erişmiş olan karaciğerin şeklinin, hepatektomi öncesi orijinal şekile benzememesi vücut için gerekli olan karaciğer fonksiyonları açısından önemli olmamaktadır (Fausto and Campbell, 2003; Palmes and Spiegel, 2004).



Şekil 2.1 Parsiyal hepatektomi oranına göre sıçan karaciğer anatomisi. Gri: kalan fonksiyonel karaciğer lobları, beyaz: Fonksiyonel olmayan karaciğer lobları (Palmes and Spiegel, 2004).

Karaciğer cerrahisindeki ilerlemeler hepatektominin tekrarlanmasını mümkün hale getirmiştir. Cerrahi işlem olmaksızın uygulanan yöntemlerde önemli ilerleme kaydedilmesine karşın, hepatektominin tekrarlanması, yeniden ortaya çıkan ya da metastatik olan tümörlerin tedavisinde önemli bir rol oynar. İkinci bir hepatektomi, tekrarlanan karaciğer hücre karsinomalarında ve karsinomların kolon ya da rektum kaynaklı olup metastazla karaciğere ulaşması durumlarında gereklidir. İkinci parsiyal hepatektomiden sonraki mortalite ve hayatta kalma oranları, ilk hepatektomi ile benzerdir. %70 parsiyal hepatektomiden iki hafta sonra, sıçanların rejenere olan karaciğerlerinin omental ve sağ inferior loplarının çıkarılması (%30 parsiyal hepatektomi) şeklinde ikinci parsiyal hepatektomi yapılması sonucunda, karaciğer kütlesini ilk parsiyal hepatektomiye göre daha yavaş bir büyüme ile geri kazanmaktadır.

Sonuçta geçici bir karaciğer fonksiyon yetmezliği olmasına rağmen iyileşme gerçekleşir (Aoki, et al., 2001).

Karaciğerin pek çok deneysel çalışmaya konu olmasının en büyük sebeplerinden birisi rejenerasyon ve kendisini yenileyebilme özelliğine sahip olmasıdır. Karaciğerin sahip olduğu bu önemli özelliğinde hangi mekanizmaların rol oynadığı merak edilmektedir. Bu nedenle karaciğerin işlevi ve yapısı hakkında çok sayıda araştırma yapılmış ve yapılmakta olup, merak edilen özellikleri anlaşılmaya çalışılmaktadır.

2.1. Karaciğer Lobülü ve Kök Hücreler

Karaciğer dıştan periton ile örtülüdür. Peritonun altında organı tümüyle dıştan kuşatan elastik liflerden zengin bir bağ doku olan karaciğer kapsülü (Glisson kapsülü) bulunur. Glisson kapsülü organ içine girerek karaciğeri lobüllere ayırır. Lobüllerin birleştiği yerlerde bağ dokusu artar. Enine kesitlerde üçgen biçiminde seçilen bu alan arter, ven ve safra kanalı (portal triad)' nı içeren portal alan/aralık (Glisson üçgeni= Kiernan aralığı)' dır (Şekil 2.2). Karaciğerde şekillenmiş üç tip lobül vardır. Bunlar portal lobül, karaciğer asinusu ve klasik lobüldür.

Portal lobül, safra salgılanışı gözönüne alınarak üç klasik karaciğer lobülünün merkezlerindeki vena sentralislerin birleştirilmesiyle sınırları çizilen üçgen biçimli yapıdır. Portal aralık içindeki bir safra kanalına safra veren farklı klasik lobüllere ait komşu karaciğer hücreleri portal lobül olarak gruplanır.

Karaciğer asinusu, karaciğerde iki komşu klasik lobül içinde aynı interlobüler venden kanlanan hücre grupları tarafından oluşturulur. Karaciğer asinusu, iki komşu klasik lobülün vena sentralisleri ile bu lobüllerin birleştiği kenarın iki ucunda bulunan portal aralıklar arasında sınırlanmış alandır.

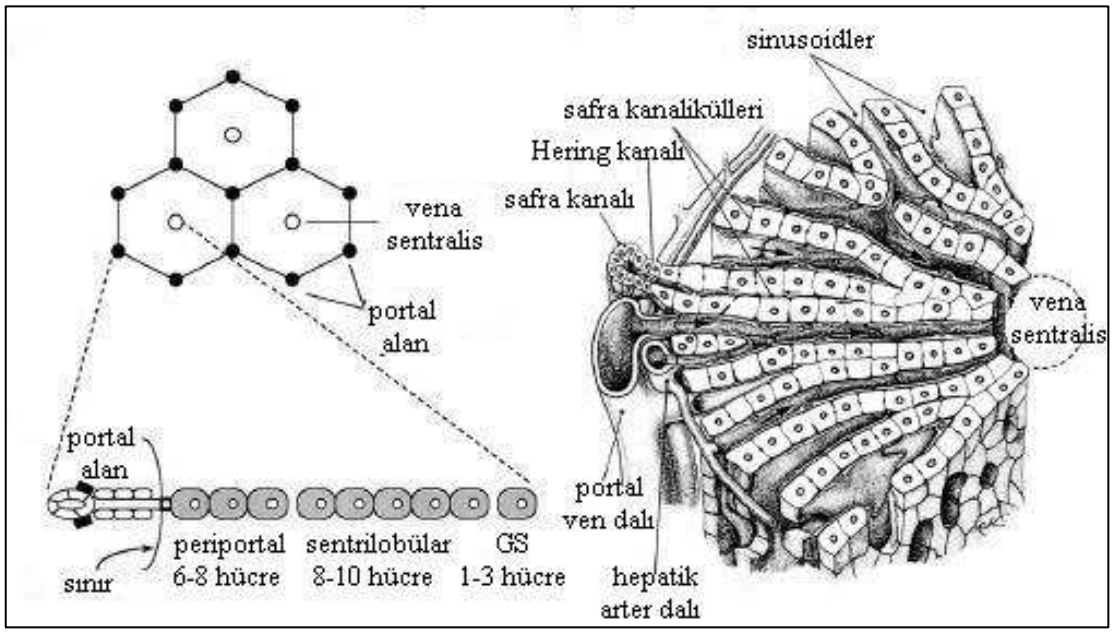
Klasik lobül, enine kesitlerde altıgen şekilli olarak seçilen, her köşesinde portal aralık ve ortasında lobüle giren kanın toplandığı vena sentralis bulunan yapıdır. Vena sentralis çevresinde ışınsal seyirli, birbirleriyle anastomozlaşan, dallanan karaciğer hücreleri (hepatosit) retikulum oluşturur. Tek bir hücre kalınlığındaki karaciğer hücre kordonlarına Remark kordonları denir. Bu şekilde biçimlenmiş yapı klasik karaciğer

lobülüdür. Remark kordonları arasında, safra kanalları, retikulum lifleri ve portal aralıkta bulunan vena porta ile arteria hepatika dallarının kanlarını boşalttıkları lobül içi kan kapillerleri (sinusoid) bulunur. Vena sentralise açılan sinusoidlerin duvarlarında endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri yer almaktadır. Elektron mikroskobunda hepatosit ile endotel arasında seçilen ve retikulum lifleri ile birlikte kan plazmasının bulunduğu perisinusoidal aralık (Disse aralığı= subendotelyal aralık) yer alır. Disse aralığı içinde hem Kupffer hem de endotel hücrelerinden türeyebilen Ito hücreleri (yağ depolayan hücre= ekstra-vasküler retiküler hücre) mevcuttur. Remark kordonlarındaki hepatositlerin arasında, duvarlarını hepatositlerin oluşturduğu safra kanalikülleri yer alır. Klasik lobülün periferinde, safra kanaliküllerinin duvarlarını oluşturan hepatositler, açık eozinofili gösteren kübik şekilli hücrelere dönüşür ve "Hering kanalı" nı oluşturur (Paker, 1993)(Şekil 2.2).

Hepatositlerin kanlanmasındaki özellik dikkate alınarak fonksiyonel açıdan hepatositleri üç zona ayırmak mümkündür (Paker, 1993). Klasik karaciğer lobülünün çevresinde periportal zon (kenar bölge= periferik zon) bulunur. Periportal zondan sonra merkeze doğru sentrilobülar zon (ara zon) yer alır. Vena sentralis çevresindeki ilk üç sıra hücreden oluşmuş dar bölge sentral zondur (Paker, 1993; Fausto and Campbell, 2003)(Şekil 2.2). Sentral zondaki hepatositler sentrilobüler hepatositlerden farklı olarak glutamin sentetaz (GS) üretir (Fausto and Campbell, 2003). Karaciğer lobülündeki periportal zondaki hepatositler glikoneojenez ve glikojenoliz olaylarında; sentrilobüler zondaki hepatositler de glikoliz olayı ve glikojen sentezinde aktiftirler.

Vena sentralis çevresindeki hücreler GS aktivitesiyle amonyağı metabolize edip üreye çevirirler. Periportal bölgedeki hepatositler ise üreyi uzaklaştırırlar. Karaciğerin farklı bölgelerinde bu ve benzeri şekilde farklı hücresel cevapların olması nedeniyle rejenerasyon yönünden lobül içi farklılıklar da olabilmektedir. Örneğin sentral ve periportal zonlarda yer alan hepatositlerde oksijen miktarlarının birbirlerinin yarısı kadar olması nedeniyle oksijen bağımlı transkripsiyon faktörleri farklı etkiler göstermektedir (Fausto and Campbell, 2003). Karaciğer lobülünün portal alanı yakınlarına yerleşmiş olan hepatositler, hücre döngüsünün S fazına vena sentralis çevresine yerleşmiş olan hücrelerden daha hızlı biçimde erişirler (Kay and Fausto, 1997). Hepatosit proliferasyonu periportal zonda başlayıp 36-48 saat içinde perisentral zona ulaşır (Mimuro, et al., 2002; Palmes and Spiegel, 2004) ve yaklaşık 7 günde de

tipik karaciğer lobülleri yapılanır (Palmes and Spiegel, 2004). Bu bilgiler, karaciğer rejenerasyonunu yönlendiren faktörler ile bunların verdiği sinyallerin lobül içindeki etki ve durumlarını ortaya koyar niteliktedir.



Şekil 2.2 Karaciğerde histolojik olarak altıgen yapıda görülen lobüller ve lobül yapısı (Fausto and Campbell, 2003).

Kültür ortamından bazı büyüme faktörlerinin çıkartılması sonucunda hepatositler DNA replikasyonu yapamazlar. Çünkü, kültür ortamında hepatosit replikasyonu sıradan koşullar altında çok sınırlıdır. Diğer taraftan, hepatositlerin replikasyonu in vivo ve in vitro çalışmalarda bir ya da iki döngüden ileriye geçmemektedir (Borowiak, et al., 2004).

Karaciğer hasarı ve transplantasyon ile ilgili in vivo deneylerin sonuçlarına göre, hepatositler çok yüksek bir replikasyon kapasitesine sahiptirler. Bu da kök hücrelerden kaynaklanmaktadır (Fausto, 2000). Kemirgen ve insanlarda projenitör ya da karaciğerde kök hücre populasyonu bulunmaktadır. Mitojenik anlamda bir hareketlilik göstermeyen kök hücrelerin karaciğerde Hering kanallarında yerleşim gösterdikleri

varsayılmaktadır (Kay and Fausto, 1997; Fausto and Campbell, 2003)(Bkz. Şekil 2.2). Bu nedenle karaciğer dokusu rejenerasyon gösteren barsak epiteli, deri ya da kemik iliği gibi dokulardan farklıdır (Ankoma-Sey, 1999; Vogten, 2004). Epitel hücrelerinin sürekli bölünme göstermelerine karşılık, karaciğerdeki kök hücreleri sadece hepatositlerin ya da safra kanalı hücrelerinin hasar görmesi gibi hallerde bölünme gösterirler ve bu özelliklerini sonra yavaşça kaybederler. Hepatositler periportal zondan vena sentralise doğru göç ederler ve bu göç süresince farklılaşmazlar (Kay and Fausto, 1997). Bu nedenle karaciğerde hücre bölünmesinin bir merkezi yoktur. Mitotik aktivite, hücre göçü ve farklılaşmanın ardından yeni lobüller oluşur. Böylece karaciğer ağırlığı hızlı bir şekilde normal durumuna gelir (Higgins and Anderson, 1931). Hepatositlerin replikasyonu bloke edildiğinde ya da geciktiğinde kök hücreler bölünür. Buna paralel olarak epitel hücreleri, endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri gibi parankimal olmayan hücreler de kök hücre özelliği göstererek dokudaki eksikliği tamamlarlar (Kay and Fausto, 1997). Galun and Axelrod (2002) çalışmalarında, karaciğerdeki kök hücreleri "oval hücreler" olarak adlandırarak, aynı zamanda hepatositleri ve safra kanalı hücrelerini oluşturdukları için "bipotansiyel projenitör hücreler" olarak tanımlarlar. Kök hücreleri, karaciğerde meydana gelebilecek geniş çaplı hücre ya da hücre dışı matriks hasarlarında aktive olurlar (Kay and Fausto, 1997). Tek başına parsiyal hepatektomi uygulaması sonrasında kök hücreler aktifleşmemekte, parsiyal hepatektomi yanısıra kimyasal hasar oluşturulduğunda aktifleşmektedir. Ayrıca hepatositler gibi kök hücreleri de büyüme faktörlerine cevap verirler ancak, ekspresyon farklılıkları vardır. Buna benzer başka farklılıklar ortaya konulduğunda, kök hücrelerin karaciğer rejenerasyonu açısından durumu net olarak açıklanamamaktadır. Bu nedenle, son yıllardaki araştırmalar kök hücrelerinin rejenerasyon sürecindeki yerinin ortaya konması yönündedir (Fausto and Campbell, 2003).

Genel olarak karaciğerde rejenerasyonun başlaması, ilerlemesi ve kontrolü tüm karaciğer hücreleri tarafından sağlanır. Bölünmekte olan hepatositler, parankimal olmayan hücreler (Kupffer hücreleri, endotel hücreleri, Ito hücreleri) ve hücre dışı maddeler arasındaki ilişki de rejenerasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynar (Fondevila, et al., 2003; Vogten, 2004). Moleküler seviyede yapılan araştırmalarda

karaciğerde gözlenen ilişkiler ve bu ilişkilerde görev yapan faktörler hakkında daha fazla bilgi edinilmektedir.

2.2. Karaciğer Rejenerasyonunda Etkili Moleküler Faktörler

Sitokinler ve büyüme faktörleri hepatik rejenerasyon ile ilişkili olan biyolojik maddeler olup, hepatik rejenerasyonu uyarıp tetikleyenler ve durduranlar olarak gruplandırılırlar (Ankoma-Sey, 1999).

Çizelge 2.1 Karaciğer rejenerasyonunda etkili faktörler (Ankoma-Sey, 1999).

Büyüme Uyarıcı Faktörler	
Tam Mitojen (birincil, temel)	**Dolaylı Etkili Mitojenler (Komitojenler)**
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	İnsülin
Transforming Growth Factor-α (TGF-α)	Glukagon
Epidermal Growth Factor (EGF)	Parathormon
Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)	Tiroid hormonu
Insulin- like Growth Factor (IGF)	Adrenal kortikal hormonlar
Acidic Fibroblast Growth Factor	Katekolaminler
Keratinocyte Growth Factor	(norepinefrin, vazopresin, anjiotensin)
Büyüme Durdurucu Faktörler	
Transforming Growth Factor-β (TGF- β)	
Interleukin- 1 (IL- 1)	
Activanlar, inhibinler	

Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α), Interleukin-6 (IL-6), Hepatocyte Growth Factor (HGF) ve Transforming Growth Factor-α (TGF-α)' nın hepatik rejenerasyonu tetiklerken, Interleukin-1 (IL-1), Transforming Growth Factor-β (TGF-β) ve aktivin ise başlamış olan rejenerasyonu bloke ederler (Kay and Fausto, 1997; Ankoma-Sey, 1999; Andıran, et al., 2000; Hou, et al., 2003). Bunların yanında dolaylı olarak insülin, nörepinefrin, gastrin, prostoglandin E_2, kalsiyum ve D vitamini gibi komitojen maddelerin de temel mitojenler varlığında karaciğer rejenerasyonu üzerine önemli etkileri vardır (Michalopoulos and Defrances, 1997; Ankoma-Sey, 1999; Andıran, et al., 2000).

Hepatositlerin in vitro olarak HGF, Epidermal Growth Factor (EGF) ve TGF-α büyüme faktörlerine tam cevap verebilmesi için ortamda ilk olarak TNF-α ve IL-6 sitokinleri ile sitotoksitite engelleyici diğer ajanlara gerek vardır (Fausto, 2000; Galun and Axelrod, 2002).

TNF-α karaciğer rejenerasyonu sırasında Kupffer hücrelerinin senteziyle oluşturulan proinflamatör bir sitokindir ve serumdaki kaynağı sadece Kupffer hücreleri değil alveolar makrofajlar da olabilmektedir (Scotte, et al., 1997). Parsiyal hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonu, TNF-α üretiminin baskılanmasıyla inhibe edilmektedir (Watanabe, et al., 2001). Bunun tersine TNF-α' nın aşırı ekspresyonu sonucunda hepatositler hiperplazi göstererek, karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına göre ihtiyaçtan daha fazla artmasına neden olmaktadır. Ancak, yaşlı hayvanlarda yüksek bölünme aktivitesi devam ederken, hücrelerin iş gücünün yüksek olması sayesinde bu oran dengede tutulabilir. Ancak, bu hayvanların yaklaşık %85 kadarında hepatik adenoma ve karsinomalar teşekkül etmektedir (Kay and Fausto, 1997; Fausto and Campbell, 2003). Serbest oksijen radikalleri (SOR) ve glutatyon içeriği, TNF-α' nın hepatositler üzerine proliferatif ya da apoptotik etkilerinden hangisini uygulayacağını belirler (Fausto, 2000). TNF-α' nın bu işlevi yerine getirirken, apoptotik veya anti-apoptotik intrasellüler proteinlerin oluşumunu sağlayan bax, bcl-x, bcl-2 gibi genlerin aktivasyonu üzerine etkilidir (Galun and Axelrod, 2002). TNF-α' nın inhibitörü olan bir antijen kullanılarak söz konusu genlerin aktivasyonları durdurulabilir. Galun and Axelrod' a (2002) göre, bu molekülün TNFR-1 ile TNFR-2 olmak üzere iki hücre yüzey reseptörü bulunur ve bu reseptörlerin bloke edilmesi durumunda TNF-α fonksiyonel durumunu yitirir. Yapılmış olan bir araştırmada,

TNFR-1 eksikliğinde, farelere CCl_4 enjeksiyonu yapılarak karaciğer hasarı oluşturulmasına rağmen, hepatositlerdeki DNA sentezi inhibe olmaktadır (Yamada and Fausto, 1998).

HGF, "scatter faktör" olarak da bilinen ve sıçan kan pulcuklarından olduğu kadar karaciğer yetmezliği olan hastaların plazmalarından da izole edilebilen bir moleküldür (Kaibori, et al., 2000). Aoki, et al.' a (2001) göre, HGF karaciğer rejenerasyonunun kontrol ve düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu önemli rolü ise karaciğer rejenerasyonunda özellikle yüksek düzeyde mitojen nitelik göstermesidir (Panis, et al., 1998). Bu molekül hem in vitro hem de in vivo şartlarda büyüme faktörü olma özelliğini devam ettirir (Akino, et al., 2005). Rekombinant HGF, primer kültürde sıçan ve insan hepatositleri için potansiyel bir mitojendir. HGF, parsiyal hepatektomi yapılan, kimyasal hasarlı ve akut hepatitli sıçanlarda daha fazla hasarın oluşmasına engel olmak için karaciğer rejenerasyonunu uyarır (Kaibori, et al., 2000). %30 parsiyal hepatektomi yapılmış hayvanlarda, karaciğere infüzyon ile çok az miktarlarda HGF ve TGF-α verildiğinde DNA sentezinde büyük artışlar olmaktadır. Fakat, aynı uygulama hiç hasara uğratılmamış karaciğerde bu sonuca neden olmaz (Kay and Fausto, 1997; Fausto and Campbell, 2003). HGF sıçanlarda, parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 6 saatte karaciğer tarafından üretilir (Kay and Fausto, 1997). Parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 18-24 saat içinde HGF mRNA seviyesi en üst düzeye ulaşır ve buna paralel olarak akciğer ve dalak gibi organların mezenşimal hücrelerinde de mRNA ekspresyonunu artırır (Ankoma-Sey, 1999). HGF karaciğerde parankimal olmayan hücrelerde ve özellikle yağ depolayan hücrelerde üretilir (Aoki, et al., 2001). Ankoma-Sey' e (1999) göre, HGF hepatositler haricindeki intrahepatik ve ekstrahepatik mezenşimal hücrelerde üretilir ve hepatositler üzerine mitojenik etkileri de endokrin ve parakrin etkileşim şeklindedir. HGF gibi bazı büyüme faktörlerinin en önemli kaynağı pankreasın ekzokrin kısmı olduğu için, HGF parakrin mekanizmayla hepatositler üzerine etkilidir. Pankreatektomi ile birlikte parsiyal hepatektomi uygulanmış deneklerin karaciğerlerinin rejenerasyonu ve iyileşmesinde gerileme olmaktadır. (Tang, et al., 1997). HGF' nin mitojen etkisi sadece hepatositler ile sınırlı olmayıp farklı hücre tipleri üzerine de benzer etkiler yapar (Ankoma-Sey, 1999). HGF' nin bu şekilde farklı hücrelerde benzer etkisi henüz netlik kazanmamakla birlikte, bu faktörün hücre yüzey reseptörlerinin hedef hücrelerde bulunmasından kaynaklanmaktadır. HGF transgenik

farelerde aşırı üretilirse küçük hacimli, diploid ve replikasyon özelliğini devam ettirebilen hücrelerin sayısal oranları artar ve büyük bir karaciğer gelişimine neden olur. Parsiyal hepatektomiden sonra tümöral bir oluşum gözlenmemektedir ve yüksek miktarda HGF tümör büyümesini inhibe edici özellik göstermektedir (Kay and Fausto, 1997). HGF muhtemelen apoptotik moleküler sinyalleri etkileyerek karaciğer rejenerasyonunu hızlandırmaktadır (Galun and Axelrod, 2002).

IL-6 sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonunu uyaran önemli bir mitojen ve anti-apoptotik faktördür (Fausto, 2000; Galun and Axelrod, 2002). Rejenerasyon uyarısına cevap verirken, TNF-α aktivasyonuyla etkinlik kazanan IL-6, farklı hedef hücre tipleri üzerine çok yönlü biyolojik aktiviler gösteren pleiotropik bir sitokindir (Scotte, et al., 1993). Bu sitokin, hemapoietik sistem düzenlenmesinde, lenfosit fonksiyonlarında ve hücre farklılaşmasında görev alan önemli bir mediatördür. Sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonraki 24-48. saatler arasında IL-6'nın serum konsantrasyon seviyesi artar (Salazar-Montes, et al., 1999; Ankoma-Sey, 1999; Borowiak, et al., 2004). IL-6' nın fizyolojik miktarı rejenerasyon için gereklidir ancak, fazla IL-6 büyüme durdurucu onkogenleri uyararak rejenerasyonun bozulmasına neden olabilir (Kaya vd., 2002). İnflamatör sitokinlerin önemli kaynağı Kupffer hücreleri (Ankoma-Sey, 1999) ve sinusoidlerdeki endoteldir (Aoki, et al. 2001). Ayrıca, TNF-α, IL-6 ve HGF ile heparine bağlı EGF' nin temel kaynağı, karaciğerdeki parankimal olmayan hücreler de olabilmektedir (Fausto and Campbell, 2003). Scotte, et al.' a (1993) göre, IL-6 sitokininin hepatosit büyümesi üzerine etkisi otokrin mekanizma ile olabilir. Ayrıca IL-6'nın karaciğeri toksik hasarlardan korumada da önemli rolü vardır (Debonera, et al., 2001).

Sıçan ve farelerde tükrük bezlerinden salgılanan EGF, hepatositler için temel bir mitojendir (Ankoma-Sey, 1999). Araştırmacıya göre, EGF' nin plazmadaki seviyesi düşerse parsiyal hepatektomi yapılmış sıçanlarda karaciğer rejenerasyonu son bulmaktadır. Bir diğer temel mitojen olan TGF-α ise EGF' den daha sonra rejenerasyona katılır ve HGF gibi parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 6 saatte karaciğer tarafından üretililir (Kay and Fausto, 1997). Hepatositler tarafından sentezlenen TGF-α otokrin uyarı ile etki eder (Scotte, et al. 1997; Ankoma-Sey, 1999; Fausto and Campbell 2003) .

Hücre döngüsünde yer alan ve potansiyel transkripsiyon faktörlerinden olan Signal Transducers Activators of Transcription ($STAT_3$)'ün aktivasyonu IL-6 sitokininin serbest kalmasına ve EGF' nin uyarısına bağlıdır (Ankoma-Sey, 1999; Fausto, 2000; Debonera, et al., 2001; Vogten, 2004). Bu açıdan hücre döngüsünün ilerlemesinde IL-6 varlığı oldukça önemlidir (Salazar-Montes, et al., 1999). Sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonraki 30 dakika ve 3. saatler arasında $STAT_3$' ün seviyesi yüksektir. $STAT_3$' ün hücre büyümesi, farklılaşması ve pek çok sistemde hücrelerin G1' den S fazına geçişlerinde önemlidir. Hepatositlerin G1'den S fazına geçişinde, HGF ve TGF-α büyüme faktörlerinin de varlığında $STAT_3$ aktivasyonu gereklidir (Ankoma-Sey, 1999).

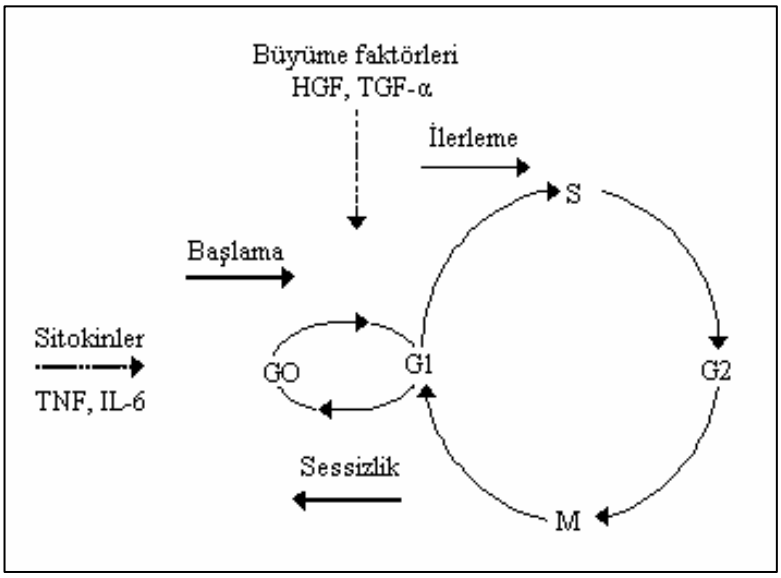
Karaciğerde rejenerasyonu durduran ve büyümeye engel olan önemli sitokinlerden ikisi TGF-β ile IL-1' dir. TGF-β' nın karaciğerde parankimal olmayan hücreler tarafından üretilir (Ebrenfried, et al., 1997; Date, et al., 1998; Lee, et al., 2003). Karaciğerde normal ya da patolojik durumların her ikisinde de bu sitokin önemlidir. Hepatositler üzerine parakrin yolla etkili olan TGF-β' nın büyüme durdurucu özelliği ile ilgili in vitro çalışmalar vardır (Date, et al., 1998; Nakamura, et al., 2004). İn vitro ortamda konsantrasyonu artırılan TGF-β oksidatif strese neden olur ve daha fazla hepatosit apoptozisine yol açar.

IL-1 molekülü de akut faz cevabında TNF-α, IL-6 gibi oluşturulan proinflamatuvar bir sitokin olarak tanımlanır. Buna ek olarak, yine diğer sitokinler gibi çok yönlü fonksiyonları olan bir molekül olarak ifade edilir. En önemli fonksiyonu karaciğer rejenerasyonunun düzenlenmesinde büyümeyi durdurucu etkisidir (Scotte, et al., 1997). Karabelyos, et al. (1999), IL-1 ve TNF-α, karaciğer rejenerasyonunda apoptozise engel olarak rejenerasyonun sürekliliğini sağlayan sitokinlerdir.

Karaciğer rejenerasyonunun tetiklenmesi, durdurulması ya da kontrolünün sağlanmasında önemli tüm bu faktörlerin birbirleriyle olan karmaşık ilişkilerinin açıklık kazanması, rejenerasyonun daha anlaşılır olmasını sağlayacaktır. Karaciğerde rejenerasyona neden olabilecek herhangi bir uyarıcının varlığında meydana gelen hücresel olaylar zinciri, rejenerasyon mekanizmasının şekillenmesine olanak sağlar.

2.3. Karaciğer Rejenerasyonunun Mekanizması

Karaciğer rejenerasyon uyarısı gelmeden önce hepatositlerin hemen hemen hepsi G_0 fazında bulunurlar (Ebrenfried, et al., 1997; Ankoma-Sey, 1999; Palmes and Spiegel, 2004). Hücre döngüsünün, uyarının gelmesinden sonra ilerleme fazından çok, başlama fazının büyüme faktörlerine gereksinimi vardır (Kay and Fausto, 1997). Transkripsiyon faktörü olan Nuclear Factor-κB (NF-κB) (Kay and Fausto, 1997; Fausto and Campbell, 2003), $STAT_3$, Nuclear adaptor protein complex-1 (AP-1) ve sitokin düzenleyici olabileceği düşünülen enhancer binding protein β (C/EBPβ) karaciğer rejenerasyonunun başlamasında önemli rol oynarlar. Bu moleküller başlangıçta TNF-α tarafından uyarılırlar (Fausto, 2000; Borowiak, et al., 2004) (Şekil 2.3, Şekil 2.4). Bu nedenle deneysel olarak TNF-α ve bu sitokinin uyardığı IL-6 miktarının biyokimyasal yöntemler ile belirlenmesi, parsiyal hepatektomi sonrasında rejenerasyon durumu ile ilgili bilgi verir (Watanabe, et al., 2001; Hou, et al., 2003).

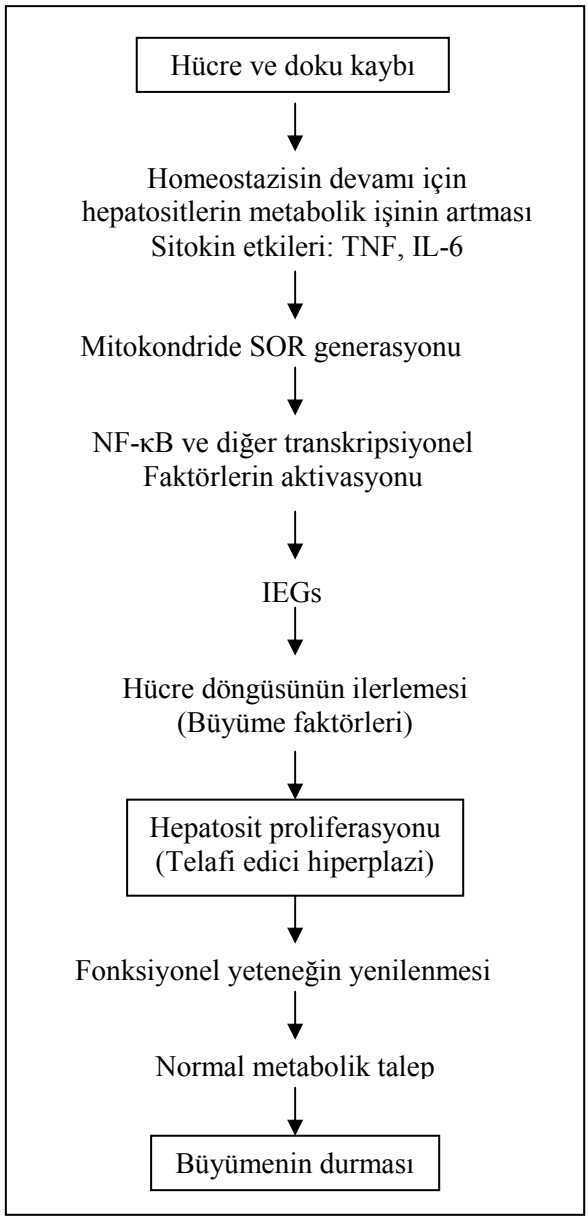


Şekil 2.3 Karaciğer rejenerasyonunun başlama ve hücre döngüsünden oluşmuş ilerleme fazları (Fausto, 2000).

Parsiyal hepatektomi ya da kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarından sonra Kupffer ve endotel hücreleri tarafından TNF-α ve IL-6 üretimi başlatılır. IL-6 üretimi TNF-α tarafından uyarılmaktadır. IL-6 ve özellikle TNF-α ile birlikte karaciğerden (HGF) ve çevre organlardan gelen büyüme faktörlerinin (pankreas > HGF; duedonum > EGF; adrenal bez > norepinefrin) etkisiyle SOR üretimi sağlanır (Fausto, 2000; Taub,) . Bir çok hücre tipinde bulunduğu gibi hepatositlerde de bulunan ve p65- p50 protein alt ünitelerinden oluşmuş NF-κB molekülü normalde inaktiftir. Bu durum molekülün p65 ünitesine bağlı IκB inhibitöründen kaynaklanmaktadır. SOR aracılığıyla IKK enzim kompleksi tetiklenerek IκB molekülünü katalizlemesi ve NF-κB' den kopması sağlanır. Böylece, hepatosit sitoplazmasında fosforilasyondan sonra aktivite kazanan NF-κB hücre çekirdeğine göç eder. Molekülün çekirdeğe geçişi engellendiğinde karaciğerde apoptozis başlar (Fausto, 2000).

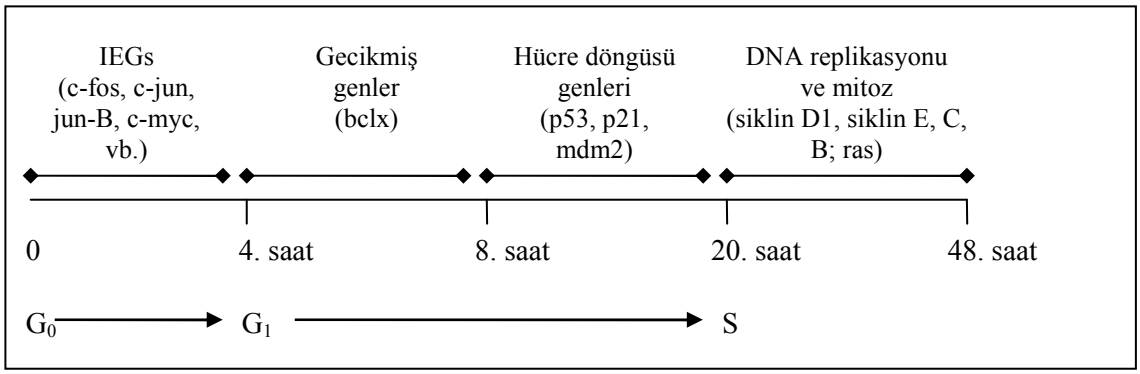
Parsiyal hepatektomiden sonra öncelikle transkripsiyon faktörlerinden NF-κB, AP-1, C/EBPβ ve bunların hemen arkasından da $STAT_3$' ün DNA' ya bağlanmalarında artış olur. NF-κB operasyondan 10-15 dakika sonra ölçülebilir ve 1-2 saat içinde de normal seviyeye düşer. $STAT_3$ ise operasyondan sonraki 1-2 saat içinde belirlenebilir ve aktivasyonunu 4-6 saat kadar sürdürebilir (Kay and Fausto, 1997; Fausto, 2000). IL-6 sitokini ve diğer büyüme faktörleri varlığında sitoplazmada aktivite kazanmış $STAT_3$, NF-κB gibi hücre çekirdeğine göç eder. DNA molekülüne bağlanmasından sonra hepatosit proliferasyonunda gerçekleşen iki aşamalı gen ekspresyonunun ilk fazı "The immediate early genes (IEG_S)" olarak bilinen c-myc, jun B, c-jun, c-fos gibi protoonkogenlerin ekspresyonu başlatılır (Fausto, 2000; Debonera, et al., 2001; Vogten, 2004; Taub,). IEG_S lösin ailesinin üyelerinden proteinleri kodlar ve bunlar hücre onarımıyla ilişkilidir. Bu genlerin aktive olduğu dönem "acil erken faz" olarak adlandırılır (Tsuchia, et al., 2000). Transkripsiyon faktörleri, tirozin fosfataz ve hücre zar proteinleri IEGs tarafından meydana getirilir (Fausto, 2000). "Delayed early genes" gecikmiş erken genler olarak da ifade edilen ve apoptozise engel olan Bcl-X_L geninin örnek gösterildiği gen ekspresyonunun ikinci fazıdır. Ayrıca, Bcl-X_L geni hepatosit proliferasyonu sırasında mitokondrilerde meydana gelmiş olan SOR' ne karşı antioksidan özellik gösterir (Fausto, 2000). Ankoma-Sey (1999), hepatosit rejenerasyonunda gerçekleşen, iki aşamalı gen ekspresyonunda yer alan 70' den fazla genin önemli olanlarını araştırma makalesinde belirtmektedir.

Deney hayvanına TNF-α' nın enjekte edilmesi, AP-1' in bağlanmasını artırıcı yönde bir özellik kazandırır. AP-1 bağlanması ise parsiyal hepatektomiden çok kısa bir süre sonra c-Jun ve c-Jun nüklear kinazın aktivitesiyle paralel değerlendirilmektedir. Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve primer genlerin ekspresyonu sonucunda hepatositler, hücre döngüsünün G_1 fazına doğru itililirler. Bu olay parsiyal hepatektomiden sonraki 4. saate isabet eder (Fausto, 2000)(Şekil 2.5).



Şekil 2.4 Mitojenik sinyal ve karaciğer rejenerasyonu ile ilişkili olaylar zinciri (Fausto, 2000).

Hücre döngüsünde görev alan p53, p21, mdm genleri ile siklinler ve siklin bağımlı kinazlar olarak bilinen hücre içi enzimler parsiyal hepatektomi uyarısıyla aktivite kazanırlar. Siklin D1' in kinaz ile oluşturduğu kompleks, hücre döngüsündeki bazı faktörleri fosforilleyerek, rejenerasyonun 20. saatinde, döngünün G_1 fazından S fazına geçmesini ve replikasyonun gerçekleşmesini sağlar (Ebrenfried, et al., 1997; Fausto, 2000). Bu süreçte siklin D, E, A ve B' nin ekspresyonlarına da gereksinim duyulur ve sonuç olarak DNA molekülü replikasyona uğrar (Kay and Fausto, 1997; Fausto, 2000)(Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda gen aktivitesi zinciri (Fausto, 2000).

Hepatosit hücre döngüsünde, siklin D1' den siklin E' ye geçiş önemli bir sınır noktadır. İn vivo ve in vitro koşullarda, bu iki siklini eksprese edebilen adenovirus vektörleri, hepatosit DNA replikasyonunu uyarabilir ve bu aşamadan itibaren, büyüme faktörleri olmaksızın replikasyon ilerleyebilir (Fausto and Campbell, 2003). Siklin bağımlı kinazlar ve bunların yapılarına katılarak aktivasyonlarını yönlendiren siklin proteinleri sadece hepatosit hücre döngüsünde değil aynı biçimde tüm ökaryotik hücrelerin döngülerinde de düzenleyici rol oynar (Andreeff, et al., 2000). DNA molekülündeki ve gen ekspresyonlarındaki artışın tespit edilmesi, rejenerasyon sürecinin yönü ve ilerleyişinin yorumlanması açısından önemlidir. Hepatosit hücre

döngüsünde G_1 fazının ortalarında başlayan ve S fazında da aktivasyonu devam eden Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) bir çekirdek polipeptididir (Ohta and Ichımura, 2000). PCNA molekülünün, DNA polimeraz için bir kofaktör olarak, S fazı ile DNA sentezinin bir işaretçisi olmasının avantajı vardır (Assy, et al., 1998; Picard, et al., 2002; Kamer, et al., 2003). Bu antijen immunohistokimyasal yöntemler ile kolayca belirlenebilir ve PCNA indeks verilerinin değerlendirilmesiyle karaciğer büyümesi yorumlanabilir (Furuta, et al., 2000). Karaciğerdeki rejenerasyonun tespitinde immunohistokimyasal olarak ayrıca Ki-67, bromodeoksiuridin (BrdU), DNA polimeraz-α, siklin D1 işaretleyicileri de kullanılmaktadır (Sathar, et al., 1997; Başoğlu, et al., 2000; Ohta and Ichımura, 2000).

Karaciğerde büyümenin kontrolü, karaciğerin anatomisinden çok fonksiyonu ile ilgilidir. Karaciğer tümörlerinden dolayı insanlarda parsiyal hepatektomi yapıldığında, fare ve sıçanlarda olduğu gibi insan karaciğerinin lob sayısı fazla olmamasına rağmen kalan doku rejenere olmakta ve iyileşme görülebilmektedir. İnsanlarda bu durum, karaciğer cerrahi operasyonlarının daha güvenilir yapılmasını sağlayabildiği gibi özellikle karaciğer doku nakillerinde bir vericiden iki alıcının birlikte faydalanmasını sağlayabilir.

Karaciğer hücreleri direkt mitojenik ajanlara cevap vermektedir. Kurşun nitrat, etilendibromid ve hepatositlerdeki peroksizomların proliferasyonunu tetikleyici bazı kimyasallar in vivo koşullarda uygun oranda uygulandıklarında hepatositleri öldürmeyip direkt olarak mitoza yönlendirmektedirler. Kemirgenlerde bu tür ilaç uygulamaları karaciğerde büyümeye neden olmakta ve uygulama durdurulduğunda karaciğer büyümesi gerilemektedir. Karaciğerin en önemli özelliği, kütlesinin %90-95' inin ve toplam hücrelerinin %65' inin mitoz yeteneğine sahip olmasıdır. Hepatositler normal bir karaciğerde oldukça düşük proliferasyon göstermektedir (Fukuhara, et. al., 2003). Parsiyal hepatektomi yapılmış sıçanlarda cerrahiden sonraki ilk 40 saat içinde hepatositlerin %90-95'i replikasyon yapar. Bu sürenin ilk 12-14. saatlerine kadar DNA sentezi olmaz ve 24. saatinde ise replikasyon en üst seviyeye ulaşır (Ebrenfried, et al., 1997; Ankoma-Sey, 1999; Fausto, 2000; Gaglio, et al., 2002; Fausto and Campbell, 2003; Picard, et al., 2003; Fernandez, et al., 2004). Cerrahi işlemlerden 24 saat sonra hepatositlerin %40-50' si hücre döngüsündeki S fazındadır (Kay and Fausto, 1997). Buna paralel olarak sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 48 saat içinde DNA

sentezi ve mitoz en yüksek seviyelere ulaşır (Hashimoto and Sanjo, 1997; Li, et al., 1999; Fukuhara, et al., 1999).

Parsiyal hepatektomiden sonra proliferasyon göstermeyen hepatositler genç sıçanlarda yaklaşık %5, çok yaşlılarda ise %25' lik bir oranı teşkil eder. Karaciğer rejenerasyonu süresince doku kütlesinin geri kazanılması için bir ya da iki kez replikasyon aktivitesi gösteren hepatositler daha sonra normalde olduğu gibi G_0 fazına geri dönebilirler (Kay and Fausto, 1997; Ankoma-Sey, 1999; Galun, et al., 2002; Fausto and Campbell, 2003). Ayrıca, insan ve hayvan karaciğerlerinde parsiyal hepatektomiden sonra diploid (Galun, et al., 2002) ve hatta büyük görünümlü tetraploid, oktoploid hepatositler göze çarpmakta özellikle tetraploid hepatosit sayısı daha çok olmaktadır (Kay and Fausto, 1997; Fausto and Campbell, 2003).

Deneysel çalışmalar sırasında, karaciğer rejenerasyonunda meydana gelebilecek gecikmeler, yine konu üzerinde yapılan araştırmalar ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Sonuçta karaciğer rejenerasyonunun gecikmesine, protein sentezinin azalmış olması, endojen endotoksinler tarafından kalan karaciğerin ya da karaciğer metabolizmasının zayıflatılması, retiküloendotel sistem fonksiyonlarının ve glikojenolizin azalması sebep gösterilebilir (Mimuro, et al., 2002).

Bu tür gecikmelerin önüne geçilmesi ve iyileşmenin hızlandırılması amacına yönelik olarak kimyasal ilaç tedavileri uygulansa da son yıllarda alternatif tıp ya da diğer adıyla tamamlayıcı tıp uygulamalarının önem kazandığı gözlenmektedir.

2.4. Karaciğer Hastalıklarında Kullanılan Bazı Alternatif Tıp Uygulamaları

Doğada bulunan çeşitli bitkilerden daha fazla yararlanma eğilimi bulunan halk tarafından, vücuda daha yararlı olabilecek ya da bir takım rahatsızlıklara ilaç olabilecek besinlerin alınması yanında, özellikle bitki kısımlarının, bunların sulu ekstrelerinin veya çözeltilerinin kullanılması dikkat çekicidir. Alternatif tıp uygulamalarına daha bilimsel bir açıdan bakıldığında, etken madde veya bileşikler kolaylıkla tespit edilebilmekte ve bunlar doğal olarak elde edilebildikleri gibi sentetik olarak da yapılıp kullanılabilmektedir. Benzer uygulamalar karaciğer hastalıklarının engellenmesinde,

hasta dokunun iyileştirilmesinde ya da bir nedene bağlı olarak yapılan parsiyal hepatektomi sonrasında doku rejenerasyonun çabuklaştırılması amacıyla da yapılabilmektedir.

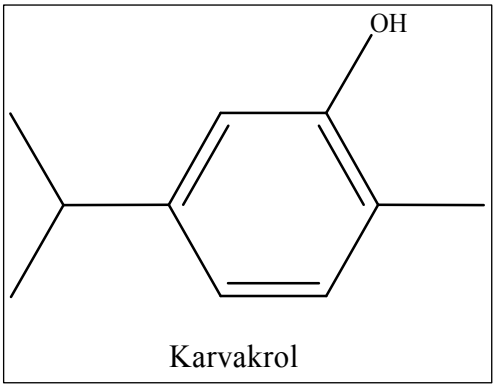
Baytop' un (1999) "Türkiyede Bitkiler ile Tedavi" adlı eserinde *Cynara scolymus* (Enginar) türünün tanen, inulin, sinarin ve flavon içeren taze yapraklarından hazırlanan içeceğin karaciğer hastalıklarında, *Herniaria glabra* (Türkotu) türünün de aynı amaçla kullanıldığı belirtilmiştir. *Viburnum opulus* (Gilaburu) türünün izovalerian, tanen ve renk maddesi taşıyan meyvelerinin sulandırılmış suyunun içilerek safra kesesi ve karaciğer hastalıklarında kullanıldığını açıklamıştır. Aynı eserde karaciğer sirozuna karşı *Juniperus drupacea* türünden elde edilen katran köpüğünün içildiği ifade edilmiştir. *Silybum marianum* (Milk thistle) türünün "devedikeni tohumu" adıyla bilinen meyvalarının ve bundan hazırlanan "silymarin" isimli flavo-lignan karışımın, karaciğeri alkolik hastalıklara karşı koruduğu yine bu eserde anlatılmıştır. Benzer ifade Flora, et al. (1998) tarafından da desteklenmiştir. Ticari olarak da üretilen silymarin, karaciğeri koruyucu ve onarıcı özelliğinden dolayı pek çok deneysel çalışmaya materyal olmuştur. Silymarin flavonoidinin özellikle antioksidan etkileri vardır ve hücre zarındaki lipid peroksidasyonunu engeller (Farghalı, et al., 2000; Oliveira, et al., 2001; Ramadan, et al., 2002; Rolo, et.al., 2003; Soto, et al., 2003). Silymarinin parsiyal hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonu sırasında DNA ve protein sentezinin artışına neden olur ve rejenerasyon oranını yükseltir (Magliulo, et al., 1973; Luper, 1998). Srivastava, et al.' a (1994) göre sıçanlara oral olarak verilen sulu silymarin çözeltisi, %70 parsiyal hepatektomiden sonra karaciğerde mitotik indeksi artırır. Ayrıca silymarin, hepatosit rejenerasyonunu hızlandırır (Jacobs, et al., 2002).

Aromatik hoş bir koku ve lezzet verici özelliğinden dolayı besin olarak kullandığımız bitki çeşitlerinden birisi de "kekik"' tir. Tedavi amaçlı ilaç olarak da değerlendirilen kekiğin ülkemizde ticareti de yapılmaktadır. Hepsi Ballıbabagiller (Labiatae = Lamiaceae) familyasına bağlı kekik türlerinin dahil olduğu *Origanum, Thymbra, Coridothymus, Satureja ve Thymus* cinsleri vardır. Uçucu yağ üretiminde kullanılan türlerinin ise *Origanum onites* (bilyalı kekik, İzmir kekiği), *Origanum vulgare subsp. hirtum* (İstanbul kekiği, kara kekik), *Origanum minutiflorum* (Sütçüler kekiği, yayla kekiği, toka kekiği), *Origanum majorana* (Beyaz kekik, Alanya kekiği) ve

Origanum syriacum var. bevanii (dağ kekiği, Suriye kekiği, İsrail kekiği)' dir. (Başer, 2001, 2002).

Thymus vulgaris L.' nin yapraklarının sulu ekstresinin ya da bundan saflaştırılmış uçucu yağlarının halk tarafından tedavi için kullanıldığı bilinmektedir. Solunum bozukluğu, bronşit, üst solunum yolu rahatsızlıkları, öksürük, barsak kırampları, sindirim sistemi düzensizlikleri, mide ağrısı, dolaşım ve boşaltım sistemi bozuklukları, soğuk algınlığı, romatizma, nezle gibi çok sayıda rahatsızlığa ve enfeksiyona karşı kullanılmaktadır (Dean Coleman). Bu bitkinin özüt ya da yağlarının yaşlanma önleyici, antibakteriyel, antifungal, antiseptik özellikleri vardır. Uçucu yağının %60' dan fazla bir kısmını karvakrol ve timol oluşturmaktadır. Kekik türlerinin yer aldığı Labiate familyasının tüm cinslerinde ortak özellik, yüksek miktarda uçucu yağ içermeleri ve uçucu yağın ana bileşiminin kekiğe kendine özgü kokusunu veren karvakrol ve/veya timol' ün olmasıdır (Başer, 2001; Baydar vd., 2003) . Ayrıca karvakrolün Anabasis, Carum, Cinnamomum, Mentha, Ocimum, Zea gibi bitkilerden de izole edilmektedir (Golob, et al.,1999).

Karvakrol C_{10} H $_{14}$ O kimyasal formüllü ve 2- Methyl- 5 -(1-Methylethyl)Phenol kimyasal isminde monoterpenoik fenoldür (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Karvakrolün açık kimyasal formülü (Yanishlieva, et al., 1999; Stammati, et al., 1999; Carvalho, et al., 2003; Zeytinoglu, et al., 2003).

Karvakrolün 2-hydroxy-1- methyl-4-(1- methylethyl) benzene, 2- hydroxy- p-cymene, 2-methyl- 5- isopropylphenol, 3-isopropyl- 6- methylphenol, antioxine, isopropyl o- cresol, isothymol, p- cymen-2- ol, 5-isopropyl- 2- methylphenol ve o-thymol gibi sinonimlerine de rastlamak mümkündür (MSDS; The Turkish Oregano Company; FAO; NIOSH; De Vincenzi, et al. 2004). Bu bileşik alkol ve eter ile kolay biçimde çözünebilir ancak, su ile kolay çözünemez (Baphonet).

Karvakrolün çeşitli aktiviteleriyle çok sayıda antioksidan özellikleri belirlendiği için ve kimyasal yapısında hidroksil (-OH) grupları bulunmasından dolayı antioksidan olarak değerlendirilebilir (Kulisic, et al., 2004; Sökmen, et al., 2004). *Origanum vulgare*' de yüksek oranda karvakrol ile timol bulunur ve uçucu yağın serbest radikal bağlayıcı özelliğini sergilerler (Şahin, et al., 2004). Son yapılan bir araştırmada da karvakrolün genotoksik maddelere karşı insan sağlığını koruyabileceği bildirilmiştir (Ipek, et al., 2005). Karvakrolün bu tip özellikleri Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi (TBAM) tarafından yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir (Başer, 2001). Karvakrolün subakut, kronik toksititesi ile üreme sağlığı üzerine ve teratojenik etkilerine yönelik veri bulunmamaktadır (De Vincenzi, et al., 2004).

3. MATERYAL VE METOD

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiş olan deneysel çalışmamızın tamamı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Laboratuvarlarında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi etik kurulunun 2005/295 sayılı onayı ile yapılmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Deneysel çalışmamızda sağlıklı, erkek, 230±30 gram ağırlıkta, 3 aylık, Wistar cinsi, albino sıçanlar kullanıldı. Tüm deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarından temin edilerek deney süresince 12; 12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısı (22±2 ^{o}C) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldılar. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta süre ile ortam koşullarına adaptasyonu sağlandı (Ebrenfried, et al., 1997; Furuta, et al., 2000; Watanabe, et al., 2001). Bu adaptasyon sürecinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi.

3.2. Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları

Origanum onites L. bitkisinden buhar distilasyonu (fraksiyonel distilasyon) ünitesi kullanılarak elde edilen uçucu yağın gaz kromotografisi / kütle spektrometresi ile analizi yapılarak karvakrol bakımından zengin olan fraksiyonu ayrıldı (Ipek, et al., 2005). Deneysel çalışmalarımızda bu yolla elde edilmiş olan ve Prof.Dr. K.H.C. Başer tarafından sağlanan %99 saflıktaki karvakrol kullanıldı. Silymarin ise ticari olarak (Sigma, S0292) temin edildi.

Bu maddelerin her ikisi de 0,5 mililitre (mL) %0,9 steril serum fizyolojik ile çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirildi. Kimyasal madde enjeksiyonları, çözeltilerin taze olarak hazırlanmasından sonra, steril tek kullanımlık enjektörler ile cerrahi girişimlerden 60 dakika önce, tek doz olarak periton altına uygulandı.

3.3. Deney Grupları

Deney hayvanları arasından rastgele seçimle herbirinde n=8' er sıçan olmak üzere toplam 7 grup oluşturuldu. Bunlar;

Grup 1: Kontrol grubu (n=8): Bu grup hayvanlara cerrahi ya da enjeksiyon uygulamalarından hiçbiri yapılmamıştır.

Grup 2: Serum fizyolojik grubu (n=8): Her hayvana 0,5 mL serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmıştır.

Grup 3: Karvakrol grubu (n=8): Her hayvana 73 $mg.kg^{-1}$ tek doz karvakrol enjeksiyonu yapılmıştır (MSDS; NIOSH).

Grup 4: Silymarin grubu (n=8): Her hayvana 100 $mg.kg^{-1}$ tek doz silymarin enjeksiyonu yapılmıştır (Magliulo, et al., 1973; Oliveira, et al., 2001).

Grup 2, 3 ve 4' deki hayvanlara cerrahi işlemlerden 60 dakika önce madde enjeksiyonları uygulandıktan sonra sadece laparotomi yapılıp karaciğer loplarını birbirine bağlayan zarlar ayrıldı. %68-70 oranında parsiyal hepatektomi yapılacakmış gibi karaciğerin öndeki sağ orta ve sol yan lopları ayrılarak iplik geçirildi. Parsiyal hepatektomi yapılmadan laparotomi bölgesi kapatıldı.

Grup 5: Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (n=8)

Grup 6: Karvakrol + parsiyal hepatektomi (n=8)

Grup 7: Silymarin + parsiyal hepatektomi (n=8)

Grup 5, 6 ve 7' deki hayvanlara cerrahi işlemlerden 60 dakika önce madde enjeksiyonları uygulandı ayrıca, yaklaşık %68-70 oranında parsiyal hepatektomi yapıldı.

3.4. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirildi. Diurnal hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkileri dikkate alınarak tüm cerrahi işlemler 09.00 ile 12.00 saatleri arasında yapıldı (Assy, et al., 1998; Karabelyos, et al., 1999; Kaya, et al., 2002; Akino, et al., 2005). Deney hayvanlarına intraperitonal yol ile 50 $mg.kg^{-1}$ tiopental sodyum anestezisi uygulandı (Tang, et al., 1997; Crocenzi, et al., 2000, 2003).

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

Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verildi (Kaya vd., 2002). Sonra, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kapatıldı ve poviiodeks antiseptik solusyon ile laparotomi bölgesi temizlendi. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diet değişikliği yapılmaksızın 72 saat boyunca yaşatıldı (Watanabe, et al., 2001).

3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Karaciğer rejenerasyon oranlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere tüm hayvanların, ilk laparotominin yapıldığı 0. saatte ve ikinci laparotominin yapılıp hayvanların öldürüldükleri 72. saatte vücut ağırlıkları tespit edildi (Tang, et al., 1997).

Deney gruplarına ait hayvanlar hafif eter anestezisi altında, intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürüldüler. Daha sonra da karaciğerler hızlı bir şekilde çıkarıldı.

3.5.1. Kan ve kemik iliği

Kan örneklerinin 1/5' lik kısmı sitratlı tüplere koyularak, Hemavet 850 marka ve model kan sayım cihazının sıçan kalibrasyonunda sayımı yapıldı. Kalan kısmından ise Eppendorf Centrifuge 5804 R marka ve model cihaz ile 10 dakika 3000 rpm devirde santrifüjlenerek serumlar elde edildi (Sanz, et al., 1998; Aktay, et al., 2000; Theocharis, et al., 2001). Polietilen tüplere aktarılan serum örnekleri biyokimyasal analizler için -80 ^{0}C derin dondurucuda korundu (Furuta, et al., 2000).

Karaciğer hücrelerinin olası fonksiyon bozukluğunu tespit etmek amacıyla biyokimyasal olarak serum örneklerinde aspartate transaminase (AST) ve alanine transaminase (ALT) enzimlerinin seviyeleri belirlendi (Aoki, et al., 2001; Kaya, et al., 2002). ALT, AST ölçümleri HITACHI-917 oto analizörü ile Human (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden Germany) marka ticari kitler kullanılarak yapıldı. Aynı serum örneklerinde IL-6 ve TNF-α sitokinlerinin seviyeleri yine biyokimyasal olarak tespit edildi (Scotte, et al., 1993; Scotte, et al., 1997). Serum sitokin seviyeleri Trinity (Biotech Captia Reader) model ELISA cihazında, Biosource (Biosource International Inc. California USA) marka ELISA kitler kullanılarak ölçüldü. Tüm spektrofotometrik ölçümlerde, Shimadzu UV-1601 spektrofotometresi kullanıldı.

Deney hayvanına ait femural kemik iliği 5 mL serum fizyolojik ile çıkarılarak pipetaj yoluyla dağılması sağlandı. Tüpler içindeki örnekler 5 dakika 3000 rpm devirde santrifüjlenerek süpernatantının 3 mL' si alınarak atılıp, kalan kısmı ise çalkalanıp kan sayım cihazıyla kemik iliği hücrelerinin sayımı yapıldı.

3.5.2. Karaciğer dokusu

İntrakardiyak kanın alınmasını takiben ikinci laparotomi ile tüm karaciğer çıkarılıp serum fizyolojik ile hızlı şekilde yıkanmıştır (Karabelyos, et al., 1999).

3.5.2.1. Karaciğer rejenerasyon oranı

Grup 1, 2, 3 ve 4' e ait karaciğerlerin her birinin yaş ağırlıkları Precisa XB 220A marka ve model, 10^{-4} hassas terazi ile ölçüldü. Grup 5, 6 ve 7' de ise önce 0. saatte alınan sonra da 72. saatte alınan tüm karaciğerin yaş ağırlıkları aynı şekilde ölçüldü (Scotte, et al., 1993; Li, et al., 1999; Kaya, et al., 2002; Hou, et al., 2003). Karaciğer yaş ağırlıkları ve bunların %68 ve %32 oranındaki miktarları, Child' in (1953) formülüne yerleştirilerek regenerasyon oranı tespitinde kullanıldı (Tang, et al., 1997; Fan, et al., 2002).

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

3.5.2.2. Karaciğer doku takibi ve immunohistokimyasal uygulamalar

Karaciğer ağırlık ölçümlerinin arkasından doku örnekleri hızlı bir şekilde %10' luk nötral formalin tespit çözeltisine alınarak 24 saat süre ile fiksasyonu sağlandı. Kimyasal fiksasyonu tamamlanan dokulara rutin takip işlemleri uygulandı ve parafin blokları hazırlandı. Etil alkol serisinde sırasıyla 1' er saat %70, %80, $\%90_1$, $\%90_2$, $\%96_1$, $\%96_2$ ve 30 dakika absolü etil alkolden geçirilerek dehidratasyon sağlandı. 30' ar dakika 2 kez ksilol uygulamasıyla dokuların şeffaflanması sağlandı. Dokular parafinizasyon için 57 °C etüvdeki 3 ayrı parafinde (paraplast plus Sigma P3683) sırasıyla 30, 60, 60 dakika sürelerle bekletilerek bloklandı. Bu bloklardan standart

Hematoksilin & Eosin (H&E) boyama ve immunohistokimya uygulaması yapılmak üzere mikrotom (Leica RM 2025) kullanılarak 4 μ' lik kesitler alınarak Poly-L-Lysine kaplı lamlar üzerine tespit edildi. Kesitlerin bir kısmının 37 °C etüvde 1 gece bekletildi ve daha sonra ksilolde deparafinize edildi. Derecesi azalan etil alkol serilerinde hidratasyonu sağlanarak H&E boyamaları yapıldı.

Kesitlerin diğer kısmında ise hepatositlerde mitotik aktivitenin belirlenmesi amacıyla, parafin kesitlerde çalışılmaya uygun ticari PCNA ve IL-6 antikorları kullanılarak immunohistokimyasal uygulamalar yapılmıştır. İmmunohistokimyasal boyamalar için 60 °C etüvde 60 dakika bekletilen kesitler, 10' ar dakika 2 ksilol banyosundan geçirilip sırasıyla 2' şer dakika absolü ve %96' lık etil alkolden geçirildi. Histolojik doku takibi sırasında maskelenmiş olması muhtemel doku antijenlerinin ortaya çıkarılması için, kesitler %10' luk pH=6 olan sitrat tamponu (Citrate buffer for Heat-Induced Epitope Retrieval, Lab vision, AP-9003-500) içine koyularak 3-5 dakika su buharı basıncı altında işleme tutuldu. Preparatlar 1 dakika distile suda yıkanıp kesitlerin etrafı kurulanarak özel, kapaklı boyama kabı içine dizildi. İmmunohistokimyasal amaçla kullanılacak enzimlerin dokudaki mevcut benzerleriyle rekabete girmesini önlemek üzere her kesitin üzerine 1' er damla %3' lük hidrojen peroksit (Large volume hydrogen peroxide block, Lab vision, TA-125-HP) damlatılarak 10 dakika sonra, distile su ile 1 dakika ve pH=7,4 olan fosfat tamponu (PBS) ile 5 dakika yıkama yapıldı. Kesitler üzerine sonraki aşamada kullanılacak antikorlar ile tepkimeye girmeyen ve diğer hücre proteinlerini pozitif reaksiyonlara karşı bloklayan ultra V blok (Large volume ultra V block, Lab vision, TA-125-UB) solüsyonundan damlatılarak 5' er dakika muamele edildi. Kesitler yıkanmadan 1/200 çözeltisi hazırlanmış PCNA fare monoklonal antikoru (NeoMarkers, Ab-1 Clone PC10) ile 60 dakika işlem gördü. Bu primer antikor uygulamasını takiben kesitlerin PBS ile 2 kez 5' er dakika yıkanması sağlandı. 10 dakika biyotin (Biotinylated goat anti-mause, Lab vision, TM-125-BN) sekonder antikor muamelesi yapılarak primer antikor bağlanması sağlandı. PBS ile 2 kez 5' er dakika yıkanmış kesitler, biotine bağlanma özelliği gösteren streptavidin (Large volume streptavidin peroxidase, Lab vision, TS-125-HR) ile 10 dakika muamele edildi. PBS ile 2 kez 5' er dakika tekrar yıkanmış doku kesitlerine, çözücü madde (Large volume AEC substrate system, Lab vision, TA-125-HAS) kullanılarak 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) boyar maddesinden (AEC

chromogen, Lab vision, TA-007-HAC) taze hazırlanmış çözelti damlatılarak 3' er dakika boyanması sağlandı. Şale içine alınan tüm kesitler 1 dakika distile su ile yıkandıktan sonra hematoksilin ile 1 dakika boyandı ve distile su ile durulandı. Havada kurutulmuş tüm preparatlar özel yapıştırıcı (Large volume Ultramount, Lab vision, TA-125-UM) kullanılarak lamel ile kapatılıp daimi hale getirildi. Aynı işlemler IL-6 için de uygulanmış olup sadece primer antikor olarak PCNA yerine 1/200 çözeltisi hazırlanmış IL-6 monoklonal antikoru (IL-6 M-19 sc-1265, Santa Cruz Biotechnology) kullanıldı.

H&E boyama yapılmış olan tüm karaciğer kesitlerinde kontrol grubu ile karşılaştırmalı şekilde kör olarak histopatolojik incelemeler gerçekleştirildi. Aynı preparatlarda, rastgele seçilmiş farklı kesit alanlarında 1000 adet parankimal karaciğer hücresinde mitozun çeşitli safhalarını gösteren hücrelerin sayısı tespit edilerek mitotik indeks çıkarıldı (Srivastava, et al. 1994; Kaya vd., 2002; Hou, et al., 2003). PCNA uygulanmış karaciğer kesitlerinde hepatosit proliferasyonu incelendi (Atici, et al., 2003; Hou, et al., 2003). Mikroskobik olarak PCNA işaretli karaciğer hücrelerinin çekirdekleri kahverengi-kızıl, mitotik aktivite göstermeyen hücreler ise mavi-lacivert boyalı olarak görüntülendi. Mitotik indeksin belirlenmesinde olduğu gibi, rastgele seçilmiş farklı kesit alanlarında 1000 adet parankimal karaciğer hücresinde belirlenen PCNA pozitif çekirdekli hücrelerin sayısının % olarak ifadesiyle PCNA indeksi çıkarıldı (Tang, et al., 1997; Aoki, et al., 2001; Gaglio, et al., 2002; Kaya vd., 2002; Hou, et al., 2003). IL-6 immunohistokimyasal uygulanmış karaciğer doku kesitlerinde tüm kesit alanları mikroskobik olarak incelenerek Kupffer hücreleri ile endotel hücrelerin IL-6 sitokin içeriği belirlendi. Deney hayvanlarının herbirine ait kesitlerde IL-6 pozitif olan hücrelerde pempe- kırmızı boyalı görünüm dikkate alınarak IL-6 varlığı 0-1-2 biçiminde sırasıyla az, çok, daha çok anlamlarını ifade edecek şekilde skorlandı.

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

3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde "SPSS 12.0 for windows" versiyonu bilgisayar paket programı kullanıldı. Kan serumlarında analizi yapılmış olan AST, ALT, TNF-α, IL-6; kan dokusunda sayımı yapılmış olan kırmızı (RBC) ve beyaz (WBC) kan hücreleri ile hemoglobin (Hb); kemik iliği hücre sayımından elde edilen veriler; karaciğer ağırlıklarından hesaplanmış olan RO; karaciğer kesitlerinde bakılan mitotik indeks, PCNA indeksi ve IL-6 skorlarının gruplar arasındaki farklılık durumları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi, gruplar arası karşılaştırmalarda ise Tukey Testi kullanıldı. Gruplar arası IL-6 skorlarının farklılık durumu için ayrıca Mann-Whitney U test kullanıldı.

Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (P) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, $P<0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

4. SONUÇLAR

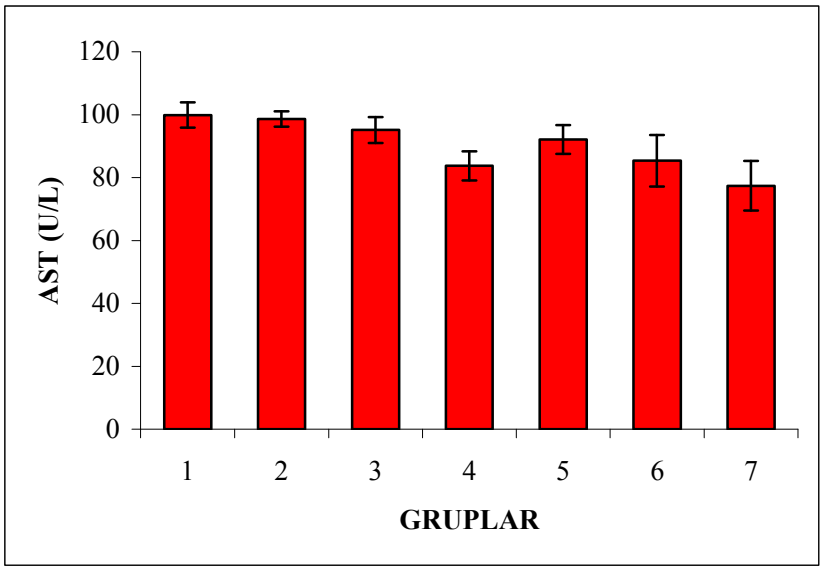
4.1. Kan ve Kemik İliği

Deney hayvanlarına ait kan serumlarının biyokimyasal analizlerinden elde edilen AST, ALT değerleri gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildi (Çizelge 4.1). Buna göre, AST seviyeleri Grup 1, 2 ve 3' de diğer gruplara oranla biraz yüksek görüldü. Ancak, bu durum istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Parsiyal hepatektomi yapılan Grup 5' deki AST serum seviyesi Grup 6 ve 7' ye göre biraz yüksek fakat diğer gruplar ile benzer bulundu (Şekil 4.1). ALT seviyeleri açısından Grup 1, 2, 3 ve 4' ün birbirlerine yakın olduğu saptandı. Grup 5, 6 ve 7' nin serum ALT seviyeleri ise bu dört gruba göre yüksek bulundu (Şekil 4.2). Ancak, tüm gruplar arasında AST ve ALT serum seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir.

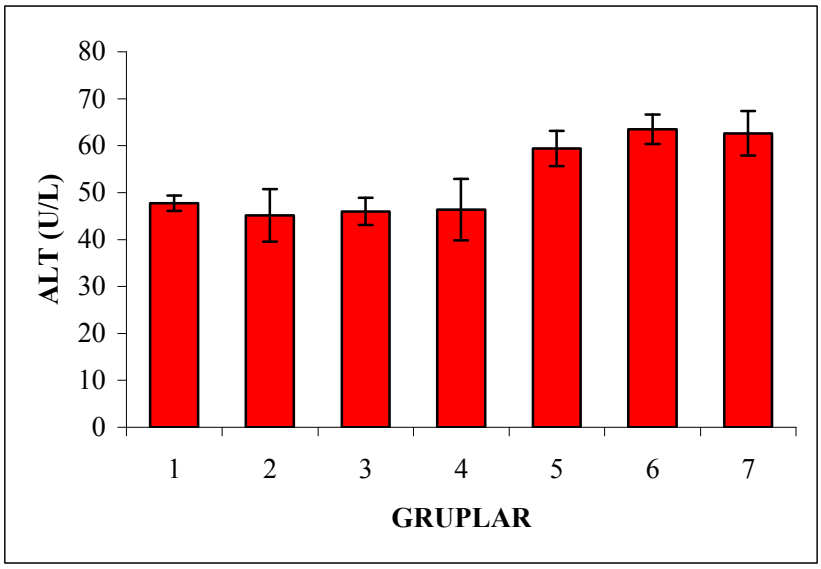
TNF-α ve IL-6 sitokinlerinin serum seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında, TNF-α seviyesinde önemli bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.3). IL-6 seviyesi açısından ise Şekil 4.4' deki standart hata grafiğinde Grup 7' nin diğer gruplara göre yüksek olduğu görülmektedir. Ancak istatistiksel değerlendirmeler sonucunda ise hem TNF-α hem de IL-6 seviyelerinin gruplar arasında önemli bir fark göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Deney gruplarına ait AST, ALT, TNF-α ve IL-6 serum seviyelerinin ortalama değerleri ± standart hataları (P<0.05 anlamlı fark vardır).

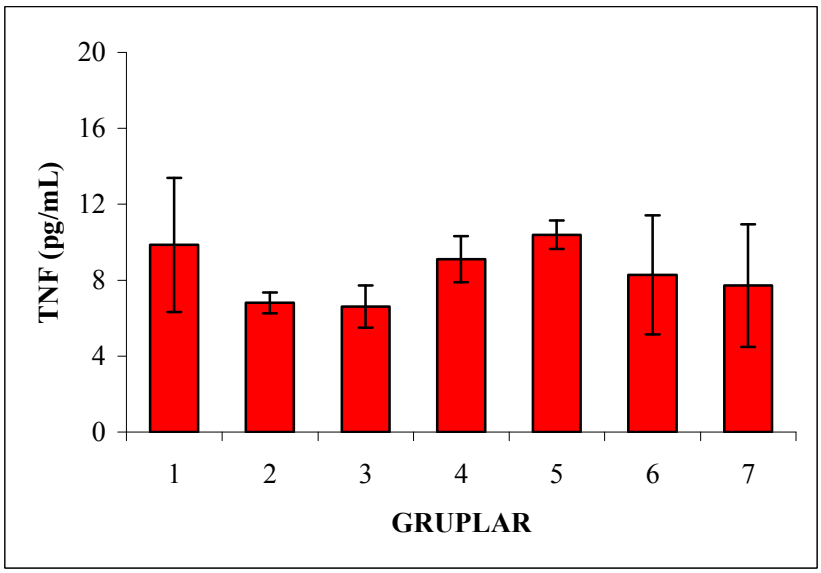
GRUP	**AST** (U/L)	**ALT** (U/L)	**TNF-α** (pg/mL)	**IL-6** (pg/mL)
1	99.88±4.04	47.75±1.64	9.86±3.53	14.00±6.31
2	98.63±2.44	45.13±5.59	6.81±0.55	13.16±7.48
3	95.13±4.12	46.00±2.88	6.61±1.11	9.22±1.65
4	83.75±4.62	46.38±6.55	9.11±1.21	13.48±3.65
5	92.13±4.57	59.38±3.75	10.39±0.75	9.45±1.69
6	85.38±8.20	63.50±3.12	8.28±3.14	14.74±3.79
7	77.38±7.90	62.63±4.72	7.72±3.23	19.94±9.71
P	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05



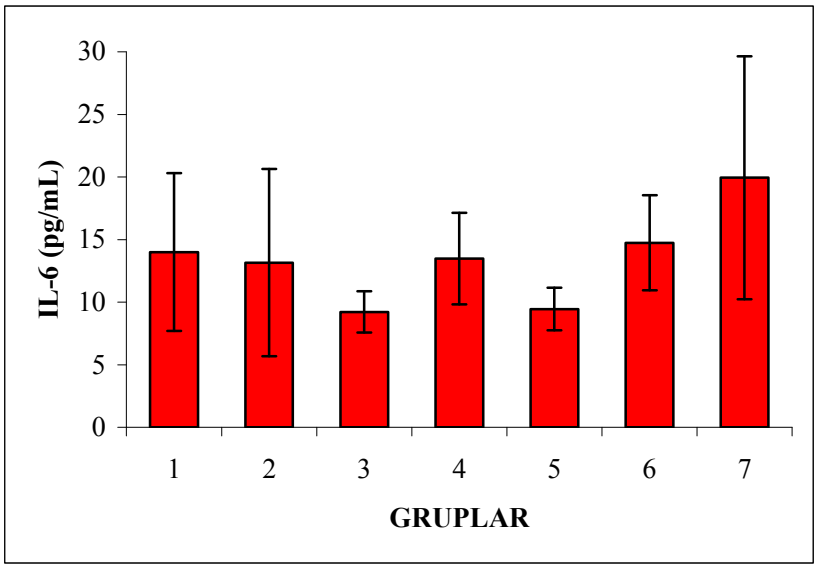
Şekil 4.1 Deney gruplarına ait serum AST seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.



Şekil 4.2 Deney gruplarına ait serum ALT seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.



Şekil 4.3 Deney gruplarına ait serum TNF-α seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.



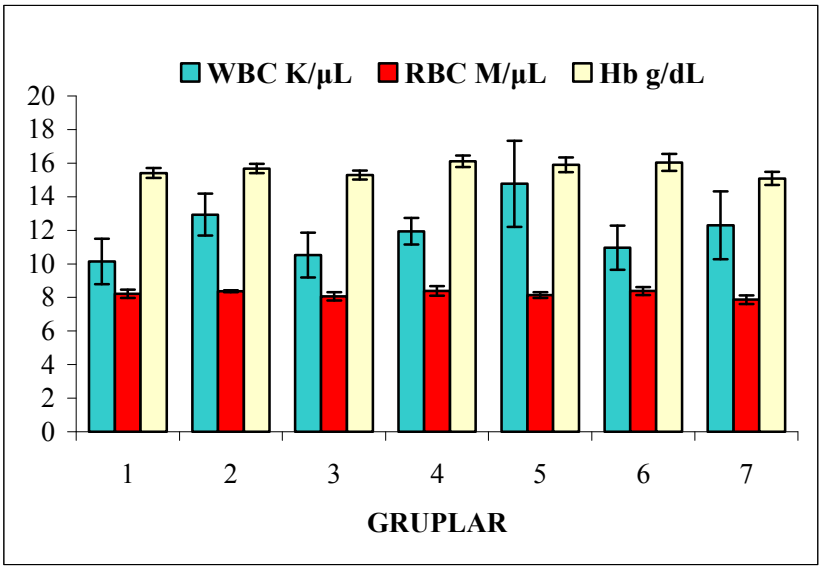
Şekil 4.4 Deney gruplarına ait serum IL-6 seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.

Deney hayvanlarına ait kan örneklerinde sayımı yapılmış olan kırmızı (RBC) ve beyaz (WBC) kan hücrelerinin sayımı ile hemoglobin (Hb) miktar tayininden elde edilen veriler deney grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (Çizelge 4.2; Şekil 4.5).

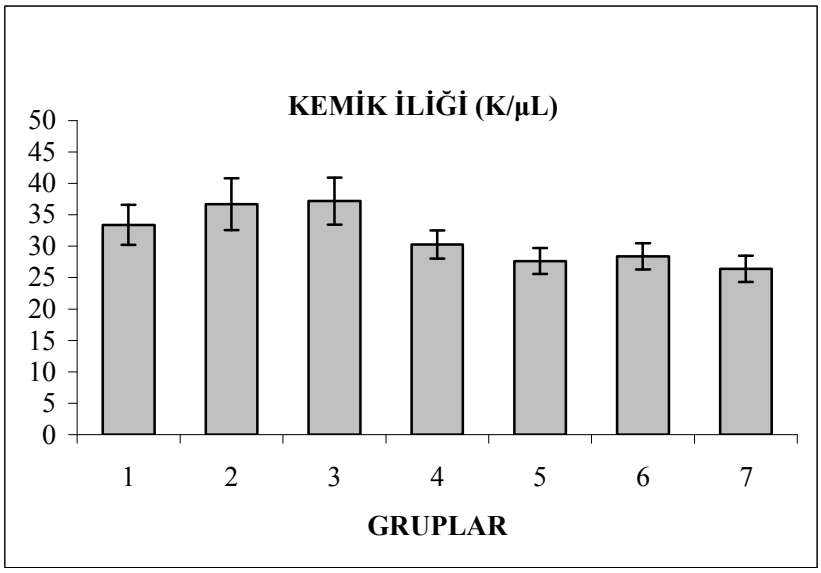
Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6' de görüldüğü gibi deney hayvanlarının femural kemik iliğinde yapılan hücre sayımlarından elde edilen veriler, gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.2 Deney gruplarına ait kan dokusundaki kırmızı (RBC), beyaz (WBC) kan hücrelerinin sayıları ve hemoglobin (Hb) miktarı ile kemik iliği hücre sayılarının ortalama değerleri ± standart hataları ($P<0.05$ anlamlı fark vardır).

GRUP	**WBC** (K/µL)	**RBC** (M/µL)	**Hb** (g/dL)	**K. iliği** (K/µL)
1	10.14±1.35	8.22±0.25	15.41±0.30	33.40±3.19
2	12.93±1.25	8.37±0.06	15.68±0.28	36.70±4.11
3	10.52±1.33	8.06±0.25	15.29±0.26	37.19±3.73
4	11.94±0.79	8.39±0.29	16.11±0.34	30.29±2.24
5	14.77±2.56	8.14±0.17	15.90±0.43	27.63±2.06
6	10.96±1.32	8.38±0.23	16.04±0.50	28.39±2.09
7	12.29±2.02	7.87±0.26	15.09±0.39	26.40±2.11
P	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05



Şekil 4.5 Deney gruplarına ait kan dokusundaki RBC, WBC sayıları ile Hb miktarlarının ortalama ve standart hata grafiği.



Şekil 4.6 Deney gruplarına ait kemik iliği hücre sayılarının ortalama ve standart hata grafiği.

4.2. Karaciğer Dokusu

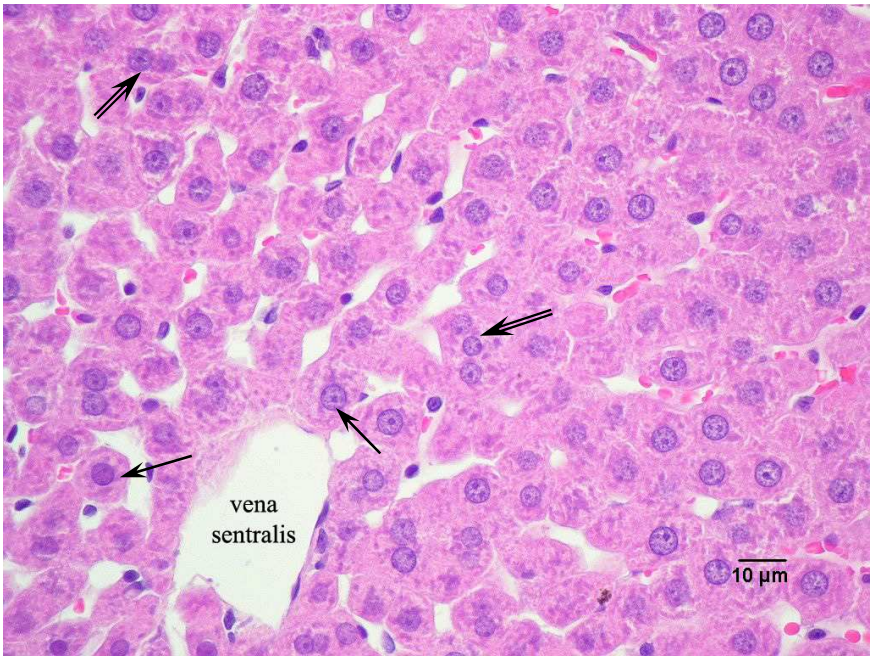
4.2.1. Histolojik değerlendirme

Kontrol grubuna (Grup 1) ait hayvanların karaciğer kesitlerinde, vena sentralis çevresinde yer alan hepatositlerin ışınsal tarzda düzenlenmesiyle oluşturduğu lobüllerin birleştiği bölümlerde, üçgen şeklinde portal alanlar gözlenmektedir. Sinusoid duvarında endotel hücreleri, çekirdeklerinin yassı şekilli ve koyu boyanması ile, Kupffer hücreleri ise çekirdeklerinin endotel hücre çekirdeklerinden daha büyük, oval ya da üçgenimsi şekilleri ile ayırt edilmektedir. Şekil 4.7' de görüldüğü gibi hepatosit çekirdekleri bir ya da iki adet olmak üzere büyük ve yuvarlak şekilli olup sitoplazmaları ise eozinofili göstermektedir. Şekil 4.8; Şekil 4.9 ve Şekil 4.10' da görüldüğü gibi sırasıyla serum fizyolojik (Grup 2), karvakrol (Grup 3) ve silymarin (Grup 4) grubuna ait hayvanların karaciğer kesitlerindeki histolojik yapı kontrol grubu ile benzer şekildedir.

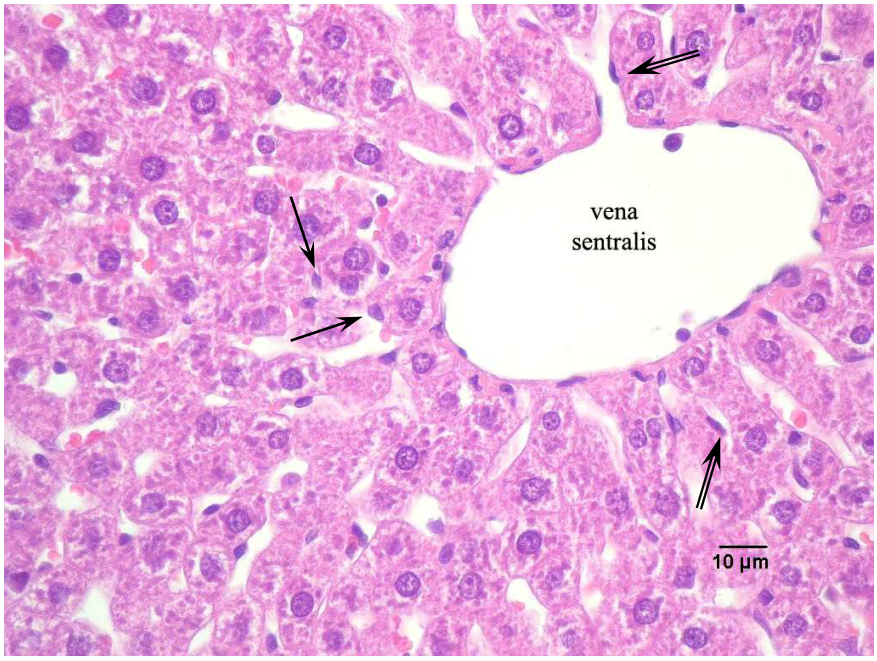
Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubuna (Grup 5) ait hayvanların karaciğer kesitlerindeki hepatositlerde çeşitli safhalardaki mitozun yaygın olduğu

gözlenmekte ve hepatositlerde vakuolizasyon dikkat çekmektedir (Şekil 4.11). Ayrıca Şekil 4.12' de açıkça görüldüğü gibi sinusoidal konjesyon mevcut olup nötrofiller (polimorf nüklear lökosit = PMNL) az sayıdadır. Bu gruba ait kesitler genel olarak değerlendirildiğinde, klasik karaciğer lobül yapısının korunduğu gözlenmiştir.

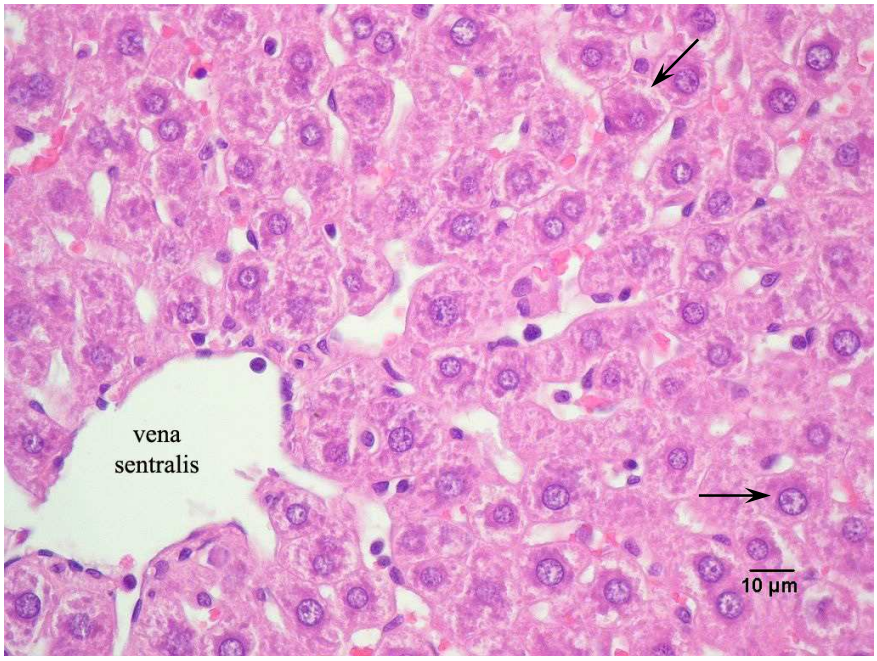
Karvakrol + parsiyal hepatektomi (Grup 6) ve silymarin + parsiyal hepatektomi (Grup 7) gruplarına ait hayvanların karaciğer kesitlerinde, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14' de görüldüğü gibi mitozun çeşitli safhalarındaki hepatositlere sıkça rastlanmaktadır. Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubunun kesitlerindeki hepatositlerde yaygın gözlenen vakuolizasyon oldukça azalmıştır. Sinusoidal konjesyona, karvakrol + parsiyal hepatektomi ve silymarin + parsiyal hepatektomi gruplarına ait hayvanların bazılarında rastlanmıştır. Bu grupların her ikisinde de hepatositlerin korunmuş olduğunu düşünmekteyiz. Gruplar arasında ise fark gözlenmemiştir.



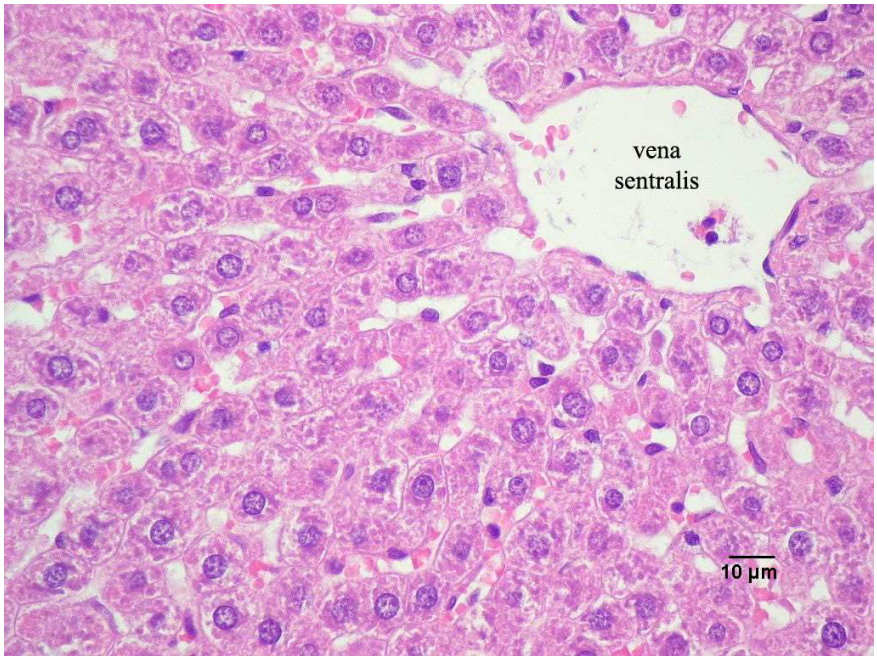
Şekil 4.7 Kontrol grubu (Grup 1) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde vena sentralis çevresindeki bir (↗) ve iki çekirdekli (↗↗) hepatositler.



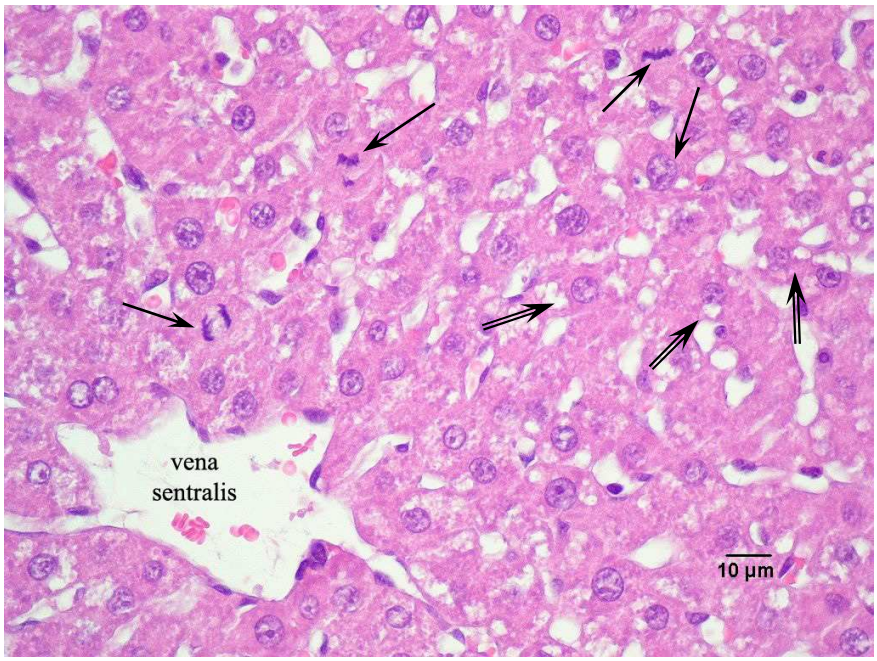
Şekil 4.8 Serum fizyolojik grubu (Grup 2) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde Kupffer hücreleri (↗) ve sinusoidlerde endotel hücreleri (⇗).



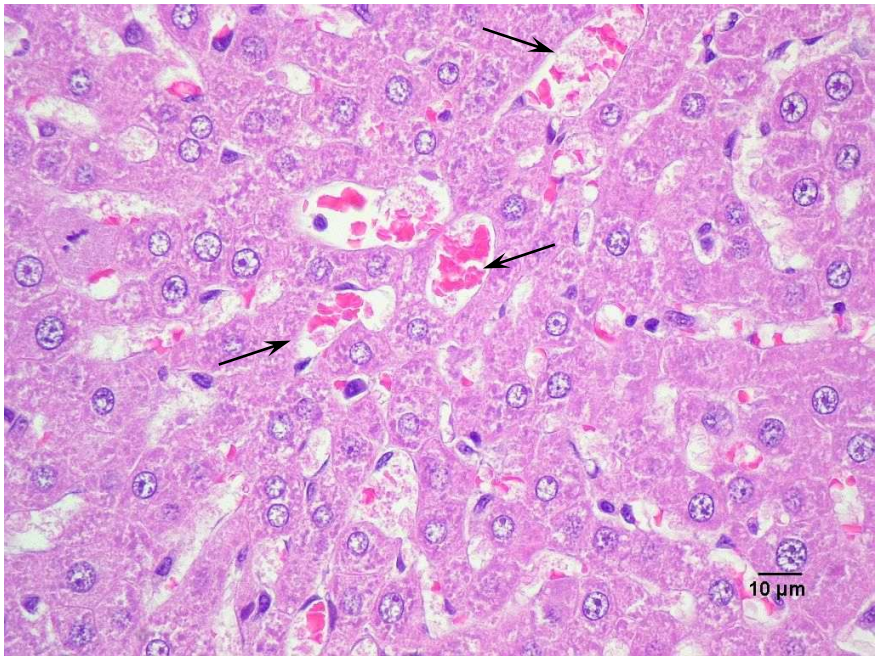
Şekil 4.9 Karvakrol grubu (Grup 3) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde sentral zondaki eozinofilik sitoplazmalı hepatositler (↗).



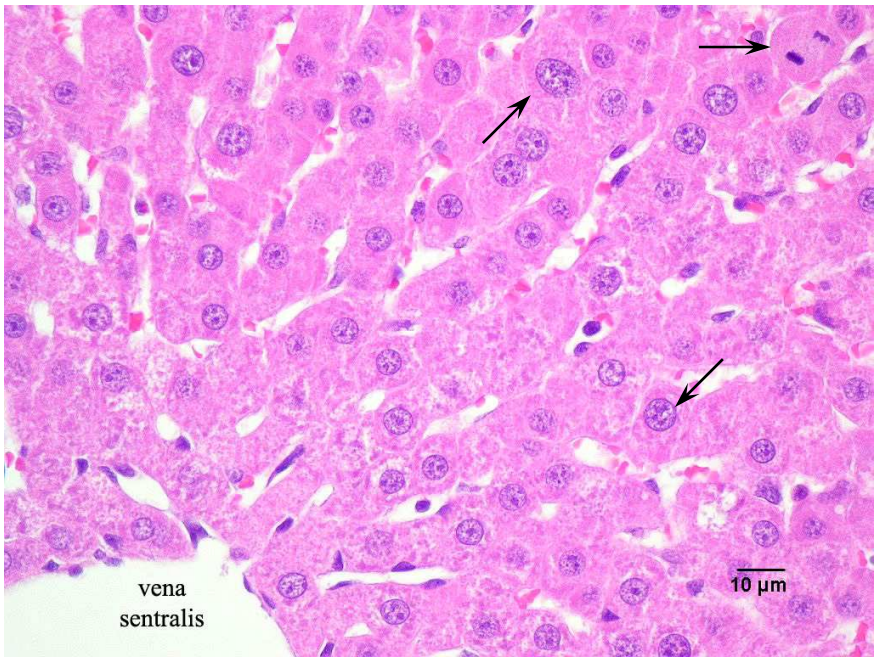
Şekil 4.10 Silymarin grubu (Grup 4) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde normal görünümlü hepatositler.



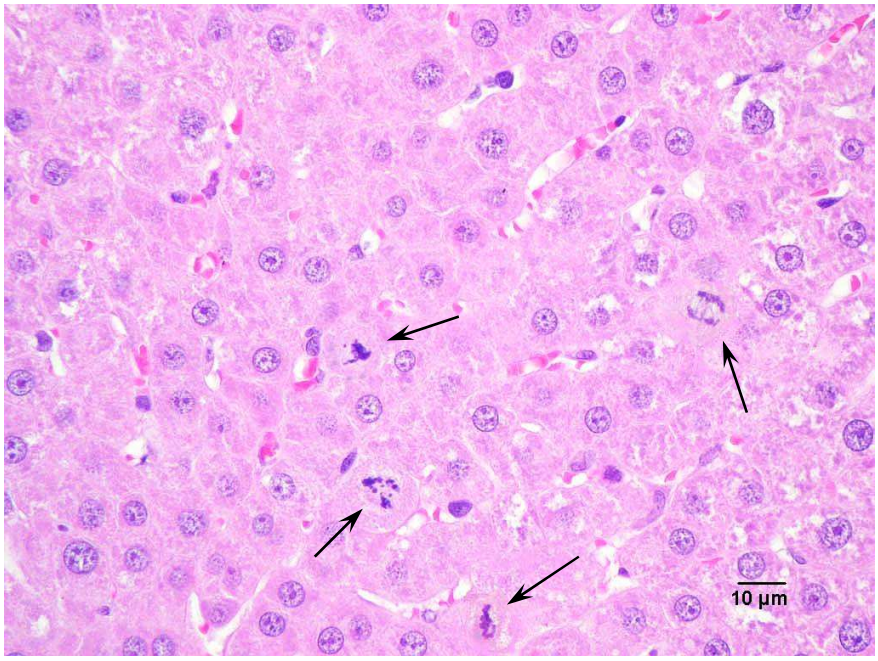
Şekil 4.11 Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 5) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler (↗) ile hepatositlerde yaygın vakuolizasyon (⇗).



Şekil 4.12 Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 5) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde sinusoidal konjesyon (↗).



Şekil 4.13 Karvakrol + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 6) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler (↗).



Şekil 4.14 Silymarin + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 7) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler (↗)

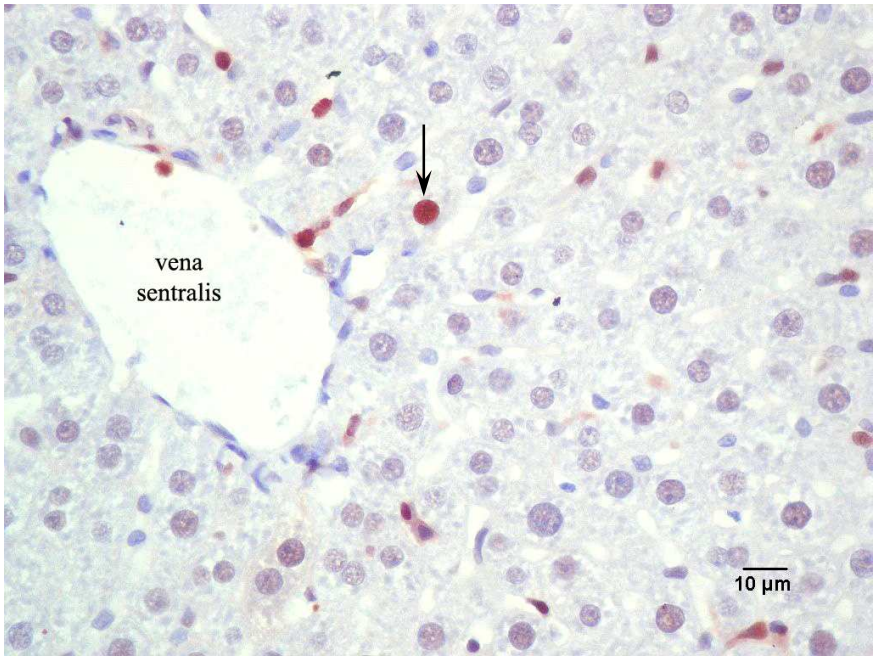
4.2.2. Karaciğer rejenerasyon oranı, mitotik indeks ve PCNA indeksi

Parsiyal hepatektomi yapılmış olan Grup 5, 6 ve 7' de 0. saatte ve 72. saatte alınan karaciğerlerin yaş ağırlıkları R.O. formülünde hesaplanarak üç grup arasında yapılan değerlendirmeler Çizelge 4.3' de görülmektedir. Şekil 4.19' dan da anlaşılacağı gibi karaciğer rejenerasyon oranına göre, Grup 5 ile karşılaştırıldığında Grup 6 ve 7 yüksek tespit edildi ve istatistiksel olarak ($P<0.05$) anlamlı fark bulundu. Grup 6 ve 7 R.O.' ları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark görülmedi.

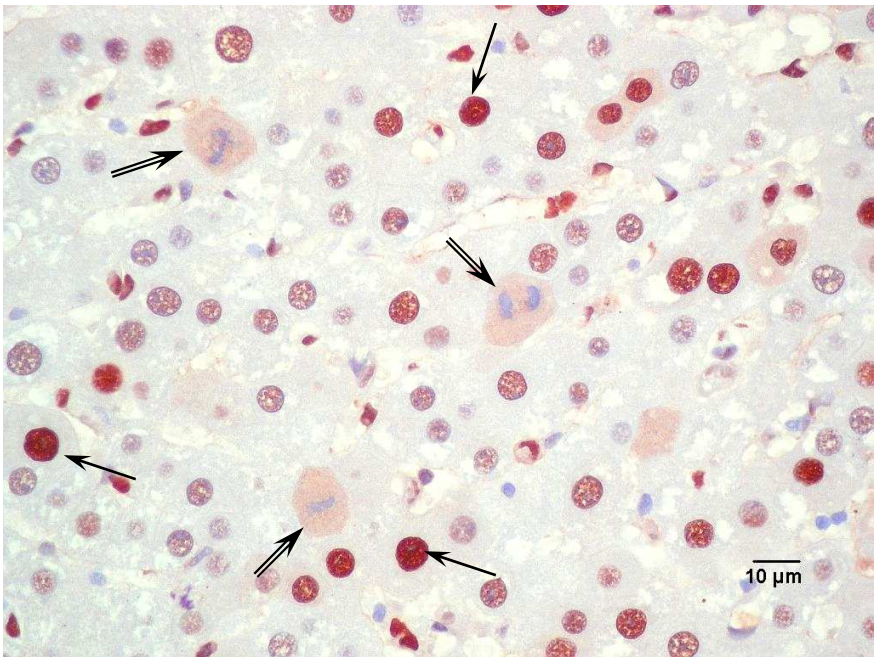
Karaciğer kesitlerinin H&E boyama yapılmış preparatlarında mitoz gösteren hepatositlerin, göstermeyenlere oranı ile elde edilen mitotik indeks verileri tüm gruplar arasında karşılaştırıldı. Grup 1, 2, 3 ve 4' e ait kesitlerde mitoz gösteren hepatositlere rastlanmadı. Bu gruplar arasında hem sayısal değerler açısından hem de istatistiksel anlamda fark görülmedi (Şekil 4.20). Grup 5, 6 ve 7 kendi aralarında mitotik indeks

açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup 5 ile 6 arasında ($P<0.01$), 5 ile 7 arasında ($P<0.001$) ve 6 ile 7 arasında ($P<0.05$) önemli fark belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Parsiyal hepatektomi yapılmış olan Grup 5, 6 ve 7' nin karaciğer kesitleri incelendiğinde çok sayıda mitoz gösteren ve mitozun çeşitli safhalarındaki hepatositlerle karşılaşıldı.

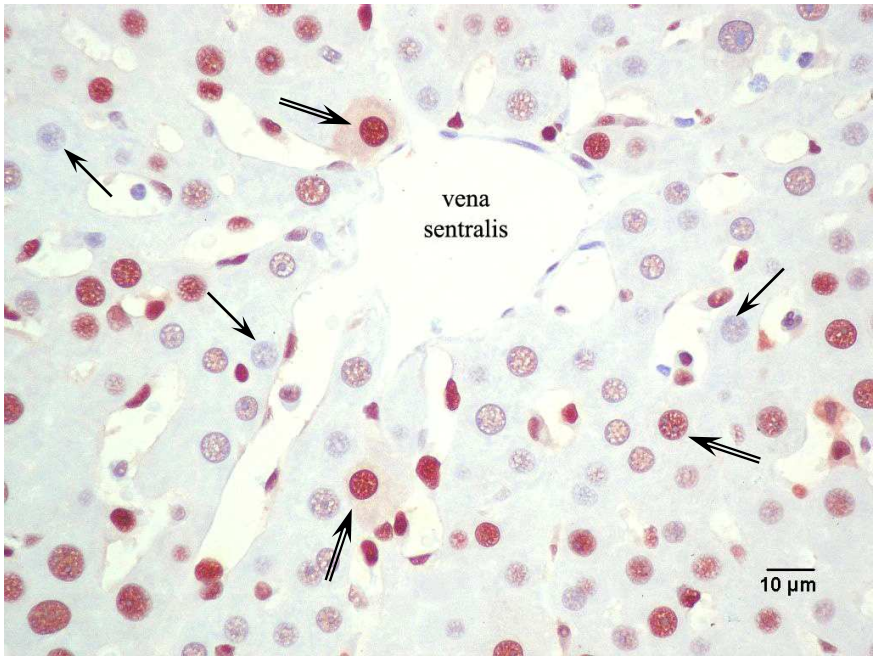
Karaciğer kesitlerinde immunohistokimyasal olarak PCNA işaretlemesi yapılan bütün gruplar incelenerek, PCNA pozitif gösteren hepetositlerin, PCNA negatif gösterenlere oranı ile elde edilen PCNA indeks verileri tüm gruplar arasında karşılaştırıldı (Çizelge 4.3; Şekil 4.21). Grup 1, 2, 3 ve 4 arasında hem sayısal değerlerde hem de istatistiksel olarak PCNA indeksi açısından fark görülmedi. Şekil 4.15' de örnek gösterildiği gibi Grup 1, 2, 3 ve 4' e ait kesitlerde PCNA pozitif hepatositlere çok az sayıda rastlandı. Grup 5, 6 ve 7 ise kendi aralarında PCNA indeksi açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup 5 ile 6 arasında ($P<0.001$), 5 ile 7 arasında ($P<0.001$) ve 6 ile 7 arasında ($P<0.05$) önemli fark görüldü. Parsiyal hepatektomi yapılmış olan Grup 5, 6 ve 7' nin karaciğer kesitlerinde sırasıyla Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18' de gösterildiği gibi çok sayıda PCNA pozitif ve mitoz bölünmenin çeşitli safhalarında bulunan hepatositlere rastlandı.



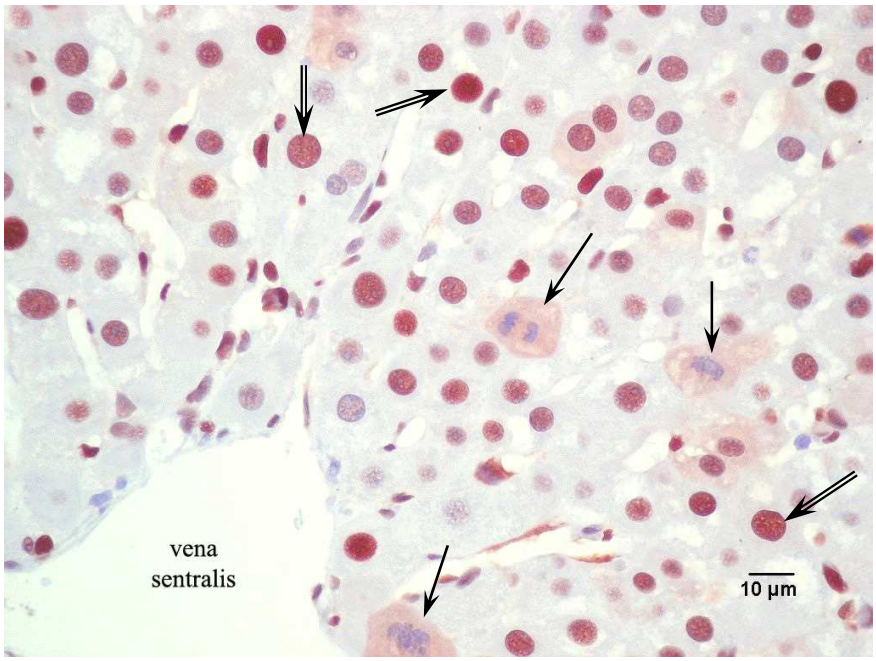
Şekil 4.15 Kontrol grubuna ait hayvanların karaciğer kesitinde çok az sayıda PCNA pozitif hepatosit (↗).



Şekil 4.16 Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 5) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde çok sayıda PCNA pozitif hepatositler (↗) ile mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler (↗).



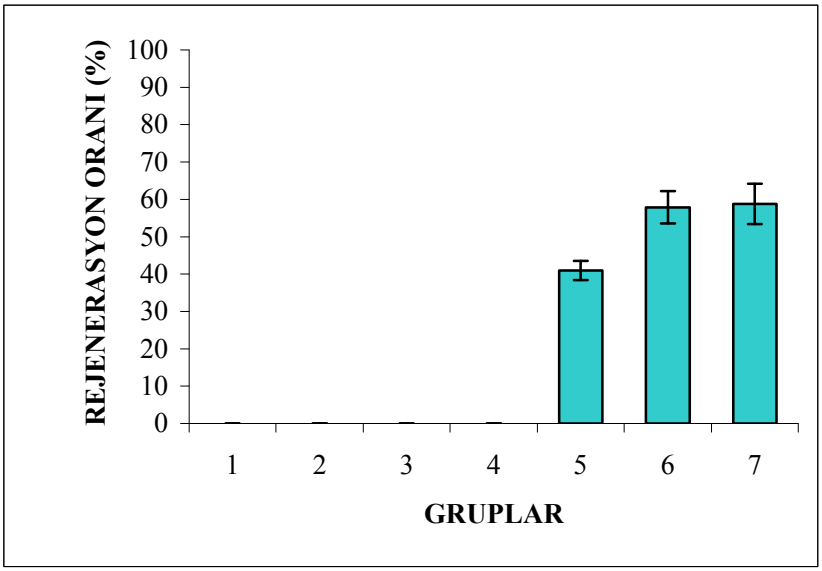
Şekil 4.17 Karvakrol + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 6) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde PCNA pozitif (⇗) ve PCNA negatif (↗) hepatositler.



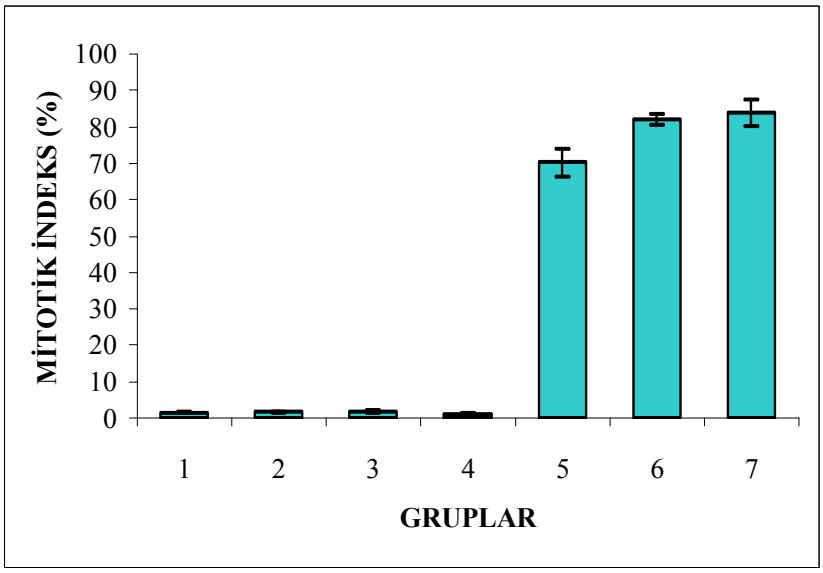
Şekil 4.18 Silymarin + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 7) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde PCNA pozitif hepatositler (⇗) ile mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositler (↗).

Çizelge 4.3 Deney gruplarına ait karaciğer dokularında R.O., mitotik indeks ve PCNA indeksi ortalamaları ± standart hataları ile IL-6 skorlarının ortalama değerleri (P<0.05 anlamlı fark vardır).

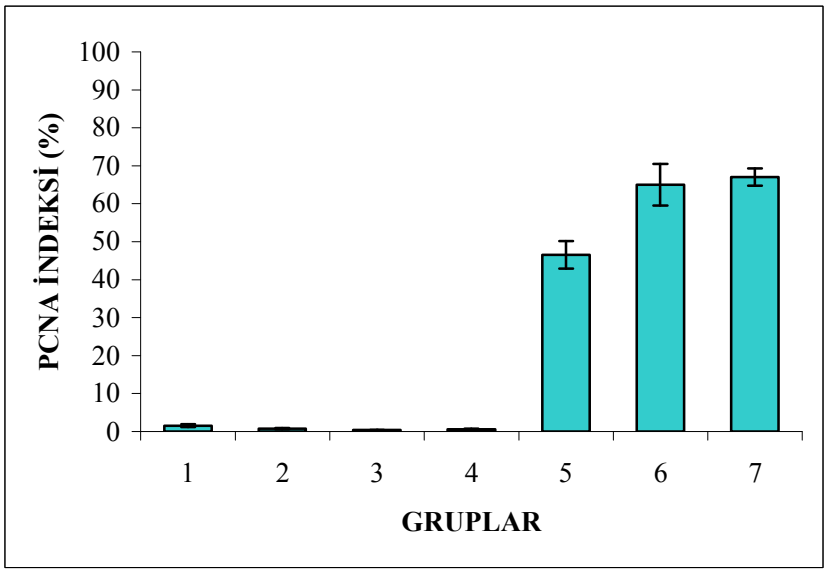
GRUP	**R.O.** (%)	**MİTOZ** (%)	**PCNA** (%)	**IL-6**
1	-	15.25±0.18	1.55±0.38	0.38
2	-	16.50±0.30	0.78±0.16	0.38
3	-	18.25±0.25	0.40±0.06	0.38
4	-	11.75±0.16	0.59±0.18	0.50
5	40.96±2.61	70.17±3.82	46.53±3.62	0.88
6	57.85±4.33*	81.96±1.55**	65.01±5.52***	0.88
7	58.78±5.41*	83.86±3.57***	67.04±2.28***	1.00
P	**5-6: P<0.05** * **5-7: P<0.05** * 6-7: P>0.05	**5-6: P<0.01**** **5-7: P<0.001***** 6-7: P>0.05	**5-6: P<0.001***** **5-7: P<0.001***** 6-7: P>0.05	P>0.05



Şekil 4.19 Deney gruplarına ait karaciğer rejenerasyon oranlarının ortalama ve standart hata grafiği.

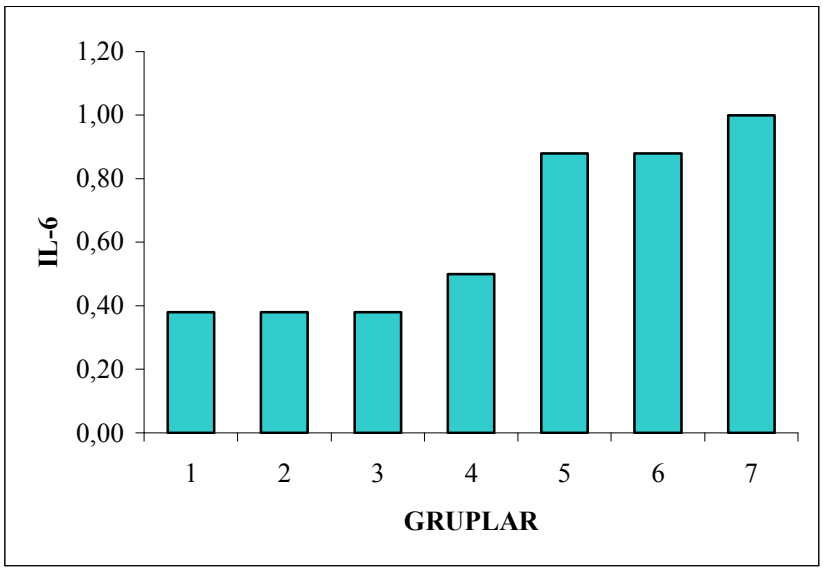


Şekil 4.20 Deney gruplarına ait karaciğer kesitlerindeki hepatosit mitotik indekslerinin ortalama ve standart hata grafiği.

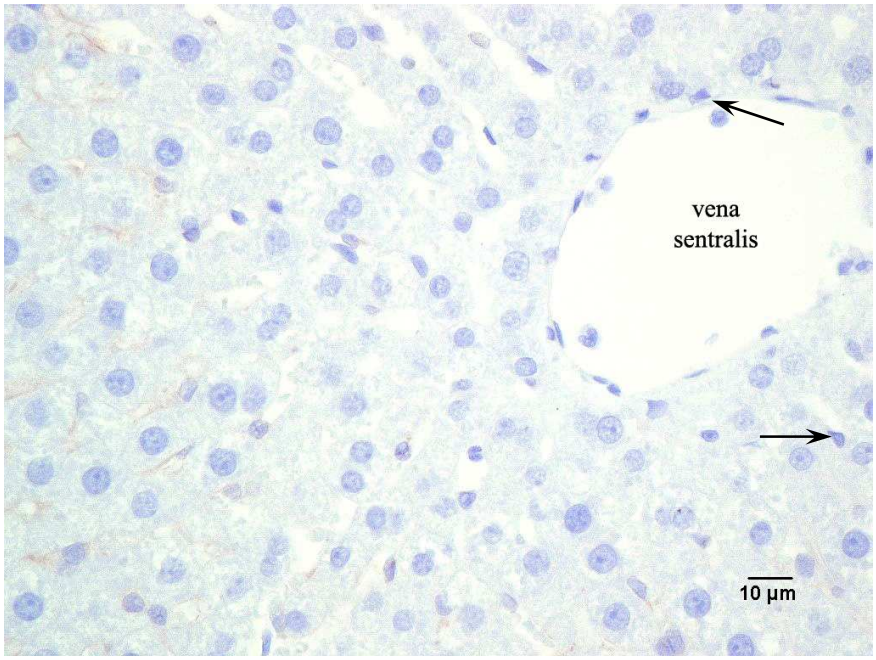


Şekil 4.21 Deney gruplarına ait karaciğer kesitlerindeki hepatosit PCNA indekslerinin ortalama ve standart hata grafiği.

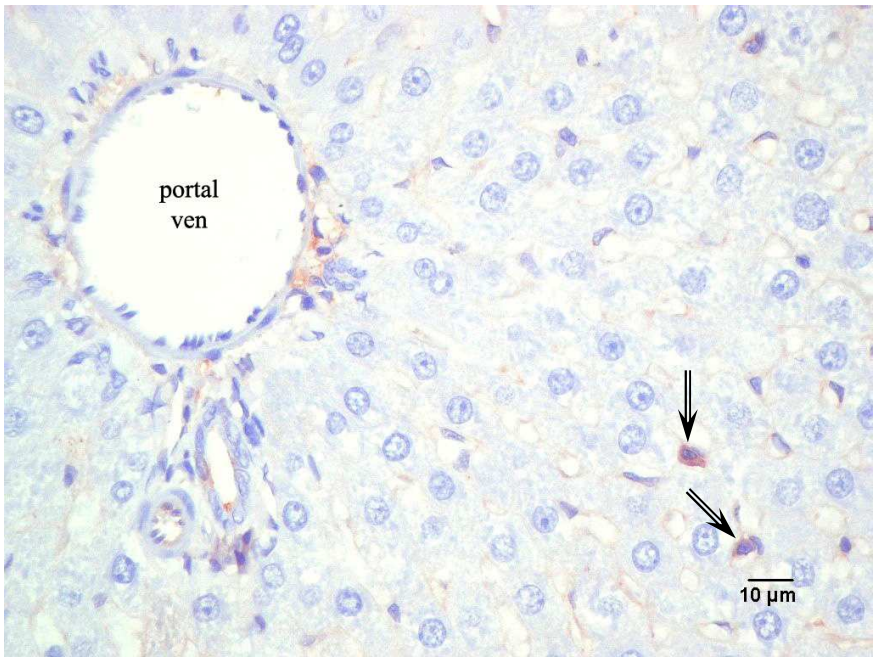
IL-6 immunohistokimyasal uygulaması yapılmış olan tüm gruplara ait karaciğer kesitleri incelenerek. IL-6 pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücrelerinin varlığına göre yapılan skorlamalar gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Bkz. Çizelge 4.3; Şekil 4.22). Grup 1, 2, 3 ve 4' e ait kesitlerin bir kaçında IL-6 pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücrelerine az rastlanırken bir çok kesitte Şekil 4.23' de görüldüğü gibi IL-6 pozitif reaksiyon gösteren hücrelere hiç rastlanmadı. Grup 5' in karaciğer kesitlerinde 1, 2, 3 ve 4. gruplara göre IL-6 pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücrelerine rastlanırken (Şekil 4.24) 6 ve 7. grupların karaciğer kesitlerinde 5. gruba göre daha fazla IL-6 pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücrelerine rastlandı (Şekil 4.25; Şekil 4.26; Şekil 4.27; Şekil 4.28). Gruplar arasında IL-6 pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücrelerinin skorları açısından istatistiksel olarak fark görülmedi. Parsiyal hepatektomi yapılan grupların karaciğer kesitlerinde Şekil 4.28' de örnek olarak gösterildiği gibi sinusoidlerde IL-6 pozitif reaksiyon veren endotel hücrelerine de rastlandı.



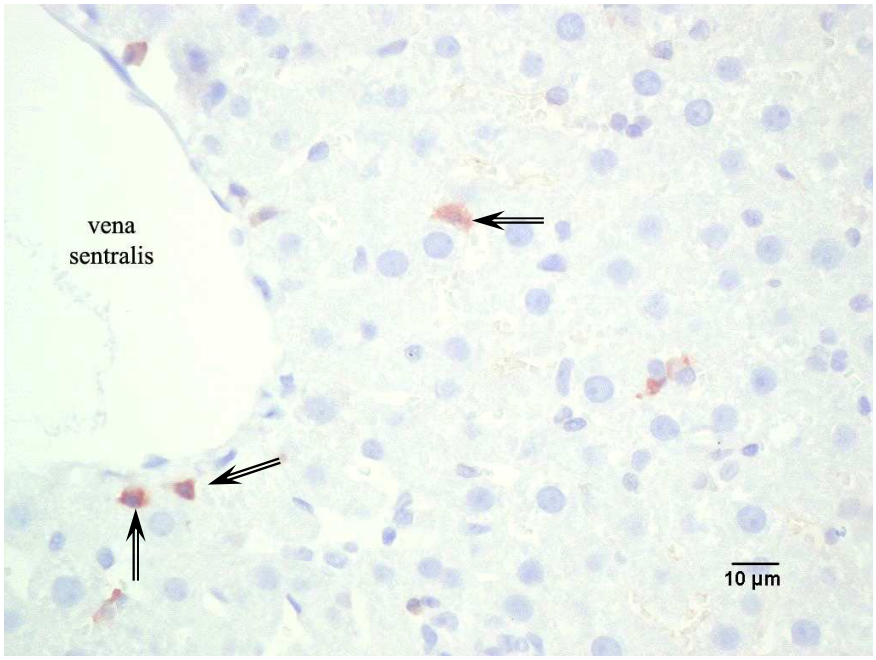
Şekil 4.22 Deney gruplarına ait karaciğer kesitlerinde IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri varlığının ortalama skor değerleri grafiği.



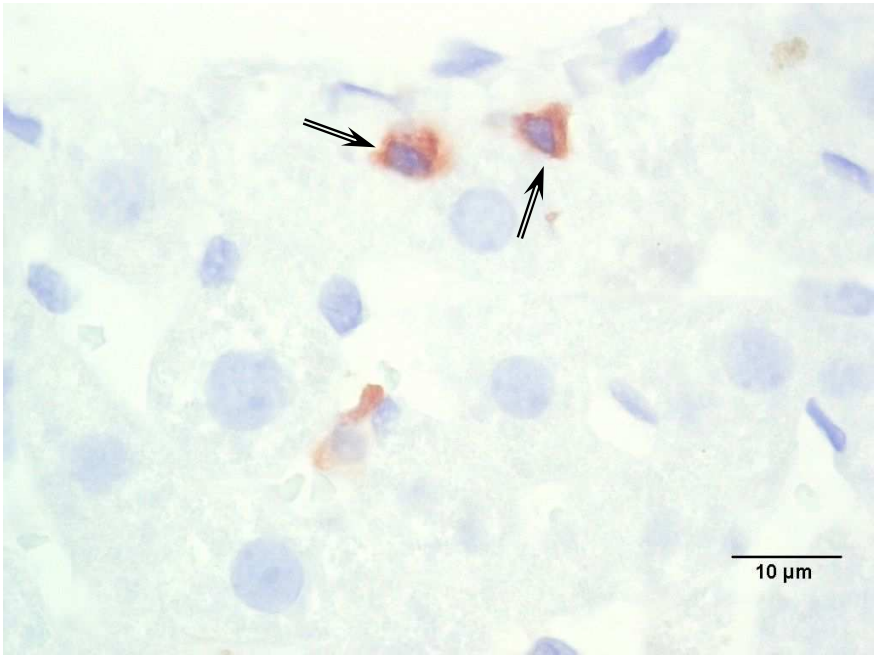
Şekil 4.23 Kontrol grubuna ait hayvanların karaciğer kesitlerinde IL-6 için negatif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri (↗).



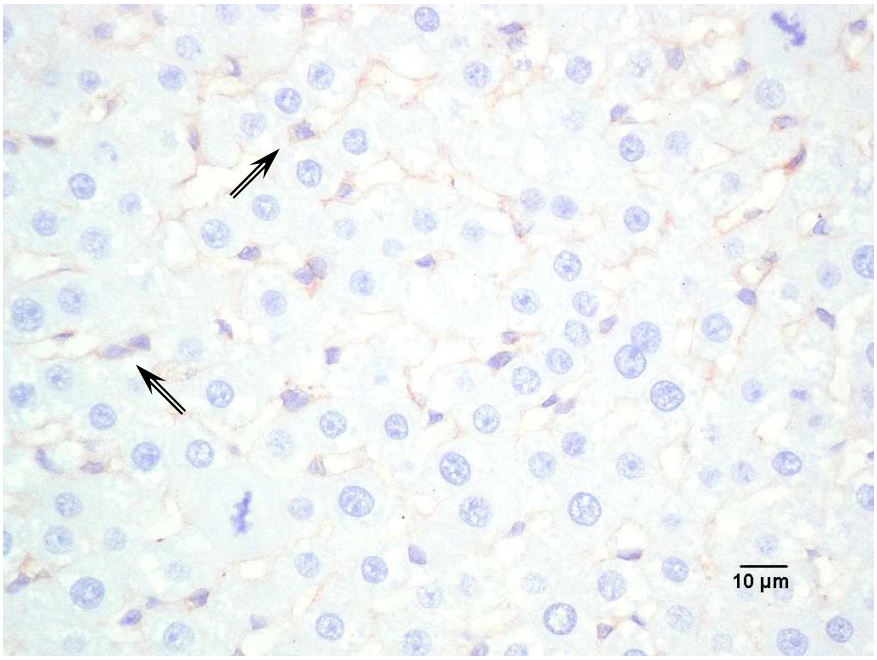
Şekil 4.24 Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 5) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri (⇗).



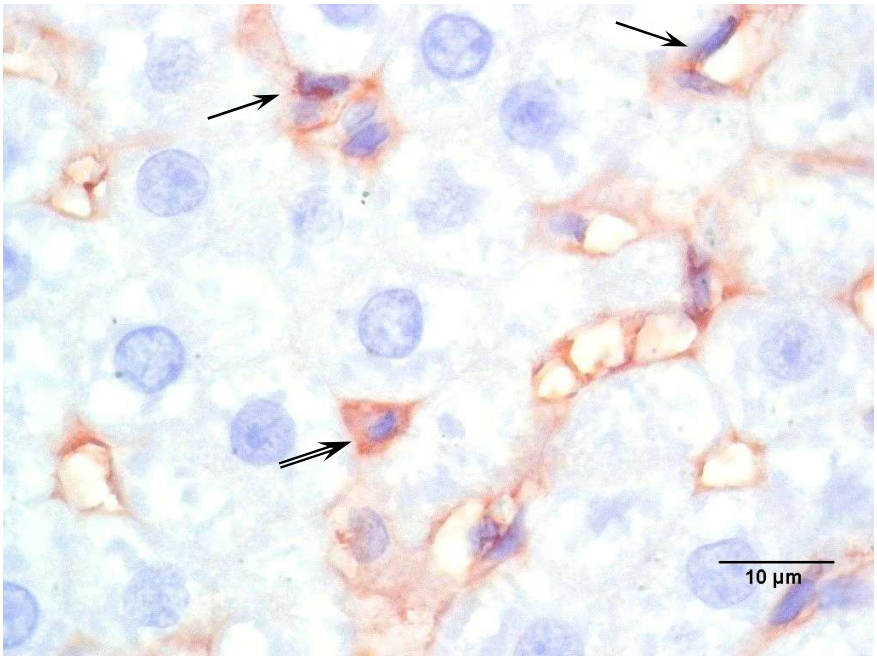
Şekil 4.25 Karvakrol + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 6) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri (⇗).



Şekil 4.26 Karvakrol + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 6) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde büyük büyütmelerde detaylı olarak gözlenen IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri (⇗).



Şekil 4.27 Silymarin + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 7) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücreleri (⇗).



Şekil 4.28 Silymarin + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 7) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde büyük büyütmelerde detaylı olarak gözlenen IL-6 için pozitif reaksiyon gösteren Kupffer hücresi (⇗) ve sinusoidlerdeki endotel hücreleri (↗).

5. TARTIŞMA

Bir organın parçasının eksilmesi ya da hasar görmesinden sonra doku kütlesini yeniden tamamlayabilmesi yeteneği rejenerasyon olarak tanımlanmıştır (Fernandez, et al., 2004). Karaciğerin önemli doku kayıplarında hücreler arası etkileşim ve karmaşık bir medyatör ağı sayesinde kendisini onarabilme yeteneğine sahip olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Higgins and Anderson. 1931; Hou, et al., 2003). Karaciğer rejenerasyonu ile ilgili çalışmaların çoğunda deney hayvanlarında önceden var olan hasarlı karaciğer üzerinde çalışılmış ya da kimyasal maddeler kullanılarak veya parsiyal hepatektomi yapılarak karaciğerde hasar oluşturulmuştur (Palmes and Spiegel, 2004) . Palmes and Spiegel, (2004) sıçanlarda her bir karaciğer lobunun tüm karaciğer loblarının toplam kütlesine oranlarını belirterek parsiyal hepatektomi çalışmalarında kullanılan modeli açıklamışlardır. Toplam karaciğer kütlesine göre sağ lob %38, sol lob %30, kuyruk lobu %8 ve iki parçalı olan quadrat (dörtgen) lob ise %10 oranında bir kütleyi içermektedir. Sıçanlarda yapılan parsiyal hepatektomi araştırmalarına en uygun model olarak karaciğerin %68-70' lik bir kısmının rezeke edilmesi olduğu belirtilmiştir (Ebrenfried, et al., 1997).

Rejenerasyon sırasında hepatosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla yapılan araştırmalarda bazı karaciğer enzimlerinin serum seviyeleri ölçülmüştür. Araştırmalarda hücre zarının geçirgenliğindeki değişimlerin, hücrelerin sentezleme faaliyetlerinin ve hücrelerde meydana gelebilecek nekroz gibi çoğu hasarın göstergesi olarak karaciğerdeki aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) ve alkaline phosphatase (ALP) gibi enzimlerin plazmadaki miktarlarının önemi bildirilmiştir (El-Ashmawy, et al., 2005). Bununla birlikte karaciğer rejenerasyonunda önemli rol oynayan TNF-α ve IL-6 sitokinleri (Scotte, et al., 1997; Iwai, et al., 2001) ile HGF, TGF-α, IL-1 ve TGF-β gibi faktörlerin serum seviyelerinin belirlenmesi (Kay and Fausto, 1997; Ankoma-Sey, 1999; Andıran, et al., 2000; Hou, et al., 2003), hepatositlerin bölünerek çoğalmalarına ilişkin indekslerin çıkarılması (Furuta, et al., 2000; Palmes and Spiegel, 2004) karaciğerde rejenerasyonun durumu hakkında bilgi verebilmektedir.

Bu şekilde yapılan deneysel çalışmalar model alınarak yapmış olduğumuz çalışmada sıçan karaciğerinin sağ ve sol lobları çıkarılarak yaklaşık %68 parsiyal hepatektomi yapılmıştır. Çalışmamızın sonuçları daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında AST ve ALT serum seviyeleri açısından benzerlik görülmüştür. Hou, et al. (2003) tarafından yapılan çalışmada sıçanlara parsiyal hepatektomiden 30 dakika önce test amaçlı olarak FR167653 isimli organik bir bileşik çeşitli dozlarda damar yoluyla verilerek bu bileşiğin rejenerasyon ve bazı sitokinlerin salınımı üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada %70 parsiyal hepatektomi sonrasında belirli aralıklarla sıçanların tüm karaciğeri alınıp karaciğerdeki ağırlık artışı tespit edilerek iyileşmeye bakılmıştır. Bunun yanında karaciğer enzimlerinin serum seviyelerine bakılarak hepatositlerin fonksiyonel durumları tespit edilmiştir. Sonuçta, parsiyal hepatektomi yapılmış olan kontrol gruplarında AST ve ALT serum seviyeleri başlangıçta yüksek iken 72. saatte normal değerlerine gelmiş ve karaciğer iyileşme göstermiştir. %70 parsiyal hepatektomiden 14 gün sonra %30 oranında karaciğer kesimi ile ikinci bir parsiyal hepatektominin yapıldığı bir çalışmada da serum AST ve ALT seviyelerinin 72 saat sonra normal düzeye geldiği bildirilmiştir (Aoki, et al., 2001) . Sıçanlarda %70 parsiyal hepatektomi yanında %50 pankreatektomi yapan Furuta, et al. (2000) ise araştırmalarında AST ve ALT serum seviyelerinin 72. saatte normal değere düştüğünü göstermişlerdir. Li, et al. (1999) ve Fan, et al. (2002) parsiyal hepatektomiden sonraki 72. saatte serum ALT seviyesinin kontrol hayvanları ile aynı olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda da serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi deney grubunda (Grup 5) AST ve ALT seviyelerinin 72. saatte normal değerde olduğu, bu nedenle sonuçlarımızın yapılmış olan diğer araştırmaların sonuçlarıyla benzer olduğu görülmüştür.

Hepatositlerde oluşabilecek fonksiyon bozukluğunun genel olarak AST ve ALT enzimlerinin serumda artmasına göre değerlendirilebileceği de bildirilmiştir (Aoki, et al., 2001). Bu bilgiler ve araştırmalar doğrultusunda yaptığımız çalışmada enzim seviyelerinde görmüş olduğumuz düzelme sonucunda hepatositlerde fonksiyonel olarak bir iyileşmenin olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızdaki Grup 6 ve 7' de sırasıyla karvakrol ve silymarin enjeksiyonlarından 60 dakika sonra parsiyal hepatektomi yapılmış olup, Grup 5' deki gibi 72 saat sonra kan serumları alınmıştır. Bu grupların serumlarındaki AST ve ALT seviyelerinin Grup 5 ile yaklaşık aynı değerlerde olması

karvakrol ve silymarinin enzim seviyeleri yönünden hepatosit fonksiyonları üzerine olumsuz etkilerinin bulunmadığını gösterir niteliktedir.

Oliveira, et al. (2001) karaciğerde iskemik hasar oluşturarak silymarinin histolojik olarak karaciğer hasarı üzerine koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarının sonucunda, karaciğer hasarının azalarak hasar sonrası AST ve ALT değerlerinin düştüğünü rapor etmişlerdir. Ayrıca, insanlarda kronik hepatitli ve sirozlu hastalarda silymarin kullanımının, yüksek olan AST ve ALT değerlerini düşürdüğü belirtilmiştir (Luper, 1998). Yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu bilinen silymarinin hücre zarlarını ve zar geçirgenliğini serbest oksijen radikalleri (SOR)' ne karşı koruduğu (Ramadan, et al., 2002) göz önünde bulundurulduğunda AST ve ALT serum seviyelerinin karaciğer hasarından sonra normal seviyeye gelmesi beklenen bir sonuç olmuştur.

Son yıllarda yayınlanmış olan bir kaç araştırmada karvakrolün antioksidan olarak değerlendirilebileceği yer almaktadır (Kulisic, et al., 2004; Sökmen, et al., 2004). Bu bilgiler doğrultusunda yaptığımız çalışmada da test maddemiz olan karvakrolün silymarin gibi antioksidan özelliği ile hepatositleri koruyabileceği fikrini şekillendirmektedir. Ayrıca, parsiyal hepatektomiden kısa bir süre önce verilen antioksidan maddelerin SOR' ni toplayarak karaciğerde lipid peroksidasyonunu engellediği ve karaciğer rejenerasyonunu yükselttiği bildirilmiştir (Fukuhara, et al., 1999). Hepatektomi öncesi karvakrol uygulanan Grup 6' da AST ve ALT serum seviyelerinin silymarin + hepatektomi grubuna (Grup 7) benzer şekilde normal değerlerde olması nedeniyle karvakrolün hepatositlerde oluşan hasarı önlediği görüşündeyiz.

Çalışmamızda karaciğer kesitlerinde yapılan histolojik incelemeler sonucunda Grup 5' de yaygın olarak gözlediğimiz vakuolizasyon dikkat çekicidir. Hou, et al. (2003) parsiyal hepatektomi yapılmış sıçanların rejenere olan karaciğerlerinde yaptıkları histolojik incelemelerde, vakuolizasyon olarak adlandırdığımız görünümler ile karşılaşmışlardır. Araştırmacılar bu görünümlerin lipid birikimi olduğunu belirtmişler ayrıca, test amaçlı olarak kullandıkları organik bileşiğin hepatositlerdeki lipid birikimini azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda karaciğer kesitlerinde gözlediğimiz vakuolizasyonun Grup 7' de son derece azalmış olması silymarinin karaciğer hasarını önlediğini belirten araştırmalarla uyumludur. Grup 6' da Grup 7' ye benzer şekilde

hepatositlerdeki vakuolizasyonun son derece azalmış olması, çalışmamızın test maddesi olan karvakrolün de karaciğer hücrelerini parsiyal hepatektomi hasarına karşı koruyabildiği yönünde önemli bir bulgudur.

TNF-α ve IL-6 sitokinlerinin karaciğer rejenerasyonunda önemli rol oynadığı bir çok araştırmada bildirilmiştir (Scotte, et al., 1997; Iwai, et al., 2001). Iwai, et al. (2001) tarafından sıçanlarda parsiyal hepatektomiden 24 saat sonra TNF-α ve IL-6 sitokinlerinin seviyelerinde yükselme olduğu ve 48 saat sonra en yüksek seviyeye ulaştığı, 72. saatte ise kontrol grubu hayvanlarında belirlenmiş olan normal seviyeye düştüğü belirtilmiştir. Scotte, et al. (1993) tarafından ise karaciğer rejenerasyonunun devam ettiği süreçte normal olarak IL-6 üretiminin olmadığı sadece başlangıçta üretildiği ifade edilmiştir. Scotte, et al. (1997) yaptıkları bir başka çalışmanın sonuçlarına göre, IL-6 serum seviyesi parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 24. saatte en yüksek değerde iken sonraki saatlerde düşerek normal seviyeye geldiği belirtilmiştir. Araştırmamızda da TNF-α ve IL-6 sitokinlerinin parsiyal hepatektomiden 72 saat sonra tespit ettiğimiz serum seviyeleri tüm deney grupları arasında yakın değerlerde bulunmuştur. Bu değerler, yapılan çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Kaya vd. (2002) parsiyal hepatektomiden sonraki 24- 48 saatler arasında IL-6 serum seviyesinin en yüksek değere ulaştığını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar karaciğer kesitlerinde de immunohistokimyasal olarak Kupffer hücrelerindeki IL-6 varlığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda da karaciğer kesitlerinde immunohistokimyasal olarak Kupffer hücrelerindeki IL-6 varlığı tespit edilmiştir. Araştırmalarla uyumlu olarak sonuçlarımızda 72. saatte IL-6' nın serumdaki seviyesi kontrol değerlerine yakın olup ayrıca immunohistokimyasal olarak elde ettiğimiz IL-6 bulguları serumdaki değerlere benzer şekilde bulunmuştur. Çalışmamızda yer alan 2, 3 ve 4. gruplarda parsiyal hepatektomi yapılmadan madde enjeksiyonu yapılmış olması ve sonucunda karaciğer rejenerasyonunu tetikleyici TNF-α seviyesinin normal olması kullandığımız karvakrol ve silymarinin karaciğerde hasar oluşturmadığı ve TNF-α üretimini etkilemediğini düşündürmektedir. Salazar-Montes, et al. (1999), Fausto, (2000) ve Borowiak, et al. (2004) tarafından karaciğer rejenerasyonunun başlatılmasında IL-6' nın üretimini uyararak düzenlenmesini sağlayan sitokinin TNF-α olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle IL-6 serum seviyesinin TNF-α seviyesi ile yakından ilgili olduğunu ve karaciğer rejenerasyonu açısından TNF-α ve IL-6 sitokinlerinin birlikte

değerlendirilebileceğini düşünmek mümkündür. Kaya vd. (2002) tarafından IL-6' nın rejenerasyon için gerekli olduğu ancak, fazla miktarda IL-6' nın büyüme durdurucu onkogenleri uyararak rejenerasyonun bozulmasına neden olabileceği ifade edilmiştir. Eksojen olarak TNF-α verilen hayvanlarda hem normal hem de rejenere olan karaciğerde DNA sentezinin arttığını belirten Hou, et al.' a (2003) ait bu bilgi doğrultusunda IL-6' nın TNF-α artışına bağımlı olarak arttığını söylemek olasıdır. Ancak, bu tür bir uygulamanın yaşlı hayvanlara yapılması durumunda hepatik adenoma ve karsinomaların oluştuğu bildirilmiştir (Kay and Fausto, 1997; Fausto). Çalışmamızda parsiyal hepatektomi yapılmış olan Grup 5, 6 ve 7' de 72. saatte IL-6 serum seviyesinin hem serumda hem de karaciğer kesitlerinde normal olması rejenerasyonun düzenli devam ettiğini ve en azından TNF-α ile IL-6 arasındaki dengenin korunduğunu göstermektedir.

Parsiyal hepatektomi ile oluşturulan hasarlarda alınan karaciğer kütlesi ile hepatektomiden belirli zaman sonra alınan tüm karaciğerin kütleleri değerlendirilerek karaciğer rejenerasyon oranları hesaplanabilmektedir (Tang, et al., 1997; Fan, et al., 2002; Wada, et al., 2005). Li, et al. (1999) sıçanlarda 2/3 parsiyal hepatektomiden 48 saat sonra kalan karaciğer ağırlığının iki katına çıktığını ve 7-10 gün içinde de tam ağırlığa ulaştığını bildirmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada parsiyal hepatektomiden 72 saat sonra rejenere olan karaciğer ağırlıklarının parsiyal hepatektomi gruplarında ortalama olarak iki katına çıktığı tespit edilmiştir. Karaciğer yaş ağırlıkları ve bunların %68 ve %32 oranındaki miktarları, Child' in (1953) formülüne yerleştirilerek regenerasyon oranı tespitinde kullanılmıştır (Tang, et al., 1997; Fan, et al., 2002). 72. saatte ölçtüğümüz tüm karaciğerin ağırlığından hepatektomi sırasında kalan karaciğerin tahmini ağırlığının farkı bulunarak hepatektomi sırasında çıkardığımız yaklaşık %68 karaciğer ağırlığına göre hesapladığımız rejenerasyon oranları serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubu (Grup 5) için daha önce yapılmış olan çalışmalardaki rejenerasyon oranları ile uyumlu bulunmuştur (Furuta, et al., 2000; Kaya, et al., 2002). Tang, et al. (1997) araştırmalarında %68 parsiyal hepatektomiden 24, 48, 72 saat ve 8 gün sonra rejenerasyon oranlarını tespit ederek bu oranın zamana göre yükseldiği sonucuna ulaşmışlardır. Magliulo, et al. (1973) %69 parsiyal hepatektomiden kısa bir süre önce tek doz silymarin enjeksiyonu yaparak gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 72 saat sonra karaciğer ağırlık artışının

kontrol grubuna göre yüksek olduğunu saptamışlardır. Crocenzi, et al. (2000) tarafından doza bağımlı olarak silymarinin, sıçanların karaciğer ağırlığında artışa neden olduğu ve optimum dozdan daha yükseğe çıkıldığında ise ağırlıkta değişikliğin gözlenmediği tespit edilmiştir. Luper, (1998) ile Flora, et al. (1998) silymarinin hasar görmüş karaciğerde hepatositlerin DNA ve protein sentezini artırdığını, Srivastava, et al. (1994) da parsiyal hepatektomiden önce silymarin uygulanmış sıçanların hepatositlerinde cerrahiden sonraki 18 ve 72 saatler arasında DNA ve RNA sentezinde artışın olduğunu buna paralel olarak mitozun da çoğaldığını bildirmişlerdir. Araştırmamızda, parsiyal hepatektomi sonrası silymarin uygulanan grupta 72. saatte elde edilen karaciğer ağırlık artışının Grup 5' e göre yüksek olması nedeniyle araştırmalarla uyumlu olarak silymarinin hepatositlerdeki mitozu indüklediği görüşündeyiz.

Karaciğer rejenerasyonu ile ilgili araştırmalarda mitotik indeksin ve daha önemlisi PCNA indeksinin belirlenmesi sık olarak kullanılmış ve rejenerasyonun yorumlanmasında önemli rol oynamıştır (Assy, et al., 1998; Picard, et al., 2002; Kamer, et al., 2003; Castro-e-Silva, et al., 2004). Hou, et al. (2003) FR167653 isimli organik bir bileşiğin parsiyal hepatektomi yapılmış sıçanlarda karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesinde mitotik indeks ve PCNA indeks verilerinden de yararlanmıştır. Çalışmalarında parsiyal hepatektomi yaptıkları kontrol grubu sıçanlarının karaciğer kesitlerinden eş zamanlı olarak belirledikleri mitotik indeksin PCNA indeksinden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada ortaya koyduğumuz mitotik indeks ve PCNA indeks verileri hem kendi aralarında hem de araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir. Araştırmamızda mitotik indeks ve PCNA indeks sonuçları Grup 5 ve Grup 7' de yüksek bulunmuştur. Hem mitotik indeks hem de PCNA indeksleri Grup 7' de Grup 5' e göre oldukça yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda karvakrol verildikten sonra parsiyal hepatektomi yapılmış olan Grup 6 hayvanlarında belirlediğimiz mitotik indeks ve PCNA indeksi Grup 7' ye çok yakın değerdedir. Bu nedenle karvakrolün silymarine benzer şekilde karaciğer rejenerasyonu sırasında hepatositleri mitoz bölünme için indüklediğini düşünmekteyiz. Karaciğer rejenerasyonunda hepatosit proliferasyonunun periportal zonda başlayıp 36-48 saat içinde perisentral zona ulaştığı bildirilmiştir (Mimuro, et al., 2002; Palmes and Spiegel, 2004). Bir başka çalışmada parsiyal hepatektomiden sonra 32. saatte mitozun en

yüksek seviyeye ulaştığı ifade edilmiştir (Hashimoto and Sanjo, 1997; Fernandez, et al., 2004). Parsiyal hepatektomi yaptığımız Grup 5, 6 ve 7' nin karaciğer kesitlerinde yapılan incelemelerde vena sentralis çevresinde mitozun çeşitli safhalarını gösteren hepatositlerin çok sayıda olması karaciğer rejenerasyonu ile ilgili araştırmalarda belirtilen sonuçlar ile uyumludur. Ancak, çalışmamızda karaciğer kesitlerinde rastgele seçilen alanlarda yapılan incelemeler sonucunda ortaya çıkarılmış olan mitotik indeks, PCNA indeksi ve karaciğer rejenerasyon oranları yönünden Grup 6 ve 7' nin Grup 5' den daha yüksek olması, perisentral zonda gözlenen mitotik görünümlü hepatositlerin sayısal yoğunluğunun da Grup 6 ve 7' de Grup 5' e göre fazla olması gerektiğini düşündürmektedir. Ancak, araştırmamızda deneysel veriler parsiyal hepatektomiden sonraki 72. saatte elde edilmiştir. Bu nedenle, Grup 5, 6 ve 7' ye ait karaciğer kesitlerinde perisentral zonda rastladığımız mitozun çeşitli safhalarını gösteren hepatosit yoğunluklarının peripotal alanlarda da benzer şekilde yoğun olmasını doku örneklerinin parsiyal hepatektomiden 72 saat sonra alınması ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz. Svoboda and Hampson' un (1999) araştırmalarında karvakrolün mutajenik etkisinin olmadığı bir başka araştırmada ise genotoksik etkisinin olmadığı ifade edilmiştir (Ipek, et al., 2005). Bunun yanında Flora, et al. (1998) tarafından silymarinin genomik hasarlara karşı koruyucu etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Bu veriler çalışmamızın sonuçları ile karşılaştırıldığında, karvakrolün silymarine benzer şekilde hepatositlerdeki kalıtsal yapıya zarar vermeden DNA ve protein sentezini artırabildiği, buna paralel olarak mitozu artırdığı görüşündeyiz.

Karaciğer rejenerasyon mekanizmasında parsiyal hepatektomi ya da kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarından sonra Kupffer ve endotel hücreleri tarafından başlatılan TNF-α ve IL-6 üretimi ile karaciğerden ve çevre organlardan gelen büyüme faktörlerinin etkisiyle SOR üretimi sağlanmaktadır (Fausto, 2000; Taub,) . Bir çok hücre tipinde bulunan ve transkripsiyon faktörü olan Nuclear Factor-κB (NF-κB) molekülünün SOR sayesinde aktivite kazanarak hücrenin sitoplazmasından çekirdeğine geçtiği, bu geçişin engellenmesi halinde karaciğerde apoptozisin başladığı bilinmektedir. NF-κB molekülü normalde p65 ünitesine bağlı bulunan IκB inhibitöründen dolayı aktif olmadığı belirtilmektedir. SOR üretimi yoluyla IκB molekülünün enzimatik olarak NF-κB' den koparıldığı ve bu nüklear faktörün aktivite kazandığı açıklanmıştır (Fausto, 2000). Silymarinin doz ve zamana bağımlı olarak NF-

κB aktivasyonu için gerekli olan TNF-α' nın uyarıcı etkisini durdurduğu bildirilmiştir. Bu araştırmalarında Kren and Walterova, (2005) silymarinin IκB' nin uzaklaştırılmasını ve bozunmasını engelleyerek NF-κB' nin aktivasyon kazanmasını engellediğini ayrıca, bu mekanizma ile silymarinin antikanserojen etkilerinin de olabileceğini ifade etmişlerdir. Karaciğer rejenerasyonununda kanserleşme söz konusu olmadığından silymarinin hepatositler üzerine antimitojenik etki göstermediği düşünülebilir.

Araştırmamızda kan ve kemik iliği hücrelerinin sayım sonuçlarının tüm deney gruplarında normal değerlerde bulunması silymarin ve karvakrolün kemik iliği ve kan hücreleri üzerine antimitojenik etkisinin olmadığını göstermektedir. Ancak, Ipek, et al. (2003) tarafından in vitro yapılan çalışmada karvakrolün antitümöral ve antimutajenik etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sıçanlarla yapılan in vivo bir çalışmada karvakrolün akciğer kanserine karşı kuvvetli antitümöral özellik gösterdiği belirlenmiştir (Başer, 2002). Karvakrolün de silymarin gibi kanserleşme olmadığı sürece antimitojenik olarak davranmadığı düşünülebilir. Bir başka bildiride karvakrolün fibroblast kültüründe belirli dozlarda hücrelerin çoğalmasını artırdığı ancak, doz artışına bağlı olarak hücrelerde toksik etki yaparak çoğalmalarına engel olduğu hatta hücreleri öldürdüğü açıklanmıştır (Başer, 2001). Diğer taraftan daha önceki araştırmalarda karvakrolün sıçanlardaki öldürücü dozunun (LD_{50}) oral yolla verildiğinde 810 $mg.kg^{-1}$ olduğu ifade edilmiştir (Stammati, et al., 1999; Lee, et al., 2004). Farelere periton altından uygulanan 73 $mg.kg^{-1}$ karvakrolün öldürücü olduğu bildirilmiştir (MSDS). Karvakrolün karaciğer rejenerasyonu üzerine etkileri ile ilgili daha önceden yapılmış çalışma bulunmadığı için rejenerasyonu artırıcı yönde etkili olduğu düşünülen karvakrol dozu henüz belli değildir. Araştırmamızda kullandığımız karvakrolün dozu farelere uygulanan LD_{50}=73 $mg.kg^{-1}$ karvakrol miktarı dikkate alınarak sıçanların vücut ağırlıklarına oranla periton altından verilmek üzere ayarlanmıştır. Araştırmamızda karvakrol verilen sıçanların hayatta kalmaları uyguladığımız karvakrol dozunun öldürücü olmadığını göstermiştir. Çalışmamızda kullandığımız karvakrol ve silymarinin tartışılan tüm özellikleri dikkate alınarak karaciğer rejenerasyonu üzerine olumlu etkilerinde benzerlik olduğu görülmüştür.

Karvakrolün bazı mikroorganizmalar üzerine antibiyotik etkisi olduğu bildirilmiştir (Svoboda and Hampson, 1999; Bagamboula, et al., 2004; Lanciotti, et al., 2004). Karvakrolün karaciğer cerrahisinde kullanılabilirliği açısından bu özellik önemli

olabilir. Çünkü, cerrahi operasyonlar sırasında ve sonrasında yara bölgesinin enfeksiyonlara karşı korunması önemlidir. Karaciğer cerrahisinden sonra iyileşmeyi sağlayıcı ilaçlar yanında antibiyotiklerin de uygulanması yerine sadece karvakrol kullanımı, bundan sonra yapılacak daha kapsamlı çalışmaların sonuçlarına göre olasılık taşımaktadır.

Parsiyal hepatektomi deneysel modelinin kullanıldığı, karvakrolün silymarin ile karşılaştırmalı olarak sıçanlarda karaciğer üzerine etkilerinin belirlenmesini amaçladığımız bu çalışmanın sonuçlarının gelecek araştırmalar için kaynak olabileceği görüşündeyiz. Araştırmamızda %68 parsiyal hepatektomiden sonraki 72. saatte belirlemiş olduğumuz AST ve ALT enzimleri ile TNF-α ve IL-6 sitokinlerinin serum seviyelerinin ortaya çıkarılmış olması gelecek araştırmalarda parsiyal hepatektomiden sonraki farklı saatlerde karvakrolün test edilmesine olanak sağlayabilir. Ayrıca, parsiyal hepatektomiden sonra Kupffer hücrelerinde IL-6 varlığının karaciğer doku kesitlerinde belirlenmesi ile ilgili olarak az sayıda çalışma vardır. Bu nedenle araştırmamızda, Kupffer hücrelerinde IL-6 varlığının karaciğer doku kesitlerinde belirlenmesi için kullandığımız immunohistokimyasal yöntem benzer çalışmalarda da kullanılabilir. Karaciğer rejenerasyon parametrelerinden olan ve araştırmamızda da ortaya çıkardığımız mitotik indeks ile PCNA indeksi verilerinin birbirlerine paralel olması, silymarin ve karvakrolün karaciğer rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri konusundaki beklentilerimize cevap vermiştir. Rejenerasyon oranlarının hem mitotik indeks hem de PCNA indeksi ile uyum göstermesi ise silymarin ve karvakrolün karaciğer rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri açısından önemlidir. Çalışmamızda, karaciğer kesitlerinde yaptığımız histolojik değerlendirme sonuçlarına göre herhangi bir patolojik bulguya rastlanmaması, karvakrolün bundan sonraki in vivo çalışmalarda da kullanılabileceğini göstermektedir.

Alternatif tıp açısından karvakrolün karaciğer rejenerasyonu ve iyileşmesi için kullanılabilirliğinin gelecekte yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, yaptığımız çalışmaya ek olarak aynı deneysel modelde karvakrolün farklı doz ve zamanlardaki etkileri ile karaciğer rejenerasyon sürecinde karvakrolün etki mekanizmasının moleküler düzeyde belirlenmesinin yeni araştırma konuları olabileceği düşüncesindeyiz.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Akino, K., Akita, S., Mizuguchi, T., Takumi, I., Yu, R., Wang, X., Rozga, J., Demetriou, A.A., Melmed, S., Ohtsuru, A. and Yamashita, S. 2005, A novel molecular marker of pituitary tumor transforming gene involves in a rat liver regeneration, Journal of Surgical Research, (in press).

Aktay, G., Deliorman, D., Ergun, E., Ergun, F., Yeşilada, E. and Çevik C., 2000, Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury, Journal of Ethnopharmacology 73, 121-129, p.

Altun, S. ve Özalpan, A., 1998, Hepatektomi oranı ile rejenerasyon arasındaki ilişki, İst.Tıp Fak. Mecmuası 61, 4, (yayımlanmamış).

Andıran, F., Ayhan, A., Tanyel, F.C., Abbasoğlu, O. and Sayek, İ., 2000, Regenerative capacities of normal and cirrhotic liver following 70% hepatectomy in rats and the effect of α-Tocopherol on cirrhotic regeneration, Journal of Surgical Research, 89, 184-188, p.

Ankoma-Sey, V., 1999, Hepatic regeneration- revisiting the myth of prometheus. News Physiol. Sci., 14, 149-155, p.

Andreeff, M., Goodrich, D.W. and Pardee, A.B., 2000, Cell proliferation, differentiation and apoptosis, Cancer Medicine, 6th Edition, Cancer Biology, Section 1, Chapter 2, BC Decker Inc, 17-32, p.
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=cmed.chapter.174)

Aoki, T., Murakami, M., Niiya, T., Murai, N., Shimizu, Y., Kato, H. and Kusano, M., 2001, Capacity of hepatic regeneration following a second partial hepatectomy in rats, Hepatology Research 21, 228-241, p.

Assy, N., Gong, Y., Zhang, M., Pettigrew, N.M., Pashniak, D. and Minuk, G.Y., 1998, Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats, J Lab Clin Med., 131, 251-256, p.

Atici, A.E., Kaya, Y., Coskun, T., Aral, E. and Var, A., 2003, Intestinal ischemia-reperfusion impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats, Hepato-Gastroenterology, 50, 661-665, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J., 2004, Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. Flexneri, Food Microbiology, 21, 33-42, p.

Baphonet, http://www.bapho.net/baphonet/bbs/h-drive/magick5/oregano.txt

Başer, K.H.C., 2001, Her Derde Deva Bir Bitki- Kekik, Bilim ve Teknik, Mayıs 2001, 74-77, s.

Başer, K.H.C., 2002, Oregano, The genera Origanum and Lippia, The Turkish Origanum species, Agricultural Univercity of Athens, Greece, London and New York, first edition, 277, p.

Başoğlu, M., Balık, A.A., Kavak, İ., Gündoğdu, C., Erman, Z., Yıldırgan, İ. and Ören, D., 2000 Effects of growth hormone on hepatic regeneration, Turk J Med Sci., 30, 529-534, s.

Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G. and Karadoğan, T., 2004, Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey, Food Control, 15, 169-172, p.

Baytop, T.,1999, Türkiye' de bitkiler ile tedavi, ikinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 455, s.

Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C. and Birchmeier, C., 2004, Met provides essential signals for liver regeneration, PNAS 101, 10608-10613, p.

Carvalho, A.F.U., Melo, V.M.M., Craveiro, A.A., Machado, M.I.L., Bantim, M.B. and Rabelo E.F. 2003, Larvicidal Activity of the Essential Oil from Lippia sidoides Cham. against Aedes aegypti Linn, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 98, 4, 569-571, p.

Castro-e-Silva Jr, O., Zucoloto, S., Ramalho, F.S., Ramalho, L.N.Z., Reis, J.M.C., Bastos, A.A.C. and Brito, M.V.H., 2004, Antiproliferative Activity of Copaifera duckei Oleoresin on Liver Regeneration in Rats, Phytother. Res., 18, 92-94, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Crocenzi, F.A., Pellegrino, J.M., Pozzi, E.J.S., Mottino A.D., Garay E.A.R. and Roma M.G., 2000, Effect of silymarin on biliary bile salt secretion in the rat, Biochemical Pharmacology, 59, 1015-1022, p.

Crocenzi, F.A., Pozzi, E.J.S., Pellegrino, J.M., Garay, E.A.R. and Mottino, A.D., 2003, Roma M.G.Preventive effect of silymarin against taurolithocholate-induced cholestasis in the rat, Biochemical Pharmacology, 66, 355-364, p.

Date, M., Matsuzaki, K., Matsushita, M., Sakitani, K., Shibano, K., Okajima, A., Yamamoto, C., Ogata, N., Okumura, T., Seki, T., Kubota, Y., Kan, M., McKeehan, W.L. and Inoue, K., 1998, Differential expression of transforming growth factor-b and its receptors in hepatocytes and nonparenchymal cells of rat liver after CCl4 administration, Journal of Hepatology, 28, 572-581, p.

Dean Coleman, http://www.deancoleman.com/essentialref.htm

Debonera, F., Aldeguer, X., Shen, X., Gelman, A.E., Gao, F., Que, X., Greenbaum L.E., Furth E.E., Taub R., and Olthoff K.M., 2001, Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation, Journal of Surgical Research 96, 289- 295, p.

De Vincenzi, M., Stammati, A., De Vincenzi, A. and Silano, M., 2004, Constituents of Aromatic Plants: Carvacrol. Fitoterapia, 75, 801-804, p.

Ehrenfried, J.A., Ko, T.C., Thompson, E.A. and Evers, B.M., 1997, Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration, Surgery, 122, 5, 927-935, p.

El-Ashmawy, I.M., El-Nahas, A.F. and Salama, O.M., 2005, Protective Effect of Volatile Oil, Alcoholic and Aqueous Extracts of *Origanum majorana* on Lead Acetate Toxicity in Mice, Clinical Pharmacology & Toxicology, 97, 238-243, p.

Fan, Y., Praet, M., Huysse, J.V., Lelie, B. and Hemptinne, B., 2002, Effects of portal vein arterialization on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat, Liver Transplantation, 8, 2, 146-152, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations http://apps3.fao.org/jecfa/flav_agents/flavag-r.jsp

Farghali, H., Kamenikova, L., Hynie, S. and Kmonickova, E., 2000, Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: A study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury, Pharmacological Research, 41, 2, 231-237, p.

Fausto, N. and Campbell, J. S., 2003, The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation, Mechanisms of Development 120, 117-130, p.

Fausto, N., 2000, Liver regeneration, Journal of Hepotology 32, 19-31, p.

Fernandez, M.A., Turro, S., Ingelmo-Torres, M., Enrich, C. and Pol, A., 2004, Intracellular trafficking during liver regeneration Alterations in late endocytic and transcytotic pathways, Journal of Hepatology, 40, 132-139, p.

Flora, K., Hahn, M., Rosen, H., Benne, K., 1998, Milk thistle (Silybum marianum) for the therapy of liver disease, The American Journal of Gastroenterology, 93, 2, 139-143, p.

Fondevila, C., Busuttil, R.W.and Kupiec-Weglinski, J.W., 2003, Hepatic ischemia/reperfusion injury- a fresh look, Experimental and Molecular Pathology, 74, 86-93,p.

Fukuhara, K., Suzuki, M., Unno, M., Rahman, M.M., Endo, K. and Matsuno, S., 1999, The degree of hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats with peritonitis and the role of lipid peroxidation, Free Radical Biology & Medicine, 26, 7/8, 881-886, p.

Fukuhara, Y., Hirasawa, A., Li, X., Kawasaki, M., Fujino, M., Funeshima, N., Katsuma, S., Shiojima, S., Yamada, M., Okuyama, T., Suzuki, S. and Tsujimoto, G., 2003, Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. Journal of Hepatology, 38, 784-792, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Furuta, K., Kakita, A., Takahashi, T., Tomiya, T. and Fujiwara, K., 2000, Experimental study on liver regeneration after simultenous partial hepatectomy and pancreatectomy, Hepatology Research, 17, 223-236, p.

Gaglio P.J., Liu, H., Dash, S., Cheng, S., Dunne, B., Ratterree, M., Baskin, G., Blanchard, J., Bohm, R., Theise, N.D. and LaBrecque D., 2002, Liver regeneration investigated in a non-human primate model (Macaca mulatta), Journal of Hepatology, 37, 625-632, p.

Galun, E. and Axelrod, J.H., 2002, The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies, Biochimica et Biophysica Acta 1592, 345-358, p.

Gaub, J., and Iversen, J., 1984, Rat liver regeneration after %90 partial hepatectomy, Hepatology, 4, 902, p.

Golob, P., Moss, C., Dales, M., Fidgen, A., Evans, J. and Gudrups, I., The use of species and medicinals as bioactive protectans for grains, chapter 5, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome 1999, http://www.fao.org/docrep/x2230e/x2230e15.htm

Hashimoto, M. and Sanjo, K., 1997, Functional capacity of the liver after two-thirds partial hepatectomy in the rat, Surgery, 121, 6, 690-697, p.

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

Hou, Z., Yanaga, K., Kamohara, Y., Eguchi, S., Tsutsumi, R., Furu, J. and Kanematsu, T., 2003, A new suppressive agent against interleukin-1b and tumor necrosis factor-a enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats, Hepatology Research 26, 40- 46, p.

Ipek, E., Tüylü, B.A. and Zeytinoglu, H., 2003, Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures, Cytotechnology 43, 145-148, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

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

Iwai, M., Cui, T., Kitamura, H., Saito, M. And Shimazu, T., 2001, Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy, Cytokine, 13, 1, 60-64, p.

Jacobs, B.P, Dennehy, C., Pharm, D., Ramirez, G., Sapp, J. and Lawrence V.A., 2002, Milk thistle for the treatment of liver disease: A systematic review and Meta-Analysis, The American Journal of Medicine, 113, 506-515, p.

Kaibori, M., Sakakura, Y., Oda, M., Okumura, T., Kwon, A.H. and Kamiyama, Y., 2000, Role of hepatocyte growth factor in hepatic ischemia and reperfusion Injury, Transplantation Proceedings 32, 2285-2286, p.

Kamer, E., Çöker, A., Sevinç, A.İ., Özkara, E., Özer, E. and Özzeybek, T., 2003, Effect of intraperitoneal administration of gemcitabine and paclitaxel on hepatic regeneration in rats, Turk J Gastroenterol., 14, 1, 1-6, p.

Karabelyos, C., Dobozy, O., Slazai, C., Klenjanzki, K., Vargu, K., Hadhazy, A., Kiss, A., Fülop, K.A., Madarasz, B. and Falus, A., 1999, Elevated hepatic glucocorticoid receptor expression during liver regeneration in rats, Pathology Oncology Research, 5, 2, 107-109, p.

Kay, M.A. and Fausto, N., 1997, Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies, Molecular Medicine Today, 108-115.

Kaya, Y., Aral, E., Coşkun, T., Erkasap, N., and Var, A., 2002, Increased intraabdominal pressure impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats, Journal of Surgical Research, 108, 250-257, p.

Kaya, Y., Coşkun, T. ve Aral, E., 2002, Pringle manevrasının parsiyal karaciğer rezeksiyonundan sonra karaciğerin İnterlökin-6 üretimine etkisi, Çağdaş Cerrahi Dergisi, 16, 4, 202-207, s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Kren, V. and Walterova, D., 2005, Silybin and Silymarin – New Effects and Applications, Biomedical Papers 149, 2, 29- 41, p.

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

Lanciotti R., Gianotti A., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M.E. and Gardini F.,2004, Use of natural aroma compounds to improve shelflife and safety of minimally processed fruits, Trends in Food Science & Technology, 15, 201-208, p.

Lee, S.J., Kima, Y.G., Kangb, K.W., Kimc, C.W. and Kima, S.G., 2004, Effects of colchicine on liver functions of cirrhotic rats: beneficial effects result from stellate cell inactivation and inhibition of TGF-1 expression, Chemico-Biological Interactions, 147, 9-21, p.

Lee, K.W., Everts, H. and Beynen, A.C., 2004, Essential Oils in Broiler Nutrition, International Journal of Poultry Science, 3, 12, 738-752, p.

Li, Y, Wang, H.Y. and Cho, C.H., 1999, Effects of heparin on hepatic regeneration and function after partial hepatectomy in rats, World Journal of Gastroenterology, 5, 4, 305-307, p.

Luper, S., 1998, 1998, A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1., Alternative Medicine Review, 3, 6, 410-425, p.

Magliulo, E., Carosi, P.G., Minoli, L. and Gorini, S., 1973, Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin, Arzneimittel-Forschung, 23, 161-167, p.

Michalopoulos, G.K., 1997, Liver regeneration, Science, 4. 26, 60-66, p.

Mimuro, A., Aoki, T., Tsuchida, A., Miyashita, T., Koyanag, Y. and Enosawa, S., 2002, Effect of ethanolamine on liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. Transplantation Proceedings, 34, 2664-2667, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Mochida, S., Ogata, I., Hirata, K., Ohta, Y., Yamada, S. and Fujiwara, K., 1990, Provocation of massive hepatic necrosis by endotoxin after partial hepatectomy in rats, Gastroenterology, 99, 3, 771-777, p.

MSDS, (Material Safety Data Sheets) http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/ME/2 methyl-5-(1-methylethyl)phenol.html Safety (MSDS) data for 2-methyl-5-(1-methylethyl)phenol

Nakamura, T., Ueno, T., Sakamoto, M., Sakata, R., Torimura, T., Hashimoto, O., Ueno, H. and Sata, M., 2004, Suppression of transforming growth factor-b results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury, Journal of Hepatology, 41, 974-982, p.

NIOSH, National Institue for Occupational Safety and Health http://www.cdc.gov/niosh/rtecs/fi12b128.html

Ohta, Y. and Ichımura, K., 2000, Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, KI67, 5-bromo-2'-deoxyuridine and cyclin D1 in mause olfactory epithelium, Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 109, 11, 1046-1048, p.

Oliveira, C.P.M.S., Lopasso, F.P., Laurindo, F.R.M., Leitao, R.M.C. and Laudanna, A.A., 2001, Protection against liver ischemia-reperfusion injury in rats by silymarin or verapamil, Transplantation Proceedings, 33, 3010-3014, p.

Paker, Ş., 1993, Histoloji, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları; 32, 564, s.

Palmes, D. and Spiegel, H.U., 2004, Animal models of liver regeneration, Biomaterials 25, 1601-1611, p.

Panis, Y., Lomri, N. and Emond, J.C., 1998, Early gene expression associated with regeneration is intact after massive hepatectomy in rats. Journal of Surgical Research, 79, 103-108, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Picard, C., Lambotte, L., Starkel, P., Sempoux, C., Saliez, A., Berge, V.V.D. and Horsmans, Y. 2002, Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats, Journal of Hepatology, 32, 645-652, p.

Picard, C., Lambotte, L., Starkel, P., Sempoux, C., Saliez, A., Berge, V.V.D., Saeger, C. and Horsmans, Y., 2003, Retrorsine: a kinetic study of its influence on rat liver regeneration in the portal branch ligation model, Journal of Hepatology 39, 99-105, p.

Ramadan, L.A., Roushdy, H.M., Senna, G.M.A., Amin, N.E. and El-Deshw, O.A., 2002, Radioprotective effect of silymarin against radiation incuded hepatotoxicity, Pharmacological Research, 45, 6, 447-454, p.

Rolo, A.P., Oliveira, P.J., Moreno, A.J.M. and Palmeira C.M., 2003, Protection against post-ischemic mitochondrial injury in rat liver by silymarin or TUDC, Hepatology Research, 26, 217-224, p.

Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G. and Özer, H., 2004, Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey, Food Control, 15, 549-557, p.

Salazar-Montes, A., Rincon, A.R., Panduro, A. and Armendariz-Borunda, J., 1999, Chemically induced liver regeneration is characterized by specific IL-6 gene expression, Hepatology Research 15, 10-21, p.

Sanz, N., Fernandez, C.D., Simon, L.F., Alvarez, A. and Cascales, M., 1998, Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide, Biochimica et Biophysica Acta, 1384, 66-78, p.

Sathar, S.A., Sarkar, C. and Nayak, N.C., 1997, Hepatocytic proliferation in chronic liver disease: A study of liver biopsies using immunohisto chemical localization of proliferating cell nuclear antigen, Annals of Saudi Medicine, 17, 3, 363-367, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Scotte, M., Daveau, M., Hiron, M., Tcnikre, P. and Lebreton, J.P., 1993, Absence of expression of interleukin-6 (IL-6) mRNA in regenerating rat liver, 315, 2, 159-162, p.

Scotte, M., Masson, S., Lyoumi, S., Hiron, M., Paul Teniere, P., Lebreton, J.P., Daveau, M., 1997, Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat, Cytokine, 9, 11, 859-867, p.

Shimizu, H., Miyazaki, M., Wakabayashi, Y., Mitsuhashi, N., Kato, A., Ito, H., Nakagawa, K., Yoshidome, H., Kataoka, M. and Nakajima, N., 2001, Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats, Journal of Hepatology, 34, 683-689, p.

Soto, C., Recoba, R., Barron, H., Alvarez, C. and Favari, L., 2003, Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas, Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 136, 205–212, p.

Sökmen, A., Güllüce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sökmen, M. and Şahin, F., 2004, The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic Thymus spathulifolius, Food Control, 15, 627-634, p.

Srivastava, S., Srivastava, A.K., Srivastava, S., Patnaik, G.K. and Dhawan, B.N., 1994, Effect of picroliv and silymarin on liver regeneration ın rats, Indian Journal of Pharmacology, 26, 19-22, p.

Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.L. and Wright, A., 1999, Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays, Food and Chemical Toxicology, 37, 813-823, p.

Svoboda K.P. and Hampson J.B., 1999, Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Taub., R.A., Hepatic regeneration, Cell Biology, Biochemistry and Physiology of Liver Fonction, Section 1, Chapter 2, 31-48, p. (http://www.intl.elsevierhealth.com/e-books/pdf/347.pdf)

Tang, T.X., Hashimoto, T., Chao, L.Y., Itoh, K. and Manabe, T., 1997, Effects of partial pancreatectomy on liver regeneration in rats, Journal of Surgical Research 72, 8-14, p.

The Turkish Oregano Company, http://www.origanumoil.com/carvacrol.htm

Theocharis, S.E., Margeli, A.P., Skaltsas, S.D., Spiliopoulou, C.A. and Koutselinis S., 2001, Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study, Toxicology 161, 129-138, p.

Tsuchiya, T., Miyazawa, M., Abe, T., Saito, T., Kanno, H., Ishii, S., Suzuki, M., Kenjo, A., Yamada, F., Gunji, T. Kimura, T. and Gotoh, M., 2000, Hepatic regeneration and ischemia/reperfusion injury in fatty-liver rats, Transplantation Proceedings 32, 2324, p.

Vogten, J.M., 2004, Angiogenesis in the liver, DrukkerijOnkenhout B.V., Hilversum, Chapter 1, 10-20, p.

Wada, W., Medina, J., Hasegawa, Y., Kuwano, H. and Kojima, I., 2005, Adenovirus-mediated overexpression of the activin bc subunit accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats, Journal of Hepatology, 43, 823-828, p.

Watanabe, M., Yamaguchi, K., Chijiiwa, K. and Tanaka, M., 2001, FR167653 Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats, Journal of Surgical Research, 101, 146-151, p.

Yamada, Y. and Fausto, N., 1998, Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor, Am J. Pathol., 152, 1577-1589, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H. and Raneva, V.G., 1999, Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems, Food Chemistry, 64, 59-66, p.

Zeytinoglu, H., Incesu, Z. And Baser, K.H.C., 2003, Inhibition of DNA synthesis by Carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene, Phtomedicine, 10, 292-299, p.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mustafa UYANOĞLU

Doğum Yeri-Tarihi : Eskişehir, 12.01.1973

Uyruğu : T.C

Görevi : Araştırma Görevlisi

Görev Yeri : Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Meşelik 26480 Eskişehir

Yabancı Dil : İngilizce (intermediate) **Mail:**muyan@ogu.edu.tr

Eğitimi

1991–1995 :Anadolu Üniversitesi, Fen–Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden mezun oldu.

1997 :Anadolu Ünivesitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalından "Antimitotik olduğu düşünülen bazı kimyasalların Retikülo Endotelial Sistem (RES) üzerine etkileri" isimli yüksek lisans tezi ile mezun oldu. Osmangazi Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı.

1998 :Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başladı.