

**PARSİYAL HEPATEKTOMİ YAPILMIŞ SIÇANLARDA
PUNICALAGIN'IN KARACİĞER ÜZERİNDEKİ
APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Öge ARTAGAN

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Mart-2014

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1202F057**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Öge Artagan'ın "Parsiyal Hepatektomi Yapılmış Sıçanlarda Punicalagin'in Karaciğer Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 10.03.2014 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. FİLİZ ALANYALI	
Üye	: Prof. Dr. AHMET ÖZATA	
Üye	: Doç. Dr. SEVİL ŞENTÜRK	
Üye	: Doç. Dr. MUSTAFA UYANOĞLU	
Üye	:Doç. Dr. HAKAN ŞENTÜRK	

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

PARSİYAL HEPATEKTOMİ YAPILMIŞ SIÇANLARDA PUNICALAGIN'IN KARACİĞER ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Öge ARTAGAN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Filiz ALANYALI

2014, 80 sayfa

Bu çalışmada, punicalagin, parsiyal hepatektomi (PH) deney modeli ile karaciğer dokusundaki apoptotik etkileri araştırılmıştır.

Deneyssel uygulamalarda, 200±20 g ağırlıkta, 3-4 aylık, *Wistar albino* cinsi erkek sıçanlardan rastgele seçimle 6 grup oluşturuldu. Grup I, II sırasıyla 3. ve 6. saatlerde disekte edilen sham kontrol gruplarını ifade etmektedir. Grup III, IV %70 PH sonrası serum fizyolojik (SF) uygulanan sırasıyla 3. ve 6. saatlerde disekte edilen grupları ifade etmektedir. Grup V, VI ise %70 PH sonrası, % 98 saflıkta intra peritoneal punicalagin enjeksiyonu yapılan sırasıyla 3. ve 6. saatlerde disekte edilen grupları ifade etmektedir.

Parsiyal hepatektomi yöntemiyle rejenerasyonun indüklendiği sıçan karaciğerinden; RT-PCR, Q-PCR ve TUNEL analizi için doku örnekleri alındı. RT-PCR, Q-PCR, TUNEL analizi bulguları kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Kaspaz-3 gen bölgesine ait RT-PCR ($p<0.05$), Q-PCR ($p<0.05$) ve apoptotik indeks ($p<0.05$) bulgularına göre, V. ve VI. gruplarda NF- κ B gen ekspresyonu, zamana bağlı olarak baskılandı. Kaspaz-3 gen ekspresyonu ise zamana bağlı anlamlı artış gösterdi. VI. Grupta parsiyal hepatektomiden 6 saat sonra, 15mg/kg punicalagin, apoptozu indüklediği görüldü. 15mg/kg punicalagin PH sonrası zamana bağlı olarak dokuda rejenerasyonu baskıladı ve apoptozu indükledi.

Anahtar Kelimeler: Sıçan, m-RNA, RT-PCR, Tunnel Metodu, Taq-Man protein analizi, karaciğer.

ABSTRACT**PhD Dissertation****EVALUATION OF APOPTOTIC EFFECTS OF
PUNICALAGIN ON RAT LIVER WHICH ARE
EXPOSED TO PARTIAL HEPATECTOMY****Öge ARTAGAN****Anadolu University
Graduate School of Science
Department of Biology****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Filiz ALANYALI****2014, 80 pages**

In this study, the apoptotic effects of punicalagin, have been studied on liver tissues by means of partial hepatectomy (PH) experiment model.

In the experiments, six groups have been formed by arbitrary selection from 3-4 months old, male *Wistar albino* rats weighing 200 ± 20 g. Group I and II refer to sham control groups which have been respectively dissected at 3rd and 6th hours. Group III and IV refer to the SF applied groups after %70 PH which have been respectively dissected at 3rd and 6th hours. Group V and VI refer to the groups into which intra peritoneal punicalagin at 98 % purity were injected after %70 PH which have been respectively dissected at 3rd and 6th hours.

Tissue samples are obtained from the liver of the rats where regeneration is induced by means of PH for RT-PCR, Q-PCR and TUNEL analysis. Findings of RT-PCR, Q-PCR and TUNEL analysis have been evaluated comparatively with the control groups.

According to the results of RT-PCR ($p < 0.05$), Q-PCR ($p < 0.05$) and apoptotic index ($p < 0.05$) belonging to caspas-3 gene, in groups V and VI, NF- κ B gene expression was time dependently suppressed. Kaspas-3 gene expression has increased in a time dependent manner. It has been observed that 15 mg/kg punicalagin has induced apoptosis 6 hours after PH in group VI. 15 mg/kg punicalagin after PH has suppressed regeneration in the tissue in time dependent manner and induced apoptosis.

Keywords: Rat, m-RNA, RT-PCR, Tunnel Method, Taq-Man protein analysis, liver.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın şekillendirilmesi, oluşması, sonuçlandırılması, değerlendirilmesinde desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Filiz ALANYALI' ya,

Tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçların değerlendirilmesinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam sayın Doç. Dr. Mediha CANBEK'e,

Eğitimime değerli katkılar sağlayan hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya,

Deney hayvanları laboratuvar ve cihaz olanaklarından yararlanmamı sağlayan hocam sayın Doç.Dr. Hakan ŞENTÜRK'e

Çalışmalarım sırasında uyguladığım cerrahi yöntemi, bana kazandıran hocam sayın Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU'na

İstatistiksel analizlerimi aydınlattığı için hocam sayın Doç.Dr. Sevil ŞENTÜRK'e,

Çalışmalarım sırasında yardımları ve işbirliği için hocam sayın Dr. Emre CEYHAN'a ve Dr. Ahmet ÖZEN'e,

Laboratuvarıda birarada çalıştığım tüm ekip arkadaşlarıma,

Sonsuz Teşekkürler...

Tezimi; Babam Ömer BAŞOĞLAN'a, Annem Neyil BAŞOĞLAN'a ve eşim Salih ARTAGAN'a ithaf ediyorum.

Varlığıyla, ruhumu besleyen yavruma minnettarım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Karaciğer Hitolojisi.....	1
1.2. Karaciğer Anatomisi	2
1.3. Karaciğer Hücre Tipleri	3
1.4. Punicalagin.....	7
1.5. Apoptoz.....	10
1.5.1. Apoptozun İndüksiyonu	11
1.5.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	12
1.6. Kaspazların Aktivasyonu	17
1.7. NF-κB.....	19
1.8. Kantitatif RT-PCR Yöntemi	22
1.9. Hepatik Hasar.....	23
1.10. Parsiyal Hepatektomi	23
1.11. Karaciğer Rejenerasyonu	25

2. MATERYAL VE YÖNTEM 27

2.1. Deney Hayvanları.....	27
2.2. Deney Grupları.....	27
2.3. Punicalagin Uygulaması	28
2.4. Anestezi ve Cerrahi İşlemler	28
2.4.1. Parsiyal hepatektomi işlemi	28
2.5. Doku örneklerinin değerlendirilmesi	32
2.5.1. Real Time-PCR	32
2.5.1.1. Trizol ile RNA izolasyonu için gerekli malzemeler	33
2.5.1.2. RNA izolasyon basamakları.....	33
2.5.1.3. RT reaksiyonu için gerekli malzemeler	34
2.5.1.4. RNA'nın RT reaksiyonu ile c-DNA dönüşüm basamakları.....	34
2.5.1.5. cDNA saklama koşulları	36
2.5.1.6. Real Time PCR reaksiyon bileşenleri	36
2.5.2. Q RT-PCR reaksiyonu	37
2.5.2.1. Probların Sulandırılması	37
2.5.2.2. Bağlanma reaksiyonu	38
2.5.2.3. Ligasyon reaksiyonu	38
2.5.2.4. Proteoliz reaksiyonu.....	39
2.5.2.5. Q-PCR reaksiyon basamakları	39
2.5.3. TUNEL metodu.....	41
2.6. İstatistiksel analiz	44

3. BULGULAR 45

3.1. Histolojik değerlendirmeler	45
3.2. Apoptotik indeks bulguları.....	50
3.3. RT-PCR bulgular	52
3.4. Q-PCR bulguları	55

4. TARTIŞMA ve SONUÇ	58
5. KAYNAKLAR	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karaciğer lobül yapısı.....	3
Şekil 1.2. Karaciğer hücreleri ince yapısı	6
Şekil 1.3. Puncialagin açık formülü.....	9
Şekil 1.4. Nekrotik ve apoptotik ölüm farklılığı	18
Şekil 1.5. NF-κB aktivasyonu.....	21
Şekil 1.6. Q-PCR Reaksiyonu.....	22
Şekil 1.7. Sıçan karaciğerinde PH.....	26
Şekil 2.1. Sıçan batin kısmı traşlandıktan sonra, batikon ile temizlendi	29
Şekil 2.2. Median laparotomi uygulaması	30
Şekil 2.3. % 70 PH görünümü	30
Şekil 2.4. %70 PH sonrası	31
Şekil 2.5. Kas 4/0 ipek sütürle dikilerek kapatıldı	31
Şekil 2.6. Deri 4/0 ipek sütürle dikilerek kapatıldı	32
Şekil 3.1. Gruplara ait karaciğer kesitlerinde Sentral Ven (SV) çevresindeki hepatositler	46
Şekil 3.2. Gruplara ait karaciğer kesitlerinde Portal Alan (PA) çevresindeki hepatositler	47
Şekil 3.3. Karaciğer kesitlerinde mitotik hepatositler.....	48
Şekil 3.4. Karaciğer kesitlerinde apoptotik hepatositler	49
Şekil 3.5. Gruplara ait apoptotik indeks.....	51
Şekil 3.6. Gruplara ait kaspaz-3 gen ifade grafiği.	53
Şekil 3.7. Gruplara ait NF-κB gen ifade grafiği.	54
Şekil 3.8. Gruplara ait kaspaz-3 Q-PCR protein ifade grafiği.	56
Şekil 3.9. Gruplara ait NF-κB Q-PCR protein ifade grafiği.	57

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1 Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü arasındaki farklılıklar.....	12
Tablo 2.1. RT c-DNA Sentez Master Mix Karışımı	35
Tablo 2.2. Revers Transkriptaz Reaksiyonu Termal Profili.....	36
Tablo 2.3. cDNA Saklama Koşulları.....	36
Tablo 2.4. RT-PCR Reaksiyon Karışımı.....	37
Tablo 2.5. RT-PCR Reaksiyonu Termal Profili	37
Tablo 2.6. Problemlerin Sulandırılması	38
Tablo 2.7. Bağlanma Reaksiyonu Termal Profili.....	38
Tablo 2.8. Ligasyon Reaksiyonu Termal Profili	38
Tablo 2.9. Proteoliz Reaksiyon Karışımı	39
Tablo 2.10. Proteoliz Reaksiyonu Termal Profili.....	39
Tablo 2.11. Q-PCR Reaksiyon Karışımı	40

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma

mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit Messenger Ribonucleic Acid
cDNA	Komplementer DNA Complementary DNA
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Real Time Polymerase Chain Reaction
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B Nuclear Factor Kappa B
PH	Parsiyal Hepatektomi Partial Hepatectomy
AP-1	Aktivatör Protein -1 Activator Protein 1
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzim İlişkili İmmünsorbent Analizi Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-Alfa Tumor Necrosis Factor-Alpha
IκB	NF- κ B İnhibitörü Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B Kinaz I κ B Kinase
IL	Interlökin Interleukin
IL1α	Interlökin 1 Alfa Interleukin 1 Alpha

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma

IL1β	Interlökin 1 Beta Interleukin 1 Beta
NIK	NF- κ B-İndükleyici Kinaz NF- κ B Inducing Kinase
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu Phosphate-bufferd saline
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-Alfa Tumor Necrosis Factor-Alpha
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Real Time Polimerase Chain Reaction
Q-PCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Quantitative Polimerase Chain Reaction
TUNEL	TdT-Aracılı dUTP Son İşaretleme Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP Nick End Labeling
IP	İntraperitoneal Intraperitoneal
SV	Sentral Ven Vena Sentralis
PA	Portal Alan Portal Area
ALT	Alanin-transaminaz Alanine transaminase
AST	Aspartat- transaminaz Aspartate transaminase
EGF	Epidermal Growth Faktör Epidermal Growth Factor

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**Kısaltma**

HGF	Hepatosit Growth Faktör Hepatocyte Growth Factor
TGF- α	Transforming büyüme faktörü alfa Transforming growth faktör alfa
TGF- β	Transforming büyüme faktör beta Transforming growth faktör beta

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**Kısaltma**

μ	Mikron
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromol
mL	Mililitre
mg	Miligram
U/L	Ünite/Litre
%	Yüzde
L	Litre
CT	Eşik Döngüsü
M	Molar
Ppm	Milyonda Bir
°C	Santigrad derece

1. GİRİŞ

Vücudun en büyük bezi olan karaciğer diyaframın alt kısmında abdominal boşlukta yerleşmiş sekiz fonksiyonel segmentten meydana gelmiştir (Ganong, 1995; Dilek, 2003). Vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturur, 1,5-2 kg ağırlığında sindirim sistemi ile venöz drenaj arasında köprü görevi üstlenmiş bir organdır. Karaciğer safra yapımı, karbonhidrat depolanması-salınması (kan glikoz düzeyinin sabit tutulması), üre yapımı, kolesterol metabolizması, etanol metabolizması, plazma proteinlerinin sentezlenmesi, yağ metabolizması, toksinlerin oksidasyon yoluyla detoksifikasyonu gibi önemli metabolik fonksiyonlara sahiptir. Safra salgısı nedeniyle ekzokrin bez, sentezlediği bir kısım maddeleri doğrudan kana vermesi nedeniyle de endokrin bez kategorisinde bulunur (Ganong, 1995; Karlson, 1995; Dilek, 2003). Karaciğerde meydana gelebilecek herhangi bir fonksiyon bozukluğu vücuttaki tüm sistemleri etkiler. Kimyasal ajanlar, ilaçlar, alkol, kazalar, karaciğer tümörleri, viral kökenli karaciğer hastalıkları ve cerrahi girişimler gibi çok sayıda etken karaciğer dokusunun zarar görmesine neden olabilir. Karaciğer kendisini yenileyebilme potansiyeli ile vücuttaki diğer organlardan daha avantajlıdır (Yamada ve ark., 1997).

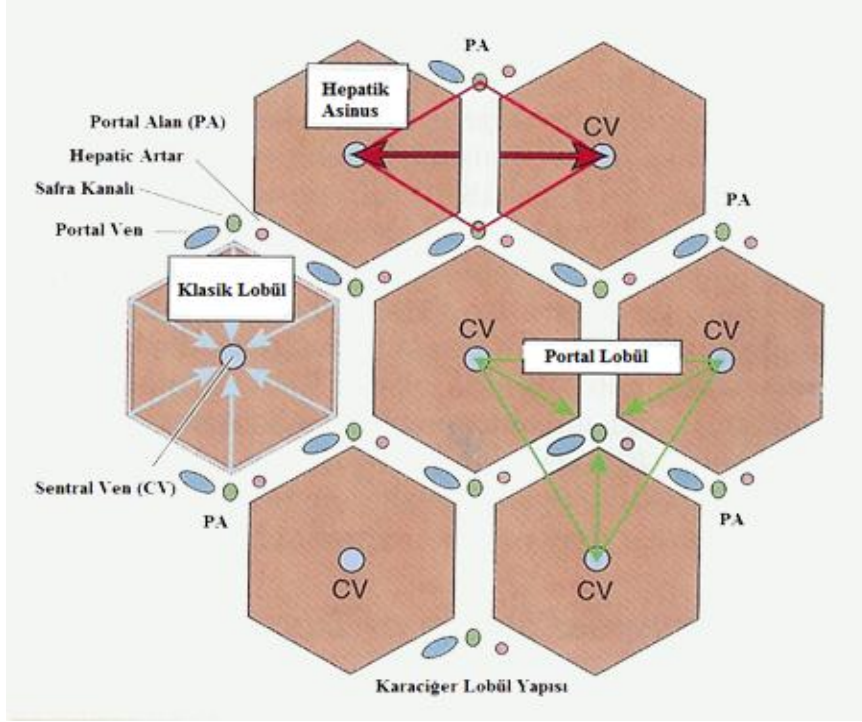
1.1. Karaciğer Histolojisi

Doku histolojisinde lobül yapısı görülür. Lobül yapılarının ortasında konumlanmış olarak hepatik ven (vena sentralis) bulunur. Lobüllerin birleştikleri köşelere portal alan denir (Şekil 1.1). Portal alanda genellikle; portal ven, hepatik arter ve safra kanalı bulunur (Junqueira ve ark., 1993). Lobüller içinde kanın dolaştığı ışınsal formda periferden sentrale doğru anastomozlaşmış sinüzoidler bulunur. Sinüzoidler endotel hücreleri ile döşenmiş durumdadır, aynı zamanda Kupffer hücreleri de (makrofajlar) sinüzoidler içerisinde bulunurlar. Endotel hücreleri ile hepatositler arasında ise madde alışverişinin gerçekleştiği disse aralığı

bulunur. Disse aralığında yıldızsı yağ depolayan ito hücreleri bulunmaktadır. İto hücreleri özellikle A vitamini depolanmasına yardımcı olan hücrelerdir. Hepatositler ortalama 20-35µm çapında altıgen ve dokunun tamamının yaklaşık olarak %80 ini oluşturan hücrelerdir. Hepatositlerin sinüzoidlere bakan yüzeylerinde mikrovilluslar bulunmaktadır. Bunlar hücrenin sekresyon ve absorpsiyon kapasitesini arttıran yapılardır. İki hepatosit arasındaki 1-2 µm çapındaki tübül yapısına safra kanalikülü denir. Safra kanalikülleri safra kanalları ile safra kanalları da herring kanallarına sonlanmaktadır (Junqueira ve ark., 1993; Dilek, 2003).

1.2. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer, bağ doku yapısında Glisson kapsül ile örtülmüş lobüller formda organize olmuş bir yapıdadır. Sağda ve solda iki büyük lob, kuadrate ve caudate loblardan oluşur. Kanın %75'i portal ven yoluyla, %25'i hepatik arter yoluyla karaciğere ulaşır. Portal ven yoluyla gelen kan, sinüzoidal yapılar yardımıyla lobül hepatositler arasından geçerek, santral vene doğru akar. Portal ven ve hepatik arter yoluyla karaciğere gelen kan, sinüzoidlerde karışmış olarak doku içinde yol alır. Sinüzoidler hepatik lobüller boyunca anastomozlaşmış kanallar sistemidir. Sinüzoidlerde bulunan endotel hücreleri ile hepatositler, madde alışverişine olanak sağlayacak şekilde ilişkilidirler (Ganong, 1995; Dilek, 2003; Junqueira ve ark., 1993).



Şekil 1.1. Karaciğer lobül yapısı. PA: Portal alan, CV: Sentral ven (Ganong, 1995).

1.3. Karaciğer Hücre Tipleri

a) Hepatositler

Karaciğer lobül yapısını oluşturan, temel metabolik reaksiyonların gerçekleştiği ana hücrelerdir. Lobül içinde ırsal formda dizilmiş 6 ya da daha fazla yüzölü yaklaşık 20-30 µm çapındadırlar (Şekil 1.2.). Tüm karaciğer dokusunun %80'ini, toplam hücre sayısının yaklaşık %60'ını oluşturlar. Endotel hücreleri ile hepatositler arasında Disse aralıkları bulunur ve kan ile hepatositler arasındaki madde alışverişi bu boşluklarda gerçekleşir. Hepatositlerin Disse aralığına bakan yüzleri safra kanalcıklarının oluşumuna katılır. Hepatositler, normal koşullarda oldukça düşük mitotik aktiviteye sahip olmasına rağmen, dokuda meydana gelebilecek herhangi bir cerrahi müdahale veya hepatik hasar sonrasında mitotik aktiviteleri artar (Ganong, 1995; Dilek, 2003; Junqueira ve ark., 1993).

b) Endotel Hücreleri

Sinüzoidleri kaplayan hücrelerdir. Endotel Hücreleri, disse aralığı ile hepatositlerden ayrılmışlardır. Sinüzoid yüzeyini kapladıkları için sinüzoidal endotel hücreleri olarak da adlandırılırlar. Sinüzoidler içerisindeki konumları itibarıyla, hepatositler ile aralarında madde alışverişine olanak sağlarlar (Smith ve ark., 2007; Junqueira ve ark., 1993).

c) Kupffer Hücreleri

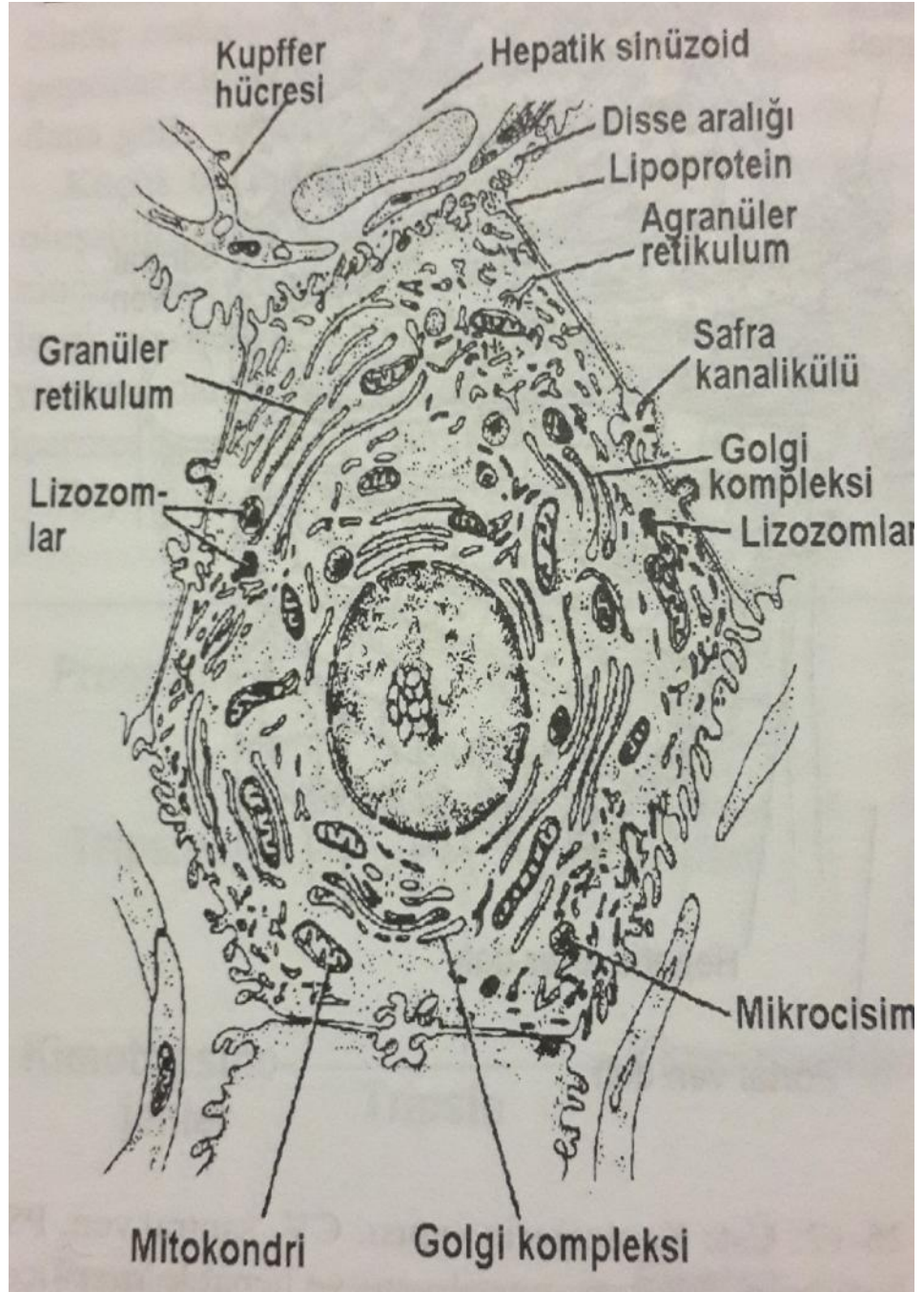
Sinüzoidal alanda endotel hücrelerinin yanında yerleşmiş makrofajlardır. Kupffer hücreleri denen bu makrofajlar, endotel hücrelerin lümene bakan kısımlarında bulunur. Temel fonksiyonları; yaşlı eritrositleri ve hemoglobini metabolize etmek, immünolojik proteinleri sentezlemektir. Lizozomların yaklaşık %25'ine sahiptirler, fagositoz ve endositoz fonksiyonlarını gerçekleştirirler. İmmünomodülatörlerle uyarıldıklarında sitokin salınımını teşvik ederler (Smith ve ark., 2007; Junqueira ve ark., 1993).

d) İto Hücreleri (Perisinüzoidal Hücre)

Disse aralığında bulunan yıldızsı formda hücrelerdir. A vitaminini, lipid damlalarında retinil esterleri şeklinde biriktirirler, depolama fonksiyonundan kaynaklı olarak yağ dolu hücrelerdir (Smith ve ark., 2007; Junqueira ve ark., 1993).

e) Pit Hücreleri

Endotel hücrelere ve Kupffer hücrelerine yapışık formda lokalize olmuş diğer bir hepatik sinuzoidal hücre tipidir (Nakatani ve ark., 2004). Potansiyel toksinlere karşı karaciğer savunma mekanizmasını oluşturan doğal öldürücü hücrelerdir (Smith ve ark., 2007; Kaneda ve ark., 1983). Yapılan çalışmalarda hepatik doğal öldürücülerin deneysel karaciğer metastazının baskılanmasında oldukça etkili olduğu ortaya koyulmuştur (Wiltrout ve ark., 1984; Wiltrout ve ark., 1985).



Şekil 1.2. Karaciğer Hücreleri ince yapısı (Ganong, 1995).

1.4. Punicalagin

Doğanın mucizevi meyvesi olarak bilinen nar (*Punica granatum*) pek çok ülkede geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır (Moneim ve ark., 2012; Ajaikumar ve ark., 2005). Nar; meyve, tohum ve suya kırmızı rengini veren antosiyaninler, ellagik asit ve punicalagin (Şekil 1.3.) gibi hidrolize tanenlerden kaynaklı zengin bir polifenol kaynağıdır (Bell ve Hawthorne, 2007; Adams ve ark., 2006). Aynı zamanda güçlü bir antioksidan (Lin ve ark., 2001), antienflamatuar (Adams ve ark., 2006), antiarteriosklerotik (Aviram ve Dornfeld, 2001; Kaplan ve Aviram, 2001; Nigris ve ark., 2005), antiproliferatif, proapoptotik (Seeram ve ark., 2005) etkili olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. Hipertansiyon (Aviram ve Dornfeld, 2001), diyabet (Das, 2001; Huang ve ark., 2005), kardiyak fibrozis (Huang ve ark., 2005b), prostat kanseri (Heber, 2008; Malik ve ark., 2005), cilt kanseri (Afaq ve ark., 2005), akciğer kanseri (Khan ve ark., 2007), kolon kanseri (Khan, 2009; Kasimsetty ve ark., 2010), göğüs kanseri (Syed ve ark., 2007; Heber, 2008), üzerinde inhibe edici etkileri olduğu deneysel olarak gösterilmiştir.

Nar suyunda en yüksek oranda bulunan bir ellagitannin olan punicalagin, ticari meyve sularında bütün nar meyvesinin preslenmesi esnasındaki basınç nedeniyle meyve suyuna geçmekte ve miktarı 2 g/L düzeyine kadar ulaşmaktadır (Adams ve ark., 2006; Gil ve ark., 2000).

Narın preslenmesi ile elde edilen nar suyunun antioksidan aktivitesinin %92 sini nar kabuğunda bulunan ve hidrolize olabilen tanenlerden kaynaklandığı (Tzulker ve ark., 2007), nar suyunun antioksidan aktivitesinin %50 den fazla kısmının sadece punicalaginden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Adams ve ark., 2006).

Punicalagin, nar kabuğuna sarı rengini veren ve işleme esnasında meyve suyuna geçen ellagik asite hidroliz olabilen (Heber, 2008) fenolik bileşiktir.

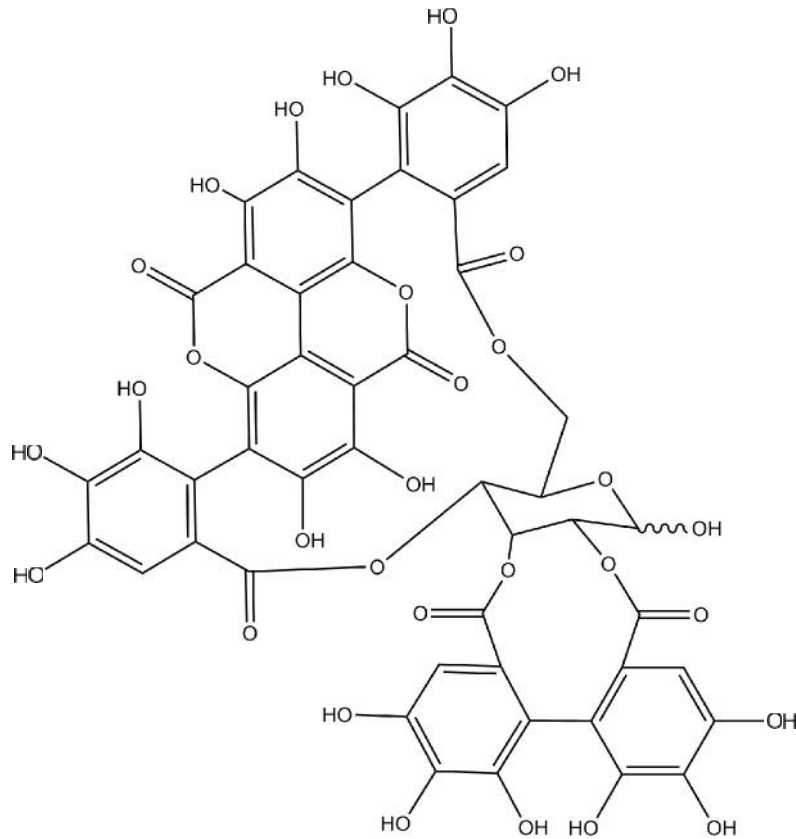
Punicalagin yüksek moleköl ağırlığında, nara özgül bir ellagitanındır (Kulkarni ve ark., 2007; Patel ve ark., 2008). Sahip olduğu antioksidan kapasite, yapısındaki hidroksil (OH) gruplarından kaynaklanmaktadır (Kulkarni ve ark., 2007).

Punicalagin, nar içeriğinde yüksek oranda bulunan bir ellagitanındır, serumda ellagik aside hidrolize olarak bağırsak florasın da urolitine (ellagik asit analogu) dönüşür. Urolitin prostat kanseri üzerinde oldukça etkili bir inhibisyona sahiptir. Heber ve arkadaşlarının (2008) yaptığı bir çalışmada prostat kanseri hücrelerinin punicalagin maruziyeti sonrasında NF-κB aktivasyonunun inhibe edildiğini ortaya koymuşlardır.

Seeram ve ark. (2005); punicalagin, ellagik asit, total nar ellagitanenlerinin antioksidan, antiproliferatif, apoptotik etkileri; insan ağız (KB, CAL27), kolon (HT-29, 9 HCT116, SW480, SW620) ve prostat (RWPE-1, 22Rv1) kanseri hücrelerinde deneysel olarak incelenmiştir. Punicalagin, ellagik asit, total nar ellagitaninlerinin 100ug/mL konsantrasyonu apoptotik etki için, 10ug/mL konsantrasyonu antioksidan aktivite için değerlendirilmeye alınmıştır. Antioksidan aktiviteleri bakımından nar suyu, toplam nar ellagitaninleri, punicalagin, ellagik asit olarak sıralanmıştır (Seeram ve ark., 2005).

Sprague-Dawley sıçanlarda, nar suyunda oldukça fazla bulunan bir ellagitanin olan punicalagin (≥2 g/L), olası toksik etkileri incelenmiştir. Diyetlerinde ortalama %6 punicalagin bulunacak şekilde 37 gün boyunca beslenmişlerdir. Glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzim düzeylerinde herhangi bir artış gözlenmemiştir. Histopatolojik bulgularda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Cerdá B ve ark., 2003).

Lin ve arkadaşları (2001), asetaminofen ile indüklenmiş karaciğer hasarı karşısında, punicalaginın antioksidan ve antihepatotoksik etkilerinin ilişkilendirilmesi hedeflenmiştir. Asetaminofen uygulamasının ardından serumda AST ve ALT düzeylerinde artış görülmüştür. Punicala ve Punicalagin uygulamasıyla ALT ve AST değerlerinin düştüğü kaydedilmiştir. Punicalaginın düşük dozlarda antioksidan ve hepatoprotektif etkili, yüksek dozlarda ise hepatotoksik etkili olduğu bulunmuştur (Lin ve ark., 2001).



Şekil 1.3. Punicalagin açık formülü (Seeram ve ark., 2005).

1.5. Apoptoz

Apoptoz birçok kimyasal maddenin toksisite düzeyinin araştırılmasında kullanılan parametrelerden biridir. Apoptoz, hücrenin apoptotik sinyal üretmesiyle başlar, aynı zamanda hücrede biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerle kendini gösterir (Mignon ve ark., 1998; Dietrich, 1997). Apoptoz sürecinde kaspazların öldürücü olarak aktivite gösterdiği bilinmektedir. (Cohen, 1997; Yıldırım ve ark., 2007). Kaspazlar inaktif proenzim olarak sentezlenirler, genellikle hücrelerdeki inaktif zimojenlerde bulunurlar ve proteolitik parçalanmaları ile aktive olurlar. Aktif kaspazlar protein substratları parçalayarak hücrenin hacimce küçülerek ölüme gitmesine neden olurlar. Hücre, apoptotik evreye girdikten sonra aktif hale gelirler (Kerr ve ark., 1972). Bu enzimler iki ana grupta incelenir. Bunlardan biri başlatıcı kaspazlar, diğerleri ise efektör kaspazlardır. Burada en önemli olan kaspaz grubu efektör kaspazlardır. Bu kaspazlar hücre ölüm yolağını devam ettiren enzimlerdir. Birçok kaspaz tanımlanmıştır. Bunlardan kaspaz 3 aktivasyonu geri dönüşümsüz hücre hasarına neden olduğu için, apoptozun belirlenmesinde kullanılmaktadır (Forest ve ark., 2005; Yıldırım ve ark., 2007).

Apoptoz, inflamasyon ortaya çıkmaksızın; hücrelerin ortadan kalktığı, programlı ve aynı zamanda organizmada homeostazinin sağlandığı fizyolojik bir ölüm sürecidir (Tomatır, 2003). Hücrenin yaşamı boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Kerr ve ark., ilk kez apoptoz terimini 1972'de kullanmışlardır. Morfolojik ve biyokimyasal olarak nekrotik hücre ölüm şekline tamamen farklıdır (Bylinsky, 1997; Hızel, 1997; Israels ve Israels 1999; Nagata, 1999). Apoptoz çeşitli viral, immünolojik, malign ya da ilaç kökenli insan karaciğer hastalıklarında ortaya çıkabilmektedir. Karaciğer apoptoz mekanizmasında etkili olan iki protein, hepatosit yüzeyinde bulunan fas/apo-1 ve safra hücrelerinde lokalize olmuş Bcl-2 proteinleridir (Feldman, 1997). Büyüme sinyalinin ortadan kalktığı durumlarda apoptoz tetiklenir. Apoptoz sinyali alan hücrede kaspaz proteinleri salınmaya başlar, kromatin yoğunlaşır, DNA fragmentasyonu başlar,

hücre büzüşüp kondanse olur, hücre iskeleti dağılır, apoptotik cisimciklere dönüşür (Öktem ve ark., 2001; Walker ve ark 1988; Tomatır, 2003; Kerr ve ark., 1972; Turner ve ark., 2004; Yıldırım ve ark., 2007) (Tablo 1.1.).

1.5.1. Apoptozun İndüksiyonu

Apoptoz; Fas (APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ligandlar ile uyarılmaları sonucu indüklenir ve sitokrom c'nin salınmasının ardından, apoptozom oluşumu (sitokrom c, Apaf-1, kaspaz-9 kompleksi) ile devam eder. Apoptozom oluşumu ile membran potansiyeli değişir, plazma membranın iç tarafındaki fosfatidilserin, aminofosfolipid transferaz enziminin yardımıyla membranın dış yüzeyine transloke olur. Bu fosfatidilserinlere makrofaj reseptörleri bağlanarak fagositozu başlatır. Aynı zamanda translokasyon ile kaspazlar aktive olur. Kaspazların aktivasyonu ile karakteristik morfolojik değişiklikler görülmeye başlar (Antar, 2005; Ulukaya, 2003; Öktem ve ark., 2001; Walker ve ark 1988; Tomatır, 2003; Kerr ve ark., 1972; Turner ve ark., 2004; Yıldırım ve ark., 2007).

Bcl-2 ailesi hem pro-apoptotik (Bax, Bak, Bad, Bcl-XS) hem de anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL) üyeler içerir. Bcl-2 molekülleri mitokondrilerden sitokrom c salınımını kısıtlayarak apoptozu inhibe ederken, proapoptotik faktörler de sitokrom c salınımını, Apaf-1'e bağlanmasını ve kaspazları aktive eder. Organizmada, DNA hasarına yanıt olarak p53 indüksiyonu ile bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan Bax'ın indüksiyonuna yol açar ve apoptoz başlatır. p53 Bax'ın indüksiyonu dışında Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonu ile de apoptozu başlatabilir (Lodish ve ark., 2008).

Tablo 1.1 Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü arasındaki farklılıklar (Ulukaya, 2003).

Apoptoz	Nekroz
Hücre membranının büzüşmesi	Hücre membran bütünlüğünün kaybı
Organelleri ve kromatin parçalarını içerir, apoptotik cisimciklerin oluşumu gözlenir	Hücre lizis olur, dağılır
Organelllerin disintegrasyonu yoktur.	Organellerin disintegrasyonu mevcuttur.
Vakuolizasyon gözlenmez.	Hücrede vakuollerin oluşumu gözlenir.
Hücre iskeletinin yıkımı vardır.	Sistemik hücre iskelet elemanlarının yıkımı yoktur.
Hücrede hacimce küçülme gözlenir	Hücrede şişme gözlenir
200kb ve katları şeklinde DNA fragmentasyonu gözlenir.	Rastgele DNA fragmentasyonu gözlenir
Hücrede inflamasyon oluşmaz.	Hücrede inflamasyon oluşur.
Enerji gereksinimi vardır.	Enerji gereksinimi yoktur.
Fagositler yoluyla gerçekleşir.	Komşu hücreler yoluyla gerçekleşir.
Kromatin kondensasyonu, apoptotik cisimcikler, izole tek hücrenin ölümü söz konusudur.	Hücre ölümü çevre dokularda da hasara neden olur

1.5.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Hücre apoptoza giderken, hücrede birçok morfolojik (hücre büzüşmesi, kromatin kondensasyonu, apoptotik cisimcikler vb.) ve biyokimyasal değişiklikler (DNA fragmentasyonu, fosfotidilserin moleküllerinin hücre membranının dış yüzeyine transloke olması vb.) ortaya çıkar (Şekil 1.4.). Apoptotik hücrelerin tespiti için kullanılan yöntemler de bu nedenle çok çeşitlilik göstermektedir (Güleç ve Eren, 2008).

- TUNEL yöntemi
- Hematoksilen-eozin boyama
- Giemsa boyama
- Elektronmikroskopi
- Anneksin V yöntemi
- Agaroz jel elektroforezi
- Flow sitometri
- ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)
- Faz kontrast mikroskopi
- M30 yöntemi
- Kaspaz-3 yöntemi
- Western blotting
- Floresan Mikroskopi

TUNEL yöntemi (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP Nick End Labeling.)

DNA fragmentasyonunun in situ olarak tespit edilmesini sağlar (Gavrieli ve ark., 1992; Kressel ve Groscurth, 1994; Yılmaz ve ark., 2005). Kromatin materyalinin parçalanması sonucu ortaya çıkan 3'OH uçlarının DNA polimeraz yardımıyla terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme yöntemidir (Aral, 1996; Elmore 2007; Kressel ve Groscurth, 1994). TUNEL yöntemi ile apoptotik sürecin başında, kromatin yoğunlaşması yeni başladığı sırada, morfolojik değişiklikler henüz ortaya çıkmadan önce tespit edilebilmektedir (Arends ve ark., 1990; Kerr ve ark., 1972). In situ apoptoz tespit yöntemi apoptoz ile ilişkili kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonunu tespit ettiğinden; apoptozu nekrozdan morfolojik olarak ayırmaktadır (Labat-Moleur ve ark 1998).

Hematoksilen-eozin boyama

Hematoksilen-eozin (HE) boyama yöntemi pratik bir uygulamadır. Işık mikroskobu incelemelerinde HE boyama ile apoptotik ve normal fizyolojiye sahip hücre morfolojileri kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. HE boyası genetik materyali boyadığı için DNA fragmentasyonları çekirdek zarı civarında lokalize olmuş apoptotik cisimcikler şeklinde gözlemlenebilir (Güleş ve Eren 2008; Ulukaya, 2003; Mountz ve Zhou ;2001).

Giemsa Boyama

Giemsa boyama tekniğinde hücre çekirdeği boyandığı için, apoptotik hücreler belirgin morfolojik farklılıklarla ayırt edilebilmektedir (Yılmaz, 2005; Güleş ve Eren 2008).

Elektronmikroskopi

Hücre subsellüler yapı değişikliklerinin ayrıntılı bir biçimde incelenmesine olanak sağlayan ileri mikroskopi tekniğidir. Hücre hacminin küçülmesi, kromatin fragmentasyonu-kondensasyonu, hücre organellerinin şişme-büzülme durumları, hücre zarı bütünlüğü gibi ayrıntıların incelenmesine olanak sağlar (Yılmaz, 2005; Güleş ve Eren 2008).

Anneksin V yöntemi

Normal fizyolojiye sahip hücrelerde membranın iç yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin bulunmaktadır. Hücre apoptotik evreye girdiğinde, iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik sürecin başlangıç evrelerinde meydana gelir. Hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilme özelliğine sahip olan Anneksin-V, floresan bir madde olan FITC ile işaretlenerek apoptotik hücre

görünür hale getirilebilmektedir (Zhang ve ark., 1997; Yılmaz; 2005; Güleş ve Eren; 2008).

Agaroz jel elektroforezi

Agaroz, yüklü parçacıkların elektrik alanı altında; molekül ağırlığına bağlı olarak hareket etmesi esasına dayanır. Agaroz orta ve büyük oranlardaki DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için yaygın ve pratik olarak kullanılan destek ortamıdır. DNA kırıklarının gösterilebildiği bir yöntemdir. Apoptotik hücrelerdeki endonükleaz aktivitesi kromatinin fragmentasyonuna neden olur. Endonükleaz, DNA'da yaklaşık 180-200 baz çifti ve katları oranında kırılmaya yol açar. Kırılmaların sonucunda jelde merdiven biçiminde bir görüntü ortaya çıkar, bu bulgu apoptoz için karakteristiktir (Yılmaz, 2005; Güleş ve Eren, 2008; Ulukaya, 2003).

Flow sitometri

Flow sitometri metodunda, hücreler veya moleküller floresan (13-phycoerithrin, FITC, propidium iyodür, rhodamine-GG vb.) bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak, apoptotik süreçte ekspresyonu artan protein tespit edilebilmektedir (Aral, 1996; Güleş ve Eren, 2008). Klinikte apoptozun belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

ELISA yöntemi, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli olan antiglobulinin ilave edilmesi ve daha sonra substratın eklenmesi sonucunda ortaya çıkan renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı, spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. Apoptozda görülen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların salınmasını takip eden DNA fragmentasyonudur (Salgame ve ark., 1997). ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında, gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. (Overbeeke ve ark., 1998, Ulukaya, 2003). Bu analiz yöntemi agaroz jel elektroforez ile apoptotik

DNA merdiveninin belirlenmesinden yaklaşık 500 kat daha fazla duyarlı ve çok sayıda örneğin test edilebilmesi açısından daha uygundur (Salgame ve ark., 1997).

Faz kontrast mikroskopi

Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (blebs) ve hücre sitoplazmasında meydana gelen vakuoller gözlemlenebilir (Güleş ve Eren, 2008).

M30 yöntemi

Apoptotik hücrelerdeki kaspazların, sitokeratin 18'i kırmaları sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal olarak boyanması prensibine dayanır. Sitokeratin 18'in eksprese olduğu dokularda uygulanması mümkündür. Bu dokular genellikle epitelyal kaynaklı dokulardır (Güleş ve Eren, 2008; Ulukaya, 2003).

Kaspaz-3 yöntemi

Immunohistokimyasal boyama yöntemi ile dokudaki apoptotik hücrelerde ekspresyonu artan kaspaz-3 belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın, kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekmektedir (Güleş ve Eren, 2008; Overbeeke ve ark., 1998; Ulukaya, 2003).

Western blotting

Western blotlama, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metod ile, spesifik protein ona özgü antikor kullanılarak bir karışım içinden saptanabilmektedir. Western blotting yardımıyla apoptoza özgü proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn: kaspaz-3) ya da kırılıp kırılmadıklarının saptanması mümkündür (Yılmaz, 2005; Güleş ve Eren, 2008).

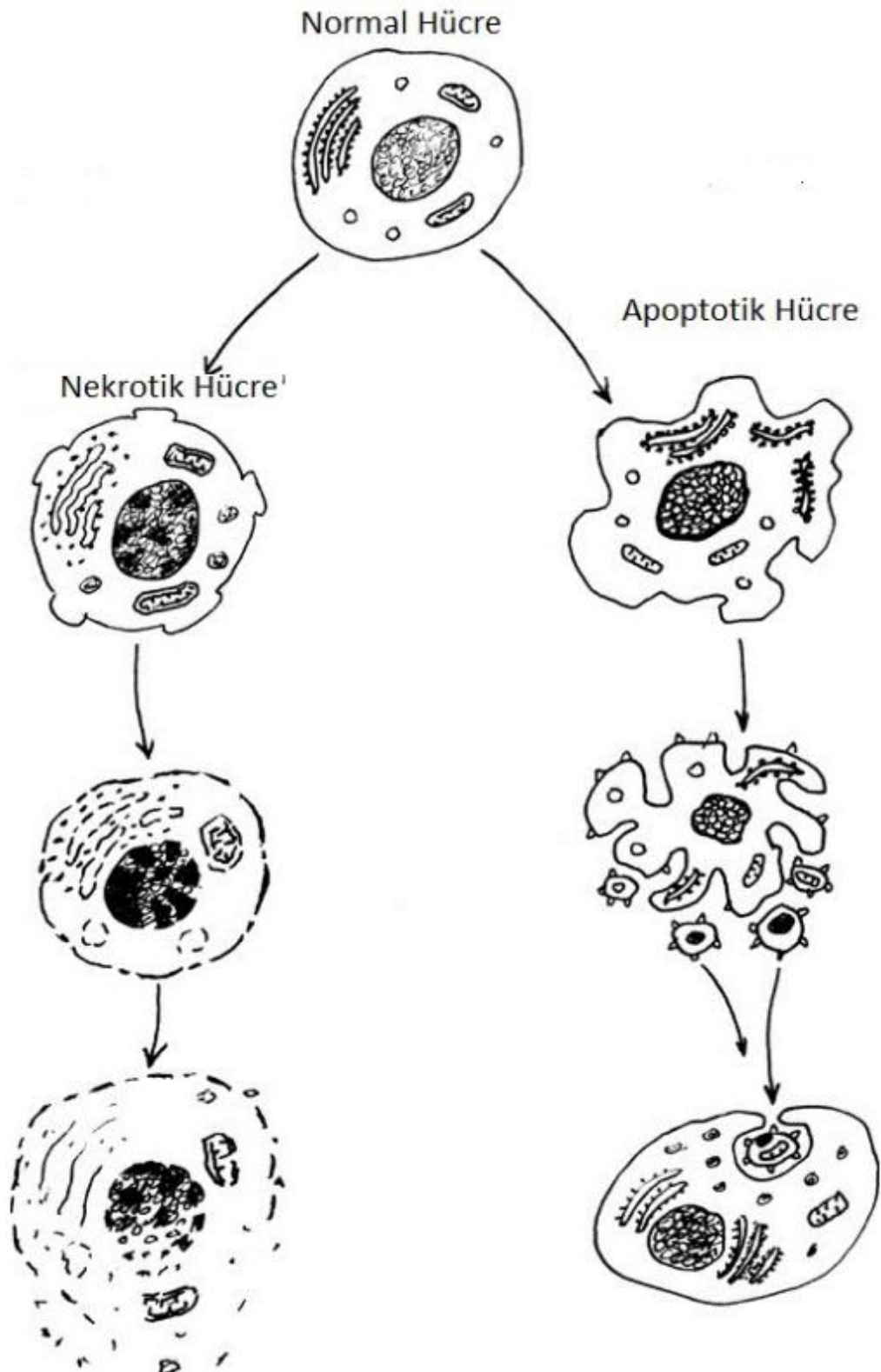
Floresan Mikroskopi

Floresan mikroskopi, floresan özelliği olan boyaların (Rhodamine, Hoechst boyası, DAPI “4,6 diamidine-2’-phenylindole”, propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC “fluorescein isothiocyanate”) kullanılmasıyla yapılan bir preparasyon tekniğidir. Preparata uygun dalga boyunun seçilmesinin ardından, floresan maddenin uyarılması ile yansıyan ışığın analizi sonucu görüntünün elde edilmesi prensibine dayanır. Floresan boyalar DNA’ya bağlandığı için hücre çekirdeğinin görünür hale gelmesini mümkün kılmaktadırlar. Yöntem hücre ölüm şeklinin, hücre morfolojisinin tespit edilmesi esasına dayanır (Ulukaya, 2003; Yılmaz, 2005).

1.6. Kaspazların Aktivasyonu

Kaspazlar, inflamasyon ve apoptosis gibi çeşitli hücresel işlevlerden sorumlu evrimsel olarak korunmuş bir sistein proteinaz ailesidir (Khan, 2008). Kaspazlar hücre içinde inaktif formda bulunurlar. Apoptoz sinyalinin alınmasıyla birlikte aktive olurlar. Aktivasyonları adaptör proteinler aracılığı ile gerçekleşir. Adaptör proteinler başlatıcı kaspazları birbirine yaklaştırarak aktive ederler. Apoptoz sırasında ilk görev alanlar başlatıcı/öncü kaspazlar, apoptotik yolağın sonraki aşamalarında aktive olanlar efektör kaspazlardır. Başlatıcı kaspazlar; kaspaz 2, 8, 10, efektör kaspazlar; kaspaz 3, 6, 7 olarak gruplandırılırlar (Yıldırım ve ark., 2007).

Kaspaz-3 en önemli öldürücü kaspazdır. Kaspaz-3 aktivasyonu erken apoptozun biyokimyasal belirteçidir. Apoptoz tayininde Kaspaz-3 aktivitesinin tespit edilmesi önemli bir parametredir (Pfister ve ark., 2013).



Şekil 1.4. Nekrotik ve Apoptotik ölüm farklılığı (Meer ve ark., 2010)

1.7. NF- κ B (NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B)

NF- κ B hemen hemen hayvan hücrelerinin tamamında (omurgalı ve omurgasızlarda) bulunan (Luqman ve Pezzuto, 2010), hücrenin immün ve enflamatuvar uyarılara verdiği yanıtın düzenlenmesini ve hücrenin canlılığını sürdürmesini kontrol eden en önemli protein grubudur. Bu kontrol kanser kemorezistansı, onkogenez, adaptif immünite, B ve T lenfositlerin lenfopoezini içeren birçok biyolojik olayı kapsar (Yıldırım ve ark., 2007).

Hücrenin yaşam ve ölüm arasındaki belirleyici role sahip regülatörlerinden biri NF- κ B yolağıdır. Transkripsiyon faktörü nükleer faktör NF- κ B, dokularda apoptotik hücre ölümünün güçlü bir indükleyicisi olan TNF- α 'nın neden olduğu apoptoza karşı koruyucu görev üstlenmiştir. Karaciğerde hepatektomiden 48 saat sonra, NF- κ B aktivasyonu eksikliği karşısında DNA sentezinde %80 oranında azalma olduğu ortaya koyulmuştur (Plümpe ve ark., 2000).

Hepatositlerde, NF- κ B aktivitesi inhibe edildiğinde apoptozun tetiklendiği belirtilmiştir (Bellas, 1997). %70 parsiyal hepatektomi deney modeli in vivo olarak NF- κ B aktivasyonunun, hücre proliferasyonunun indüksiyonu ve apoptozun inhibisyonun gösterilmesinde özgün bir deney modelidir (Plümpe ve ark., 2000).

NF- κ B; p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), RelA (p65), c-Rel ve RelB alt ünitelerine sahip (Karin, 2011) Rel ailesinin indüklenebilir bir heterodimerik transkripsiyon faktörüdür (Karin ve Lin, 2002). Aynı zamanda hücre dışı stres gibi çeşitli uyarılara karşı hücrenin ana mediatördür (Takahashi ve ark., 2002). NF- κ B aktivasyon kontrolü; sitoplazmada, endojen I κ B inhibitörü tarafından kontrol edilir. Nükleer faktör inhibitörü kappa B (I κ B)'nin fosforilasyon ve proteolitik yıkımı, NF- κ B'nin serbest bırakılması ve nükleer translokasyonunun

yanısıra proenflamatuar genlerin transkripsiyonunu da sağlar (Takahashi ve ark., 2002).

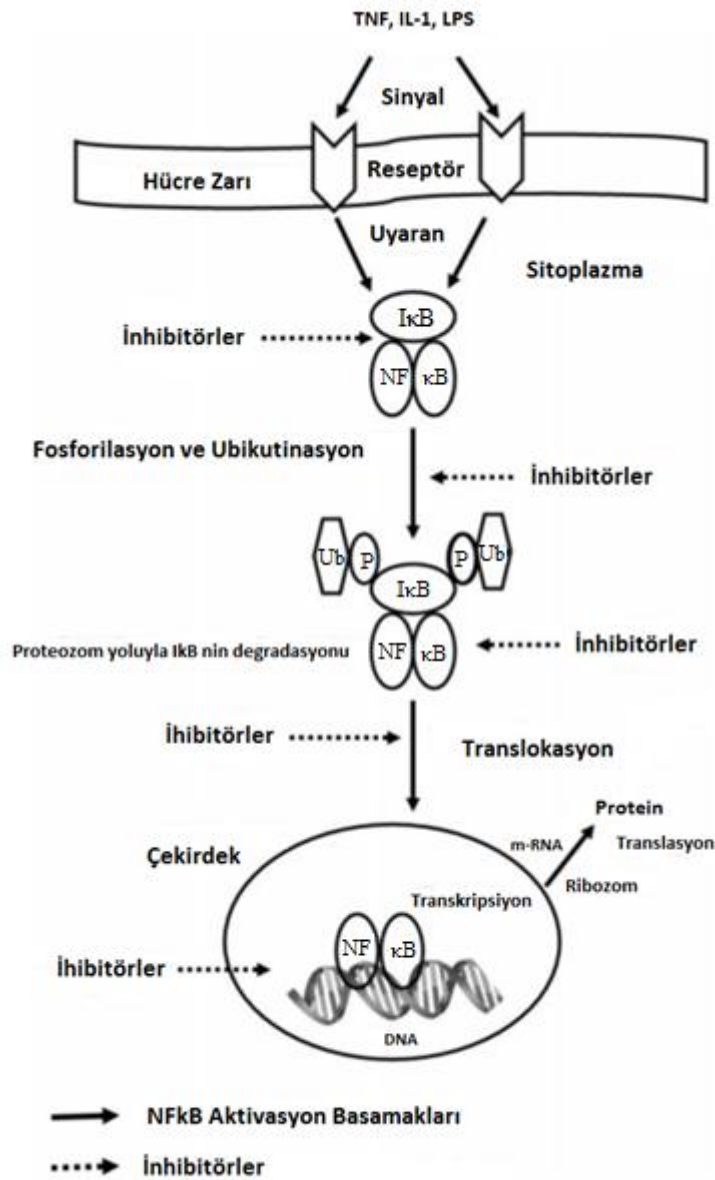
NF- κ B aktivasyonu bloke edildiğinde, apoptoz kaspaz inhibitörleri tarafından bloke edilir. TNF- α aktivasyonu ise kaspaz-2 ve kaspaz-3 aktivasyonunu artırır, kaspaz-8 ise sadece NF- κ B aktivasyonu engellendiğinde aktive olur (Xu ve ark., 1998).

NF- κ B, inflamasyon ve apoptosis ile ilişkili genlerin düzenlenmesinden sorumlu, Rel-family proteinlerinin heterodimerik bir kompleksidir (Anlela ve ark., 2000; Karin ve Lin, 2002, Karin ve ark., 2002). NF- κ B, G₀ fazında Nükleer faktör inhibitörü kappa B (I κ B) proteinleri tarafından inaktif formda sentezlenir. NF- κ B; sitokinler, radyasyon ve kemoterapötik ajanlarla fosforilasyon, ubiquitinasyon ve I κ B'nin proteozom-aracılı yıkımı ile aktive olur (Yıldız, 2007).

İnflamasyon, sitokinler (TNF- α , interleukin-1), büyüme faktörleri, hormonlar (EGF, insulin), mikrobiyal antijenler, virüsler (HIV-1, HTLV-1) ve ürünleri (double-stranded RNA, Tax protein) NF- κ B aktivasyonunu başlatırlar (Liou, 2006).

NF- κ B aktivasyonu TNF- α stimülasyonu ile gerçekleşir. Bu stimülasyon NF- κ B indükleyen kinazları uyarır (NIK). NIK ise I κ B kinaz (IKK) kompleksinin aktivasyonuna neden olur, I κ B kinaz N-terminal serin rezidülerinden I κ B proteinlerini fosforlar. Fosforlanmış I κ B proteinleri ubiquitin ligazlar tarafında tanınır. Bu tanınma poliubikitinasyona ve I κ B proteinlerinin ardışık degradasyonuna neden olur. I κ B proteinlerinin degradasyonu ile serbest kalan NF- κ B dimerleri çekirdeğe geçerek orada spesifik sekanslara bağlanır (Andela ve ark., 2000; Luqman ve Pezzuto 2010). Aktive olmuş NF- κ B'nin inaktivasyonu ise çeşitli geri bildirim yolları ve yeni sentezlenmiş I κ B proteinlerinin tekrar NF- κ B ye bağlanması ve sitozole geçmesi ile sonlanır (Şekil 1.5.). NF- κ B nin inaktivasyonu, I κ B proteinlerinin NF- κ B ye bağlı olarak, nükleer lokalizasyon sekanslarını maskeleyerek ile gerçekleşir (Luqman, 2010).

Transforme olmamış hepatositlerde, NF- κ B aktivitesi inhibitör proteinler tarafından baskılanmıştır (Plümpe ve ark., 2000). %70'lik parsiyal hepatektomi sonrası serum TNF α seviyeleri artar, bu artış NF- κ B'nin nükleer translokasyonuna neden olur. Farelerde TNF-R₁ eksikliğinde, zayıf NF- κ B aktivitesi, IL-6 seviyesinin düşmesine ve DNA replikasyonunun azalması ile sonuçlanır (Plümpe ve ark., 2000).



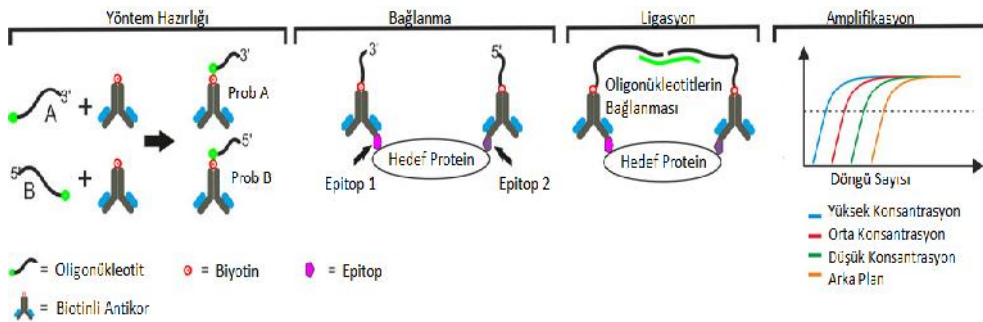
Şekil 1.5. NF- κ B aktivasyonu (Luqman ve Pezzuto, 2010)

1.8. Kantitatif RT-PCR Yöntemi

TaqMan protein analizi (TPA), kalıp DNA amplifikasyonu ile proteinleri tespit eden, protein kantifikasyonunda yeni nicel bir metoddur (Fredriksson ve ark., 2007).

Üç temel basamakta gerçekleşir (Swartzman ve ark., 2010).

1. Çift haldeki oligonükleotit problemlerin hedef proteinlere bağlanması: Spesifik antitacı ile bağı olan (biotin-streptavidin bağı ile) oligonükleotit problemler hedef proteine bağlanırlar (Şekil 1.6.).
2. Oligonükleotitlerin ligasyonu: DNA ligaz ile hedef proteine bağlanmış oligonükleotit problemlerin ligasyonu gerçekleşir (Şekil 1.6.).
3. Ligasyon ürününün amplifikasyonu ve TaqMan real-time protein metodu ile analizi: Ligasyon ürünü, TaqMan real-time PCR için kalıp görevi görür ve amplifikasyonu başlatır (Şekil 1.6.) (Swartzman ve ark., 2010; Gullberg ve ark.,2004).



Şekil 1.6. Q-PCR Reaksiyonu (Pfister ve ark., 2013).

1.9. Hepatik Hasar

Akut karaciğer hasarı, alkole bağlı karaciğer hasarı, ilaçlara bağlı karaciğer hasarı, kronik karaciğer hasarı olmak üzere hepatik hasar tipleri gruplandırılabilir. AST, ALT, γ -glutamil-transpeptidaz ve glutamat-dehidrogenaz gibi enzim değerlerinin kan da yükselmeleri karaciğerde hepatik hasara işaret etmektedir (Karlson, 1980). Transaminaz düzeylerinin, AST için 200U/L, ALT için 300U/L değerlerine ulaşmış olması hepatik hasarın göstergesidir. Akut hepatik hasarda AST, ALT düzeyleri hızlı pik yapar, pikden sonra hızlı bir düşüş gösterir. AST düzeyi ALT düzeyine göre daima daha yüksektir yarılanma ömrü de ALT ye göre daha kısadır (Dilek, 2003).

1.10. Parsiyal Hepatektomi

Karaciğerde parsiyel hepatektomi genellikle kitlesel lezyonların (metastaz, primer karaciğer tümörleri, hemanjiom, vb.,) tedavisinde, canlıya karaciğer transplantasyonlarında uygulanmaktadır (Bedirli ve ark., 2005).

Karaciğer loblarının bir kısmının (yaklaşık %70) cerrahi olarak çıkartılması (parsiyal hepatektomi) sonrası, karaciğer eski yapısına dönmek için hepatositler hızla bölünme evresine geçerler (Rabes, 1978; Fausto; 1990). %70 PH sonrası hepatositler G_0 fazından G_1 fazına geçişleri 4-6 saat içinde tamamlanır. Hepatositlerin G_1 fazından S fazına geçişleri 18 saat içinde başlar ve 24 saat içinde maksimum seviyeye ulaşır (Chagas ve ark., 2009). Karaciğer tekrar normal büyüklüğüne erişene kadar rejenerasyon devam eder (Michalopoulos ve DeFrances, 1997). Karaciğer yapısında çok farklı hücre tipleri mevcuttur ve hepatik rejenerasyon esnasında aktif rol alırlar. Kısmi hepatektomi sonrasında rejeneratif yanıtın başlaması birçok faktöre bağlıdır (Ayan. ve ark., 2011; Bedirli, ve ark., 2005; Michalopoulos ve DeFrances, 1997). Büyüme hormonlarının endokrin ve parokrin etkileri, spesifik protoonkogenlerin aktivasyonları, transkripsiyon faktörleri

rejenerasyon sırasında oldukça önemlidir (Ayan ve ark., 2011; Webber ve ark, 1993).

NF- κ B, STAT3 ve AP-1 (Adaptör-ilişkili protein kompleksi) karaciğer rejenerasyonunu başlatan temel transkripsiyon faktörleridir. PH den sonraki ilk 4 saat içerisinde NF- κ B, AP-1, STAT3 transkripsiyon faktörlerinin bağlanmaları artar. NF- κ B aktivasyonu PH den sonra 30 dakika içinde gözlenmeye başlar ve 4-5 saat kadar devam eder (Tewari ve ark., 1992; FitzGerald ve ark., 1995; Fausto, 2000). AP-1 ve STAT3 ün bağlanması PH den sonra oldukça yavaş bir şekilde gerçekleşir ve STAT3 ün bağlanması için 6 saatten fazla bir süreye ihtiyaç duyulabilir.

Apoptoz ve inflamasyon süreçlerinde rol oynayan bir sitokin olan TNF bir çok hücrede NF- κ B yi aktive eder, ip TNF enjeksiyonunun 30 dakika sonra sıçan karaciğerinde yüksek oranda NF- κ B bağlanmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Yamada ve ark., 1997).

2/3 PH modelinde, sol ve medial loblar bağlanıp çıkartılır. Böylelikle karaciğerin %65-70'i çıkartılmış olur (Şekil 1.7.) (Higgins ve Anderson, 1931). Hepatositler nadiren bölünen, oldukça farklılaşmış hücre gruplarıdır. Ancak 2/3'lük PH ardından eş zamanlı olarak hücre siklusuna girerler. PH nin ardından ilk basamakta 4-6 saat içinde hücreler büyüme faktörlerine tamamiyle cevap verebilir ve replikatif basamağa geçebilirler (Suzuki ve Tsukamoto, 2004).

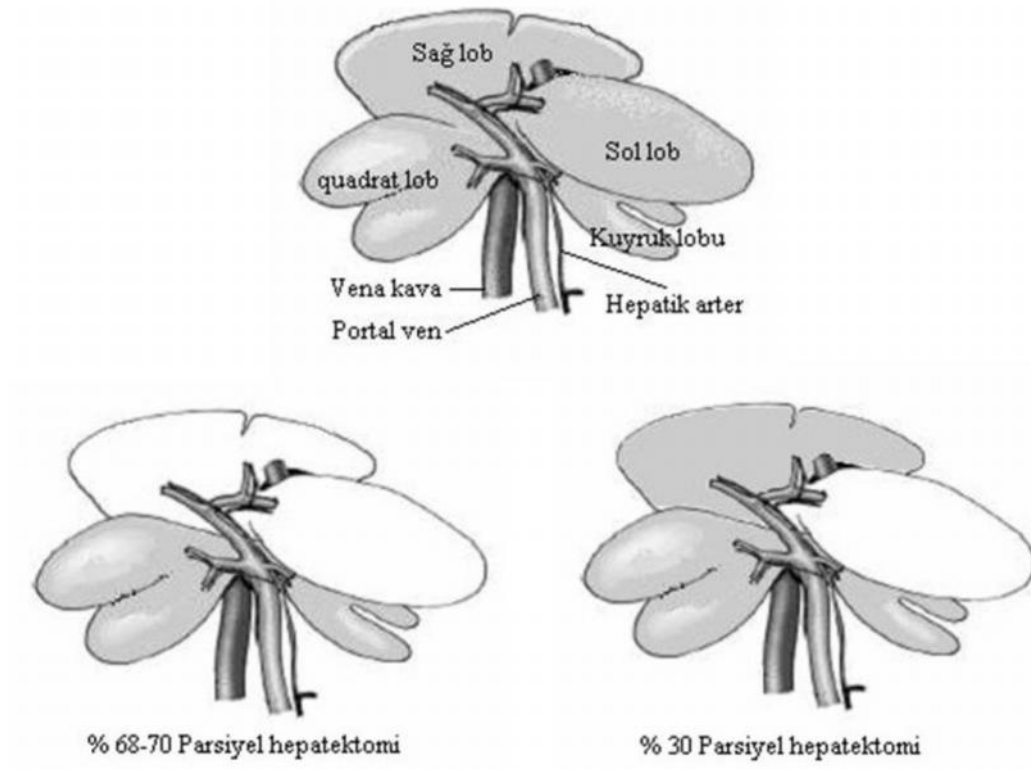
Memeli karaciğer hücrelerinin %65'ini oluşturan, düşük proliferatif aktivite ve geniş bir yaşam sürecine sahip hepatositler; karaciğer dokusunun bir kısmının çıkartılmasından sonra, dikkat çekici bir rejenerasyon kapasitesi gösterirler. Memeli karaciğer hücrelerinin %65'ini oluşturan hepatositler düşük proliferatif aktivite ve geniş bir yaşam sürecine sahiptirler (Yamada ve ark., 1997). Genç sıçan ve farelerde, %70 PH den sonra karaciğer kütlesi 7-10 gün içerisinde tekrar toplam kütle büyüklüğüne erişir (Yamada ve ark., 1997; Grisham, 1962; Higgins ve Anderson, 1931).

Bu çalışmada % 70'lik PH işlemi ile rejenerasyonun indüklendiği ve bu indüksiyona karşılık punicalaginın sıçan karaciğeri üzerinde oluşturduğu apoptotik etki, gen düzeyinde ve histolojik olarak araştırılmıştır.

1.11. Karaciğer Rejenerasyonu

Normal fizyolojiye sahip karaciğer dokusunda rejenerasyon oldukça nadir seyreden bir durumdur. Hepatositlerde mitotik aktiviteye çok nadir rastlanır, öte yandan karaciğer dokusunun cerrahi olarak ya da hepatik hasar sonucu kaybı ile dokuda mitotik aktivite hızlanır (Fausto, 2000). Hepatositlerde mitotik aktivite, kanda dolaşan şalon(chalon) olarak isimlendirilen haberci maddeler tarafından kontrol edilir. PH işlemiyle dokuda miktarı azalan şalonların DNA replikasyonunu baskılayamamakta ve mitotik aktivite hızlanmaktadır. Doku organizmanın ihtiyacını karşılayabilecek büyüklüğe ulaştığında, hücrede şalonların da miktarı artmış ve DNA replikasyonu baskılanmaya başlamıştır. Şalonlar dokuda mitotik aktivitenin sonlanmasına neden olur (Fausto, 2000; Dilek, 2003). EGF (epidermal growth faktör), HGF (Hepatosit growth faktör), TGF- α (transforming growth faktör alfa), TGF- β (transforming growth faktör beta), IL-6 hepatositlerde rejenerasyonu kontrol eden faktörlerdendir (Fausto, 2000; Fausto ve ark., 1995).

PH sonrası rejenerasyon ilk 12 saat içinde başlayıp, 24 saatte maksimum düzeye ulaşmaktadır. Yaklaşık olarak 10 gün içerisinde organ kendisini tamamen organizmanın ihtiyaç duyduğu büyüklüğe tamamlamaktadır (Tewari ve ark., 1992; FitzGerald ve ark., 1995). Büyüme, karaciğer kütlesi ile vücut kütle oranı dengelenene kadar devam etmektedir. Organ transplantasyonlarında transplante edilen parça küçük ise, vücut oranı doğrultusunda büyür; ya da transplante edilen miktar büyük ise vücut oranı ile orantılı olarak küçülmektedir (Fausto, 2000).



Şekil 1.7. Sıçan karaciğerinde PH (Palmes ve Spiegel, 2004).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Deney hayvanları

Deneyisel çalışmamızda sağlıklı, 200 ± 20 g ağırlıkta, 3-4 aylık, *Wistar albino* cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Tüm deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Çalışma süresince 12:12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, sıcaklığı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve nemi %45-50 olarak optimize edilmiş laboratuvar ortamında yaşatılmıştır. Deneyisel çalışmalar öncesinde hayvanların bir hafta ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Bu süre zarfında deney hayvanları polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ve çeşme suyu verilerek bakılmıştır.

2.2. Deney grupları

Her bir deney grubu için 7 hayvan kullanılmak koşulu ile 6 grup oluşturuldu.

Grup I: Sham 3 saat grubu, herhangi bir cerrahi uygulamaya maruz bırakılmaksızın, batin açılıp kapatılan ve 3 saat sonra disekte edilen grubu ifade etmektedir.

Grup II: Sham 6 saat grubu, herhangi bir cerrahi uygulamaya maruz bırakılmaksızın, batin açılıp kapatılan ve 6 saat sonra disekte edilen grubu ifade etmektedir.

Grup III: %70 PH işleminin hemen ardından 1mL SF enjeksiyonu yapılan ve 3 saat sonra disekte edilen grubu ifade etmektedir.

Grup IV: %70 PH işleminin hemen ardından 1mL SF enjeksiyonu yapılan ve 6 saat sonra disekte edilen grubu ifade etmektedir.

Grup V: %70 PH işleminin hemen ardından 15mg/kg (Lin, 2001) punicalagin enjeksiyonu yapılan ve 3 saat sonra disekte edilen grubu ifade etmektedir.

Grup VI: %70 PH işleminin hemen ardından 15mg/kg (Lin, 2001) punicalagin enjeksiyonu yapılan ve 6 saat sonra disekte edilen grubu ifade etmektedir.

2.3. Punicalagin Uygulaması

Punicalagin (P0023) $\geq 98\%$ (HPLC) saflıkta Sigmadan temin edilmiştir. Punicalagin, hepatektomi işleminden hemen ardından, steril 1 mL %0.9 SF içinde 15mg/kg (Lin, 2001) çözülerek intra peritoneal olarak uygulanmıştır.

2.4. Anestezi ve cerrahi işlemler

Cerrahi uygulamaların tamamı steril koşullar altında gerçekleştirildi. Deney hayvanlarına intramusküler 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezisi uygulanarak, midline laparotomi gerçekleştirildi. Cerrahi uygulamalar sonrasında karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

2.4.1. Parsiyal hepatektomi işlemi

Parsiyal hepatektomi uygulanacak deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sabit sıcaklık koşullarında diseksiyon tablasına tespit edildi. Rektal ısı kontrolü yapıldı. Cerrahi uygulama bölgesi traşlandı ve batikon ile temizlendi (Şekil 2.1.). Higgins ve Anderson'un (1931) tekniğiyle parsiyal hepatektomi gerçekleştirildi.

Deney hayvanının karın bölgesine, vücuda paralel 2-3 cm' lik bir orta hat kesisi ile laparotomi yapıldı (Şekil 2.2.). Karaciğer loplarnı birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin yaklaşık %68- 70 oranında kütesini oluşturan öndeki sağ, orta ve sol yan loplara ayrıldı (Şekil 2.3.). Bu loplara ait hepatik arter, ven ve safra kanalları etrafından, ipek sütün geçirilerek bağlandı. Bağın hemen üstünden kesim gerçekleştirildi (Şekil 2.4.).

Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril SF verildi (Kaya ve ark., 2002). Sonra, kas (Şekil 2.5.) ve deri (Şekil 2.6.) kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 4/0 ipek sütünle dikilerek kapatıldı. Poviiodoks antiseptik solüsyon ile laparotomi bölgesi temizlendi. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı, kimyasal sterilizasyonu yapılmış, polikarbonat kafeslere ayrı ayrı yerleştirildi. Diyet değişikliği yapılmaksızın, deney gruplarına bağlı olarak 3 ve 6 saatlik periyotlarda yaşatıldı.



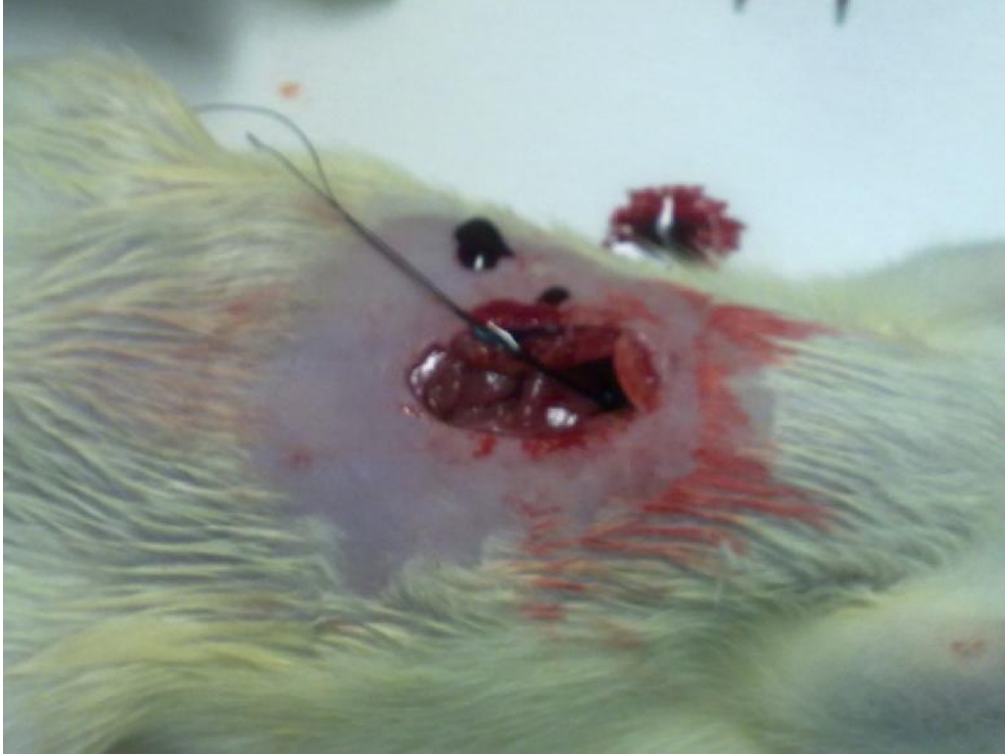
Şekil 2.1. Sıçan batın kısmı traşlandıktan sonra, batikon ile temizlendi.



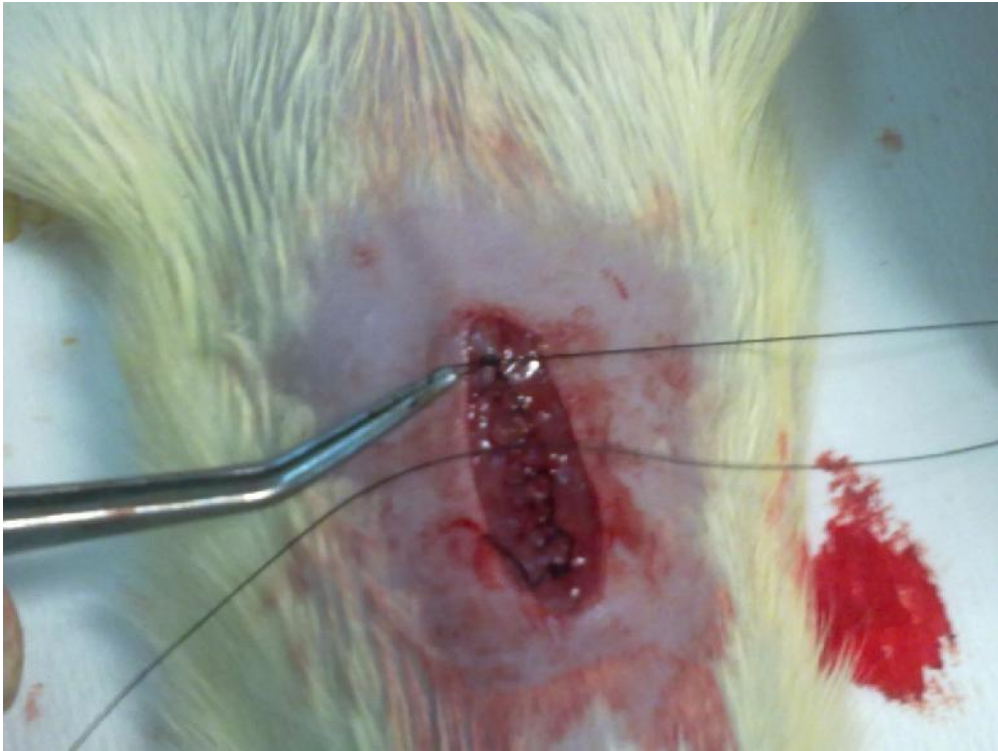
Şekil 2.2. Median laparotomi uygulaması.



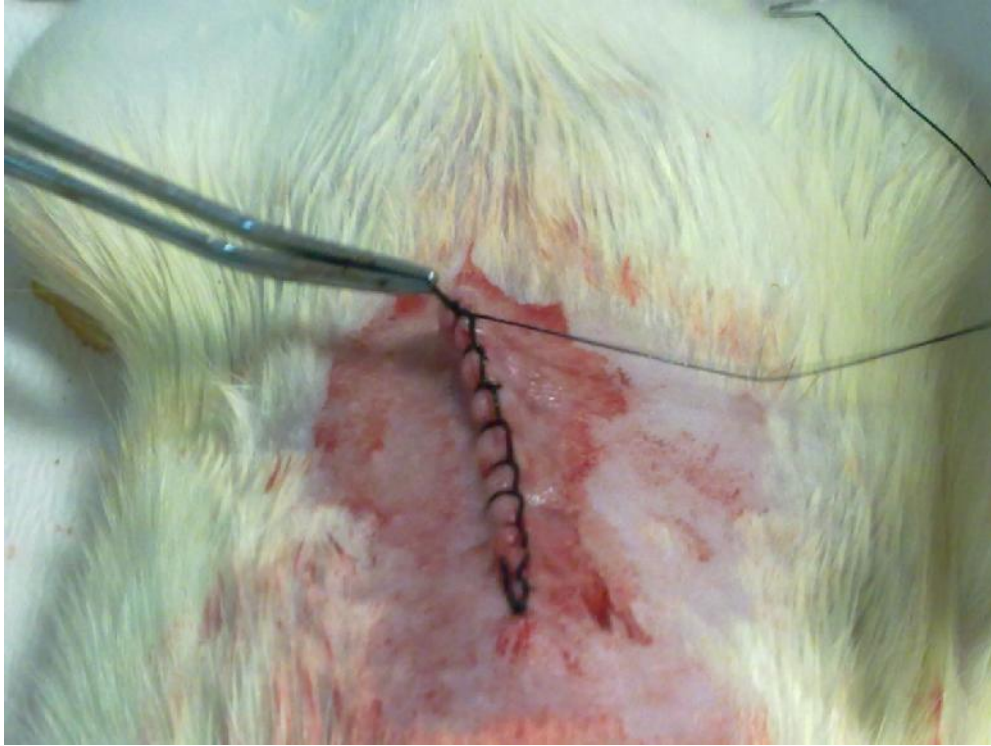
Şekil 2.3. % 70 PH görünümü (PH uygulanan loblar).



Şekil 2.4. %70 PH sonrası.



Şekil 2.5. Kas, 4/0 ipek suturele dikilerek kapatıldı.



Şekil 2.6 Deri, 4/0 ipek suture ile dikilerek kapatıldı.

2.5. Doku örneklerinin değerlendirilmesi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında etik kurallar çerçevesinde hayvanlardan intrakardiyak kan alındıktan sonra diseksiyonları gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80°C de muhafaza edilmiştir.

2.5.1. Real Time-PCR

Yaklaşık olarak 50-100 mg karaciğer doku örneklerinden, trizol ile RNA izolasyonu yapılmıştır, izole edilen RNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi için revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

2.5.1.1. Trizol ile RNA İzolasyonu için Gerekli Malzemeler

1. Trizol
2. Kloroform/4-Bromoanizol
3. 2–merkaptoetanol
4. %96–100 alkol, %70 alkol
5. 12,000g kapasiteli mikrosantrifuj cihazı
6. 1.5 mL RNaz-sız mikrosantrifüj tüpleri
7. RNaz–sız pipet uçları (filtreli)
8. Homojenizatör

2.5.1.2. RNA İzolasyon Basamakları

1. Doku örneği oda ısısında 2-3 dakika inkübe edildi.
2. 50-100 mg doku örneği oda sıcaklığında 5 dakika 1mL Trizol ile inkübe edildi.
3. Her 1mL Trizol için tüpe 0.2 mL kloroform ilave edildi. Tüp yavaş hareketlerle 15 saniye çalkalandı.
Vortekslemek RNA örneğinin DNA kontaminasyonunu arttırabilmektedir.
4. Örnek +4 °C’de 12,000g de 15 dakika santrifüj edildi.
Santrifüj sonrası RNA içeriğinin bulunduğu renksiz üst kısım alındı.
5. Yaklaşık 400 µL renksiz sıvı kısım yeni bir RNaz-sız santrifüj tüpüne aktarıldı.
6. Eşit hacimde %70’lik alkol ilave edildi ve ardından vortekslendi.
7. 700µL örnek kolona aktarıldı.
8. 12000g de 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kolondan tüpe geçen numune yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
9. Numune üzerine, 700µL yıkama solüsyonu I eklendi ve oda ısısında 12000g de 15sn santrifüj edildi.

10. 500 μ L yıkama solüsyonu II ilave edildi, oda ısısında 12000g de 15sn santrifüj edildi.
11. Toplama tüpleri boşaltıldı ve membranın kuruması için oda sıcaklığında 12000g de 1 dakika santrifüj edildi.
12. 30 μ L RNaz-sız su eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
13. Spin kolon en az 12000g de 2 dak santrifüj edildi.
14. Tekrar 30 μ L RNaz-sız su eklendi ve oda sıcaklığında 14000g de 2 dakika santrifüj edildi.
15. Kolonlar atıldı, toplama tüplerine RNA elde edildi.

2.5.1.3. RT Reaksiyonu için Gerekli Malzemeler

- a. Revers transkriptaz (200 U/ μ l).
- b. Random primer (100 μ M)
- c. dNTP karışımı (10 mM)
- d. Revers transkriptaz tamponu
- e. Nükeazsız su
- f. RNaz İnhibitörü

2.5.1.4. RNA nın RT Reaksiyonu ile c-DNA Dönüşüm Basamakları

Örnek sayısından beş fazla sayıda reaksiyon karışımı (RNA hariç) hazırlandı. Her PCR tüpüne, karışımdan 10 μ L eklendi.

1. 10 μ L (Tablo 2.1. deki şekilde hazırlandı) 2 $\times$ RT-PCR reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu plate e pipetlendi.
2. 10 μ L RNA örneği her bir kuyucuğa pipetlendi.
3. Plate yüzeyleri sıkıca yapıştırılarak kapatıldı.
4. 96 kuyucuklu plate kısa süre santrifüj edildi. (Örneklerin kuyucuklarda dibe çökmesi için.)
5. PCR reaksiyonu başlayana kadar plateler buz üzerinde bekletildi.
6. Revers transkriptaz reaksiyonu Tablo 2.2. deki şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 2.1. RT c-DNA Sentez Master Mix Karışımı *10 uL RNA eklendi her bir kuyucuğa.

İçerik	Reaksiyon Hacmi(uL)	
	RNaz İnhibitörü ile	RNaz İnhibitörsüz
10 $\times$ RT Tamponu	2 μ L	2 μ L
25 $\times$ dNTP Karışımı (100 mM)	0.8 μ L	0.8 μ L
10 $\times$ RT Primerler	2 μ L	2 μ L
MultiScribe™ Revers Transkriptaz	1 μ L	1 μ L
RNaz İnhibitörü	1 μ L	–
Nukleazsız su	3.2 μ L	4.2 μ L
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 μ L	10 μ L

- I. Reaksiyon hacmi 20 μ L'ye ayarlandı.
- II. PCR cihazına 96 kuyucuklu plaka yüklendi.
- III. Revers transkripsiyon reaksiyonu başlatıldı.

Tablo 2.2. Revers Transkriptaz Reaksiyon Termal Profil

	1.Basamak	2.Basamak	3.Basamak	4.Basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Zaman	10 dak.	120 dak.	5 dak.	∞

2.5.1.5. cDNA Saklama Koşulları

Elde edilen cDNA Tablo 2.3. deki koşullarda muhafaza edildi. Uzayan saklama koşullarında nükleik asit degradasyonunu engellemek için, final konsantrasyonu 1mM olarak ayarlanabilecek şekilde EDTA ilave edildi.

Tablo 2.3. cDNA Saklama Koşulları

Saklama Süresi	Saklama Sıcaklığı (°C)
Kısa Süre (24 saate kadar)*	2-6°C
Uzun Süre	(-15)-(-25) °C

2.5.1.6. RT-PCR Reaksiyon Bileşenleri

RT-PCR reaksiyon karışımı Tablo 2.4. deki oranlarda hazırlandı. Reaksiyon Tablo 2.5 deki termal profil koşullarında gerçekleştirildi.

Tablo 2.4. RT-PCR Reaksiyon Karışımı

İçerik	Hacim (µL)/Reaksiyon
TaqMan Gen Ekspresyon Mastur Karışımı (2X)	10 µL
TaqMan Gen Ekspresyon Test (20X)	1 µL
c-DNA (62,5ng/µL)	2,5 µL
H ₂ O	6,5 µL
Toplam Hacim	19 µL

*c-DNA miktarı 1uL de 25 ng olacak şekilde optimize edildi

Tablo 2.5. RT-PCR Reaksiyonu Termal Profili

			40 Döngü	40 Döngü
Süre	2 dak	10 dak	15 sn	1dak
Derece	50°C	95°C	95°C	60°C

2.5.2. Q RT-PCR Reaksiyonu

2.5.2.1. Probların Sulandırılması

Test prob dilüsyon tamponu, test prob A, test probe B eritildikten sonra, istenen oranlarda ilave edilerek solüsyon hazırlandı (Tablo 2.6).

Tablo 2.6. Probların Sulandırılması

Test Prob Solüsyonu	Hacim (μL)
Test Prob Dilüsyon Tamponu1X	216
Test Prob A 20X	12
Test Prob B 20X	12
Toplam Hacim	240

2.5.2.2. Bağlanma Reaksiyonu

Test prob solüsyonu kuyucuklara 2 μL ilave edildi, üzerlerine 2 μL örnek ilave edildi. Bağlanma reaksiyonu Tablo 2.7. deki koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 2.7. Bağlanma Reaksiyonu Termal Profili

Derece ($^{\circ}\text{C}$)	37	+4
Süre (Dak.)	60.00	∞

2.5.2.3. Ligasyon Reaksiyonu

DNA ligaz dilüe edildi ve Tablo 2.8 de belirlenen koşullarda ligasyon reaksiyonu kuruldu.

Tablo 2.8. Ligasyon Reaksiyonu Termal Profili

Derece ($^{\circ}\text{C}$)	37	+4
Süre (Dak.)	10.00	∞

2.5.2.4. Proteoliz Reaksiyonu

Proteoliz reaksiyon karışımı Tablo 2.9 daki şekilde hazırlandı ve Tablo 2.10. daki reaksiyon koşullarında gerçekleştirildi.

Tablo 2.9. Proteoliz Reaksiyon Karışımı

	Hacim (µL)
Proteaz (100X)	4
PBS 1X pH:7.4	396
Toplam Hacim	400

Tablo 2.10. Proteoliz Reaksiyonu Termal Profili

	Proteolizin Sonlandırılması	Proteinazın İnaktivasyonu	
Derece (°C)	37	95	+4
Süre (Dak.)	10	5	∞

2.5.2.5. Kantitatif PCR (Q-PCR) Reaksiyon Basamakları

1. 12 µL test prob A, 12 µL test prob B ve 216 µL test prob dilüsyon tamponu kullanılarak test solüsyonu hazırlandı.
2. Her bir kuyucuğa 2 µL test prob solüsyonu ve 2 µL hücre lizatu eklendi.
3. 37°C’de 60 dak. inkübe edildi.
4. 2 µL DNA ligaz ve 998 µL ligaz dilüsyon tamponu kullanarak DNA ligaz dilüe edildi.

5. 600 µL ligasyon reaksiyon tamponu, 10 908 µL su ve 12 µL dilüe DNA Ligaz kullanarak ligasyon solüsyonunu hazırlandı.
6. Her bir kuyucuğa 96 µL ligasyon solüsyonu eklendi ve 37°C'de 10 dk. inkübe edildi.
7. Ligasyonu durdurmak için 4 µL proteaz ve 396 µL PBS karıştırıldı. Her bir kuyucuğa 2 µL dilüe proteaz solüsyonu eklendi.
8. 37°C'de 10 dk. veya 95°C'de 5 dk. inkübe edildi.
9. 1200 µL TaqMan Protein Test Fast Master Mix ve 120 µL Universal PCR Test karıştırılarak Q-PCR karışımı oluşturuldu, ardından 11 µL/kuyucuk PCR karışımı ve 9 µL/kuyucuk proteazla muamele edilmiş ligasyon ürünleri ilave edildi.
10. Q-PCR işlemi gerçekleştirildi.
11. Sonuçlardan C_T değerleri elde edilip analizleri yapıldı

Kantitatif PCR reaksiyon karışımı Tablo 2.11. deki oranlar kullanılarak hazırlandı.

Tablo 2.11. Q-PCR Reaksiyon Karışımı

Real Time Master Karışımı	Hacim(uL)	
	1 Reaksiyon	96 kuyucuklu plaka
TaqMan Protein Exp. Fast Master Karışımı 2X	10	960
Üniversal PCR Assay 20X	1	96
Toplam Hacim	11	1056

2.5.3. TUNEL Metodu

Apoptotik hücreleri belirlemek için birçok metod önerilmiştir. Apoptozun biyokimyasal belirteci endonüklez olarak bilinmektedir. TUNEL Metodu DNA ipliğinde ortaya çıkan kırıkların in situ işaretlenmesini enzimatik olarak gerçekleştirmektedir.

Karaciğer kesitlerinin Apop Taq Plus Peroxidase in Situ Apoptosis kiti kullanılarak TUNEL boyamaları gerçekleştirildi. Tüm grupların apoptotik indeksleri çıkartılıp, istatistiksel analizleri yapıldı. 40X objektifte 5 farklı alandan elde edilen apoptotik ve normal hepatositlerin sayıları belirlendi, oranlanarak apoptotik indeks çıkartıldı.

Parafin kesitler için TUNEL (Terminal dUTP nick-end labeling) protokolü

1. Doku kesitlerine şale içerisinde deparafinizasyon işlemi uygulaması

- a. Kesitler 3 kere 5'er dakika ksilende yıkandı.
- b. Daha sonra kesitler 2 kere 5'er dakika absolü etanolde yıkandı.
- c. Kesitler %95 etanolde 1 kere 3 dakika yıkandı. Ardından %70 etanol de 1 kere 3 dakika yıkandı.
- d. Kesitler 5 dakika PBS ile yıkandı.

2. Dokuya ön işlem uygulanması

- a. Proteinaz K (20µg/ml) oda sıcaklığında kesit üzerine, 60µL/5cm² miktarda olacak şekilde 15 dakika boyunca uygulandı.
- b. Kesitler 2 kere 2'şer dakika şale içerisinde distile su ile yıkandı.

3. Endojen peroksidazın sulandırılması

- a. %3 hidrojen peroksit PBS içinde 5 dakika oda sıcaklığında sulandırıldı.
- b. Doku örneği her biri 5 dakika olmak üzere 2 kere PBS ya da su ile hafifçe yıkandı.

4. Dengeleme tamponu uygulaması

- a. Kesitin etrafındaki fazla sıvı dikkatlice aspire edildi.
- b. Hemen ardından kesit üzerine, 75 $\mu\text{L}/5\text{cm}^2$ miktarda olacak şekilde dengeleme tamponu direk olarak uygulandı.
- c. En az 10 saniye oda sıcaklığında inkübe edildi.

5. TdT (Terminal deoksinükleotidil transferaz) enzimi uygulanması

- a. Kesit etrafındaki fazla sıvı hashas bir şekilde aspire edildi.
- b. Hemen kesit üzerine 55 $\mu\text{L}/5\text{ cm}^2$ olacak şekilde TdT enzimi pipetlendi.
- c. 1 saat süre ile 37°C'de nemli ortamda inkübe edildi.

6. Durdurma/Yıkama tamponunun uygulanması

- a. İçerisinde durdurma/yıkama tamponu bulunan şale içerisine kesitler alındı, 15 saniye hafifçe çalkalandı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- b. Anti-Digoxigenin konjugatından örnek sayısı yetecek miktarda alındı, oda sıcaklığına getirildi.

7. Anti-Digoxigenin konjugatının uygulanması

- a. Kesitler 1er dakika 3 tekrarlı olarak PBS ile yıkandı.
- b. Kesitin etrafındaki fazla sıvı dikkatlice aspire edildi.
- c. Oda sıcaklığına getirilmiş olan Anti-Digoxigenin konjugatı 65 $\mu\text{L}/5\text{ cm}^2$ olacak şekilde kesitlerin üzerine uygulandı.
- d. Kesitler 30 dakika nemli oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. PBS de yıkama

- a. Kesitler şale içerisinde oda sıcaklığında 2 dakika 4 tekrar şeklinde PBS ile yıkandı.
- b. Lamlar yıkanırken peroksidaz substrat solüsyonu hazırlandı.

9. Peroksidaz substratın renk gelişimi

- a. Kesitin etrafındaki fazla sıvı dikkatlice aspire edildi.
- b. Peroksidaz substratı yeterli miktarda ($75\mu\text{L}/5\text{cm}^2$) tüm kesit yüzeyini kaplayacak şekilde uygulandı.
- c. Oda sıcaklığında 3-6 dakika işaretleme yapıldı.
- d. Uygun işaretleme süresini tespit etmek için lam mikroskop altında izlendi.

10. Kesit yıkanması

- a. Kesitler şale içerisinde distile su ile 1'er dakika 3 tekrar şeklinde yıkandı.
- b. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında şale içerisinde distile suda 5 dakika inkübe edildi.

11. Kesitlere ikincil boyamanın uygulanması

- a. Kesitler oda sıcaklığında şale içerisinde, 10 dakika süresince %0.5'lik metil yeşil kullanılarak ikincil boyamaları yapıldıktan sonra şale içinde 3 kere distile su ile yıkandı. 1. ve 2. yıkamada 10 kere daldırılıp çıkartılarak yıkandı. 3. yıkamada ise 30 saniye şale içerisine daldırılarak bekletildi.
- b. Kesitler şale içinde 3 kere %100 lük N-Bütanol ile yıkandı. 1. ve 2. yıkamada 10 kere daldırılıp çıkartılarak, 3. yıkamada ise 30 saniye şale içerisine daldırılarak bekletildi.

12. Kesitler kapatıldı ve mikroskop altında incelendi.

Daha sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi (ApopTaq® Plus Peroxidase *In Situ* Apptosis Detection Kit).

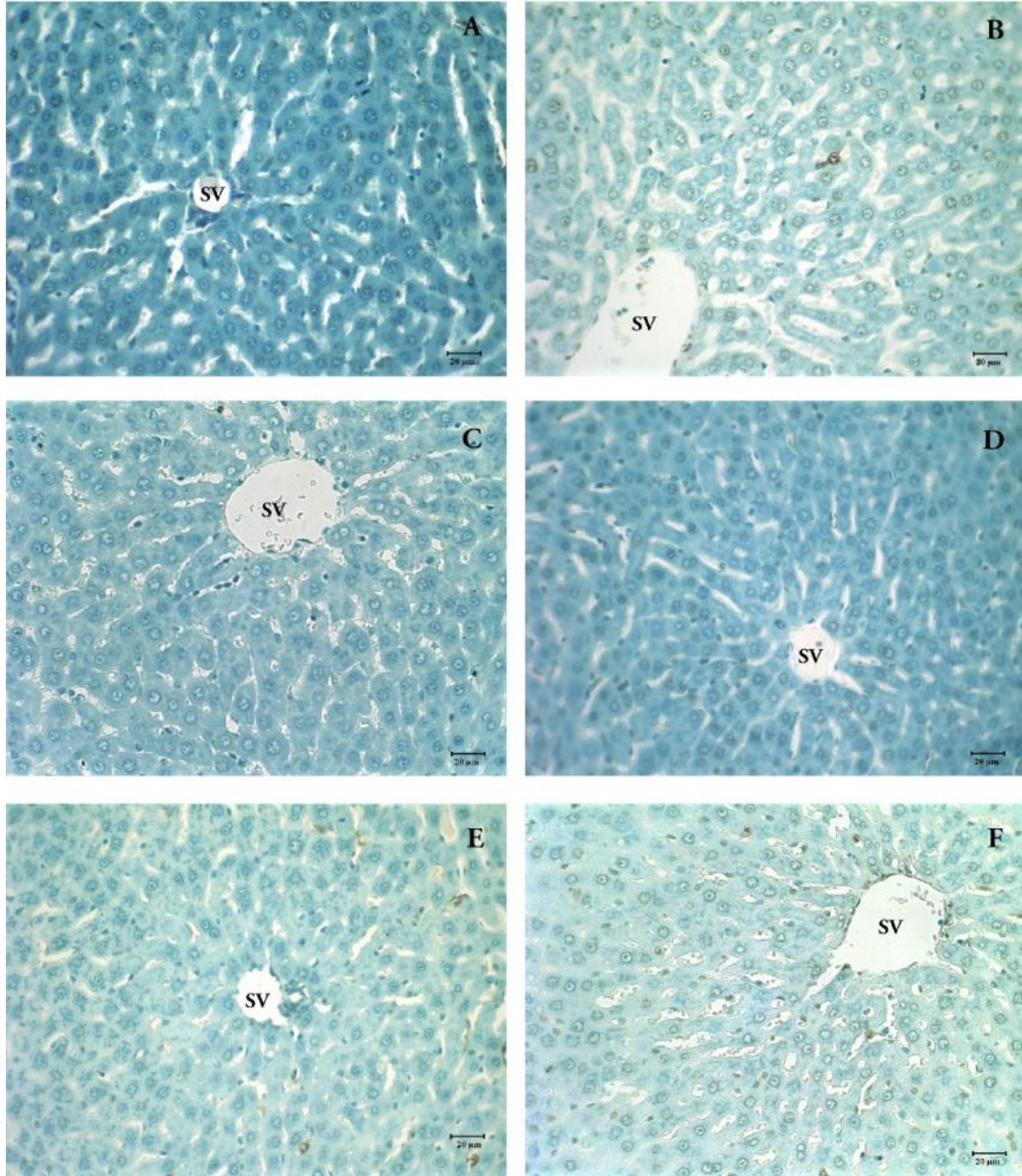
2.6. İstatistiksel Analiz

Tüm sonuçlar IBM Statistics 20 programı kullanılarak Kruskal-Wallis ve Kolmogorov-Smirnov testleri uygulanarak değerlendirildi. Kruskal-Wallis testi sonrasında $P < .05$ anlamlılıkla, gruplar arasında farklılık tespit edildi. İkili grupları karşılaştırmak amaçlı Kolmogorov-Smirnov ikili örneklem testi uygulandı, her iki grup karşılaştırıldığında $P < .05$ bulunan gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar ortaya kondu.

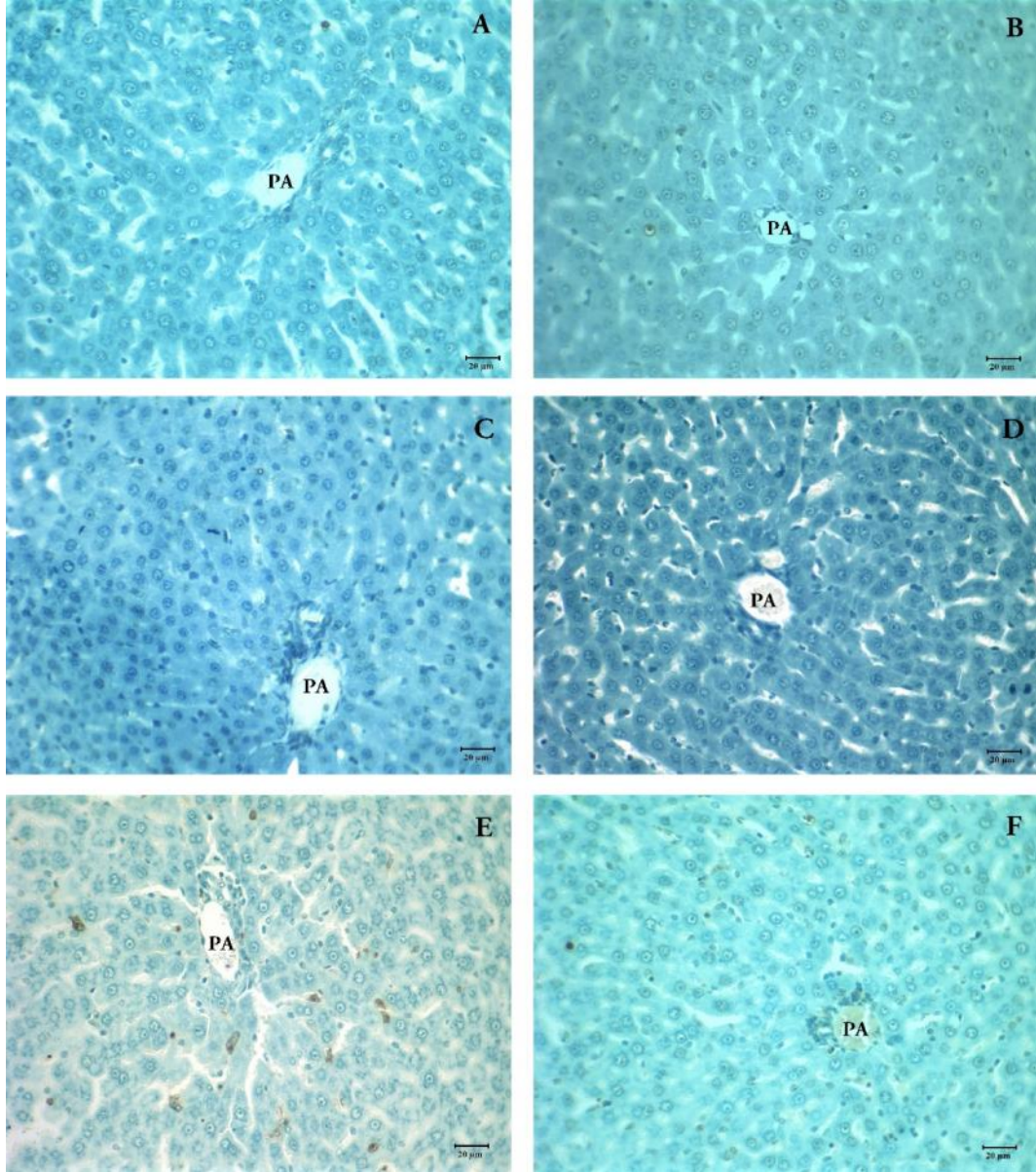
3. BULGULAR

3.1. Histolojik Değerlendirmeler

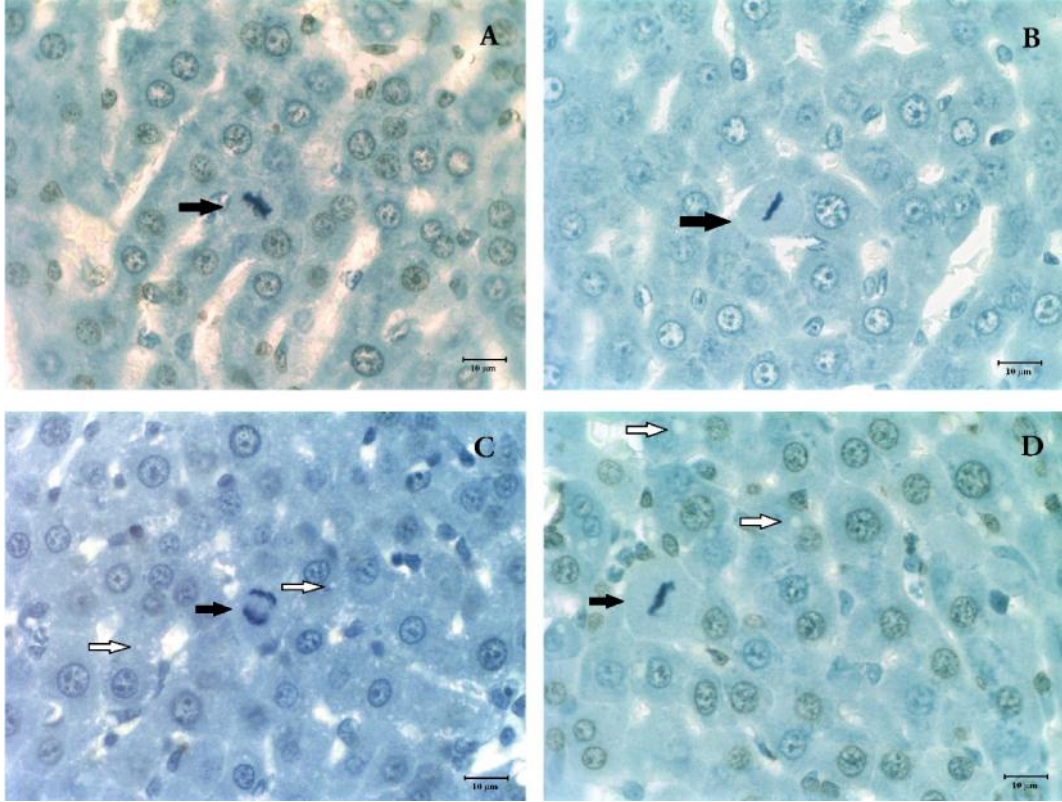
Deney gruplarına ait TUNEL kesitlerinde; I. gruba ait kesitlerde sentral ven (sv) çevresinde hepatositlerin ışınsal formda lokalizasyonu ile oluşturduğu lobüllerin birleştiği bölümlerde, üçgen formda portal alanlar (pa) gözlenmektedir. Doku normal histolojiye sahiptir (Şekil 3.1A, Şekil 3.2A). Mitotik (Şekil 3.1A) ve apoptotik (Şekil 3.2A) hücreler gözlenmektedir. II. Gruba ait kesitlerde histolojik yapı normal görünüme sahiptir, ancak apoptotik hücrelerin sayısı I. Gruba oranla artmıştır (Şekil 3.1B, Şekil 3.2B). PH nin hemen ardından SF verilen Grup III ve Grup IV karaciğer kesitlerinde de doku bütünlüğü aynen korunurken mitozun yaygın olduğu gözlenmekte ve hepatositlerde PH den kaynaklı vakuolizasyonlar ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.1C, Şekil 3.1D, Şekil 3.2C, Şekil 3.2D, Şekil 3.3C, Şekil 3.3D,). IV. Grupta ait kesitlerde, mitotik aktivite III. Gruba göre oldukça artmıştır. PH uygulamasının ardından 15mg/kg ip punicalagin uygulanan ve 3. saatin sonunda diseksiyonu yapılan V. Grupta apoptotik hücreler artmıştır (Şekil 3.1E, Şekil 3.2E, Şekil 3.4C). PH uygulamasının ardından 15mg/kg ip punicalagin uygulanan ve 6 saat sonra disekte edilen Grup VI da histolojik yapı bütünlüğü aynen korunurken TUNEL pozitif hücrelerin ve vakuolizasyonların sayısının oldukça fazla arttığı gözlenmektedir (Şekil 3.1F, Şekil 3.2F, Şekil 3.4D).



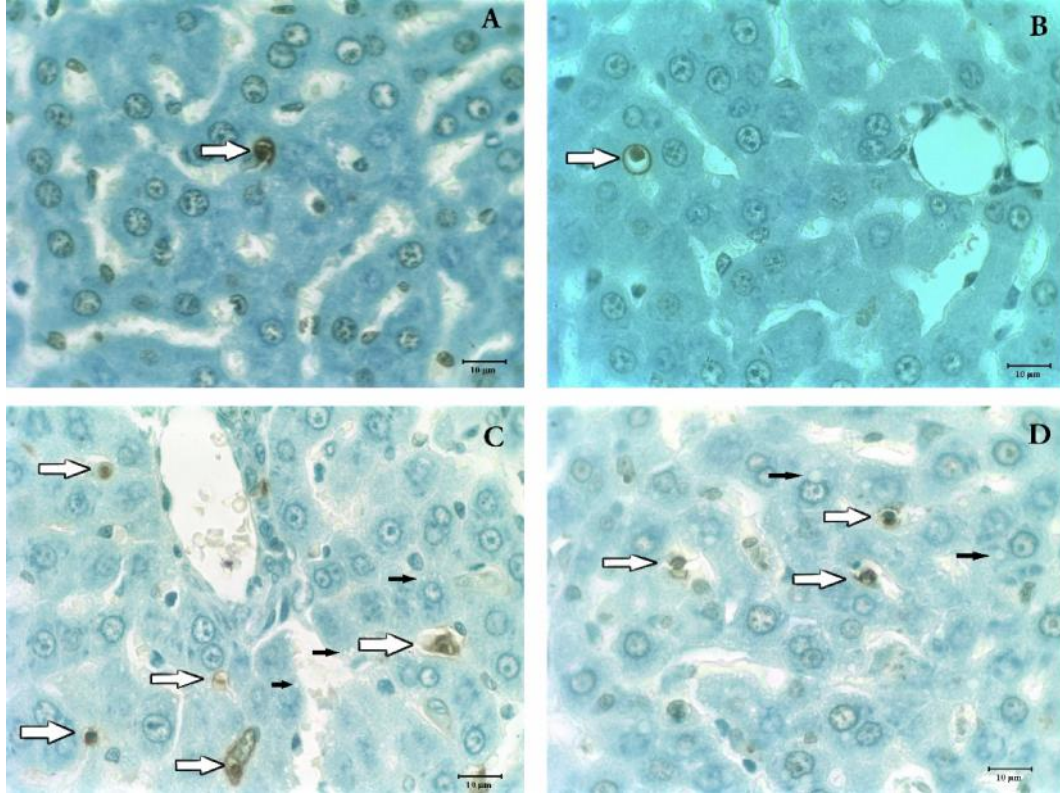
Şekil 3.1. Gruplara ait karaciğer kesitlerinde Sentral Ven (SV) çevresindeki hepatositler: A) Grup I, B) Grup II, C) Grup III, D) Grup IV, E) Grup V, F) Grup VI.



Şekil 3.2. Gruplara ait karaciğer kesitlerinde Portal Alan (PA) çevresindeki hepatositler: A) Grup I, B) Grup II, C) Grup III, D) Grup IV, E) Grup V, F) Grup VI.



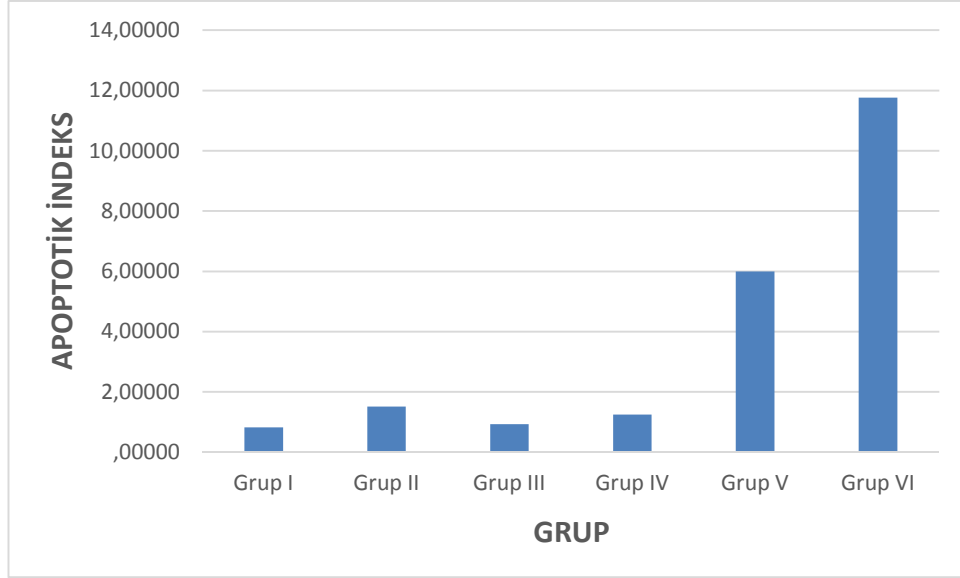
Şekil 3.3. Karaciğer kesitlerinde mitotik hepatositler: A) Grup I, B) Grup II, C) Grup III, D) Grup IV. Mitotik aktivite siyah renk ok ile, vakuolizasyon beyaz renk ok ile gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Karaciğer kesitlerinde apoptotik hepatositler: A) Grup I, B) Grup II, C) Grup V, D) Grup VI. Apoptotik aktivite beyaz renk ok ile, vakuolizasyon siyah renk ok ile gösterilmiştir.

3.2. Apoptotik İndeks Bulguları

TUNEL boyamaları gerçekleştirilen karaciğer kesitlerinde, rastgele seçilen beş farklı kesit alanındaki apoptotik hücre sayısının normal fizyolojiye sahip hücre sayısına oranlanması ile apoptotik indeks değerleri belirlendi. Deney grupları arasında apoptotik indeks değişimleri tespit edildi. Gruplar arasındaki apoptotik indeks değişimleri kıyaslandığında en yüksek apoptotik indeks değeri VI. Grupta, en düşük apoptotik indeks değerleri I. ve III. Gruba ait olduğu tespit edildi. Apoptotik indeks değerlerine göre VI. Grup, II. ve IV. Grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ortaya çıkmıştır ($P < .05$). Grup V ve VI'da zamana bağlı olarak PH'den sonra, karaciğer hücrelerinde punicalagin maruziyetinin apoptozu indüklediği görülmektedir. Grup VI, Grup V den istatistiksel anlamlı farklılık göstermiştir ($P < .05$). VI. Grupta PH den hemen sonra, 15mg/kg punicalagin (Lin ve ark., 2001) uygulamasının, 6. saatin sonunda apoptozu indüklendiği görülmektedir (Şekil 3.5).

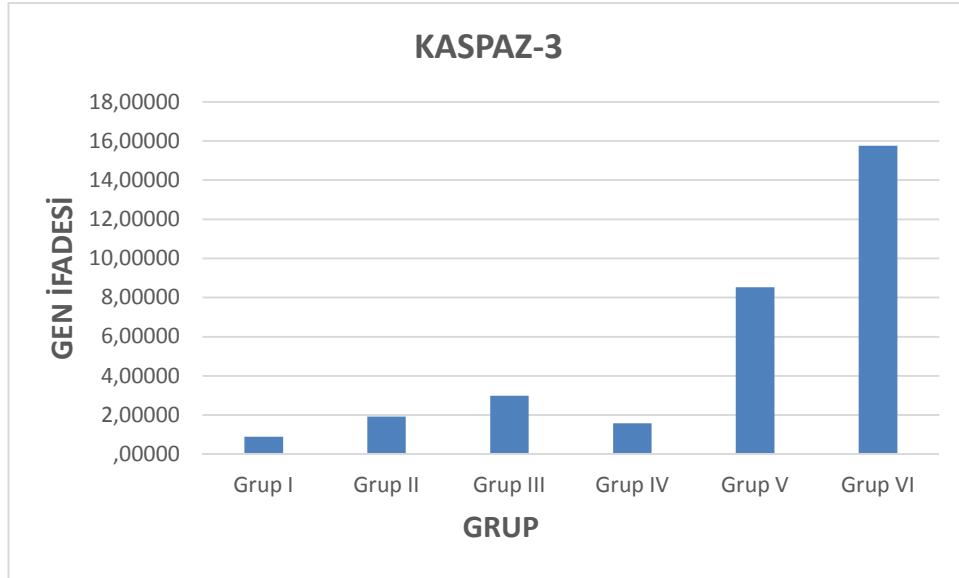


Şekil 3.5 Gruplara ait apoptotik indeks sonuçları: Kruskal-Wallis Asymp. Sig.= .001; $P < .05$

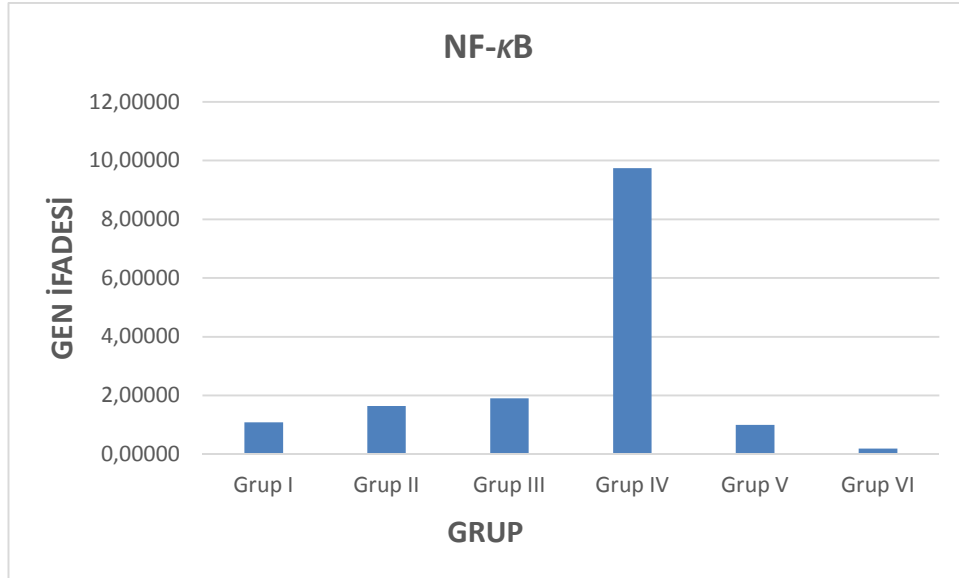
3.3. RT-PCR Bulguları

Kazpaz-3 gen ifadesi için, gruplar arası farklılıklar, istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) bulunmuştur. Grup VI'da kaspoz-3 gen ifadesi Grup V ve Grup IV'den anlamlı farklılık göstermiştir. Parsiyal hepatektominin ardından punicalagin uygulanan Grup V ve Grup VI'da kaspoz-3 aktivitesi zamana bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Grup V, Grup III'den anlamlı farklılık ortaya koymuştur ($P<0.05$) (Şekil 3.6).

NF- κ B gen ifadesi gruplar arası karşılaştırılmanın sonucunda, Grup III'de artış göstermiş ancak Grup IV'de oldukça yüksek seviyelere ulaşmıştır. Grup III ve IV arasında NF- κ B gen ifadesi zamana bağlı bir artış göstermiştir. PH'nin ardından punicalagin enjeksiyonuna maruz kalan gruplarda NF- κ B gen ifadesinde zamana bağlı bir azalma ortaya çıkmıştır. Grup V ve VI'da PH sonrası punicalagin uygulaması NF- κ B gen ifade düzeyini zamana bağlı olarak baskılamıştır (Şekil 3.7). NF- κ B gen ifadesinde Grup IV'de istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş gözlenmiştir ($P < 0.05$).



Şekil 3.6. Gruplara ait kaspaz-3 gen ifadesi grafiği (n=7). Kruskal-Wallis Asymp. Sig.= .000; $P<.05$

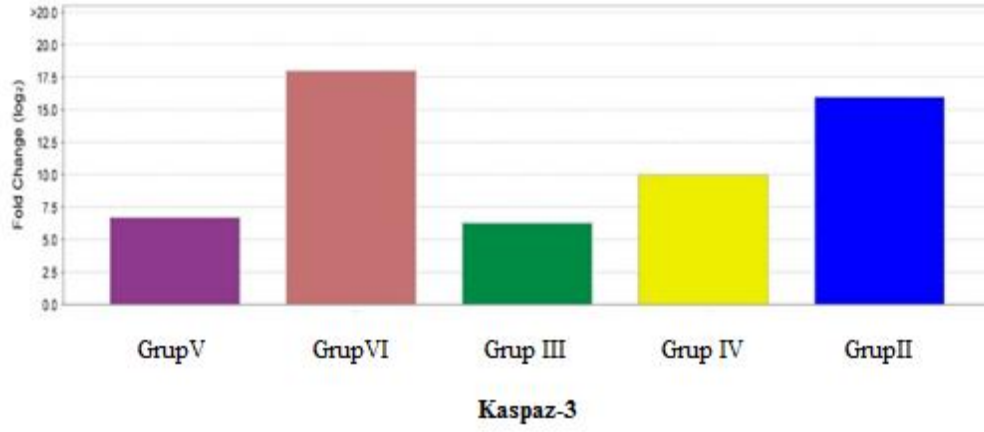


Şekil 3.7. Gruplara ait NF-κB gen ifadesi grafiği (n=7). Kruskal-Wallis Asymp. Sig.= .000; P<.05

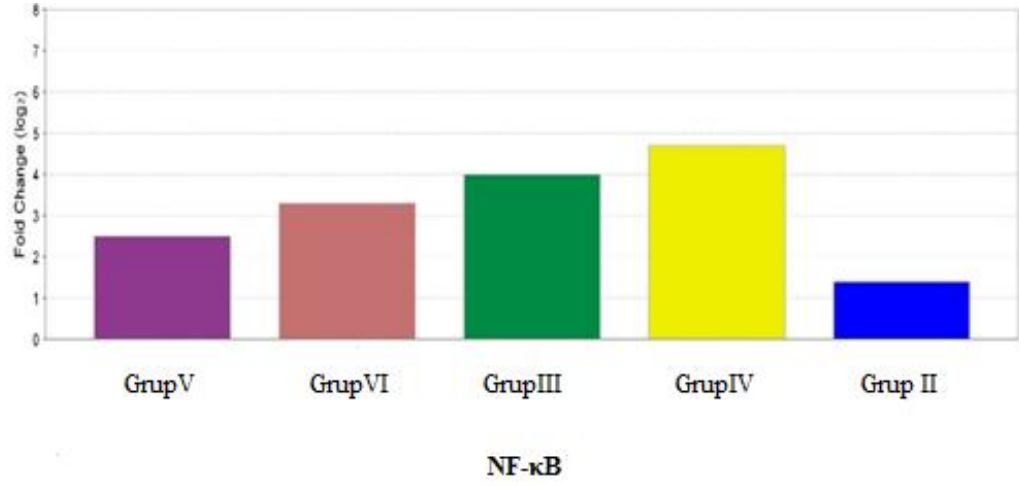
3.4. Q-PCR Bulguları

Q-PCR bulgularında, Grup I referans alınarak diğer deney gruplarının karşılaştırılması yapılmıştır. Kaspaz-3 protein ifadesi Grup I, II, III, ve IV'e göre Grup V'de artış göstermiş ancak Grup VI'da ulaştığı seviye önemli bir farklılık ortaya koymuştur. Kaspaz-3 protein ifadesi 6. saatin sonunda en yüksek değerine ulaşmıştır (Grup-VI) (Şekil 3.8). PH sonrası ip punicalagin enjeksiyonu ile kaspaz-3 protein ifade düzeyi 3.saatin sonunda belli bir artış göstermiştir ancak 6. saatin sonunda oldukça fazla bir artış gözlenmiştir. Punicalagin uygulaması kaspaz-3 protein ifade düzeyini zamana bağlı olarak arttırmıştır (Şekil 3.8).

Grup IV'de NF- κ B protein ifadesi diğer deney gruplarından farklılık göstermiştir. PH yapılmış Grup III'de NF- κ B protein ifadesi artış göstermeye başlamış, ancak 6. saatin sonunda maksimum değerlere yükselmiştir (Grup IV). PH sonrası punicalagin enjeksiyonu yapılmış olan iki grupta (Grup V-VI) ise NF- κ B protein ifadesi baskılanmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Gruplara ait kaspaz-3 Q-PCR protein ifade grafiği (Değerlendirmede Grup I referans alınmıştır).



Şekil 3.9. Gruplara ait NF-κB Q-PCR protein ifade grafiği. (Değerlendirmede Grup I referans alınmıştır).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer ile ilgili ilk bilimsel çalışmalar Higgins ve Anderson adlı bilim adamları tarafından yapılmıştır (1931). Karaciğer dokusunun cerrahi olarak ya da çeşitli kimyasalların etkisiyle zarar görmesi, hepatositlerin hızla hücre döngüsüne girmesini sağlar. Dokunun önceki kütlesi tekrar oluşuncaya kadar devam eden bir mekanizma ortaya çıkar (Junqueira ve ark., 1993). Rejenerasyon herhangi bir travma karşısında dokunun geliştirdiği mekanizmadır. Normal erişkin karaciğer dokusunda mitotik indeks %0.01 ya da daha azdır, ancak rejeneratif karaciğer dokusunda bu oran %3'lere kadar çıkmaktadır (Anderson ve ark., 1990; Bucher, 1995; Gökçimen ve ark., 1990).

Karaciğerde PH genellikle kitlesel lezyonların (metastaz, primer karaciğer tümörleri, hemanjiom, vb.) tedavisinde, canlıya karaciğer transplantasyonlarında uygulanmaktadır (Higgins ve Anderson, 1931; Kay ve Fausto, 1997).

Sıçan karaciğerinde %70'lik PH, rejeneratif indüksiyon anlamında optimum bir oran olduğu ve bu oranın alt ya da üst değerlerinde gerçekleştirilecek bir PH rejenerasyonu inhibe edebileceği düşünülmüştür (Borowiak, ve ark., 2004; Chagas ve ark., 2009; Fausto, 2000, Palmes ve Spiegel, 2004).

Hepatositler normal koşullarda nadiren bölünen hücrelerdir. Karaciğer loblarının bir kısmının (yaklaşık %70) cerrahi olarak çıkarılması sonrasında karaciğer eski yapısına dönmek için, hepatositler hızla bölünmeye geçerler. PH den kısa süre sonra G₀ dinlenme fazından, G₁ (proliferatif) fazına girip hücre döngüsüne katılırlar. Hepatik kütle kemirgenlerde yaklaşık 5-8 günde yeniden eski halini alır (Ayan. ve ark., 2011; Bedirli, ve ark., 2005; Michalopoulos ve DeFrances, 1997). Kemirgenlerdeki hepatik rejenerasyonunun insanda gözlemlenen ile benzerlik göstermesi, kemirgenlerdeki sonuçların insan karaciğeri için de geçerli nitelikte olabileceğini göstermiştir (Chagas ve ark., 2009).

PH deney modeli karaciğer rejenerasyon süresince hücre proliferasyonunun çalışılabilmesi açısından uygun bir deney modeli olarak düşünülmektedir. (Fausto,

2000; Chagas ve ark., 2009). PH den sonra, kalan hepatositler hızla hücre döngüsüne girerler. Hepatositlerin G_0 dinlenme evresinden dönüşüm geçirerek proliferasyon yapabilir hale geldikleri G_1 evresine, PH den sonra yaklaşık 4-6 saat içerisinde gelirler (Chagas ve ark., 2009; Fausto, 2000; Özek ve Tsukamoto, 1999).

Karaciğer birçok toksik kimyasalın detoksifikasyonunu gerçekleştirdiği için, karaciğer hasarı sık karşılaşılan bir durumdur. Hepatotoksik kimyasalların çoğunluğu, karaciğer lipidleri ile kovalent bağlar oluşturan reaktif türler üreterek zarar vermektedir. Zararlı kimyasallara aşırı maruziyet sonucunda, ortaya çıkan serbest radikaller doğal savunma sistemini baskılayarak, hepatik hasara yol açmaktadır (Deshwal ve ark., 2011). Bu hasar, nekroz veya apoptoz ile karakterize olan hepatosit kaybı ile gerçekleşir (Helling, 2006). Karaciğerde oluşabilecek hepatik hasarın kemirgenler üzerinde araştırılmasının temel nedeni, kemirgenlerde ortaya çıkan yanıtın insanlardakine benzerlik göstermesidir (Haschek ve Rousseaux, 1998; Fausto, 2001).

Günümüzde bitkilerden türevlenen yaklaşık 120 farklı kimyasal madde tespit edilmiştir. Bu kimyasalların çoğu basit sentetik modifikasyonlar ya da doğal yollarla elde edilen maddelerin kopyası şeklinde anti-kanser ilaçları olarak kullanılmaktadır (Taylor, 2005).

Punicalagin ($C_{48}H_{28}O_{30}$) oldukça yüksek molekül ağırlığına (1084g/mol) sahip, narın özellikle kabuk kısmında bulunan suda çözünebilen fenolik bileşiktir. Punicalagin, nar meyve ve suyundaki antioksidan potansiyelin % 50'sinden fazlasına sahip bioaktif içerik olarak rapor edilmiştir. Antioksidan kapasitesi fenolik bileşiğin yapısında bulunan hidroksil (OH) gruplarından ileri gelmektedir. Meyve suyunda yaklaşık olarak 2g/L den yüksek seviyelerde bulunabilmektedir (Gil ve ark., 2000; Kulkarni ve ark., 2004).

Punicalagin 37 gün süreyle farelere verilmesi durumunda herhangi bir toksisitenin gözlenmediği rapor edilmiştir. 37 gün sonunda glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzim düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Histopatolojik

bulgulara kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Cerdá B ve ark., 2003).

Lin ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada asetaminofen ile indüklenmiş hepatik hasar üzerinde, punicalagin hepatoprotektif etkileri araştırılmıştır. Hepatik hasarın biyokimyasal bir göstergesi olan, serum ALT ve AST değerleri asetaminofen uygulaması ile artış göstermiştir. Asetaminofen uygulamasının ardından punicalagine maruz kalan deney gruplarında ALT ve AST değerlerinin düştüğü kaydedilmiştir. Hitolojik bulgular asetaminofen intoksikasyonu ile ortaya çıkan hepatik hasarın, punicalagin enjeksiyonu ile bertaraf edildiğine işaret etmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında punicalagin Caco-2 hücrelerinde hücre döngüsünün belirli noktalarında inhibe edici etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Punicalagin kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Larossa ve ark., 2006).

Khan ve arkadaşları (2009), kolon kanserinde punicalagin rolü başlıklı çalışmada, antiapoptotik bcl-XL proteininin ekspresyonunun, 30 μ M ellagik asit ve 100 μ M punicalagin maruziyetiyle kolon kanseri hücrelerinde baskılandığını ifade etmiştir. Aynı zamanda punicalagin kaspaz 9 ve prokaspaz 3 indüksiyonunu arttırdığını da ifade etmiştir. İn vitro deney modelinde punicalagin kaspaz 9 ve prokaspaz 3 indüksiyonunu tetiklemiştir ancak NF- κ B fosforilasyonunu etkin bir şekilde baskılamıştır. Uygulamış olduğumuz deney modelinde de ise in vivo olarak proliferasyonun indüklendiği hepatositler üzerine punicalagin apoptotik etkileri ortaya konmuştur. Proliferatif karaciğer dokusunda dahi punicalagin 15mg/kg maruziyeti ile 3. saatte apoptozu tetiklemiştir. 6 saat sonra apoptotik parametrelerde 3 saat sonrasına göre çok ciddi bir farklılık ortaya çıkmıştır.

Punicalagin ve türevlerinin hücre hatları üzerinde hepatoprotektif, hepatotoksik, antioksidan ve apoptotik etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Punicalagin düşük dozlarda antioksidan, daha yüksek dozlarda apoptotik, ve çok yüksek dozlarda hepatotoksik etkili bulunmuştur. Ancak deney hayvanları üzerinde PH deney modeli kullanılarak, organizmadaki apoptotik ve

rejeneratif belirteçlerin antagonistik etkilerinin araştırıldığı bir çalışma tespit edilmemiştir.

Bu çalışmada %70 PH sonrası, rejeneratif karaciğerde punicalaginın apoptotik etkileri incelenmiştir. Deneysel çalışmalar 6 grup göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Grup I ve Grup II PH yapılmaksızın cerrahi strese maruz bırakılması amacıyla batin açılıp kapatılmıştır. Grup I, 3 saatin ardından disekte edilmiştir, Grup II 6 saatin sonunda disekte edilmiştir. Grup III, IV, V, VI ya PH uygulanmıştır. Grup III, PH sonrası ip SF uygulamasının ardından 3 saatin sonunda disekte edilmiştir. Grup IV PH nin ardından ip SF uygulaması sonrasında 6 saatin sonunda disekte edilmiştir. Grup V ve VI, PH sonrası 15mg/kg punicalagin uygulanmış ve sırasıyla 3 ve 6 saatin sonunda disekte edilmişlerdir.

%70 PH sonrası ip punicalagin 3 saatin sonunda kaspaz-3 gen ekspresyonunu arttırmış, NF- κ B gen ekspresyonunu baskılanmıştır. 6 saatin sonunda kaspaz-3 gen ekspresyonu, 3 saate göre oldukça fazla artış göstermiştir. 15mg/kg ip punicalagin uygulanmış, rejeneratif karaciğerde kaspaz-3 ekspresyonu zamana bağlı anlamlı artış göstermiştir. Kaspaz-3 gen ekspresyonunun en yüksek seviyeye ulaştığı Grup VI da NF- κ B ekspresyonu önemli ölçüde baskılanmıştır.

Bulgular ışığında PH nin ardından NF- κ B gen ve protein ekspresyonu 3 saatin sonunda artmış (Grup III), ancak 6 saatin sonunda (Grup IV) ortaya çıkan artış miktarı çok daha yüksek seviyelere ulaşmıştır. PH sonrası herhangi bir ajana maruz kalmaksızın NF- κ B aktivasyonu zamana bağlı anlamlı artış göstermiştir. Rejeneratif karaciğere 15mg/kg punicalagin maruziyeti artmakta olan NF- κ B yi baskılamıştır. NF- κ B nin punicalagin maruziyeti sonrası baskılanmasıyla, kaspaz-3 protein ve gen ekspresyonları artış göstermeye başlamıştır. Kaspaz-3, 6 saatin sonunda zamana bağlı olarak artış göstermiştir.

PH sonrası punicalagin uygulaması ile NF- κ B'nin baskılanması apoptozun tetiklendiğinin bir göstergesi olarak düşünülmektedir (Takahashi ve ark., 2002). Bulgular; karaciğer rejenerasyonunun erken evresinde, punicalagin kaynaklı apoptozun hepatositlerde kaspaz-3 aktivasyonu ile bağlantılı olduğuna işaret etmektedir.

Apoptoz PH deney modelinde, çok farklı nitelikte kimyasallar kullanılarak tetiklenmiştir.

Özeki ve Tsukamoto (1999), yaptıkları bir çalışmada, PH nin hemen ardından uygulanan retinoik asit ile 4. saatte DNA fragmentasyonu gözlenmeye başlamış ve 8. saatte maksimum seviyeye ulaştığını rapor etmişlerdir. Agaroz jel elektroforezi görüntülerinde tipik ladder pattern morfolojisini gözlemlemişlerdir.

Suzuki ve Tsukamoto (2004), PH sonrası manganez klorür enjeksiyonunu takiben, kaspaz-3 aktivasyonu ilk olarak 30 dakika içinde gözlemlemeye başlamışlar ve 4. saatte karakteristik DNA fragmentasyonu görüntüsü ortaya çıkmıştır.

Kobayashi ve arkadaşları (2002), PH sonrası, kemoterapötik bir ajan olan metotreksat uygulaması ile deneysel olarak apoptozu indüklemişlerdir. TUNEL metodu ve agaroz jel elektroforezi ile apoptotik bulguları tespit etmişler. Karakteristik DNA fragmentasyonu 2. saatten itibaren gözlemlenmeye başlamıştır ve 4. saatte daha yüksek seviyelere ulaşmıştır.

Ayan ve arkadaşları (2011), *Wistar albino* sıçanlarda bir karotenoid olan likopenin (4 mg/kg), oksidan-antioksidan parametreler, kalan karaciğer histolojisi ve plazma nitrik oksit düzeyleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. PH sonrası likopen uygulamasının oksidatif stresi arttırdığını ifade etmişlerdir.

Literatürde apoptozun indüklendiği farklı deney modelleri olmasına karşın, punicalagin kullanıldığı benzer nitelikte bir deney modeli bulunmamaktadır. Bizim deney modelimizde de PH'ye maruz kalmış, karaciğer rejenerasyonun teşvik edildiği bir dokuda, apoptoz punicalagin ile 3 saatin ardından indüklenmiştir. 6 saat sonra bu indüksiyon çok daha yüksek seviyelere ulaşmıştır. 3 ve 6 saat sonra ortaya çıkan apoptotik değişimler TUNEL histolojik değerlendirmeler, RT-PCR ve Q-PCR bulguları ile koordinasyon göstermiştir.

Apoptoz istenmeyen ya da genetiği değişmiş hücrelerin dokuda inflamasyona neden olmaksızın, ortadan kalkmaları için en ideal ölüm şeklidir. Chagas ve ark., portakal kabuğu, limon otu yağı ve çilek de bulunan farnesolün PH

sonrası rejeneratif karaciğerde hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu indüklediğini ifade etmişlerdir. Bulgular farnesolün kanser önleyici nitelikte kullanılabileceğine işaret etmektedir. Aynı şekilde arsenit, manganez ve hekzametilen amiloridin PH sonrası cilt altından uygulandığında, 4 saat sonra apoptozu indüklediği görülmüştür (Chagas ve ark., 2009).

TUNEL yöntemi ile apoptozun erken evrelerinde dahi hücrelerin tespit edilebilmesi mümkündür. TUNEL apoptoz değerlendirilmesinde duyarlı ve standart bir yöntemdir (Kockx ve ark.,1998). Apop Taq Peroksidase In Situ tespit kiti, apoptoz ile kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonunu tespit ettiğinden; görüntü alanında normal fizyolojiye sahip hücrelerden apoptotik hücrelerin ayrılmasını olanaklı kılmaktadır. Apoptotik hücrelerde sitoplazmik büzülme ve hacimce küçülme hücre çevresinde belirgin olarak farkedilmektedir.

In situ nick end-labeling sonuçları, PH'nin hemen ardından punicalagin uygulaması sonrasında, 3 saatin sonunda hepatositler arasında spesifik morfolojik kriterler ile apoptotik cisimciklerin ortaya çıktığını ve vakuolizasyonların belirmeye başladığını göstermiştir. Gruplar arasındaki apoptotik indeks değişimleri incelendiğinde, apoptotik hücrelerin sayısının V. grupta artmaya başladığı ve VI. grupta oldukça yüksek seviyelere ulaştığı gözlenmiştir. Aynı oranda punicalagin (15mg/kg) 6 saatin sonunda 3 saate göre çok daha fazla apoptotik etkili bulunmuştur.

Çalışmamızda histolojik incelemeler sonucunda PH uygulanmış sıçan karaciğerlerinde (Grup V ve VI) vakuolizasyonların oluşumunun arttığı görülmüştür. Vakuolizasyonlar lipid damlalarının birikimi olarak nitelendirilmektedir (Hou, ve ark., 2003).

NF- κ B, p50 ve p65'in heterodimer bir formudur ve nükleer faktör inhibitörü kappa B (I κ B) proteinleri tarafından hücre hayat döngüsünün G₀ fazında inaktif olarak sentezlenir. NF- κ B; sitokinler, radyasyon ve kemoterapötik ajanlar ile fosforilasyon, ubikuitinasyon ve I κ B'nın proteozom yoluyla degradasyonu ile aktive olur (Yıldız ve ark., 2007; Andela ve ark., 2000; Blackwell ve Christman; 1997).

NF- κ B regülasyonunun birçok kanser vakasında gözlenlenmiş olması büyük önem taşımaktadır. NF- κ B, hücre proliferasyonu, angiogenez, metastaz, inflamasyon ve apoptozun baskılanması ile ilgili genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu değiştirebilmektedir (Luqman ve Pezzuto, 2010). NF- κ B'nin bloke edilmesi, tümör hücrelerinin proliferasyonunun durmasına ve antitümör ajanlarına karşı daha hassas olmasına neden olmaktadır (Luqman ve Pezzuto, 2010; Karin, 2006).

Kemopreventif bileşikler olarak nitelendirilen flavonoidlerin (resveratrol ve curcumin vb.) NF- κ B aktivasyonunu bloke edici özellikleri olduğu bilinmektedir. (Luqman ve Pezzuto, 2010; Soobrattee ve ark., 2006). Kullanmış olduğumuz deney modelinde de, PH sonrasında punicalagin molekülünün 3 saat sonra NF- κ B aktivasyonunun inhibe ettiği ve 6 saat sonunda bu inhibisyon derecesinin çok daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Benzer bulgular NF- κ B'nin, onkogenin erken evresindeki rolünü gösteren, fonksiyonel olarak kemopreventif ilaçlar ve besinlerin hedefi olduğu hipotezini desteklemektedir (Luqman ve Pezzuto, 2010).

NF- κ B aktivasyonunun hücre proliferasyonu, apoptoz, sitokin salınımı ve onkogenin de önemli olduğu ifade edilmiştir. Tümör hücrelerinde NF- κ B aktivasyonu normal bitişik dokularla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Luqman ve Pezzuto, 2010; Sasaki ve ark., 2001). NF- κ B'nin bazı kanser türlerinde (akciğer, mide, prostat gibi) apoptotik hücre ölümünün engellenmesinde önemli rol oynadığına dair bulgular mevcuttur (Karin ve Lin 2002; Chen ve Sawyers, 2002). NF- κ B aktivasyonu, karaciğer hücre proliferasyonu ve apoptoz inhibisyonunu içeren bir prosesdir (Plümpe ve ark., 2000).

Plümpe ve arkadaşlarının (2000) yaptığı bir çalışma, NF- κ B'nin karaciğer hücrelerini apoptoza karşı korumada ve karaciğer rejenerasyon sürecinde hepatositlerin hücre döngüsünde ilerlemesini tetiklemede önemli rolü olduğunu göstermektedir.

NF- κ B bağıışıklığın, inflamasyonun ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir fonksiyona sahiptir. Ayrıca NF- κ B kanserde aktive olduğundan onkogenin de temel bir rol oynadığı düşünülmektedir. (Kim ve ark., 2005; Dolcet ve ark., 2005).

V. Grupta ilk dört gruptan farklı olarak kaspaz-3 gen ve protein ifade düzeylerinde anlamlı artış ortaya çıkmıştır. VI. Grupta hepatositlerde vakuolizasyon, sinüzoidal dilatasyon, apoptoz aktivitesi en yüksek değerde seyretmiştir. Apoptotik indeks değeri ilk beş gruptan anlamı farklılık göstermiştir.

Histopatolojik incelemede parsiyal hepatektomiden sonra ilk olarak hepatositlerde vakuolizasyon meydana geldiği, takip eden zaman diliminde apoptozun arttığına göstergesi olan apoptotik indeksin arttığı görülmüştür.

Deneyssel olarak oluşturulan hepatik rezeksiyon sonrası punicalagin uygulaması ile gelişen karaciğer apoptozunu histolojik açıdan incelemek amacı ile planladığımız çalışmada, rejenerasyonun indüksiyonuna karşı, punicalagin zamana bağlı olarak apoptozu indüklemiştir. Sonuçlar punicalagin kemopreventif veya tedavi edici olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel Moneim, A.E. (2011), "Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats," J. Med. Plant Res., In Press.
- Adams, L.S., Seeram, N.P., Aggarwal, B.B., Takada, Y. ve Heber, D. (2006), "Pomegranate Juice, Total Pomegranate Ellagitannins, and Punicalagin Suppress Inflammatory Cell Signaling in Colon Cancer Cells," Journal of Agricultural and Food Chemistry, **54**, 980-985.
- Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D. ve Mukhtar, H. (2005), "Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NFkappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice," Int. J. Cancer., **113**, 423-433.
- Ajaikumar, K.B., Asheef, M., Babu, B.H. ve Padikkala, J. (2005), " The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract," Joynral of Ethopharmacology, 96, 171-176.
- Allison, M. R. ve Sarraf, C.E. (1995), "Apoptosis: regulation and relevance to toxicology," Human and Experimantel Toxicology, **14**(3), 234-47.
- Andela, V.B., Schwarz, E.M., Puzas, J.E., O'Keefe, R.J., Rosier, R.N. (2000), "Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB," Cancer Res., 60(23), 6557- 62.
- Anderson RW, Zieve L, Lindblad S. (1990), "Ultrastructural Study of Hepatic Regeneration Following One-Lobe,Two-Lobe, and Subtotal Hepatectomy in the Rat," Ex. Pathol., 38, 61-72.
- Andiran, F., Ayhan, A., Tanyel, F.C., Abbasoglu, O. ve Sayek, I. (2000), "Regenerative capacities of normal and cirrhotic liver following 70% hepatectomy in rats and the effect of N-Tocopherol on cirrhotic regeneration," Journal of Surgical Research, **89**, 184-188.

- Ankoma-Sey, V. (1999), "Hepatic regeneration- revisiting the myth of prometheus," *News Physiol. Sci.*, **14**, 149-155.
- Antar V. (2005), Bir genel kaspaz inhibitörü olan QVD-OPH'nın medüllas spinalis yaralanması sonrası apoptozisteki rolü, Uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Aral, H. (1996), "Apoptotik hücrelerin tanınma yöntemleri," *Sendrom*, 38-42.
- Arends, M.J., Morris, R.G. ve Wyllie, A.H. (1990), "Apoptosis: the role of the endonuclease," *Am. J. Pathol.* **136**, 593-608.
- Aviram, M. ve Dornfeld, L. (2001), "Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure," *Atherosclerosis*, **158**, 195-198.
- Ayan, F., Aytaç, E., Saygılı, S., Genç, H., Karaca, Ç., Bayrak, İ., Uzun, H., Salihoğlu, Z., Erdamar, S., Sözer, V., Altuğ, T., Seymen, P. ve Seymen, H.O. (2011), "Effects of lycopene on oxidative stress and remnant liver histology after partial hepatectomy in rats," *Turk J. Gastroenterol.* **22** (4), 408-413
- Aytaç, E., Ayan, F., Saygılı, S., Genç, H., Karaca, C., Bayrak, I., Uzun, H., Salihoğlu, Z., Erdamar, S., Sözer, V., Altuğ, T., Seymen, P. ve Seymen, H.O. (2011), "Effects of lycopene on oxidative stress and remnant liver histology after partial hepatectomy in rats," *Turk J. Gastroenterology*, **22** (4), 408-413.
- Bardakçı, F. Ve Yenidünya, A.F. (2007), "Moleküler biyoloji teknikleri 1:Nükleik asit analiz teknikleri (in) Moleküler Biyoloji," (Ed: Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç B.), Nobel Yayın, Ankara, 519-553.
- Bedirli, A., Kerem, M. ve Pasaoglu, H. (2005), "Effects of ischemic preconditioning on regenerative capacity of hepatocyte in the ischemically damaged rat livers," *J Surg. Res.*, **125**, 42-8.

- Bell, C. ve Hawthorne, S. (2007), "Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **60**, 139-144.
- Blackwell, T.S., Christman, J.W. (1997), "The role of nuclear factor- kappa B in cytokine gene regulation," *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.*, 17(1), 3-9.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C. ve Birchmeier, C. (2004), "Met provides essential signals for liver regeneration," *PNAS*, **101**, 10608-10613.
- Bucher RL. Regeneration of Mammalian Liver. Cancer Commission of Harward University 1995; 1081.
- Bylinsky, G. (1997), "Cell suicide: the birth of a mega- market," *Fortune*, 131, 75-6.
- Cerdá, B., Ceron, J.J., Tomas-Barberan, F.A. ve Espin, J.C. (2003), "Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 rats is not toxic," *J. Agric. Food Chem.*, **51**(11), 3493-3501.
- Chagas, C.E.A., Vieira, A., Ong, T.P. ve Moreno, F.S. (2009), "Farnesol inhibits cell proliferation and induces apoptosis after partial hepatectomy in rats," *Acta. Cirurgica Brasileira*, **24**(5), 377-382.
- Chen, C.D. ve Sawyers, C.L. (2002), "NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer," *Mol. Cell Biol*, 22(8), 2862-70.
- Cohen, G. M. (1997), "Caspases: the executioners of apoptosis," *Biochem. J.*, **326**, 1-16.
- Das, A. K. (2001), "Studies on the hypoglycaemic activity of Punica granatum seed in streptozotocin induced diabetic rats," *Phytother Res.*, **15**, 628-629.

- Deshwal, N., Sharma, A.K. ve Sharma, P. (2011), "Review on hepatoprotective plants," *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **7**(1), 15-26.
- Dietrich, J.B. (1997), "Apoptosis and anti-apoptosis genes in the Bcl-2 family," *Arch. Physiol. Biochem.*, **105**(2), 125–135.
- Dilek, O.N. (2003), "Karaciger," *Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları*, Afyon, 21-70.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. ve Matias-Guiu, X. (2005), "NF- κ B in development and progression of human cancer," *Virchows Arch. Environ Health*, **446**, 475–82.
- Elmore, S. (2007), "Apoptosis: A review of programmed cell death," *Toxicol. Pathol.*, **35**(4), 495–516.
- Fausto, N. (1990), "A Textbook of Liver Disease," in: (Ed: Zakin, D. ve Boyer J.L.), *Hepatology*, W.B. Saunders, Philadelphia, PA, 49-65.
- Fausto, N. (2000), "Liver regeneration," *J. Hepatol.*, **32**(1), 19-31
- Fausto, N. (2001), "Liver regeneration: from laboratory to clinic," *Liver Transpl.*, **7**, 835-844.
- Fausto, N., Laird A.D. ve Webber, E.M. (1995), "Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration," *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **9**(15), 1527-1536
- Feldman, G. (1997), "Liver apoptosis," *J. Hepatol.* **26** (2), 1-11.
- FitzGerald, M., Webber, E., Donovan, J. ve Fausto N. (1995), "Rapid DNA binding by nuclear factor κ B in hepatocytes at the start of liver regeneration," *Cell Growth Diff.*, **6**, 417-27.

- Forest, V., Peoch, M., Campos, L., Guyotat D. ve Vergnon, Jm. (2005), "Effects of cryotherapy or chemotherapy on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice," *Cryobiology*, **50**(1), 29–37.
- Fredriksson, S., Dixon, W., Ji, H., Koong, A.C., Mindrinos, M. ve Davis, R.W. (2007), "Multiplexed protein detection by proximity ligation for cancer biomarker validation," *Nat. Methods*, **4**(4), 327–329.
- Ganong, W.F. (1995), "Medical Physiology," (Çev Ed: Doğan, A.,) Barış Kitabevi, İstanbul, 543-544.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. ve Ben-Sasson, S.A. (1992), "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation," *J. Cell Biol.*, **119**, 493-501.
- Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. ve Kader, A.A. (2000), "Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing," *J Agric Food Chem.*, **4**, 4581–9.
- Gillis, A.J., Stoop, H., Biermann, K., Van Gurp, R.J., Swartzman, E., Cribbes S., Ferlinz, A., Shannon, M., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H. (2011), "Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT34, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis," *International journal of andrology*, **34**, 160-174.
- Gökçimen, A., Öztürk, Ö. ve Karaöz, E. (1990), "Rejenerasyon," *T. Klin. Tıp Bilimleri*, **19**, 169-183.
- Grisham, J.W. (1962), "A Morphologic Study of Deoxyribonucleic Acid Synthesis and Cell Proliferation in Regenerating Rat Liver; Autoradiography with Thymidine-H3," *Cancer Res.* **22**, 842-849.

- Gullberg, M., Gústafsdóttir, S.M., Schallmeiner, E., Jarvius, J., Bjarnegård, M., Betsholtz, C., Landegren, U. ve Fredriksson, S. (2004), "Cytokine detection by antibody-based proximity ligation," PNAS, **101**(22), 8420-8424.
- Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008), "Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler," Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 73-78.
- Haschek, W.M. ve Rousseaux, G.C.(1998), "Fundamentals of Toxicologic Pathology, " Academic Press, London.
- Heber, D. (2008), "Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins," Cancer Letters, 269(2), 262-268.
- Helling, T.S. (2006), "Liver failure following partial hepatectomy, " HPB (Oxford), 8, 3, 165-174.
- Hızel, N. (1997), "Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü), " Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi, 6, 196-7.
- Higgins, G.M. and Anderson R.M. (1931), "Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal, " Archives of Pathology, 12, 186-202.
- Hockenbery, D. (1995), "Defining apoptosis, " American Journal of Pathology, **146**, 16-19.
- Hou, Z., Yanaga, K., Kamohara, Y., Eguchi S., Tsutsumi, R., Furui, J. ve 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.
- Huang, T.H., Peng, G., Kota, B.P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D. ve Li, Y. (2005a), "Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR-gamma and identification of an active component," Toxicol. Appl. Pharmacol., **207**, 160-169.

- Huang, T.H., Yang Q., Harada, M., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis B.D. ve Li, Y. (2005b), "Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappa B pathways." *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **46**, 856-862.
- Israels, L.G. ve Israels, E.D. (1999), "Apoptosis," *The Oncologist*, 4, 332-9.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. (1993), "Basic Histology," (Çev. Ed.: Aytekin, Y., Solakoğlu, S.) Barış Kitabevi, İstanbul, 380-393.
- Kaneda. K., Dan, C. ve Wake, K. (1983), "Pit cells as natural killer cells," *Biomed. Res.*, 4, 567-576.
- Kaplan, M. and Aviram, M. (2001), "Retention of oxidized LDL by extracellular matrix proteoglycans leads to its uptake by macrophages: An alternative approach to study lipoproteins cellular uptake," *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 21, 386-393.
- Karin, M. ve Lin A. (2002), "NF-kappaB at the crossroads of life and death," *Nat. Immunol.*, 3(3), 221-7.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R. ve Li, Z.W. (2002), "NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit," *Nat. Rev. Cancer.*, 2(4), 301-10.
- Karin, M. (2006), "Nuclear factor- κ B in cancer development and progression," *Nature*, 441, 431-436
- Karin, M. (2011), "NF- κ B in Health and Disease," Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Karlson P. (1980), "Kurzes Lehrbuch der Biochemie," (Çev. Ed: Telefoncu, A.), Stuttgart.
- Kasımsetty, S.G., Bialonska, D., Reddy, M. K., Ma, G., Khan, S.I. ve Ferreira, D. (2010), "Colon Cancer Chemopreventive Activities of Pomegranate Ellagitannins and Urolithins," *J. Agric. Food Chem.*, **58**(4), 2180-2187.

- Kay, M. A. ve Fausto, N. (1997), "Liver regeneration: prospects for therapy based on new Technologies," *Molecular Medicine Today*, 108-115.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R. (1972), "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics," *British Journal of Cancer*, **26**, 239–257.
- Khan, N., Adhami, V.M. ve Mukhtar, H. (2008), "Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer," *Biochemical Pharmacology*, 76(11) 1333-1339.
- Khan, N., Afag, F., Kweon, M.H., Kim, K. ve Mukhtar, H. (2007), "Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice," *Cancer Res.*, **67**, 3475-3482.
- Khan, S.A. (2009), "The role of pomegranate (*Punica Granatum L.*) in colon cancer," *Pak. J. Pharm. Sci.*, **22**(3), 346-348.
- Kim, E.J, Lee, Y.J., Shin, H.K. ve Park, J.H. (2005), "Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanum* in HT-29 human colon cancer cells," *Nutrition*, 21, 1141–8.
- Kobayashi, K., Terada, C. Ve Tsukamoto, I. (2002), "Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy, " *European Journal of Pharmacology*, 438, 19– 24.
- Kockx, M.M., Muhring, J., Knaapen, M.W.M. ve de Meyer G.R.Y. (1998), "RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis," *The American Journal of Pathology*, 152(4), 88-888, 1998.
- Kressel, M. ve Groscurth, P. (1994), "Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA," *Cell Tissue Res.*, 278, 549–56.

- Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M. ve Divakar, S. (2004), "Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant-punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit", *Food Chem.*, 87, 551– 7.
- Kulkarni, A.P., Mahal, H.S., Kapoor, S. ve Aradhya, S.M. (2007), "In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1491-1500.
- Labat-Moleur, F., Guillermet, C., Lorimier, P., Robert, C., Lantuejoul, S. Ve Brambilla, E. (1998), "TUNEL Apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement," *J. Histochem. Cytochem.*; 46, 327-334.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A. ve Espín, J. C. (2006), "The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway," *J. Nutr. Biochem.* **17**, 611–625
- Leers, M.P., Kolgen, W., Bjorklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Bjorklund, P., Ramaekers, F.C., Bjorklund, B., Nap M., Jornvall, H., Schutte, B. (1999), "Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis," *J. Pathol.*, 187, 567–572.
- Liou, H. (2006), "NF- κ B/Rel Transcription Factor Family," Springer Science Business Media, New York U.S.A.
- Lin, C.C., Hsu, Y.F., Lin, T.C. ve Hsu H.Y. (2001), "Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Punicalagin and Punicalin on Acetaminophen-Induced Liver Damage in Rats," *Phytotherapy Research*, **15**(3), 206-212.

- Lodish, H. Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M, Scot, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaire, P. (2008), "Molecular Cell Biology," (Çeviri Ed: Geçkil, H., Özmen, M., Yeşilada, Ö), W.H.Freeman and Company, a division of Bedford, Freeman and Worth Publihers LLC, 41 Madison Avenue, New York, USA.
- Luqman, S. ve Pezzuto, J.M. (2010), "NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention," *Phytother. Res.*, 24, 949-963.
- Malik, A., Afag, F., Sarfaraz, S., Adhami V.M., Syed, D.N. and Mukhtar, H. (2005), "Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 14813-14818.
- Meer, F.J., Faber, D.J., Aalders, M.C.G., Poot, A.A., Vermes, I. ve Leeuwen, T.G. (2010), "Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography," *Lasers Med Sci.*; 25, 259–267.
- Michalopoulos, G.K. ve De Frances, M.C. (1997), "Liver regeneration," *Science*, **276** (5309), 60-6.
- Mignon, A., Guidotti J.E., Mitchell, C., Fabre, M., Wernet, A., De La Coste, A., Soubrane, O., Gilgenkrantz, H. ve Kahn, A. (1998), "Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes," *Nature Medicine*, **4**, 1185–1188.
- Moneim, A.E.A., Dkhil, M.A. ve Al-Quraishy, S. (2011), "Studies on the effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice and peel on liver and kidney in adult male rats," *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (20), 5083-88.
- Moneim, A.E.A. (2012), "Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats," *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(2), 195-199.

- Mountz, J. D. ve Zhou T. (2001), "Apoptosis and autoimmunity (in) A Textbook of Rheumatology: *Arthritis and allied conditions*," (Ed: Kopman, W.J.) Lippincott-Williams&Wilkins.
- Nagata, S. (1999), "Fas ligand-induced apoptosis," *Annual Review of Genetics*, 33, 29-55.
- Nakatani K., Kaneda, K., Seki, S. ve Nakajima, Y. (2004) "Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function," *Med. Electron Microsc.* 37, 29–36
- Nigris, F., Williams-Ignarro, S., Lerman, L.O., Crimi, E., Botti, C., Mansueto, G., D'Armiento, F.P., De Rosa, G., Sica, V., Ignarro, L.J. ve Napoli, C. (2005), "Beneficial effects of pomegranate juice on oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 4896-4901.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C. ve Hanen, C. (1998), "Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays," *Apoptosis*, 3, 115.
- Özeki, A. and Tsukamoto, I., (1999) "Retinoic acid repressed the expression of c-fos and c-jun and induced apoptosis in regenerating rat liver after partial hepatectomy," *Biochim.Biophys.Acta.*, 1450, (3), 308-319.
- Öktem, S., Özhan, M.H. ve Özol, D.,(2001) "Apoptozisin önemi," *Toraks Dergisi*, 2(1), 91-95.
- Palmes, D. ve Spiegel, H.U. (2004), "Animal models of liver regeneration," *Biomaterials*, **25**, 1601-1611.
- Patel, C., Dadhaniya, P., Hingorani, L. Ve Soni, M.G. (2008), "Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies," *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2728-2735.

- Pınarbaşı, E. (2007), "*Apoptosis (Programlı Hücre Ölümü) (in) Moleküler Biyoloji*," (Ed: Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B.), Nobel Yayın, Ankara, 423-468.
- Pfister, C., Pfrommer, H., Tatagiba, M.S. ve Roser, F. (2013), "Detection and quantification of farnesol-induced apoptosis in difficult primary cell cultures by TaqMan protein assay," *Apoptosis*, 18, 452–466
- Plümpe, J., Malek, N.P., Bock, C.T., Rakemann, T., Manns, M.P. ve Trautwein, C. (2000), "NF- κ B determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 278, 173-183.
- Rabes, H.M. (1978), "in: Hepatotrophic Factors," Ciba Foundation Symposia, Elsevier, Amsterdam, 55, 31-59.
- Rieux-Laucat, F. (2000), "The Fas pathway: signaling of apoptosis." *Hematologie*, 6, 136–142.
- Salgame, P., Varadhachary, A.S., Primiano, L.L., Fincke, J.E., Muller, S. ve Monestier, M. (1997), "An ELISA for detection of apoptosis," *Nucleic Acids Research*, 25(3), 680–681.
- Sasaki, N., Morisaki, T., Hashizume, K., Yao, T., Tsuneyoshi, M. ve Noshiro, H. (2001), "Nuclear factor- κ B p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue," *Clin. Cancer Res.*, 7(12), 4136-42.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y. ve Zhang, Y. (2005), "In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6), 360-367.
- Smith, C., Marks, A.D. ve Lieberman, M. (2007), "Mark's Temel Tıbbi Biyokimyası," Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 976.

- Soobrattee, M.A., Bahorun, T. ve Aruoma, O.I. (2006), "Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer," *BioFactors*, 27, 19–35.
- Suzuki, T. ve Tsukamoto, I. (2004), "Apoptosis induced by 5-(N,N-hexamethylene)-amiloride in regenerating liver after partial hepatectomy," *European Journal of Pharmacology*, 503, 1-7.
- Swartzman, E., Shannon, M., Lieu, P., Chen, S.M., Mooney, C., Wei, E., Kuykendall, J., Tan, R., Settineri, T., Egry, L. Ve Ruff, D. (2010), "Expanding applications of protein analysis using proximity ligation and qPCR," *Methods*, **50**, 23-26.
- Syed, D.N., Afag, F. ve Mukhtar, H. (2007), "Pomegranate derived products for cancer chemoprevention," *Seminars in Cancer Biology*, **17**(5),377–385.
- Takahashi, Y., Ganster, R.W., Gambotto, A., Shao, L., Kaizu, T., Wu, T., Yagnik, G.P., Nakao, A., Tsoulfas, G., Ishikawa, I., Okuda, T., Geller, D.A. ve Murase, N. (2002), "Role of NF- κ B on liver cold ischemia-reperfusion injury ," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283, 1175-1184.
- Taylor L. 2005. The healing power of rainforest herbs. In *A Guide To Understanding and Using Herbal Medicinals*. Square One Publishers Inc: New York, Chapter 2: 535.
- Tewari, M., Dobrzanski, P., Mohn, K.L., Cressman, D.E., Hsu, J.C. ve Bravo, R. (1992), "Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I κ B that inhibits NF- κ B, RelB-p50, and c-Rel-p50) and PHF, a novel κ B site-binding complex," *Mol. Cell Biol.*, 12, 2898-2908.
- Tomatır, A.G. (2003), "Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü," *T Klin Tıp Bilimleri*, 23, 499-508
- Turner, P.C., Mclennan, A.G., Bates, A.D. ve White, M.R.H. (2004), "Moleküler Biyoloji Önemli Notlar,"(Çev. Ed. Konuk, M.) Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 312-315.

- Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M. ve Amir, R. (2007), "Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9559-9570.
- Ulukaya E. (2003), "Apoptozis Ders Notları,". Erişim: [http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf] Erişim tarihi: 02.01.2014.
- Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C. ve Kerr, J. F. (1988), "Patterns of cell death," *Methods and Achievements Experimental Pathology*, 13, 18–54.
- Webber, E.M., FitzGerald, M.J. ve Brown, P.I. (1993), "Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor," *Hepatology*, 18, 1422-31.
- Wiltrout, R.H., Herberman, R.B., Zhang S.R., Chirigos, M.A., Ortaldo, J.R., Green, K.M.Jr. ve Talmadge, J.E. (1985), "Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastasis in lung and liver," *J. Immunol.*, 134, 4267–4275
- Wiltrout, R.H., Mathieson, B.J., Talmadge, J.E., Reynolds, C.W., Zhang, S.R., Herberman, R.B. ve Ortaldo, J.R. (1984), "Augmentation of organassociated natural killer activity by biological response modifiers. Isolation and characterization of large granular lymphocytes from liver," *J Exp. Med.*, 160, 1431–1449
- Xu, Y., Bialik, S., Jones, B.E., Iimuro, Y., Kitsis, R.N., Srinivasan, A., Brenner, D.A. ve Czaja, M.J. (1998), "NF- κ B inactivation converts a hepatocyte cell line TNF- α response from proliferation to apoptosis," *American Journal of Physiology*, 275(44), 1058-1066.

- Yamada, Y., Kurillova, I., Peschon, J.J. ve Fausto, N. (1997), "Innitation of Liver Growth By Tumor Necrosis Factor: Deficient Liver Regeneration in Mice Lacking Type I Tumor Necrosis Factor Receptor," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 1441-1446.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B. (2007), "Moleküler Biyoloji," Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 614.
- Yıldız, O.G., Soyuer, S., Soyuer, I., Uçar, K., Gündoğ, M., Kaplan, B. ve Özkan, M. (2007), "Gastrektomi sonrası adjuvan kemoradyoterapi uygulanan mide karsinomlu olgularda NF- κ B'nin prognostik önemi," Türk Onkoloji Dergisi, 22(2), 69-73.
- Yılmaz, İ. (2005), "Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi," Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R. ve Yan, G. (1997), "Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V.," Biotechniques, 23, 525–531.