

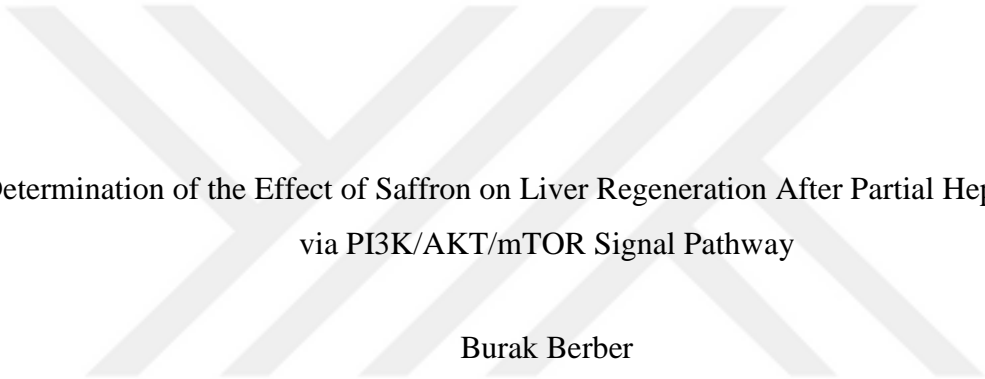
Safran' in Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonuna Etkisinin
PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı Üzerinden Belirlenmesi

Burak Berber

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2017



Determination of the Effect of Saffron on Liver Regeneration After Partial Hepatectomy
via PI3K/AKT/mTOR Signal Pathway

Burak Berber

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2017

Safran' in Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonuna Etkisinin
PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı Üzerinden Belirlenmesi

Burak Berber

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliđi Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Mediha Canbek

İkinci Danışman: Prof. Dr. Kamil Can Akçalı

Mayıs 2017

BAP 2015-713 No' lu Proje tarafından desteklenmiştir

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Burak Berber'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Safran' in Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonuna Etkisinin PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı Üzerinden Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mediha Canbek

İkinci Danışman : Prof. Dr. Kamil Can Akçalı

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Prof. Dr. Azmi Yerlikaya

Prof. Dr. Ayşe Tansu Koparal

Doç. Dr. Mustafa Uyanoglu

Doç. Dr. Pınar Öztöpcü Vatan

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mediha Canbek' in danışmanlığında hazırlamış olduğum “Safran'ın Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonuna Etkisinin PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı Üzerinden Belirlenmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallarına göre sunduğumu beyan ederim. 08.05.2017

Burak Berber

İmza

ÖZET

Karaciğer kendini onarabilme yeteneği ile vücuttaki diğer tüm organlardan daha fazla avantaja sahiptir. Çeşitli nedenlerle zarar görmesi durumunda, fonksiyonel kütesini tamamlama yönünde replikasyon ve proliferasyona başlayabilir. Karaciğer loblarının bir kısmının cerrahi olarak çıkarılması parsiyel hepatektomi-(PHx) ve hepatositlerin virüs ya da kimyasallardan zarar görmesi gibi durumlarda hepatosit replikasyonunun arttığı bilinmektedir.

Replikasyon ve proliferasyon yanıtı bir takım sinyal yolları ile gerçekleşmektedir. PI3K/Akt/mTOR yolağının; hücre büyümesi, proliferasyon, hayatta kalım, farklılaşma ve hücre iskeleti değişiminin düzenlenmesi gibi birçok fonksiyonu vardır. %70' lik parsiyel hepatektomi sonrası PI3K/Akt/mTOR aktive olur ve hepatositlerin artışı sağlar. Son yıllarda; kanser veya metabolik bozukluklar gibi pek çok hastalık PI3K/Akt/mTOR yolağının anormal aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Diyet takviyelerinin geliştirilmesi, belirli populasyon gruplarında beslenme yoluyla hastalıkların önlenmesi ya da başlangıcının geciktirilmesine yardımcı olabilir. İnsan sağlığını etkileyen fitokimyasalların etkisinin PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerinden belirlenmesi; bu yolak üzerinde moleküler etki mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Safran (*Crocus sativus L.*)'in antioksidan, anti-enflamatuar, anti-aterosklerotik, nöro-koruyucu ve yüksek yağlı diyet-kaynaklı insülin direncini önlemesi vb. etkileri bilinmektedir.

Çalışmamızda; 15 gün boyunca sıçanlara gavaj yöntemiyle 100 mg/kg safran diyeti uygulanmıştır. Diyet sonunda % 70'lik parsiyel hepatektomi işlemi ile hepatositlerin proliferasyonu uyarılmıştır. Bu işlemler ile safran' in 0-6-12 ve 24. saatlerde hepatosit proliferasyonuna etkisi; PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerinden belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre safran'ın karaciğeri koruduğu, proliferasyonu arttırıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Safran'ın PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerindeki etkisinin belirlenmesi; karaciğer hastalıklarında (örn; obezite, tip 2 diabet, kanser gibi) safran tedavisi çalışmalarına temel oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer Rejenerasyonu, PI3K/Akt/mTOR Yolağı, Safran

SUMMARY

Liver repair itself by its ability to have more advantages than any other organ in the body. In case of damage to the liver due to various reasons, replication and proliferation towards completing the functional mass start. Surgical removal of a portion of the liver lobe, known as partial hepatectomy (PHx) and hepatocyte damage from viruses or chemicals, cause an increase in hepatocyte replication.

Replication and proliferation response is realized by a number of signaling pathways. PI3K/Akt/mTOR pathway has many functions; such as cell growth, proliferation, survival, differentiation, and the regulation of cytoskeletal changes. After 70% partial hepatectomy PI3K/Akt/mTOR is activated and allows the growth of hepatocytes. In recent years; many diseases such as cancer or metabolic disorders PI3K/Akt/mTOR pathway has been associated with abnormal activity. The development of dietary supplements that can help prevent or delay the onset of nutrition-related diseases in specific population groups. Identification of effects of phytochemicals over the identifying PI3K/Akt/mTOR pathway that affect human health; will provide a better understanding of the molecular mechanism of action. Saffron (*Crocus sativus L*); antioxidant, anti-inflammatory, anti-atherosclerotic, neuroprotective and preventing high-fat diet-induced insulin resistance (and so on.) effects are known.

In our study; by gavage method to rats for 15 days of 100 mg/kg diet saffron have been applied. At the end of the diet, have been stimulate hepatocyte proliferation by 70% partial hepatectomy process. These procedures with saffron 0-6-12 and 24 hours effect on hepatocyte proliferation; PI3K/Akt/mTOR pathway have been determined through the pathway.

According to our results; we determine that saffron has protective and proliferative effect on liver. Determination of saffron effects on PI3K/Akt/mTOR pathway liver disease (e.g. obesity, type 2 diabetes, cancer) will form the basis of the saffron treatment studies.

Key Words: Liver regeneration, PI3K/Akt/mTOR pathway, saffron

TEŞEKKÜR

Tez çalışması boyunca değerli yardım ve yönlendirmelerinden dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Mediha Canbek'e ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Kamil Can Akçalı'ya teşekkür ederim. Çalışmalarımı yürütürken öğretilerinden azami ölçüde istifade ettiğim değerli hocalarım, Doç. Dr. Mustafa Uyanoglu, Doç. Dr. Hakan Şentürk, Araş. Gör. Dr. Emre Ceyhan, Araş. Gör. Ayşe Özmen ve üzerimde emeği olan diğer bütün hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek lisans sürecinde ve hayatımın her anında maddi ve manevi katkılarıyla, sabır ve anlayışlarıyla çalışmalarımındaki başarıma büyük katkısı olan aileme ve değerli desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Başak Durmuş'a, Yük. Lis. öğrencisi arkadaşlarım Leman Resulzade ve Fatma Tuğçe Uçar'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamı BAP 2015-713 No'lu proje ile destekleyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
2.1. Karaciğerin Yapısı.....	4
2.1.1. Karaciğerin fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları.....	6
2.2. Sıçan Karaciğeri	7
2.3. Karaciğer Rejenerasyonunun Aşamaları	8
2.3.1. Faz I: başlangıç	9
2.3.2. Faz II: çoğalma	12
2.3.3. Faz III: sonlanma	12
2.4. mTOR Sinyal Yolağı	14
2.5. SAFRAN	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Deney Hayvanları	20
3.2. Deney Grupları	20
3.3. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar:	21
3.3.1. Doku örneklerinin alınması ve değerlendirilmesi.....	25
3.3.1.1. <u>Histolojik PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antijen) analizi</u>	25
3.3.1.2. <u>Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu</u>	27
3.3.1.3. <u>RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi</u>	29
3.3.2. RT-PCR işlemi	30
3.3.3. Western Blot analizi	31
3.3.3.1. <u>Protein izolasyonu</u>	31
3.4. İstatistik	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR DİZİNİ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Karaciğer Rejenerasyonu (Miyajima A ve Miyaoka Y., 2013).....	1
2.1 Sıçan karaciğeri (Waynforth ve Flecknell, 1994).....	8
2.2 İnsulin sinyali	14
2.3 PI3K sinyalinin büyüme faktörleri ya da insulin tarafından uyarılması.....	16
2.4 PI3K-Akt-mTOR sinyali	17
2.5 Safran ekstraktı (<i>C. Sativus</i>)' nın içerdiği kimyasal bileşikler (Maryam M. vd.,2013).19	19
3.1 PHx öncesi batın bölgesinin %70'lik alkol ve batikom ile temizlenmesi.....	22
3.2 Karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi.....	22
3.3 Karaciğer loplarnı birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin sağ orta ve sol yan loplarn ayrılmısı-1	23
3.4 Karaciğer loplarnı birbirine bağlayan zarlar ayrılarak sağ orta ve sol yan loplarn ayrılmısı-2	23
3.5 Karaciğer loplarnına ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanması.....	24
3.6 Bağıın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilmesi	24
4.1 Gruplara ait IGF-1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma).....	36
4.2 Gruplara ait IRS-1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma).....	38
4.3 Gruplara ait PIK3CA gen ekspresyon seviyeleri (Ortalama ± Standart sapma).....	39
4.4 Gruplara ait PDK1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)	40
4.5 Gruplara ait PTEN gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)	41
4.6 Gruplara ait AKT1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)	42
4.7 Gruplara ait fosfo-Akt protein aktivasyonu.....	43
4.8 Gruplara ait TSC1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma).....	43
4.9 Gruplara ait RHEB gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma).....	44
4.10 Gruplara ait MTORC1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)	45
4.11 Gruplara bağlı olarak fosfo-mTOR protein aktivasyonu.....	45
4.12 Gruplara ait P70S6K1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma).....	46
4.13 Gruplara ait 4EBP1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma).....	47
4.14 Gruplara ait ERK gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)	48
4.15 SF gruplarına ait karaciğer kesitlerinde PCNA pozitif () ve PCNA negatif () hepatosit görünümüleri. (a) SF 0. saat , (b) SF 6. saat, (c) SF 12. saat , (d) SF 24. saat. (X20)	49
4.16 Safran gruplarına ait karaciğer kesitlerinde PCNA pozitif () ve PCNA negatif () hepatosit görünümüleri. (a) Safran 0. saat, (b) Safran 6. saat, (c) Safran 12. saat, (d) Safran 24. saat. (X20)	50
4.17 Gruplara ait PCNA indeksi. (Ortalama ± Standart sapma).	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1. Çalışmada bulunan PI3K/Akt/mTOR yolağına ait genlerin fold değışikliklerine göre ($2^{-\Delta\Delta CT}$) oluşturulan gen ekspresyon analizi.....	53
2. PI3K/Akt/mTOR yolağına ait genlerin Ortalama \pm Standart sapma değeri.....	54
3. PI3K/Akt/mTOR Yolağına ait gen ekspresyon analizinin heat-map haritasında gösterimi	55



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
Mm	Mikrometre
Cm	Santimetre
Dk	Dakika
G	Gravity
G	Gram
Kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
Mg	Miligram
mL	Mililitre
Mm	Milimetre
mM	Milimolar
Ng	Nanogram
°C	Santrigrat Derece
Rpm	Revolutions Per Minute
Sn	Saniye
V	Volt

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
AP	Amonyum persülfat
AP-1	Activator protein-1
AKT1	Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FGF	Fibroblast Growth Factor
GTP	Guanozin trifosfat
HGF	Hepatosit Growth Factor
HCl	Hidroklorik Asit
H	Hidrojen
HRP	Horseradish peroxidase
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IRS-1	Insulin Receptor Substrate-1
KC	Karaciğer
C	Karbon
cDNA	Komplementer DNA
LD	Letal Doz
LPS	Lipopolisakkarit
MTORC1	Mammalian Target of Rapamicin
M	Mitoz
NC	Nitrocellulose
NF-κB	Nuclear Factor-κB

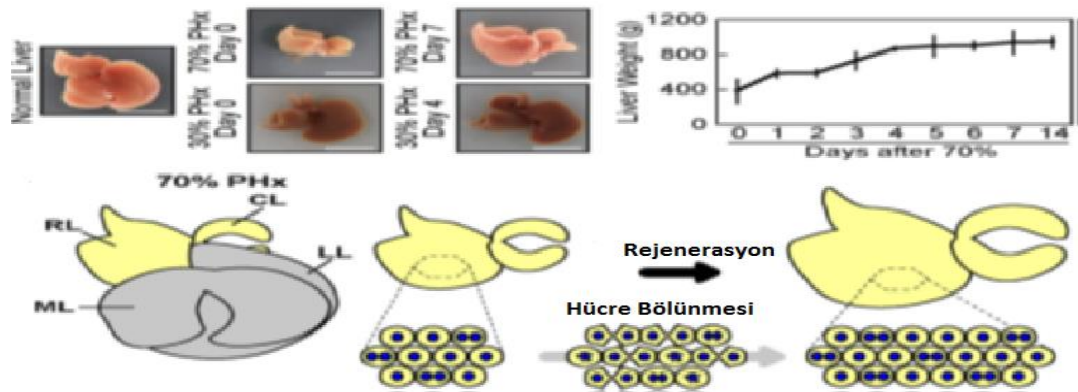
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
O	Oksijen
PDK1	Phosphoinositide dependent kinase 1
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
Pi3K	Phosphoinositide 3-kinase
PHx	Parsiyal Hepatektomi
4EBP1	Phosphorylation of the 4E- binding proteins
RHEB	Ras homologue enriched in brain
RO	Rejenerasyon Oranı
P70S6K1	ribosomal protein S6 kinaz 1
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
S	Sentez
SF	Serum Fizyolojik
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF	Transforming Growth Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
TSC1	Tumor suppressor complex 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer vücudun en büyük organlarından olup metabolizma fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli görev alır. Plazma proteinleri, safra sentezi ve sekresyonu, kan glikozunun dengelenmesi, lipid ve lipoprotein sentezi, vitamin depolanması, endojen ve eksojen bileşiklerin biyotransformasyonu gibi birçok temel fizyolojik olaylarda merkezi bir rolü bulunmaktadır (Fausto vd., 2006).

Karaciğer kendisini onarabilme yeteneği ile vücuttaki diğer tüm organlardan daha fazla avantaja sahiptir. Karaciğer çeşitli nedenlerle zarar görmesi karşısında, fonksiyonel kütlesini tamamlama yönünde replikasyon ve proliferasyona başlayabilir. Karaciğer loblarının bir kısmının cerrahi olarak çıkarılması (PHx) ve hepatositlerin virüs ya da kimyasallardan zarar görmesi gibi durumlarda hepatosit replikasyonunun arttığı görülür (Şekil 1.1) (Fausto vd. 2006; Miyajima ve Miyaoka, 2011).



Şekil 1.1 Karaciğer Rejenerasyonu (Miyajima A ve Miyaoka Y., 2011).

Karaciğer rejenerasyonu yoğun şekilde çalışılmış olmasına rağmen, birçok önemli temel mekanizmalar, hücresel hipertrofi, hücre bölünmesi, nükleer bölünme, ploidli değişiklikleri ve organ büyüklüğü kontrol mekanizmaları tanımsız kalır. Parsiyel hepatektomi; karaciğer rejenerasyonu gibi temel biyolojik soruyu çözmek için mükemmel bir deneysel sistemdir. Hepatektomi işlemi; karaciğer tümörleri için pratik bir tedavidir.

Karaciğer rejenerasyonunun mekanizmasını anlamak umut verici tedavi stratejilerinin geliştirilmesine öncülük edecektir (Miyajima ve Miyaoka., 2011).

Karaciğer rejenerasyonunun bir takım stimulatör ve inhibitör uyarıların karşılıklı karmaşık ilişkileri sonucu düzenlendiği kabul edilmektedir. Büyüme yanıtının başlaması hepatositler ve non-parankimal hücreler, ekstra sellüler matriks, metabolitler ve besinler arasındaki kompleks etkileşimler sonucu olmaktadır. Başlatıcı sinyaller, EGF (Epidermal Growth Factor), TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), IL-6 (İnterlökin-6), insülin ve matriks değişikliklerini içerirken; ilerletici sinyaller ise HGF (Hepatocyte Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor- α), EGF, insülinidir. Rejenerasyon yanıtı bir takım sinyal yolları ile gerçekleşmektedir (Taub., 2004).

Karaciğer hastalıkları, insan ölümlerine ve artan sağlık harcamalarına neden olmaktadır. Karaciğer önemli yaralanmaları telafi etmesine rağmen, organ yetmezliğine yol açan fonksiyonunda önemli bir azalma olabilir. Deregülasyon bazı karaciğer hastalıkları ve karaciğer bağlantılı-sendromların gelişiminde önemli bir faktördür ve PI3K/Akt/mTOR ağının düzgün işleyişi organ fonksiyonlarını koruyabilir (Dufour ve Clavien., 2010).

Kanser veya metabolik bozukluklar gibi pek çok hastalık PI3K/PTEN/Akt yolunun anormal aktivitesi ile ilişkilidir. Birçok tümörde, PI3K veya PTEN'in aşırı ekspresyona ya da mutasyona uğraması sonucu PI3K/PTEN/Akt sinyal yolağı aktiftir. Aşağı sinyal yolağında Akt/ mTORC1'i aktifler. PI3K/Akt/mTOR yolağının hepatik insülin direnci, tip 2 diyabet gelişiminde rol oynadığı kanıtlanmıştır (Khamzina vd., 2005).

Obezite ve tip 2 diyabet ile ilişkili metabolik kökenli karaciğer hastalığı artık batı toplumlarında en yaygın karaciğer hastalığı olarak kabul edilmektedir. Besin ve hormon giriş-çıkışında mTORC1'in merkezi bir rolü olması, mTORC1'in aşırı aktivitesi ile metabolik bozukluklara yol açmasına neden olur (Gulati ve Thomas 2007). Nitekim, yüksek besin konsantrasyonları nedeniyle aktif mTORC1 bir geri besleme döngüsünü indükleyebilir ve böylece çevre dokularında insülin duyarlılığını azaltarak karaciğer fizyolojisini etkiler. İnsülin direnci genellikle obezite ile görülmektedir. Yüksek yağ içerikli diyet obez farelerin karaciğerlerinde mTOR ve S6K1 aktivasyonunun artması

potansiyel olarak bu organda insülin direncine aracılık ettiği belirlenmiştir (Um vd., 2006; Marchesini vd., 2008; El-Serag vd., 2006; Khamzina vd., 2005).

Beslenme; Obezite, Tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ya da kanser için en önemli genetik olmayan nedendir. Nitekim çeşitli gıda bileşenleri; promotör ya da bu hastalıkların inhibitörleri olarak tespit edilmiştir. Bu anlamda, fitokimyasal maddeler yararlı etkilere sahip ana grubu oluşturur. Diyet takviyelerinin geliştirilmesi, belirli populasyon gruplarında beslenme yoluyla hastalıkların önlenmesi ya da başlangıcının geciktirilmesine yardımcı olabilir. Moleküler temelli çalışmalar insan sağlığını etkileyen fitokimyasalların daha iyi bir şekilde anlaşılmasını sağlayacaktır (Margarita vd., 2013).

Safran'ın çeşitli dozlarıyla ilgili yapılmış farklı çalışmalar (25/50/100 mg/kg) 100 mg/kg dozun 15 gün boyunca gavaj yöntemiyle verilmesinin yeterli olacağını göstermiştir (He vd. 2007; Sheng vd. 2008; Asai vd. 2005; Dhar vd. 2009). 0-6-12 ve 24. Saatler parsiyel hepatektomi sonrası rejenerasyon sürecinde önemli geçiş saatleridir. 6. saat sinyal uyarımının pik yaptığı, 24. saat G1 den S fazına geçişin tamamlandığı saatlerdir. PI3K/Akt/mTOR yolağı bilindiği üzere G1' den S fazına geçişte aktif bir sinyal yolağıdır (Huang ve Rudnick., 2014; Chen vd., 2009).

Çalışmamızda 200-250 gr ağırlığında erkek *Wistar albino* ırkı sıçanlar kullanılmış olup, n=5 olmak üzere rastgele seçimle 3 ana grup ve 4 alt grup oluşturulmuştur. Deney grubu; 15 gün boyunca safran maddesi 100 mg/kg gavaj yöntemi ile verilmiştir. Diyet sonrası % 70'lik parsiyel hepatektomi uygulaması yapıp, 0-6-12-24. saatlerde alınan karaciğer örneklerinden PI3K/Akt/mTOR yolağına ait 12 genin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Ayrıca; 2 genin western blot analizi ile protein seviyesi belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Karaciğerin Yapısı

Karaciğer, karın boşluğunun sağ üst kısmında; epigastrik bölge yerleşimli 1200-1500 gr ağırlığı ile vücuttaki en büyük organdır. Oldukça yumuşak ve esnek bir yapıya sahip olan karaciğer diyafram altında karın boşluğunun sağ üst bölümünü tama yakın olacak şekilde doldurur (Dilek, 2003).

Karaciğer sıkı bağ dokusundan oluşmuş, bol kollejen lif ve az oranda elastik lif içeren fibröz zar olan glisson kapsülü ile kaplıdır. Ayrıca bu kapsül karaciğerin sağ ve sol loblarını oluşturur. Sağ lobun arka yüzeyinde kaudat lob, alt yüzeyinde kuadrat lob yer alır. Sıçanlarda bunlara ek olarak kuyruk lobu da bulunmaktadır. Bu kapsül aynı zamanda lobülleri de oluşturur. Karaciğerin fizyolojik birimleri; silindirik yapıda, çapı 0,8-2mm ve boyu birkaç mm olan bu lobülleridir. Her lobülün merkezinde yer alan santral ven, hepatik venlere açılır. Lobüller arasında yerleşim gösteren portal üçlü ise safra kanalı, portal ven ve hepatik arter dallarını içerir. Bu bölgelerde karaciğere ulaşan arter ve ven kanı hepatositler arasındaki sinüzoidler aracılığı ile sentral vene dökülür. Sentral venden, hepatik venler aracılığı ile bu kan inferior vena cava (IVC)' ya boşaltılır. Karaciğer kan akımı % 30 oranında hepatik arterden % 70 oranında portal ven aracılığı ile sağlanır. Hepatik arter oksijenlenmiş kanı taşıırken portal ven ise gastrointestinal sistemden emilen sindirim ürünlerinden zengin venöz kanı karaciğere taşır. Kan akımı periferden merkeze doğru gerçekleşir (Dilek, 2003).

Tek tabakalı, parankimal epitel hücreleri sentral venden çıkıp yayılırlar. Karaciğer hücre tabakalarının her iki tarafına da kan taşıyan vasküler kanallar ise sinusoidlerdir. Sinusoidler sentral ven etrafında zengin, lobüller arası ve vasküler bir ağ oluştururlar. Sinusoidleri endotelial veya Kupffer hücreleri kaplar. Kemik iliği kökenli bu hücreler hepatik makrofajlar olarak da bilinir. Kupffer hücrelerinin başlıca görevi dolaşımdaki zararlı ajanları ve ömrünü tamamlayan yaşlı eritrositleri ortadan kaldırmaktır. Daha önceleri pit hücreleri olarak bilinen ve günümüzde NK (Natural Killer) hücreleri oldukları gösterilen bir grup hücre de bu bölgede yer alır. Kısa psödopodları ve sitoplazmik

granülleri olan bu hücrelerin çeşitli viral etkenlere karşı karaciğeri koruduğu bilinmektedir (Dilek, 2003).

Embriyonik gelişme sırasında hepatoblast; epitelyum kökenli olan hepatosit ve cholangiositlerin oluşumunu sağlar. Cholangiositler ve Hepatositler hasar durumunda farklılaşabilirler ve bölünebilirler (Fausto, 2004). Hepatositler ortalama 20-25 µm çaplı, altı veya daha fazla yüzeyi olan büyük, poligonal hücrelerdir. Karaciğer hücre popülasyonunun ortalama %60'ını meydana getirirler. Parankimal hücre grubundan olup karaciğerin metabolik fonksiyonlarından ve temel biyokimyasal işlemlerinden sorumludurlar (Dilek, 2003).

Karaciğerde parankimal olmayan hücreler; sinüzoidal endotel hücreleri, kuppfer hücreleri ve hepatik yıldız hücrelerdir. Sinüzoidal endotel hücreler; hepatositlere lipoprotein ve makromoleküllerin giriş-çıkışını kontrol eder. Hepatik yıldız hücreler ise; hasar durumunda aktive olarak myofibroblast hücreleri gibi davranabilir ve ekstraselüler matriksin yapısına katılırlar (Dilek, 2003).

Hepatositler aralarında sinüzoidler yer alacak şekilde santral venden periferine doğru ışınsal simetriye göre dizilmiş olup hücreler periferden merkeze doğru aldıkları kan ve madde içeriğine göre üç farklı zona ayrılır (Dilek, 2003).

Bunlar:

1. Periferik zon (Zon I): Buradaki hücrelerde granüllü endoplazmik retikulum ve bol kristal mitokondriler bulunur. Bu hücreler dolaşımında herhangi bir sorun olduğunda en geç ölen ve rejeneratif özelliği en yüksek olan hücre grubudur.
2. Ara zon (Zon II): Sınırları tam olarak belli olmayan bu hücre grubunun metabolik aktivitesi orta düzeydedir.
3. Santral zon (Zon III): Santral veni çevreleyen hücre grubudur. Hücreler periferik zona göre daha az aktiftir. Buradaki hücreler düz endoplazmik retikulum bakımından zengin, diğer organeller açısından ise fakirdir. Perfüzyon

azaldığında nekrozun, fizyolojik ve patolojik yağ birikiminin ilk olarak gözlendiği alandır.

Safra hepatositlerce sentezlenir ve iki hepatosit arasında bulunan safra kanilkülleri aracılığı ile salınır. 1-2 µm boyutunda boşluklardır. Hepatositler arasında yer alan bu küçük kaniliküller hücrelerin arasından kanla temas etmeksizin (içerdiği zonula okludensler sayesinde) bir labirent ağ oluştururlar. Safranın akışı kan akışının tersine merkezden periferine doğrudur.

Endotelial hücreler ile hepatositler arasında sinusoidler ile çevrelenen doku aralığına Disse aralığı denir. Disse aralığının içerdiği interstisyel sıvı, kan ile hepatosit arasında madde alışverişini sağlar. Yağ depolayan ito hücreleri ise; karaciğer hasarı sırasında fibroze neden olan kollajeni sentezleyen fibroblastlara dönüşür. Disse aralığında bulunan ito hücreleri ayrıca kan akışını da düzenler.

2.1.1. Karaciğerin fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları

Karaciğer yaşam için elzem olan yüzlerce fonksiyonu gerçekleştiren multifonksiyonel bir organdır. Bu fonksiyonları dört ana başlık altında inceleyebiliriz. Bunlar;

1. Atılım Fonksiyonu: Safra yolu ile bilirubin atılımı ve bilirubin metabolizması, ksenobiyotik metabolizması ve atılımı,

2. Sentez Fonksiyonu: Albumin, globulin, immunglobulinler, seruloplazmin, transferin, koagulasyon proteinleri, fibronektin, lipoprotein sentezi, karaciğer enzimleri, üre sentezi, kreatin gibi proteinlerin sentezi,

3. Metabolik Fonksiyon: Amonyak metabolizması, karbonhidrat metabolizması, yağ metabolizması, protein metabolizması,

4. Depolama Fonksiyonu: vitaminlerin depolanması, demir depolanması, glikojen depolanması,

Karaciğer bu fonksiyonları üç ana sistem vasıta ile gerçekleştirir:

1. Hepatositler: Temel biyokimyasal işlemleri gerçekleştirir. Vücuttaki proteinlerin %90'nını, spesifik proteinlerin ise (albümin ve birçok koagülasyon faktörü gibi) %100'ünü sentezler. Ayrıca sitrik asit (krebs) siklusu, glikoliz, glikoneogenesis, heksos monofosfat şantı, yağ asidi sentezi, lipoprotein metabolizması, aminoasit ve nükleik asit metabolizması da karaciğerin hepatositlerinde gerçekleşir.

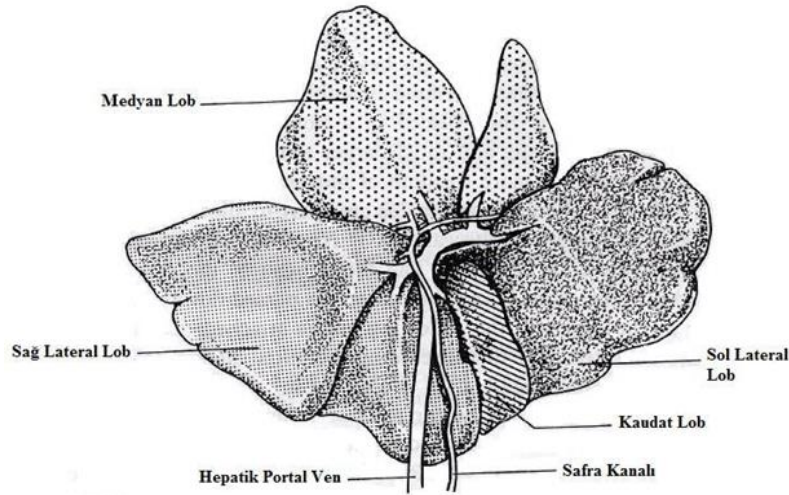
2. Safra Yolu: Biluribin atılımı ile ilgilidir. Biluribin metabolizması retiküloendotelyal sistemde gerçekleşir. Hemoglobinin bozulması ile oluşan bilirubin safra yoluyla atılır.

3. Retiküloendotelyal sistem (RES): Hemoglobin ve bilirubin metabolizmasını kapsar. Portal akım içerisinde bulunan bağırsak bakterileri gibi toksik materyaller karaciğerde sistemik dolaşıma katılmadan retiküloendotelyal sistem tarafından uzaklaştırılırlar.

Karaciğer kendini rejenere etme yeteneği olan tek organdır. Karaciğer dokusunun fonksiyonunu yerine getirememesi için %80'den fazlasının harap olması gerekir.

2.2. Sıçan Karaciğeri

Karaciğer ağırlığı sıçanlarda, vücut ağırlığının yaklaşık %4'ünü teşkil etmektedir (Palmes ve Spiegel, 2004). Sıçan karaciğeri sağ ve sol medyan, sağ ve sol lateral ve kaudat loblardan oluşan multilobuler bir yapıya sahiptir. Üst üste yığınlar halinde bulunan sıçan karaciğerinde sadece kaudat lob mide sayesinde bu yığından ayrılır. Medyan lob, en büyük lobdur ve sol lateral lob ile ilişkilidir (Gershbein ve Elias, 1954; Martins ve Neuhaus, 2007). Kaudat lob, portal ven ve inferior vena cavanın sol tarafında ve sol lateral lobun arkasında konumlanmış olup (Martins ve Neuhaus, 2007), iki bölümden oluşmuştur (Gershbein ve Elias, 1954; Martins ve Neuhaus, 2007) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Sıçan karaciğeri (Waynforth ve Flecknell, 1994)

2.3. Karaciğer Rejenerasyonunun Aşamaları

Parsiyal Hepatektomi sonrası karaciğer yenilenmesinin neden etkili ve hızlı gerçekleştiği uzun yıllardır yapılan araştırmalara rağmen henüz cevaplanamamış bir sorudur. Oldukça karmaşık olan bu sistem tahmini olarak 3 bölüme ayrılabilir:

- 1- Başlangıç Fazı: Hepatositlerin büyük bir çoğunluğu G0 (quiescent state) fazında beklemektedir. Hücre döngüsüne giriş G1 fazı ve G1/S kontrol noktası ile gerçekleşir. Ekstrasellüler matrix (ECM)'in çözünmesi ile başlar. Ratlarda bu süreç 12-18 saat arası sürer. 3 fazın en kısa süreni olmasına rağmen, karaciğer rejenerasyonunu tetikleyen başlangıç olaylarının açıklanabilmesi için en çok analiz edilmeye çalışılan fazdır.
- 2- Çoğalma Fazı: Hepatositler DNA sentezini gerçekleştirir, hücre döngüsü tamamlar ve yeniden G0 fazına geçerler. Hepatositlerin çok az bir kısmı ikinci kez mitoz girer. ECM yeniden oluşur. Diğer hepatik hücre tipleri örneğin cholangiositler ve Sinüsodial endotel hücreleri (SEC) bölünür. Bu faz parsiyal hepatektomi sonrası kemirgenlerde 12-18 saatten yaklaşık 4 güne kadar sürer.

- 3- Sonlanma Fazı: Regenerasyon sürecinin geri kalan kısmı (4 ile 7 gün arası) . Bu süreç; büyüme öncesi sinyallerin azalması, rejenerasyonu baskılayıcı sinyallerin başlaması, karaciğer kütesinin eski haline dönmesi ve hepatic homeostasisin yeniden oluşması olarak açıklanabilir.

2.3.1. Faz I: başlangıç

Parsiyal Hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunun başlangıç fazı sırasında, ilk önemli olay karaciğer dokusunun kesilip çıkartılmasıyla portal sirkülasyonda ani stres oluşması ile portal damardaki basıncın (PVP) artmasıdır (Schoen vd., 2001). Karaciğer 2 ana kan damarı ile beslenir. (1) Portal damar (karaciğerde bulunan kanın %75'ini taşır) Metabolik süreç için gastrointestinal sistemden absorbe edilen besin, toksin, bile asit ve diğer bileşenleri karaciğere taşır. (2) Hepatic atardamar; düşük kan hacmine rağmen oksijen, hormon, sitokin ve immün ajanlar (lemfosit, monosit, vd.)'ı karaciğere taşır. PVP artışı ile karaciğerde endothel hücreler tarafından Nitrik Oksit (NO) salınır. N-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) tarafından NO sentezinin bloke edilmesi PHx sonrası 15. Dakikada tetiklenen *c-fos* mRNA ekspresyonunun baskılanması ile sağlanır ve ameliyat sonrası 48 saatlik süreçte karaciğerin büyümesi önlenir (Wang ve Lauth, 1998).

PHx sonrası ilk 5 dakika içerisinde artan PVP basıncı ile birlikte sinüsoidal endotel hücrelerinin kanal çapları ve gözenekleri genişler. Aynı zamanda hepatositlerin plazma membranı depolarize olur. Ancak; depolarizasyonun önlenmesi cerrahi müdahale sonrası 1-1.5 saatte genellikle görülen gen ekspresyonu sinyalini azaltmaz. Bu da depolarizasyonun rejenerasyonun başlangıç fazında küçük bir etkisinin olduğunu gösterir (Minuk vd., 1997). Beta- katenin, normalde hepatosit plazma membranında E-kadherine bağlanan transkripsiyon düzenleyicisi, hepatosit çekirdeğine göç ederek hedef genleri cerrahi sonrası ilk 5 dakika içerisinde aktif eder. Bu olay E-kadherinin downregülasyonu aracılığı ile gerçekleşir (Monga vd., 2001). Normal hepatic büyüme Notch/Jagged Sinyal sistemi tarafından düzenlenir. Jagged-1 ya da Notch-2 genlerinden birinde oluşan mutasyon insanlarda intrahepatik bile kanallarının yetersizliğine sebep olur (Alagille Sendromu). Jagged hücre yüzey ligandı Notch'a bağlanır ve aktive eder. Komşu hücreler arası bilgi taşıyan transmembran reseptörüdür. Notch enzimatik parçalanma geçirir ve

intraselüler domain (NICD)'in nükleusa hareket ederek gen transkripsiyonunu düzenler. PHx'den 15 dk sonra, NICD hepatositlerin nükleusunda görülür.

PHx sonrası 1. dakikada ürokinaz plazminojen aktivatörünün (uPA) etkileşimi ve hepatositler tarafından uPA'nın hücre yüzey reseptörünün eksprese edilmesi (uPAR) uPA aktivitesinin artışına sebep olur (Mars vd., 1995). uPA'nın aktivasyonu önemli bir olaydır. Birçok proteinin aktivasyonu ve parçalanmasından sorumlu bir serin proteazdır. Örneğin; uPA plazminojeni plazmine dönüştürür. Plazmin de fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlar. PHx sonrası karaciğerde plazmin varlığı ilk 15 dakikada küçük bir artış, yaklaşık 3-6. Saatler arasında da önemli bir artış gösterir (Kim vd., 1997). uPA ayrıca hepatosit büyüme faktörü (HGF)'nin biyolojik fonksiyonel formuna dönüşebilmesinden sorumlu önemli bir enzimdir (Mars vd., 1993). İlginç bir şekilde; uPA'nın yoksunluğunda (uPAR'dan bağımsız) hepatositlerde PHx sonrası rejenerasyon gecikmiştir (Roselli vd., 1998). Bu durum da uPA'nın reseptör yardımı olmaksızın cerrahi müdahaleye yanıt verdiğini göstermektedir.

HGF ve protein epidermal büyüme faktörü (EGF)'nin hepatosit hücre kültüründe önemli bir mitojenik uyarıcı oldukları ispatlanmıştır (Michalopoulos ve DeFrances, 1997). Ayrıca; EGF aile üyeleri, örneğin; transforme edici büyüme faktörü alfa (TNF-a)(Luetteke vd., 1988) ve heparine-bağlanan büyüme faktörü (HB-EGF) (Ito vd., 1994)'nin DNA sentezini başlatıcı etkileri olduğu kanıtlanmıştır. HGF'nin fonksiyonu transmembran protein olan Met'e bağlanarak tirozin kinaz reseptörünün uyarılmasını sağlamaktır (Cerrahi müdahaleden sonra 1.dk ile 60. dk'lar arasında aktiftir). Cerrahiye takiben kan dolaşımında salınmaya devam eder ve 60.-120. dakikalar arasında salınım miktarı pik yapar (Lindroos vd., 1991).

Cerrahi sonrası 30-60. Dakikalarda, karaciğerin retikuloendotel kısmı, genellikle nonparankimal hücreler (örneğin kolonjiyositler), sitokinlerin üretilmesi için uyarılırlar. TNF-a ve interleukin-6 (IL-6) da aynı yolla uyarılırlar. Bu sitokinler Kuppfer hücrelerinde otokrin, komşu hücrelerde parakrin (örneğin: hepatositler) etki gösterirler. PHx sonrası sitokinler 1. Saatte plazmada pik yapmasından dolayı endokrin salgı etkisiyle böyle bir etki gösterdiği düşünülmektedir. TNF-a ve IL-6 hepatic cerrahiye yanıt olarak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonundan sorumludurlar (Diehl ve Rai, 1996). Bu transkripsiyon

faktörlerinden AP-1 (15-60 dk içerisinde DNA' ya bağlanır ve c-jun,c-fos ve diğer diğer AP-1 partnerlerini içerir) (Diehl vd., 1994), c-myc (PHX sonrası 15. Dakikada mRNA ekspresyonu artar)(Thompson vd., 1986), NF-KabbaB (PHX sonrası 30. Dakikada DNA' ya bağlandığı görülür, 60. Dakikada kaybolur) (Cressman vd., 1994), STAT3 (Cerrahi sonrası ilk 1 saatte görülmeye başlar ve 3-4. Saatlerde pik yapar)(Yamada vd., 1997) ve C/EBPbeta(PHX sonrası 3. Saatten sonra ekspresyonu 2-3 kat artar ve 24. Saate kadar etkisi sürer) (Diehl ve Yang, 1994).

Birçok sinyal transdüksiyon yolağı PHx sonrası ilk fazda upregüle olmaktadır. Bu yollar büyüme hormonlarının bağlandığı reseptörler (örneğin: Met) ve sitokin sinyaliyle birlikte uyarılırlar. Örneğin ilk 15 dakika sonrası TNF-a, Jun Kinaz'ı aktifleştirir (MAPK8 olarak da bilinir). Aktif Jun Kinaz, transkripsiyonel faktör olan c-jun'u fosforiller (Diehl vd., 1994). Wortmannin (PI3K inhibitörü)'nin injeksiyonu ile bloklanan PI3K, PHx sonrası 48 ve 72. Saatler arasında kontrol grupları ile karşılaştırılan farelerin karaciğer hacim ve kütlelerinde azalma olduğu görülmüştür. Karaciğer normal boyutuna 7 gün sonra ulaşmıştır (Jackson vd., 2008). PDK1 yoksun spesifik karaciğerde, bir serin treonin kinaz PI3K'nın alt birimi olan transmembran protein PIP3'e bağlanarak AKT'ın fosforilasyonunu sağlar. Bunun sonucunda %70' lik PHx sonrası fare ölür. Fakat; %30' luk PHx sonrası PDK1 yoksun ve normal kontrol grubunda kayıp olmamakla birlikte mitotik olarak önemli bir fark da gözlenmemiştir (Haga vd., 2009). p42/44 MAPK sinyali parsiyal hepatektomi sonrası bifazik upregülasyon gösterir. İlk 1 saatte pik yapan MAPK sinyali daha sonra kaybolur. 5-16. Saatler arasında sinyal tekrar aktif olarak pik yapar (Chen vd., 1998).

Mekanik bozukluk, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından hepatositlerin uyarılması ile oluşturulan ağ etkisi 70'den fazla genin uyarılmasını sağlar. Aktivasyonları PHx'den sonra ilk 1-2 saatte başlayan bu genler; early growth response-1 (egr-1), growth factor modulators like insülin growth factor binding protein 1 (IGFBP1) ve diğer gerekli proteinlerin sentezini kodlayarak hepatositlerin G0 fazından çıkmasını, DNA sentezini ve sonraki aşamada da hücrenin replikasyona uğramasını sağlarlar (Haber vd., 1993).

2.3.2. Faz II: çoğalma

Karaciğer rejenerasyonunun ara fazı olan proliferasyon (çoğalma) döneminde karaciğerde bulunan tüm hücre tipleri replikasyona girer. Kemirgenlerde bahsedilen bu hücre tipleri arasında hepatositler 24-44 saat arasında DNA sentez aktivitesiyle ilk pik yapan hücrelerdir. SEC'lerin Faz I'de oluşan gözenek genişlemesi bu fazda 72 saatten küçülme gösterir (Wack vd., 2001). Kolonjiyositler PHx'den yaklaşık 2-3 gün sonra maksimum replikasyon seviyelerine ulaşırlar. Bile kanalları tekrar eski hacmine 10 günde döner (Lesage vd., 1996). Bu süreç sırasında hepatik hücre tipleri arasında önemli parakrin bir iletişim oluşur.

Hepatositlerin eksprese olması, 24-72. Saatler arasında vascular endotel büyüme faktörü (VEGF) salınımının pik yapması gibi uyaranlar PHx sonrası 3-4. günlerde endotel hücrelerinin replikasyona girmelerini tetiklerler (Shimuzu vd., 2001). SEC'ler ve yıldızlı hücreler; HGF salınımı yaparlar (Ping vd., 2006; Takeishi vd. 1999). PHx'den 4 gün sonra yıldızlı hücrelerin sentezi artar ve ekstrasellüler matriks proteinleri birikmeye başlar.

2.3.3. Faz III: sonlanma

SEC'ler güçlü hücre bölünmeleri sonucunda avasküler kümeler halinde birikir daha sonra hepatositler arasında göç ederek sinuzoidleri yeniden oluştururlar (Martinez-Hernandez ve Amenta, 1995). Engellenen Hepatosit-Ekstrasellüler matriks (ECM) etkileşimi sonlanma fazında ani bir şekilde değişebilir. Örneğin; integrin linked kinase (ILK) (integrinlerle alakalı intrasellüler bir dönüştürücü) özellikle rejenerasyonun sonlanma fazında görülür. ILK'dan yoksun farelerde hepatositlerin kontrol grubuna göre 1.5 kat daha büyük oldukları gözlenmiştir. Buna ek olarak; hepatositlerdeki DNA sentez aktivasyonu çok daha güçlü ve uzun olmuştur (Apte vd., 2009). Bu durum karaciğerde integrinlerin ekspresyon ifadelerinin değişiminden kaynaklanabilir ve Met sinyalinin daha da arttığı görülmüştür (Gkretsi vd., 2007; Apte vd., 2009).

Hepatoselüler karsinomada (HCC) aşırı eksprese olduğu bilinen ve insanlarda aşırı büyümeye sebep olan genetik bir sendromun ana nedeni Glypican-3'ün; PHx'den sonra 4 ve 6. günler arasında ekspresyonu artar. Glypican-3 aşırı eksprese edilen farelerde hepatositlerin replikasyon sürecinde gecikme ve DNA sentez aktivasyonunda azalma görülmüştür. 6 günün sonunda karaciğer eski boyutuna ulaşamamıştır. Yapılan çalışmalar

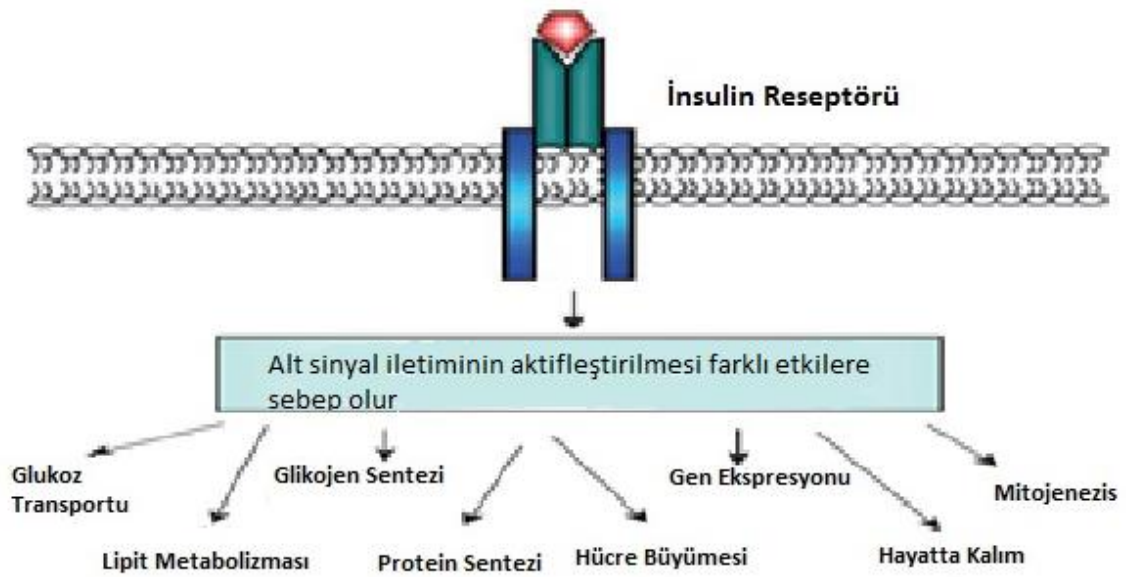
Glypican-3 ekspresyonunun karaciğer rejenerasyonda sonlanma fazı için gerekli olduğunu göstermiştir (Liu vd., 2009).

Transkripsiyon faktörlerinin miktarındaki nisbi değişiklikler ve mitoinhibitörlerin salınımı da rejenerasyonun sonlanmasına yardımcı olur. DNA'ya bağlanma aktivitesi olan C/EBPalfa transkripsiyon faktörü, PHx başlangıcında artar ardından hızlı bir şekilde düşüşe geçer. Ancak; rejeneratif yanıtın sonlanma fazına doğru yeniden aktive olur. Bu önemli olay C/EBP'nin hepatositlere karşı antiproliferatif olduğunu gösterir (Wang vd., 2001). Hippo kinaz sinyalinin üyesi olan Yes-associated protein (YAP), PHx sonrası karaciğerde downregüle olur. YAP bir transkripsiyon koaktivatörüdür ve karaciğerin boyutunu düzenler. Ayrıca; karaciğer kanserine de sebep olduğu kanıtlanmıştır (Apte vd., 2009). Non-parankimal hücrelerde salınım faktörleri interleukin 1 alfa ve beta (IL-1a ve IL-1b) (mitotik inhibitör, hepatik DNA sentezi engelleyici) rejenerasyonun proliferasyon fazından sonra salınımına başlarlar. TGF-B ve reseptörü PHx sonrası rejenerasyon başlangıcında downregüledirler. Fakat DNA sentezinin pik yapmasından sonra miktarları artar. TGFBR2 (TGF-beta reseptör II)'den yoksun farelerde PHx'yi takiben belirgin bir şekilde erken safhada hepatositlerin S fazına girdikleri görülmüştür (Oe vd., 2004; Romero-Gallo vd., 2005). Bu reseptörün yoksunluğunda 1 haftada en büyük karaciğer kütle-hacim oranı görülmüştür (Romero-Gallo vd., 2005). Bir mitoinhibitör Activin-A, TGF-B ile ilişkilidir. Activin-A inhibitörü olan follistatin infüzyonu sonucu karaciğer kütlelerinde ve DNA sentez aktivasyonunda da 5 günden fazla süre artış görülmüştür. Bu durum Activin-A'nın sonlanma fazında etkin rol oynadığını göstermektedir (Kogure vd., 1995).

Özetleme yapmak gerekirse; Büyüme faktörü (HGF-EGF vb.) ve büyüme inhibitörleri (TGF-B, ILK, IL-1 ve C/EBPa)'nin sürekli antagonist çalışarak uyarılmış olan karaciğer hücrelerinin karmaşık rejenerasyon sürecini yönetirler. Büyüme faktörleri başlangıç fazında dominantken, büyüme inhibitörleri sonlanma fazında dominant etki gösterir (Michalopoulos ve DeFrances, 2005).

2.4. mTOR Sinyal Yolağı

Karaciğerin büyümesinde insulin'in hepatotrofik bir faktör olması ve hepatosit çoğalmasını uyararak etki ettiği bilinmektedir. Hücresel seviyede, insulin etkisi; protein kinazlar ve fosfatazların uyarılması, hücresel büyüme ve farklılaşmada artış, gen transkripsiyonun aktivasyonu ya da baskılanması gibi karakterize edilebilir (Şekil 2.2). PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) sinyal yolağı insulin'in hücresel etkisinde başlıca ana sinyal yolağı olarak görölmektedir (Desdouets vd., 2010).

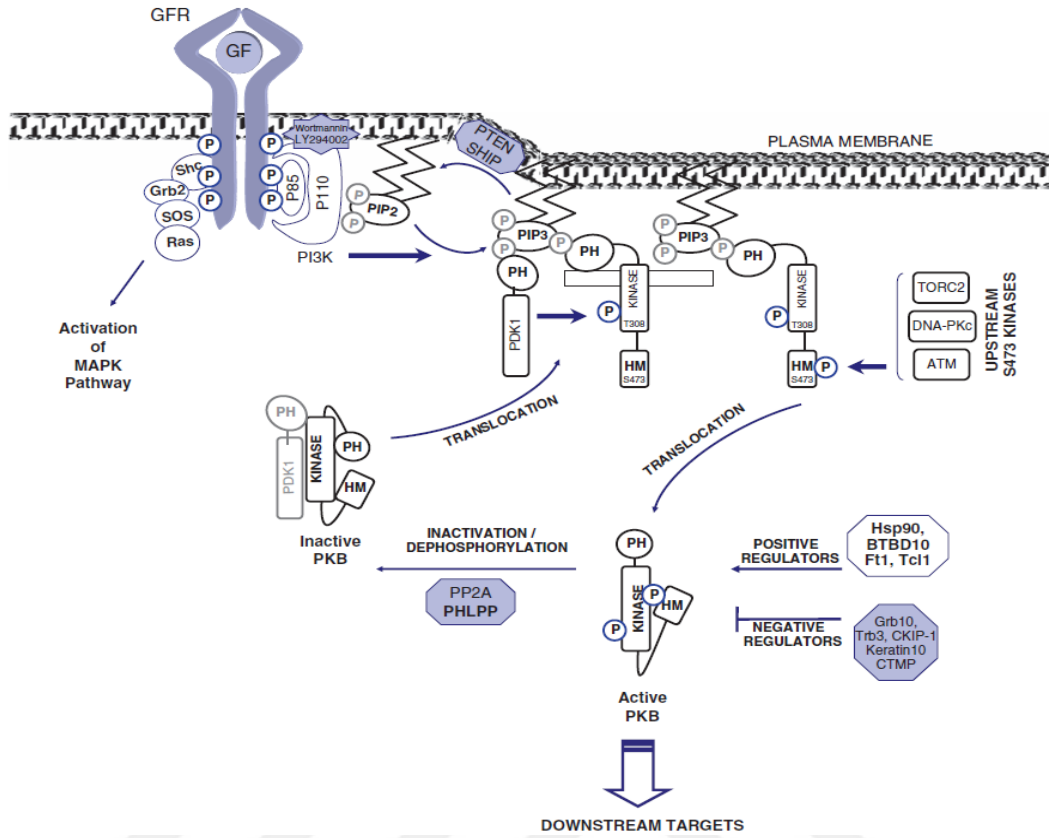


Şekil 2.2 İnsulin sinyali

PI3K/Akt/mTOR; karaciğer rejenerasyonunda hipertrofi (aşırı büyüme) için önemli bir sinyal yolağıdır. PI3K/Akt/mTOR serin-treonin protein kinazın; hücre büyümesi, proliferasyon, hayatta kalım, farklılaşma ve hücre iskeleti değişiminin düzenlenmesi gibi birçok fonksiyonu vardır. %70' lik parsiyel hepatektomi sonrası PI3K/Akt/mTOR aktive olur ve hepatositlerin çoğalmasında etkin rol oynar (Miyajima ve Miyaoka 2013).

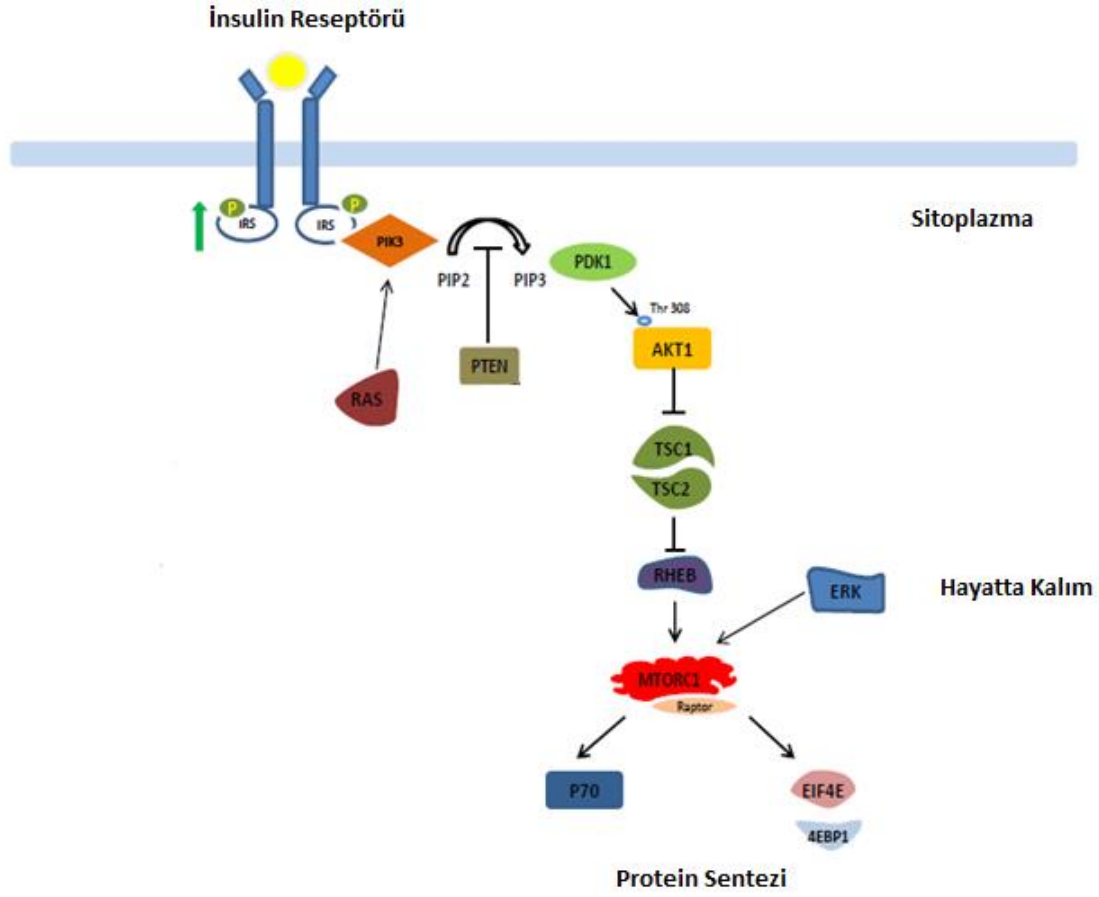
PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı;

PI3K ailesi I, II, III sınıflarını içerir. Sınıf I PI3K'lar farklı düzenleyici (p50-55/p85) ve katalitik (p110 α (PIK3CA), p110 β (PIK3CB), p110 δ (PIK3CD), p110 γ (PIK3CG) alt birimleriyle heterodimerdir (Jaber vd. 2012; Janku vd. 2011). Büyüme faktörleri-insulin gibi uyarılar IRS reseptör üzerinde bulunan tyrosine bölgelerine bağlanarak sınıf I PI3K aktive olur. Alt birimlerin aktive olabilmeleri için PIP2'nin PIP3'ü fosforile etmesi gerekir (Wymann ve Marone 2005) (Şekil 2.3). Sınıf II ve sınıf III yapısal ve fonksiyonel olarak sınıf I'den farklılık gösterir (Engelman vd. 2006). PI3K, hücre büyümesi, çoğalma, farklılaşma, motilite, sağkalım ve hücre içi haberleşmesi gibi hücrel süreçleri, geniş bir düzenlenmesinde yer alır; birçok PI3K etkisine PKB (bring protein kinaz B) aşağı sinyali aracılık eder. Sınıf I PI3K'nın yapısal fonksiyonunda mutasyon olması (örneğin; p110 α alt ünitesi) ya da negatif düzenleyici olan PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10) tarafından baskılanması birçok insan kanserinin çarpıcı özelliğidir (Sung vd. 2012; Samuels vd. 2005).



Şekil 2.3 PI3K sinyalinin büyüme faktörleri ya da insulin tarafından uyarılması (Jaber vd. 2012)

PI3K, SH2 (Src homology 2) domaini içeren ve tirozin ile fosforillenmiş IRS ile etkileşime geçer ve böylece Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3)'ı aktive eder (Gao vd. 2005). Artan PIP3 konsantrasyonu (PKB)/Akt, PH (pleckstrin homology) domainin içeren kinazı ve Phosphoinositide dependent kinase 1 olarak isimlendirilen (PDK1)' i aktive eder (Yang vd. 2002). Bununla birlikte Akt; Thr 308 ve Ser 473 bölgelerinden fosforillenerek aktive olur (Oshiro vd. 2007). Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) proteini serin/treonin protein kinaz olarak ifade edilen temel bir Akt substratıdır. Akt; Ras düzenlenmesinde rol oynarak, PI3K ve MAPK sinyal iletim olay zincirleri arasındaki olası çapraz-haberleşmeyi sağlar (Jaber vd. 2012). Akt'ın bilenen diğer hedefleri Bcl2-antagonist of cell death (BAD), forkhead box protein 01A (FoxO1), forkhead box protein 03A (FoxO3), forkhead box protein 04 (FoxO4), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ve mammalian target of rapamycin (mTOR)'dir (Şekil 2.4) (Janku ve Polivka 2013).



Şekil 2.4 PI3K-Akt-mTOR sinyali

PKB/Akt'ın yapısal aktivasyonu kontrolsüz hücre çoğalmasını tetiklemesi ve apoptozu baskılaması nedeniyle anormal hücre döngüsünün düzenlenmesine büyük katkıda bulunur. Bu hayatta kalma başlangıcı ve antiapoptotik aktivasyon hedef proteinlerin aktivasyonu ile aşağı yolak üzerinde diğer proteinlerin uyarılmasına ya da baskılanmasına neden olur. Baskın mekanizma PKB/Akt'ın düzenlediği hücre büyümesi mTOR complex 1 (mTORc1)'in uyarılmasıyla devam eder (Şekil 2.4). mTOR iki farklı multiprotein kompleksinden oluşmaktadır: mTORC1 ve mTORC2. mTOR besin, hormon ve büyüme faktörlerine yanıt olarak aktive olur. Örneğin aminosit gibi besinler ve glukoz girişi sınıf 3 PI3K (hVps34)'lar tarafından mTORC1'i aktive eder. mTORC1 / mTORC2 sinyal yolu (insulin reseptör) IR aktivasyonu ile IGF ya da insülin ile aktive edilir. Ligand insulin reseptörüne bağlanır ve (insulin reseptör substratı 1) IRS1'in tirozin fosforilasyonunda artışa neden olur. PDK1 ve PKB/Akt uyarılması sınıf 1 PI3K'yı uyararak PIP3 üretimini artırır. PKB/Akt'ın etkinleştirilmesi rapamisin duyarsız mTORC2 ve PDK1'in aktivasyonu ile ilgilidir. Aktif PKB/Akt inaktif (tumor suppressor complex 2) TSC2'yi

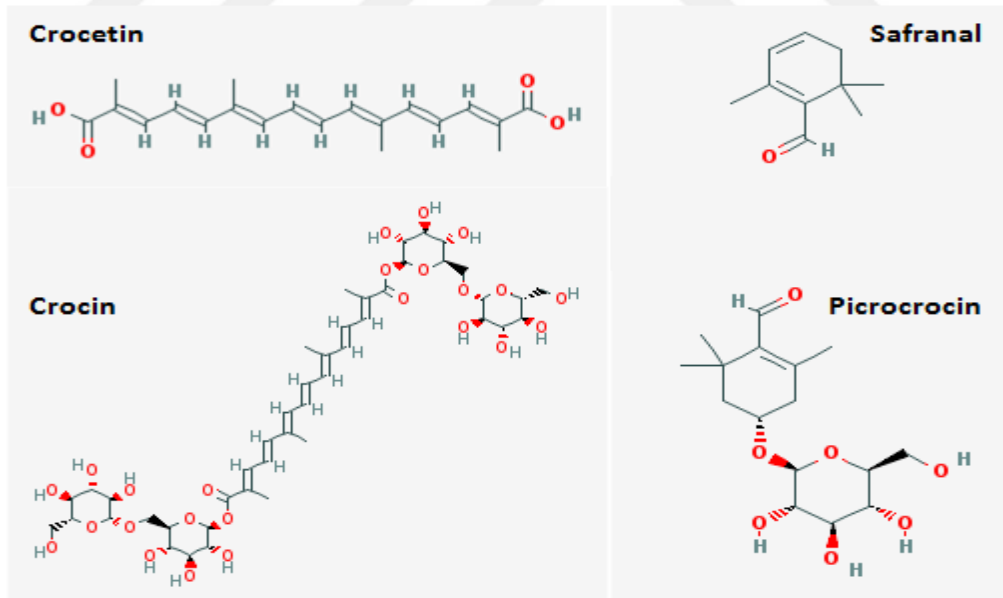
fosforiller. TSC2'nin uyarılmasıyla TSC1/2 kompleksi uyarılmış olur. TSC2'nin fosforilasyonu Rheb-GTP'yi aktive eder. Aktive Rheb (Ras homologue enriched in brain), mTORc1'e bağlanarak mTORc1'i aktifler. Bunun sonucunda translasyon başlangıcını ve ribozom biogenezini uyararak ribosomal protein S6 kinaz 1 (S6K1) ve Phosphorylation of the 4E-binding proteins (4E-BP1) uyarılmış olur (Janku ve Polivka., 2013; Wang vd., 2008; Sancak vd., 2007).

Fosforillenmiş mTORC1, aşağı sinyal iletim efektörleri; 4EBP1 ve P70S6 kinaz aracılığıyla hücre büyümesini, hücre siklusu progresyonunu ve hücre metabolizması için gerekli proteinlerin mRNA ribozomal translasyonunu sağlar. Hücre çoğalmasının durduğu fazda fosforillenmiş 4EBP1, ökaryotik transkripsiyon faktör 4E (eIF4E)'ye sıkıca bağlıdır ve protein translasyonunun başlamasını inhibe etmiş olur. Büyüme faktörleri gibi uyarıcılar mTOR yolu üzerinden 4EBP1'i fosforiller. Bu da 4EBP1'i eIF4E'nin ayrılmasına neden olur (Hara vd. 1997). eIF4E, c-myc, cyclin D1 ve ornitin dekarboksilaz gibi uyarıcılar; proteinlerin translasyonu ile G1'den S faza hücre siklusunun ilerlemesini sağlar. Böylelikle hücre siklusunun ilerlemesinde yer alan proteinlerin (cyclin D1, c-myc gibi) mRNA translasyonlarını düzenler. Ayrıca 4EBP1'in fosforilasyonu HIF-1a sentezinde artmaya neden olur. 4EBP1'in dışında S6K1'in fosforilasyonu da mRNA translasyonunu artırır. Ayrıca S6K1, IRS-1 inhibasyonu yoluyla PI3K/Akt/mTOR'u negatif geri bildirim ile inhibe etmektedir (Janku ve Polivka 2013; Wang vd. 2008; Sancak vd. 2007).

2.5. SAFRAN

Safran (*Crocus sativus L.*)'ın; stigmalarından elde edilen kimyasal karışım son 20 yıldır birçok araştırma konusu olmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda; safran çiçeğinin stigmasında 3 ana bileşiğin bulunduğu gösterilmiştir. Bunlardan crocin; safran'ı renklendiren bileşiktir, picocrocine; safran'a tadını veren, safranal ise aromasını oluşturan bileşiktir. Crocin, Picocrocine ve Safranal dışında safran birçok aminoasit, protein, mineral, flavonoidler gibi kimyasal bileşiği yapısında taşır (Azrina A, 2013) (Şekil 2.5).

Safran; antioksidan (Ghadroost vd., 2011; Yoshino vd., 2011), anti-enflamatuar (Nam vd., 2010), anti-aterosklerotik (Zheng vd., 2006), nöro-koruyucu (Ochiai vd., 2007); (Nam vd., 2010) ve yüksek yağlı diyet-kaynaklı insülin direncini önlemesi (Sheng vd., 2008) ile önemli farmakolojik özelliklere sahiptir. Safran'ın bu yararlı etkilerinin özellikle güçlü bir serbest radikal süpürücü aktivitesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Hiqashino vd., 2014 ; Azam B. vd., 2014 ; Ila D. vd., 2010).



Şekil 2.5 Safran ekstraktı (*C. Sativus*)'nın içerdiği kimyasal bileşikler (Maryam M. vd., 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneysel çalışmamız; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Moleküler Biyoloji ve Histoloji Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'nun 415/2014 sayılı izni ile yapılmıştır.

3.1. Deneysel Hayvanları

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

3.2. Deneysel Grupları

Deneyselimizde 200 gr ağırlığında erkek Wistar albino ırkı sıçanlar kullanılmıştır. Çalışmamızda $n=5$ olmak üzere rastgele seçimle 3 ana grup ve 4 alt grup oluşturulmuştur.

Sham Kontrol Grupları: Sham kontrol grubu olup hiç bir cerrahi işlem ve madde uygulaması yapılmamıştır. Gen ekspresyon analizinde kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

SF Kontrol Grupları (I=0.saat; II=6.saat; III=12.saat; IV=24.saat): SF kontrol grubu olup % 70'lik parsiyel hepatektomi öncesi oral olarak gavaj yöntemi ile 15 gün boyunca 100 mg/kg SF (Serum Fizyolojik) verilip 0-6-12-24. saatlerde karaciğer örnekleri alınmıştır.

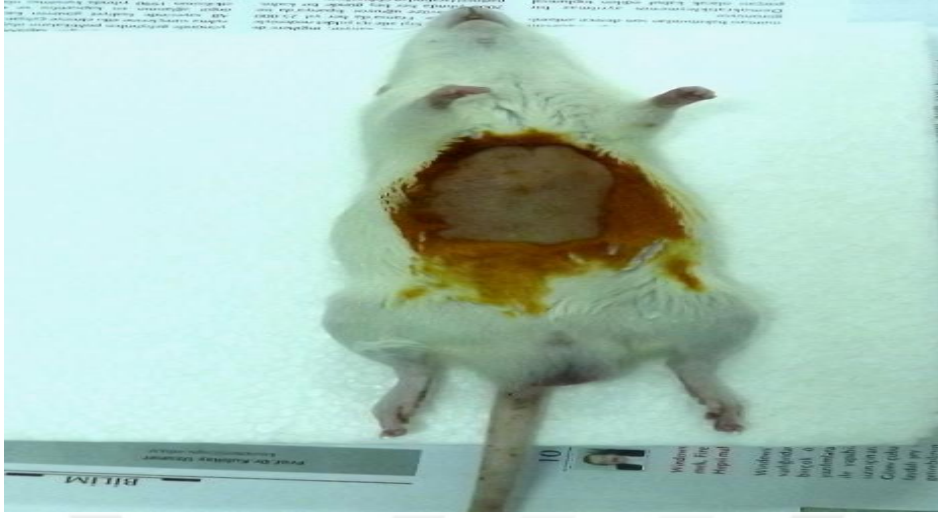
Safran Deney Grupları (V=0.saat; VI=6.saat; VII=12.saat; VIII=24.saat): Deney grubu olup 15 gün boyunca safran maddesi 100 mg/kg oral gavaj yöntemi ile verilmiştir. Diyet sonrası % 70'lik parsiyel hepatektomi uygulaması yapılarak 0-6-12-24. saatlerde karaciğer örnekleri alınmıştır.

3.3. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar:

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diurnal hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkileri dikkate alınarak tüm cerrahi işlemler 09.00 ile 12.00 saatleri arasında yapılmıştır. Deney gruplarına ait hayvanlara intramuskular olarak 10 mg.kg⁻¹ ksilazin ve 70 mg.kg⁻¹ ketamin anestezisi uygulanmıştır.

Parsiyel hepatektomi yapılacak deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edilip rektal ısı kontrolü yapılmıştır. Cerrahi uygulama bölgesinin %70'lik etilalkol ve batikom ile temizliği yapıp Higgins ve Anderson'un (1931) tekniğiyle parsiyel hepatektomi gerçekleştirilmiştir. Buna göre, deney hayvanının karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi ile laparotomi yapılmıştır. Karaciğer loplarnı birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin yaklaşık % 68-70 oranında kütesini teşkil eden öndeki sağ orta ve sol yan loplarnı ayrılmıştır. Bu loplarnı ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanmıştır. Bağıın hemen üstünden kesim gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6).

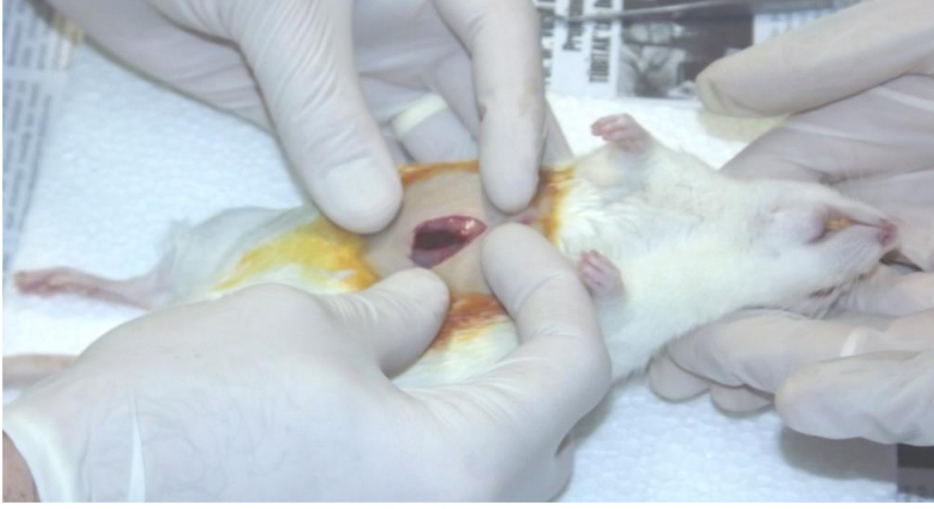
Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verilmiştir. Sonra, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek suture ile dikilerek kapatılmış ve povidoneks antiseptik solusyon ile laparotomi bölgesi temizlenmiştir. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın (0-6-12-24) saat boyunca yaşatılmıştır.



Şekil 3.1 PHx öncesi batın bölgesinin %70'lik alkol ve batikom ile temizlenmesi



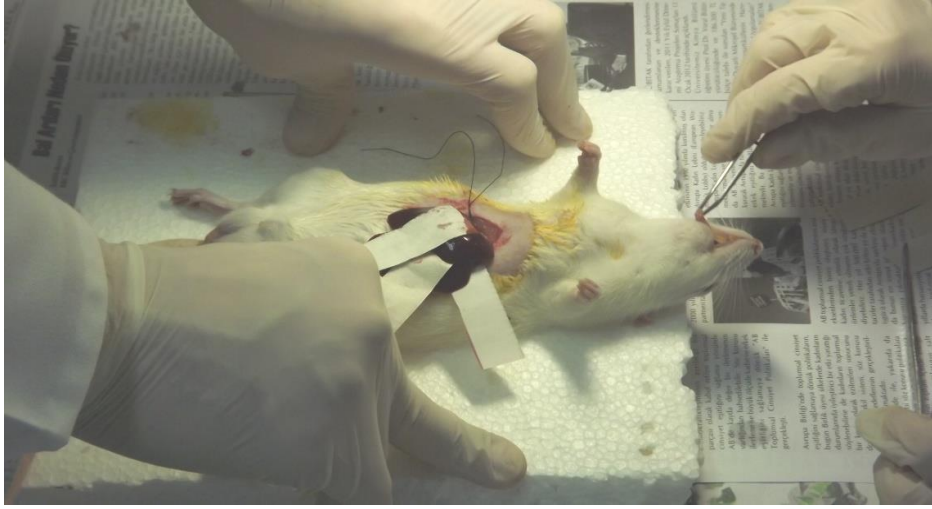
Şekil 3.2 Karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi



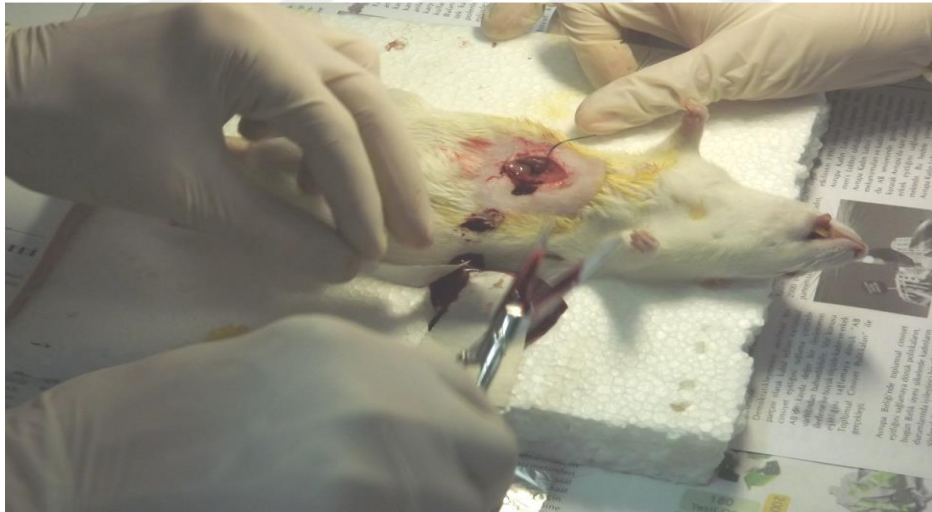
Şekil 3.3 Karaciğer loplarnı birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin sağ orta ve sol yan loplarn ayrılması-1



Şekil 3.4 Karaciğer loplarnı birbirine bağlayan zarlar ayrılarak sağ orta ve sol yan loplarn ayrılması-2



Şekil 3.5 Karaciğer loplarna ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanması



Şekil 3.6 Bağıın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilmesi

3.3.1. Doku örneklerinin alınması ve değerlendirilmesi

Karaciğer rejenerasyon oranlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere tüm hayvanların, ilk laparotominin yapıldığı 0. saatte ve ikinci laparotominin yapılarak hayvanların öldürüldükleri (6-12-24). saatte vücut ağırlıkları tespit edilmiştir. Deney gruplarına ait hayvanlar hafif eter anestezisi altında, intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürülmüşlerdir. Daha sonra da kanın alınmasını takiben laparotomi ile tüm karaciğer hızlı bir şekilde çıkarılıp serum fizyolojik ile yıkanmıştır.

3.3.1.1. Histolojik PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antijen) analizi

%10'luk nötral formaldehit sıvısına alınan ve kimyasal fiksasyonu tamamlanan tüm karaciğer doku örneklerine histolojik takip işlemleri uygulanmış, parafin blokları hazırlanmıştır. Bu bloklardan mikrotom (Leica RM 2025) kullanılarak 4-5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır.

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

- **1L Sodyum Sitrat Tamponu PH 6.0**

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

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

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

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

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

- **Membran Bloklama Ajanı**

5g yağsız süttozu 100mL TBST'de çözülmüştür.

Uygulama basamakları:

1. Mikrotomda 4-5µm kalınlığında kesitler lam üzerine alınmış ve etüvde 60°C'de 45 dk inkübe edilmiştir.
2. Lamlar 3 defa 5'er dk ksilen ile yıkanmıştır.
3. Lamlar %100'lük alkolde 3 defa 3'er dk yıkanmıştır.
4. Lamlar %95'lik alkolde 2 defa 3'er dk yıkanmıştır.
5. Lamlar %80'lik alkolde 2 defa 3'er dk yıkanmıştır.
6. Lamlar distile suda 5dk yıkanmıştır.
7. Lamlar, 10mM sodyum sitrat tamponunda (PH 6.0) 95-100°C'de inkübe edilmiştir.
8. Lamlar aynı tampon içerisinde 20dk oda sıcaklığında soğutulmuştur.
9. TBST'de 1dk yıkama yıkanmıştır.

10. Her bir lama 100µL bloklama solüsyonu eklenip 20-30dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
11. Bloklama solüsyonu döküldü. Her bir lama 100µL 1:500 oranında sulandırılmış primer antibody eklenip 45dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
12. Lamlar TBST ile 4 defa 5'er dk yıkanmıştır.
13. Lam üzerine renk güçlendirici (örn: enzim) 30dk uygulanmıştır.
14. Lamlar TBST ile 4 defa 5'er dk yıkanmıştır.
15. Distile su ile 1dk yıkanmıştır.
16. Lamlar %80'lik alkolde 2 defa 1'er dk yıkanmıştır.
17. Lamlar %95'lik alkolde 2 defa 1'er dk yıkanmıştır.
18. Lamlar %100'lük alkolde 3 defa 1'er dk yıkanmıştır.
19. Lamlar 3 defa 1'er dk ksilen ile yıkanmıştır.
20. Lamlar entellan ile kapatılmıştır.

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

3.3.1.2. Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu

Deney sonunda elde edilen karaciğer doku örnekleri Aurum™ RNA Tissue Kit (Ambion, Cat. No: 732-6830) kullanılarak TRIzol (Ambion, Cat. No: 15596-026) yardımıyla izole edilmiştir. RNA eldesi aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. 50-100mg karaciğer doku örneği 1mL TRIzol ve Next Advance ZrOB05-RNA 0,5mm RNase-free bıyeller kullanılarak Next Advance Bullet Blender Storm 24 homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir.
2. TRIzol içeren lizatlar oda ısısında nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışmasını sağlamak amacıyla 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.

3. Ardından 0,2mL kloroform lizatlar üzerine eklenmiştir ve 15 sn boyunca elde tüpler titreştirilerek çalkalanmıştır.
4. 2-3dk boyunca lizatlar oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
5. Örnekler 12000xg'de 15 dk +4°C'da santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrası karışım zayıf faz, kırmızı fenol klorofom fazı, ara faz ve renksiz RNA içeren üst faza ayrılmıştır. (Üst fazın hacmi ~600µL'dir.)
7. RNA içeren renksiz üst fazdan RNAaz-free tüplere ~400µL aktarılmıştır.
8. Daha sonra tüplere eşit hacimde %70 etanol ilave edilmiştir.
9. Karışım iyice vortekslenmiştir.
10. Etanol ilave edildikten sonra oluşabilecek çökeltileri dağıtmak için tüpler ters yüz edilmiştir.
11. Örneklerden ≤700µL koleksiyon tüpleri içeren Spin kartuşlara aktarılmıştır.
12. 12000xg'de oda sıcaklığında 15sn santrifüj edilmiştir.
13. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atıldı ve aynı koleksiyon tüpü Spin kartuşa takılmıştır.
14. Bütün örnek işlemde geçinceye kadar 12 ve 13. basamaklar tekrar edilmiştir.
15. Spin kartuşların üzerine 700µL Wash Buffer I ilave edilmiştir. Kartuşlar 12000xg'de oda sıcaklığında 15sn santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı ve aynı koleksiyon tüpü atılmıştır. Spin kartuşa yeni koleksiyon tüpü takılmıştır.
16. Kartuşa etanollü Wash Buffer II'den 500µL ilave edilmiştir.
17. 12000xg'de oda sıcaklığında 15sn santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atılmış ve aynı koleksiyon tüpü Spin kartuşa takılmıştır.
18. 16 ve 17. basamaklar tek seferliğine tekrarlanmıştır.
19. 12000xg'de oda sıcaklığında 1dk membran kuruyuncaya kadar santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılmıştır ve Spin kartuş geri kazanım tüpüne yerleştirilmiştir.
20. 30-100µL RNaz-free su Spin kartuşların merkezine ilave edilmiştir.
21. Örnekler oda sıcaklığında 1dk inkübe edilmiştir.
22. Geri kazanım tüpüne yerleştirilen Spin kartuşlar oda sıcaklığında ≥12000xg'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
23. Arındırılmış RNA'lar hemen kullanım için birkaç saat buz üzerinde ya da uzun süreli saklama için -80°C'da saklanmıştır.

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

3.3.1.3. RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi

RT-PCR işleminde gerekli olan cDNA için RNA örnekleri iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, Cat. No: 170-8890) kullanılarak belirtilen protokol çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

1. cDNA için RNA örnekleri konsantrasyonları 2000ng'a eşitlenmiştir. 20µL reaksiyon başına total RNA'nın 2 µg kadarı kullanılabilir.
2. Kit parçalarının buz üzerinde çözülmüştür.
3. Aşağıdaki tabloya göre, gerekli sayıda reaksiyonları hazırlamak için gerekli bileşenlerin hacmi hesaplanmıştır.

• 2X RT Buffer	10µL
• 20X Enzim Karışımı	1µL
• RNA Örneği	9µL'ye kadar
• Nükleaz Free Su	20µL'ye tamamlanmıştır.
• Reaksiyon Başına	Toplam 20 µL
4. RT reaksiyon karışımı plate içine bölünmüştür.
5. Plate'in üzeri optik adheziv film ile kaplanmıştır.
6. Herhangi bir hava kabarcığını ortadan kaldırmak ve içeriğin aşağı inmesini sağlamak için plate kısaca santrifüj edilmiştir.
7. Reverse transkripsiyon reaksiyonunu başlatmak için hazır olana kadar plate buz üzerinde tutulmuştur.
8. 37°C'de 1 saat reaksiyon için inkübe edildi. 5dk 95°C'ye kadar ısıtılarak reaksiyon durduruldu ve 4°C'de tutulmuştur (İnkübasyonun kolaylığı için reaksiyon, bir thermal cyclus içinde gerçekleştirilebilir).

9. Elde edilen cDNA, RT-PCR uygulaması için kullanılmıştır (Elde edilen cDNA, -15°C ile -25°C arasında uzun süreli olarak saklanabilir).

3.3.2. RT-PCR işlemi

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

1. cDNA örnekleri 100ng olacak şekilde nükleaz free su kullanılarak ayarlandı ve 9µL eklenmiştir.
2. iTaq™ Universal SYBR Green Supermix' ten 10µL eklenmiştir.
3. Forward ve Revers Primer'den 1µL eklenmiştir. Plate'in üzeri optik adheziv film ile kaplanmıştır.
 - Kullanılan Primerler:

IGF-1 (BIO_RAD)
IRS-1 (BIO_RAD)
PIK3CA (BIO_RAD)
PDK1 (BIO_RAD)
PTEN (BIO_RAD)
AKT1 (BIO_RAD)
TSC1 (BIO_RAD)
RHEB (BIO_RAD)
MTORC1 (BIO_RAD)
P70S6K1 (BIO_RAD)
4EBP1 (BIO_RAD)
ERK (BIO_RAD)
B-AKTİN (BIO_RAD)

4. RT-PCR işlemi 50°C'de 2dk, 95°C'de 10dk, 95°C'de 15sn, 60°C'de 1dk gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR işlemi ABI-StepOne Plus cihazında gerçekleştirilmiştir. Kontrol gen olarak B-aktin kullanılmıştır. Gen bölgelerinin mRNA düzeyindeki artışı B-aktin'e göre hesaplanmıştır.

3.3.3. Western Blott analizi :

Membrana transfer edilen proteinlerin uygun antikorlarla inkübe edilerek immunolojik yoldan belirlenmesine Western blotting ya da kısaca immunoblotting denir.

PI3K/Akt/mTOR yolağında araştırılacak olan protein antiodileri: Phospho-Akt (Thr308), Phospho-mTOR (Ser2481).

3.3.3.1. Protein izolasyonu

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

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

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

SDS PAGE ve Blotlama Tamponları

- 2X Elektroforez tamponu

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

- 1M Tris-HCl PH 8.8

12,114 g Tris-HCl tartılmıştır ve 60mL distile suda çözüldükten sonra PH 8.8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

- 1M Tris-HCl PH 6,8

12,114 g Tris-HCl tartılmıştır ve 60 mL distile suda çözüldükten sonra PH 6.8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

- 6X Sample Buffer

%60 Gliserol, 300 mM Tris-HCl PH 6.8, 12mM EDTA, %12 SDS, 864 mM β -Merkaptoetanol ve %0,05 bromfenol blue içermektedir.

- 10 mL için; 6 mL Gliserol

3mL 1M Tris-HCl PH 6,8

0,035 g EDTA

1,2 g SDS

600 μ L β -Merkaptoetanol

0,005 g Bromfenol blue kullanılmıştır.

%40'luk Akrilamid/Bisakrilamid (19,48g akrilamid, 0,52g bisakrilamid 50mL suda çözülmüştür).

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

%10'luk SDS (4g SDS tartılarak 40mL distile suda çözülmüştür).

Transfer Solüsyonu (PH 8.3) 25 mM Tris-Base, 192 mM Glisin, %7 Metanol ve %0,07 SDS içerir. 28,826 g Glisin, 6,057 g Tris-Base, 1,4 g SDS tartıldı. 140mL Metanol kullanılmış ve son hacim 2L'ye distile su ile tamamlanmıştır.

- 1M Tris-HCl PH 7.6

12,114 g Tris-HCl tartılmıştır ve 60mL distile suda çözüldükten sonra PH 7.6'ya ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

- Tris-buffer saline (TBS) PH 7.6

Sodyum klorid	8 g
1M Tris HCl PH 7.6	20mL

 Distile su ile 1000mL'ye tamamlanmıştır.
- Diluent ve yıkama tamponu TBS Tween (TBS-T)

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

5g yağsız süttozu 100 mL TBST'de çözülmüştür.

SDS PAGE

Örnekler 90°C'nin üzerinde olan bir sıcaklıkta 5dk denatüre edilmiştir. Denatürasyon sonrası örnekler 10sn 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra örnekler -20°C'de saklanmıştır.

Ayrıştırma Jeli (%12'lik Jel)

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

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

Yığma Jeli

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

Yığıma jeli de donduktan sonra örnekler kuyucuklara yüklenmiştir. Proteinleri ağırlık markerı olarak Sigma M4038 marker kullanılmıştır. Jel, 100V'da yaklaşık 2 saat 10dk yürütme yapılmıştır. Boyanın jelden çıkmamasına dikkat edilmiştir.

Membrana Aktarma

- Yürütme işleminden sonra jel, blotlama için 15dk transfer solüsyonunda tutulmuştur.
- 1 adet membran 8x9cm, 2 adet filtre kağıdı 11x9cm ebatlarında kesilmiştir.
- Membran 2dk distile su ile aktive edilmiştir.
- Membran ve filtre kağıtları transfer solüsyonuna alınıp western kaseti hazırlanmıştır.
- Transfer için membran 70V'da 3 saat yürütülmüştür.
- Blotlama işlemi, Novex® Chemiluminescent Substrates (WP20005) kiti kullanılarak aşağıda belirtilen prosedüre göre gerçekleştirilmiştir:
 1. Transfer sonrası, herhangi bir jel parçasını kaldırmak ve solüsyon içeriklerini gidermek için iki kez 5dk su ile membran yıkanmıştır.
 2. 10-60dk oda sıcaklığında bloklama solüsyonu içerisinde çalkalanarak (1 dönüş/sn) ya da arzuya göre, çalkalama yapmadan 4°C'de bir gece bekletilmiştir. Bloklama solüsyonu dikkatlice boşaltılmıştır.
 3. Sulandırılmış primer antikor solüsyonu eklenmiştir. 30-60dk çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. Solüsyon dikkatlice boşaltılmıştır. Primer antikorlar 1:500 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

Kullanılan primer antikorlar:

- PHxosPHxo-Akt (Thr308)- Cell Signaling
 - PHxosPHxo-mTOR (Ser2481) - Cell Signaling
4. Yıkama solüsyonu membranı aşacak hacimde eklenip 1dk çalkalanarak yıkanmıştır. Solüsyon dikkatlice boşaltılmıştır.
 5. Yıkama solüsyonu eklenip çalkalanarak 5dk yıkanmıştır. Solüsyon dikkatlice dökülmüştür. Bu adım 3 kez tekrarlanmıştır.
 6. Sulandırılmış sekonder antikor solüsyonu eklenmiştir. 30dk inkübe edilmiştir. Solüsyon dikkatlice boşaltılmıştır. Sekonder antikor (Cell Signaling) 1:10000 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

Kullanılan sekonder antikor aşağıda verilmiştir:

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

3.4. İstatistik

Karaciğer dokularından izole edilen mRNA' ların IGF-1, IRS-1, PIK3CA, PDK1, PTEN, AKT1, TSC1, RHEB, MTORC1, P70S6K1, 4EBP1, ERK transkripsiyon seviyelerinin gruplar arasındaki farklılık durumları, karaciğer doku kesitlerinin incelenmesinden elde edilen PCNA indeks sonuçları, IBM SPSS Statistics 20.0 paket programındaki tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda ise Tukey ve LSD Testi kullanılmıştır.

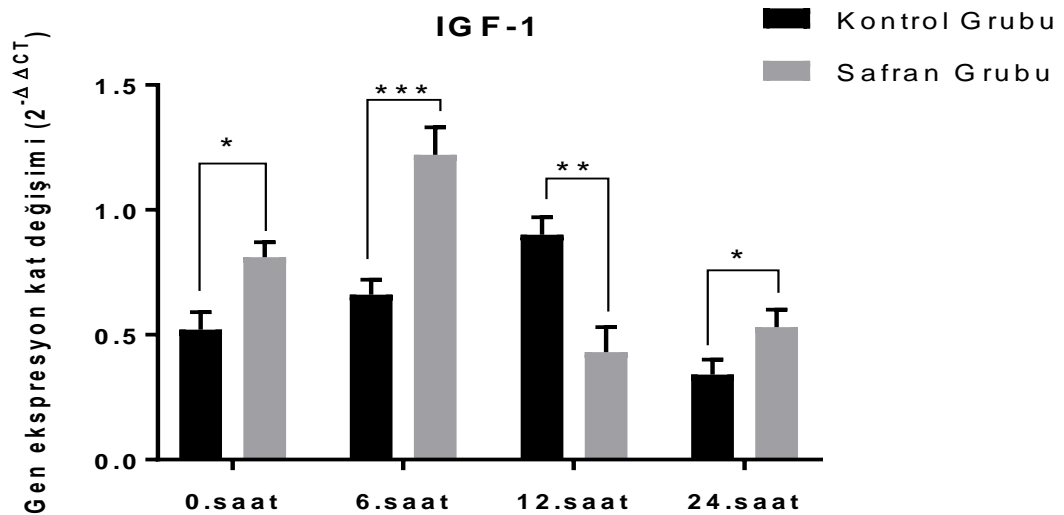
Tüm istatistik uygulamalar sonucunda ortaya çıkan sayısal değer $P < 0.05$ olduğunda deney grupları arasındaki farklar anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Karaciğer dokularından izole edilen PI3K/Akt/mTOR yolağına ait gen ve protein seviyelerinin gruplar arasındaki farklılık durumları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

PHx' den sonra IGF-1; ilk 12 saatte aktivasyona uğrayan 70'den fazla genden biridir. Hepatositlerin G0 fazından çıkmasında, aşağı sinyal yolağını aktif ederek DNA sentezinin başlamasında etkin bir rol oynar (Haber vd., 1993).

Çalışmamızda; IGF-1 gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII'den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. SF Gruplarında gen ifadesi I,II ve III nolu gruplarda artış gösterirken IV. Grupta düşüş görülmüştür. Safran verilen gruplarda V, VI ve VIII nolu gruplarda önemli ölçüde artış tespit edilmiştir. Grup II' nin Grup VI'dan ($p<0.01$), Grup III' ün Grup IV'den ($p<0.01$) ve Grup III'ün Grup VII'den ($p<0.01$) anlamlı derecede farklılık gösterdiği görülmüştür. Grup I' in Grup VI'dan ($p<0.001$), Grup IV'ün Grup VI'dan ($p<0.001$), Grup VI'nın Grup VII ($p<0.001$) ve Grup VIII ($p<0.001$)'den ileri derecede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

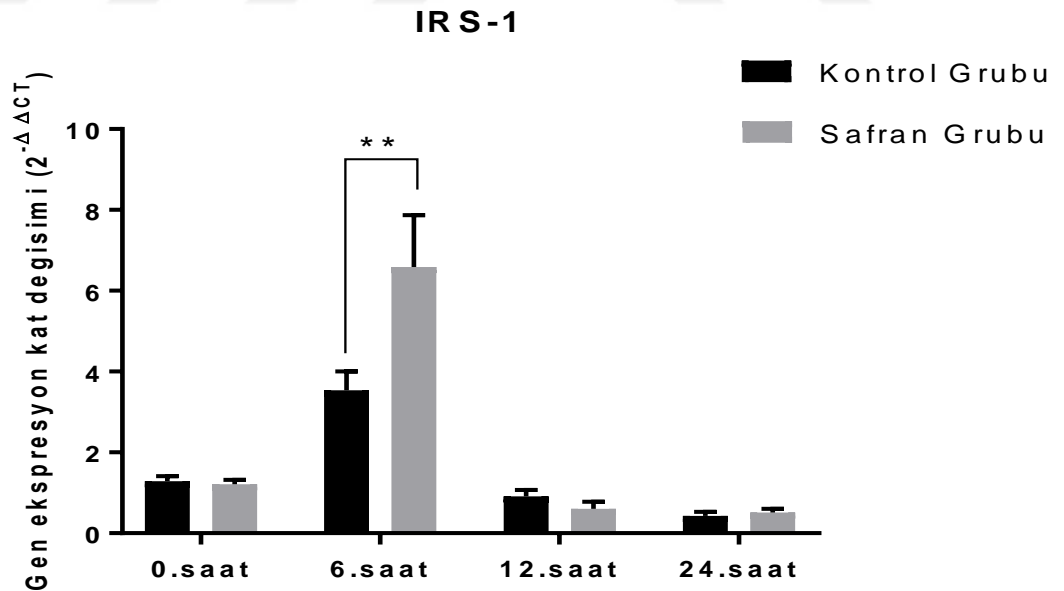


Şekil 4.1 Gruplara ait IGF-1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ ve ***: $P<0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.

İnsülin reseptör substratı (IRS), IRS-1 ve IRS-2 ailelerini içerir. İnsülin ve IGF'nin reseptör sinyalinin koordine ederek büyüme ve metabolizmayı düzenler. Hepatositlerde IRS; PI3K-AKT kaskadında önemli bir düzenleyicidir. Hücre temelli çalışmalar hepatositlerde IRS' nin insülin aracılığı ile hem büyümeyi hem de metabolizmayı düzenlediği görülmüştür.

IRS-1 gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII'den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. SF Grupları olan I. ve II. Gruplarda zamana bağlı artış görülürken III. ve IV. Gruplarda zamana bağlı azalma tespit edilmiştir. Safran Gruplarında ise VI. Grup önemli derecede artış gösterirken VII. ve VIII. Gruplarda zamana bağlı olarak düşüş görülmüştür. Grup VI' nın Grup I,III,IV,V,VI,VII ve VIII ($p<0.001$) ile ileri derecede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca; Grup II'nin, Grup IV ve Grup VIII ($p<0.01$) ile aralarında anlamlı derecede fark tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

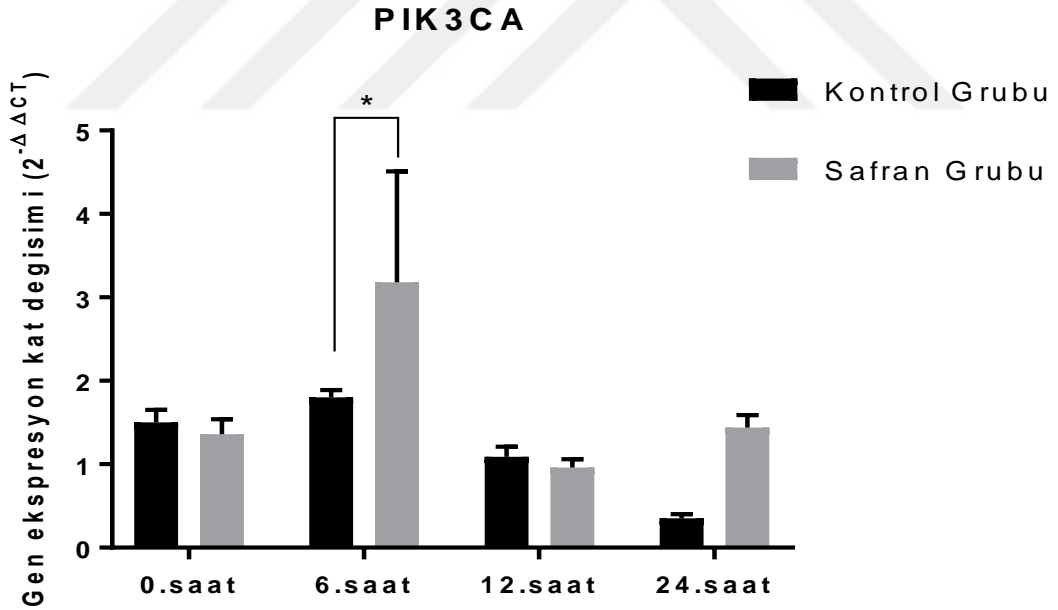


Şekil 4.2 Gruplara ait IRS-1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ ve ***: $P<0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.

PI3K büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından uyarılan, sinyali aşağı sinyal yolaklarına ileten, rejenerasyon için önemli bir proteindir. Bu nedenle rejenerasyonun ilk başlangıç fazında aktive olurlar. PI3K (Wortmanin)'in injeksiyonu ile bloke edilen PI3K, PHX sonrası 48 ve 72. Saatler arasında kontrol grupları ile karşılaştırıldığında fare karaciğerlerinde hacim ve kütleli olarak azalma görülmüştür. Karaciğer normal boyutuna 7 gün sonra ulaşmıştır (Jackson vd., 2008).

PI3KCA gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII'den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. SF Grubu olan III. ve IV. Gruplarda zamana bağlı olarak düşüş görülmüştür. Safran Grubu olan VI. Grupta önemli ölçüde ifadenin arttığı tespit edilmiştir. Grup VI, Grup I, III, V, VII, VIII' den ($p < 0.05$) ve Grup IV' den ($p < 0.01$) anlamlı derecede farklılık göstermiştir (Şekil 4.3).

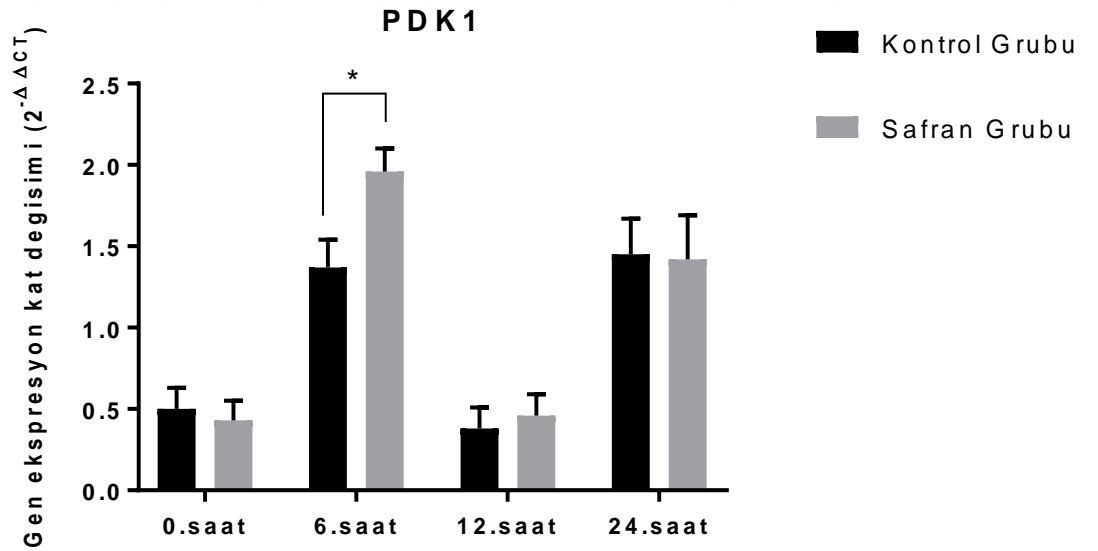


Şekil 4.3 Gruplara ait PIK3CA gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama \pm Standart sapma)

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ ve ***: $P < 0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.

PDK1; PI3K sinyal iletiminin AKT'a iletilmesinde rol alır. PDK1 yoksun karaciğerde, bir serin treonin kinaz PI3K'nın alt birimi olan transmembran protein PIP3'e bağlanarak AKT'ın hayatta kalım ve ölüm fonksiyonlarından, ölüm fonksiyonunun aktivitesine neden olarak hücrelerin apoptoza gitmesine sebep olmuştur. Bu deney sonucunda fareler ölmüştür. Fakat; %30'luk PHx sonrası PDK1 yoksun ve normal kontrol grubundan kayıp olmamakla birlikte mitotik olarak da önemli bir fark gözlenmemiştir (Haga ver ark., 2009).

PDK1 gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII' den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. SF ve Safran Gruplarına bakıldığında (II-VI, IV-VIII) gen ifadesinin 6. ve 24. saatlerde arttığı tespit edilmiştir. Grup VI'nın Grup I, III, V ve VII'den ($p<0.001$) ileri derecede anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Grup III' ün Grup IV'den ($p<0.01$) ayrıca; Grup VII'nin Grup II, IV ve VIII ($p<0.05$) ve Grup VIII'in Grup I, III ve V ($p<0.05$)'den anlamlı derece farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

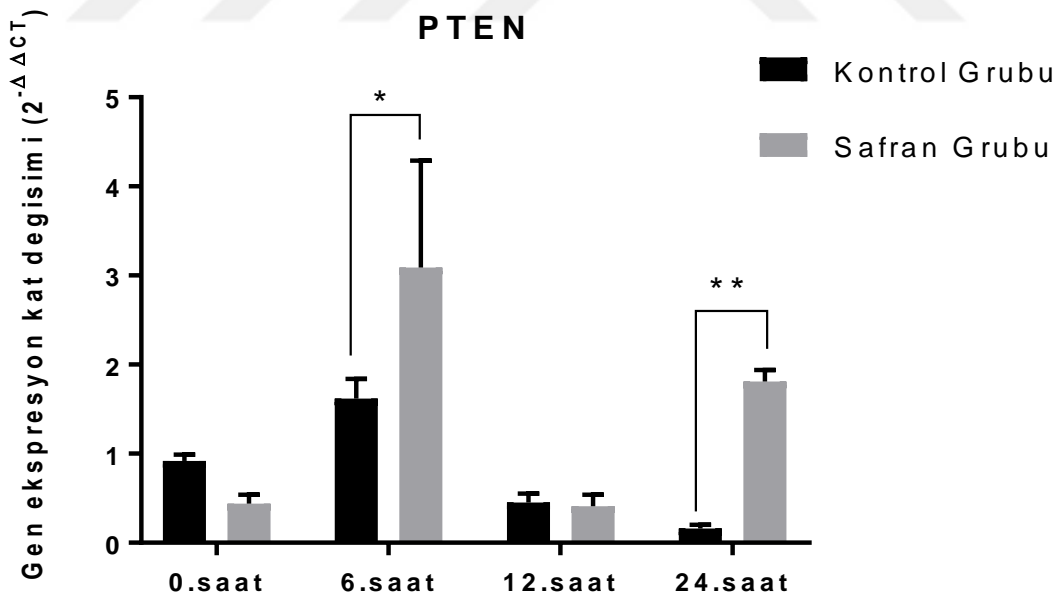


Şekil 4.4 Gruplara ait PDK1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ ve ***: $P<0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.

IGF-1 sinyalinin PI3K/AKT sinyal kaskadı üzerinde önemli bir değer etken PTEN aktivasyonudur. PTEN; 1997 yılında birbirinden bağımsız 3 laboratuvar tarafından tümör süpressör olarak adlandırılmıştır. PTEN' in PI3K/AKT yolağını negatif yönde düzenlediği tespit edilmiştir (Maehama ve Dixon, 1998). PTEN inhibe edilmiş yüksek-yağlı diyet ile obez yapılan farelerde; hücre büyümesinin ve kas yenilenmesinin arttığı gözlenmiştir (Hu vd., 2010). Birçok kanser türünde PTEN mutasyonu nedeni ile oluşan aşırı PI3K/AKT aktivasyonunun oluştuğu gözlenmiştir (Liaw vd., 1997; Nelen vd., 1997).

PTEN gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII' den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. PTEN ifadesinin SF Grubu olan II. Grupta, Safran Grubu olan VI ve VII. Gruplarda artış gösterdiği tespit edilmiştir. Grup VI'nın Grup I, II ve III ile ($p<0.05$) ve IV, V, VII ($p<0.01$) ile anlamlı derecede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca; Grup II ve Grup IV ($p<0.05$), Grup IV ve Grup VIII ($p<0.05$), Grup VIII ve Grup III, V, VII ($p<0.05$) ile anlamlı derece farklılık tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

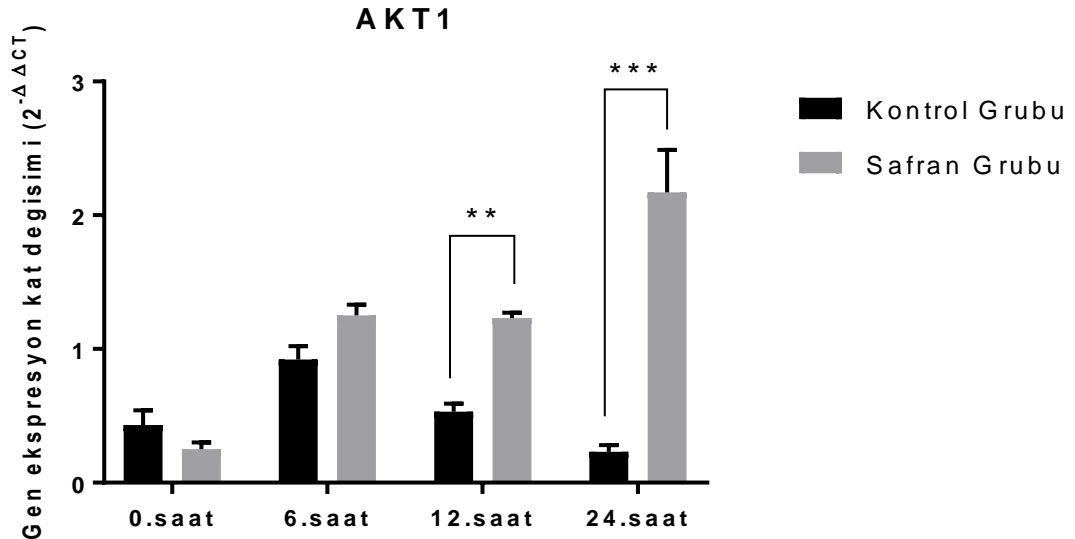


Şekil 4.5 Gruplara ait PTEN gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ ve ***: $P<0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.

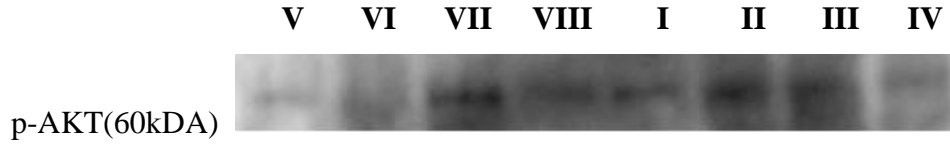
Haga vd. (2009)'lerinin PDK1 gen ifadesi susturulmuş fareler üzerinde yapılan karaciğer rejenerasyonu çalışmasında hepatositlerin proliferasyon olamadıkları gözlenmiştir. PDK1'in aşağı sinyal yolağında AKT aktivasyonunda önemli bir etken olduğu tespit edilmiştir. PDK1'in aktive olmaması AKT aktivasyonu ve aşağı sinyal yolağında bulunan AKT'in uyarımı ile aktivasyonu sağlanan mTOR ve P70S6K1 aktivasyonlarında da önemli ölçüde düşüş tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile PDK1-AKT-mTOR ve P70S6K1 arasındaki aşağı sinyal yolağı bağlantısı belirlenmiştir. AKT'in aktivasyonu proliferasyon için önemli bir merkezi noktadır.

AKT1 gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII'den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. Grup VIII'in Grup I, II, III, IV, V ($p < 0.001$)'den ileri derecede anlamlı fark gösterdiği ve Grup VI, VII ($p < 0.01$)'den de anlamlı derecede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca; Grup IV'ün Grup VI ve Grup VII ($p < 0.001$)'den, Grup V'in Grup VI ve Grup VII ($p < 0.001$)'den ileri derecede anlamlı farklı olduğu tespit edilmiştir. Gen ifadesi protein sonuçları ile de desteklenmiş olup VII ve VIII nolu gruplarda aktif AKT proteininin artmış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7).



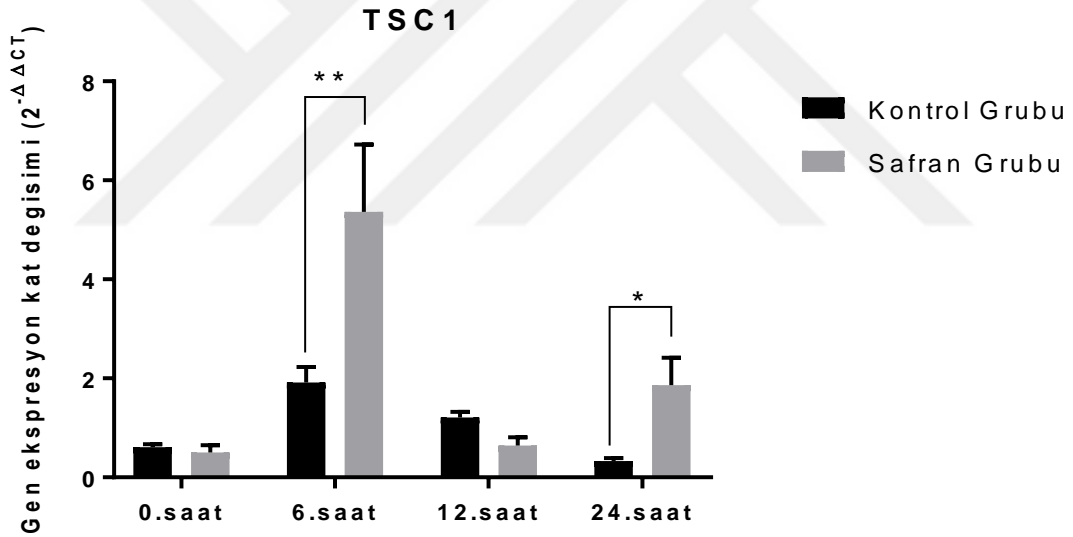
Şekil 4.6 Gruplara ait AKT1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ ve ***: $P < 0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.



Şekil 4.7 Gruplara ait fosfo-Akt protein aktivasyonu.

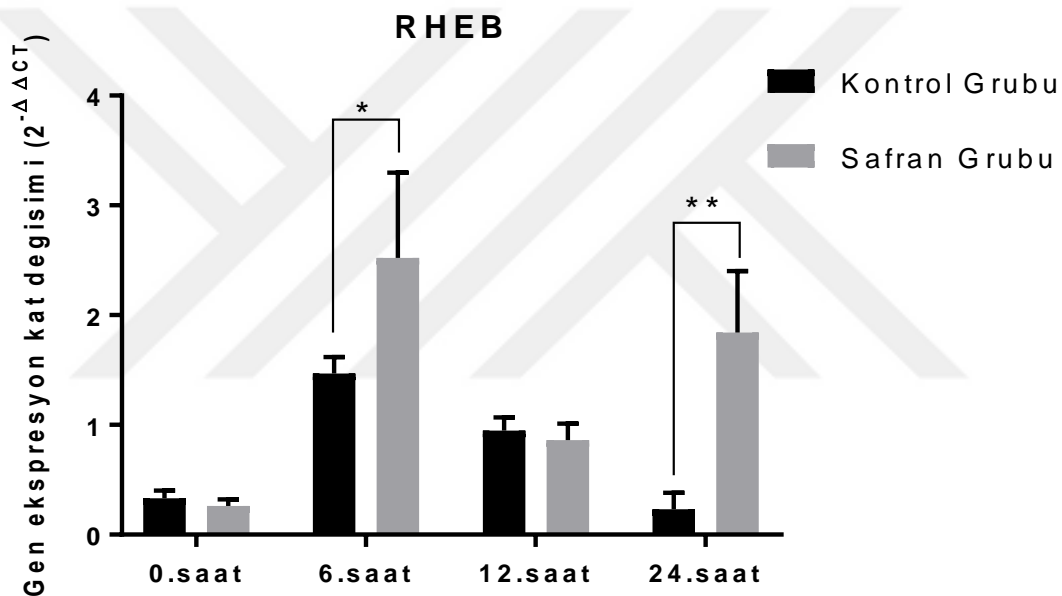
TSC1 gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII'den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. TSC1 gen ifadesinin VI. Grupta önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Grup VI, Grup I, III, IV, V, VI, VII ($p < 0.001$)'den ileri derece anlamlı farklılık göstermiştir. Ayrıca Grup VI., Grup II ve VIII ($p < 0.01$)'den anlamlı derecede farklılık göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Gruplara ait TSC1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama \pm Standart sapma)

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ ve ***: $P < 0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.

RHEB gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII'den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. SF Grubundaki gen ifadesi incelendiğinde II. Grupta bir artış olup daha sonra gen ifadesinin azaldığı görülmüştür. Safran grubunda ise SF grubuna göre VI. grupta ve VIII. grupta önemli ölçüde artış tespit edilmiştir. Grup I; Grup II, VIII ($p<0.05$) ve Grup VI ($p<0.01$) ile, Grup II; Grup IV, V ve VI ($p<0.05$) ile, Grup III; Grup VI ($p<0.05$) ile, Grup IV; Grup VI ($p<0.01$) ve Grup VIII ($p<0.05$) ile, Grup V; Grup VI ($p<0.01$) ve Grup VIII ($p<0.05$) ile; Grup VI; Grup VII ($p<0.05$) ile anlamlı derecede farklılık göstermiştir (Şekil 4.9).

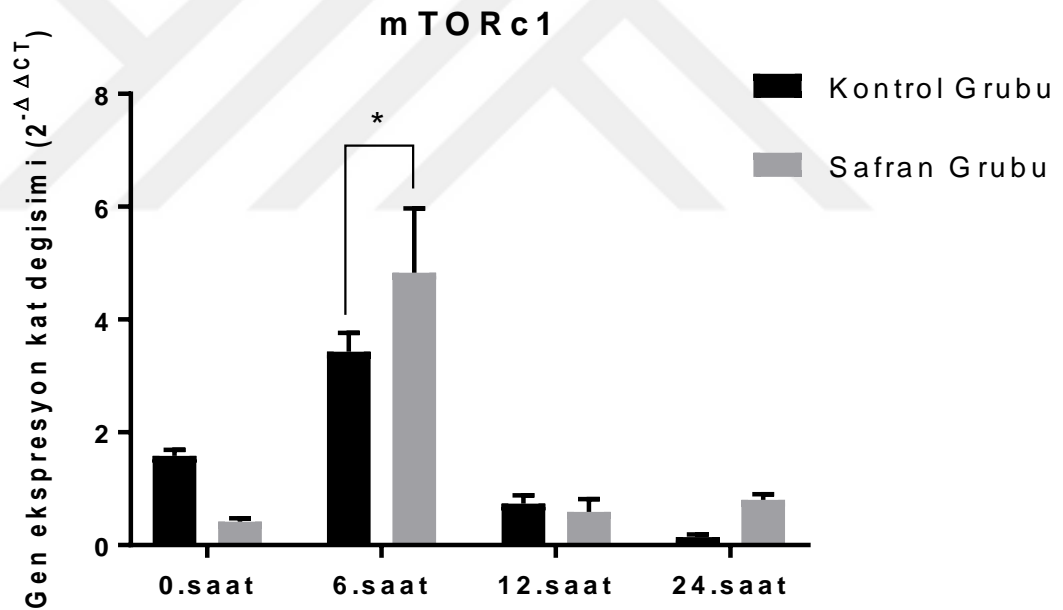


Şekil 4.9 Gruplara ait RHEB gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ ve ***: $P<0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.

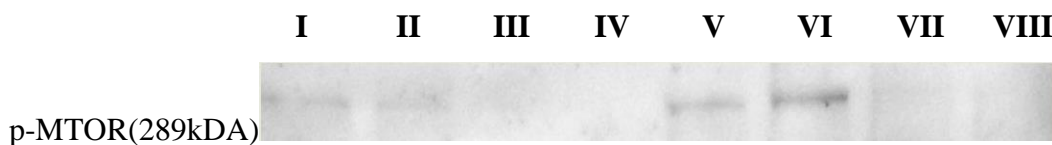
Suami MG Fouraschen vd. (2013)'nin rapamisin ile mTOR inhibasyonu yaptıkları karaciğer rejenerasyonu çalışmasında; mTOR inhibasyonu sonucu karaciğer rejenerasyonunun azaldığı ve parsiyal hepatektomiden sonra otofajinin arttığı tespit edilmiştir. Otofajinin artmasında IL-6 ve HGF sinyal yolağının etkisinin olduğu görülmüştür. Bu çalışma mTOR aktivasyonunun hepatik hücre proliferasyonunda önemli bir etken olduğunu göstermiştir.

MTORC1 gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII' den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. MTORC1 gen ifadesi SF Gruplarında I. ve II. Gruplarda artış gösterirken III. ve IV. Gruplarda zamana bağlı olarak önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. Safran Gruplarında ise; VI. grupta zamana bağlı olarak önemli ölçüde artış görülmüştür. Grup I; Grup II, IV ($p<0.05$) ve VI ($p<0.01$) ile, Grup II; Grup III, VI, VIII ($p<0.01$) ve Grup IV, V ($p<0.001$) ile, Grup III, Grup VI ($p<0.001$) ile, Grup IV; Grup VI ($p<0.001$) ile, Grup V; Grup VI ($p<0.001$) ile, Grup VI; Grup VII ve VIII ile anlamlı ve ileri derecede anlamlı farklılıklar göstermiştir. Ayrıca western blott çalışması ile MTORC1 gen ifadesindeki artış aktif MTORC1 proteininin sonuçları ile de desteklenmektedir. Protein analizine göre Safran Grupları olan V. ve VI. gruplarda protein ifadesinde önemli ölçüde artış gözlenmektedir (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



Şekil 4.10 Gruplara ait MTORC1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)

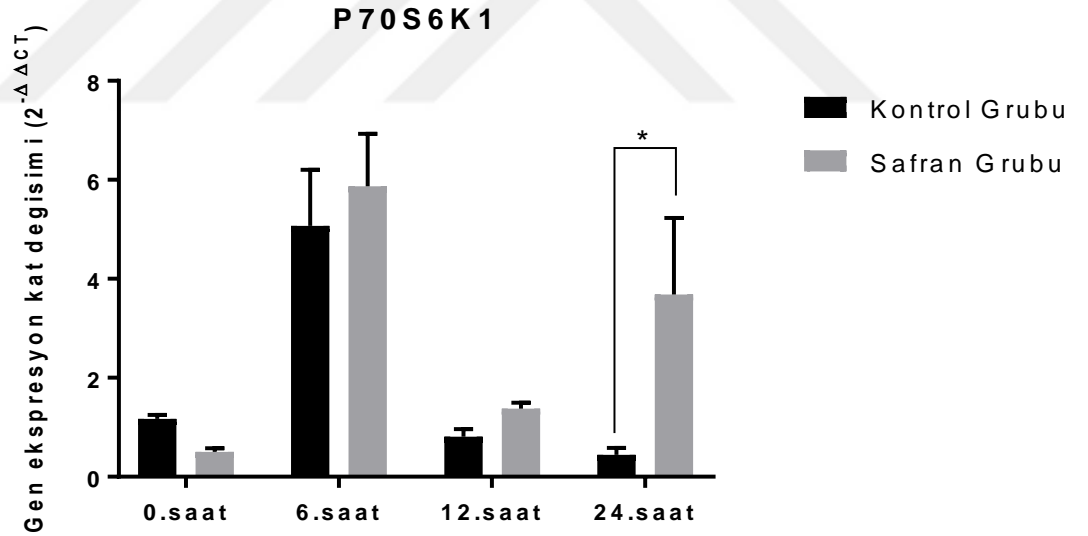
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ ve ***: $P<0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.



Şekil 4.11 Gruplara bağlı olarak fosfo-mTOR protein aktivasyonu.

Espeilac C. vd. (2011)' larının yaptıkları bir çalışmada P70S6K1/K2 gen bölgesi susturulmuş transgenik farelerde parsiyal hepatektomi sonrası 72. saatte proliferasyonda önemli ölçüde düşüş gözlenmiştir. Çalışma P70 aktivasyonunun rejenerasyon sürecinde önemli bir etken olduğunu göstermiştir.

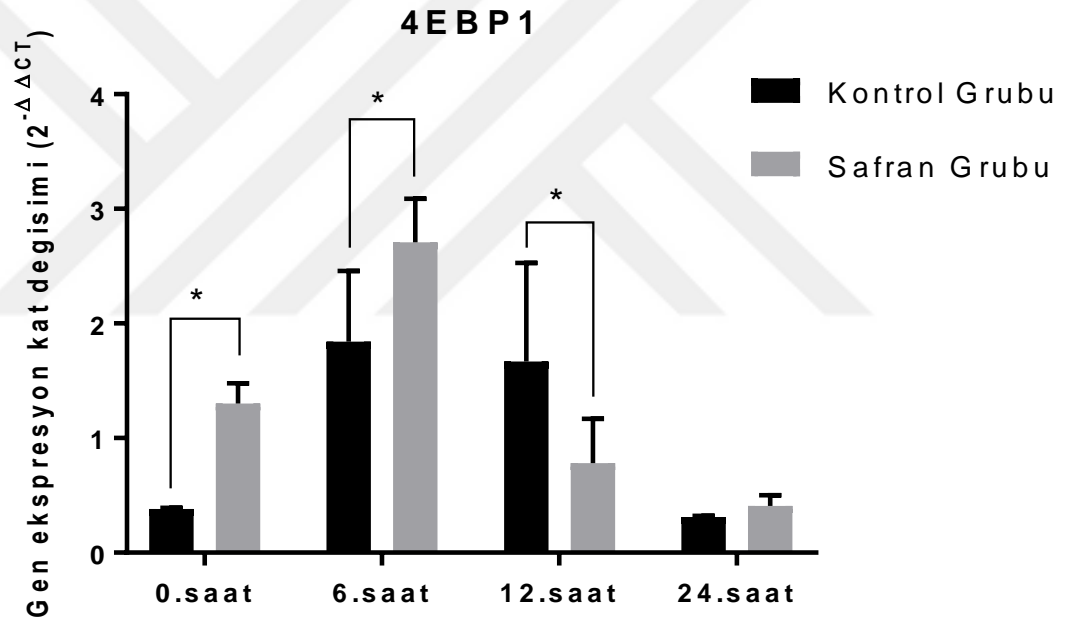
P70S6K1 gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII' den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. P70S6K1 gen ifadesi SF Grubu olan II. Grupta önemli ölçüde artış gösterirken III ve IV gruplarda ifadesi önemli ölçüde azalmıştır. Safran Grubu olan VI. ve VIII. gruplarda önemli ölçüde artış tespit edilmiştir. Grup I; Grup II, IV ($p<0.05$) ve VI ($p<0.01$) ile, Grup II; Grup I, III, IV, V, VII ($p<0.05$) ile, Grup III; Grup VIII ($p<0.05$) ve Grup VI ($p<0.01$) ile, Grup IV; Grup VIII ($p<0.05$) ve Grup VI ($p<0.001$) ile, Grup V; Grup VIII ($p<0.05$) ve Grup VI ($p<0.001$) ile, Grup VI; Grup VII ($p<0.01$) ile anlamlı ve ileri derecede anlamlı farklılıklar göstermiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Gruplara ait P70S6K1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama ± Standart sapma)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ ve ***: $P<0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.

4EBP1 gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII' den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. 4EBP1 gen ifadesi SF gruplarında II. ve III. Gruplarda önemli ölçüde artış gösterirken zamana bağlı olarak IV. Grupta ifadede azalma görülmüştür. Safran grubunda ise; Grup V, VI ve VII de anlamlı derecede artış gözlenmektedir. Zamana bağlı olarak VIII. grupta gen ifadesi azalmıştır. Grup I; Grup II, III ($p<0.05$) ve VI ($p<0.001$) ile, Grup II; Grup IV, VI ve VIII ($p<0.05$) ile, Grup IV; Grup V ($p<0.05$) ve VI ($p<0.001$) ile, Grup V; Grup VI ve VIII ($p<0.05$) ile, Grup VI; Grup VII ($p<0.01$) ve Grup VIII ($p<0.001$) ile anlamlı ve ileri derecede anlamlı farklılıklar göstermiştir (Şekil 4.13).

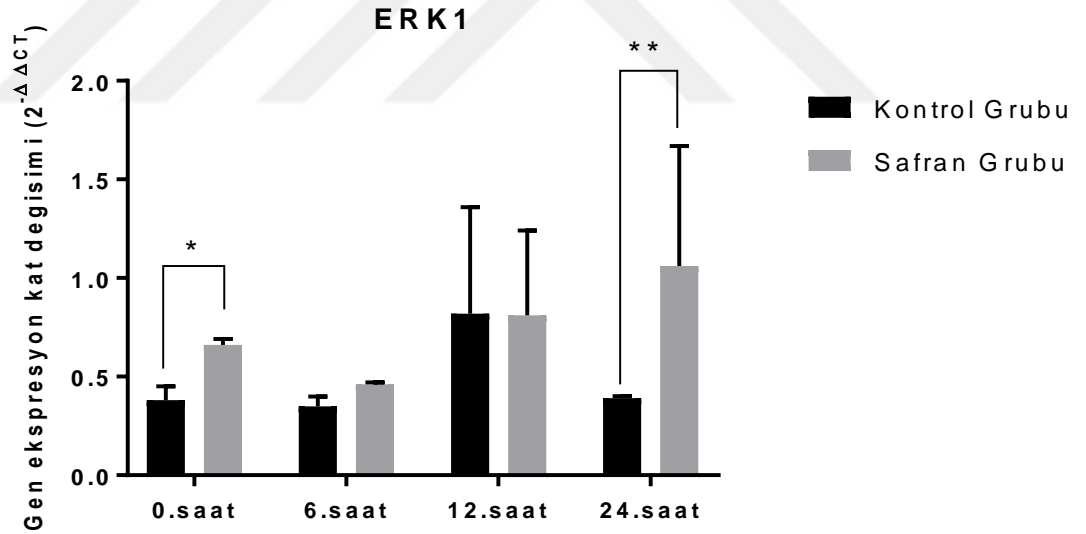


Şekil 4.13 Gruplara ait 4EBP1 gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama \pm Standart sapma)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ ve ***: $P<0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.

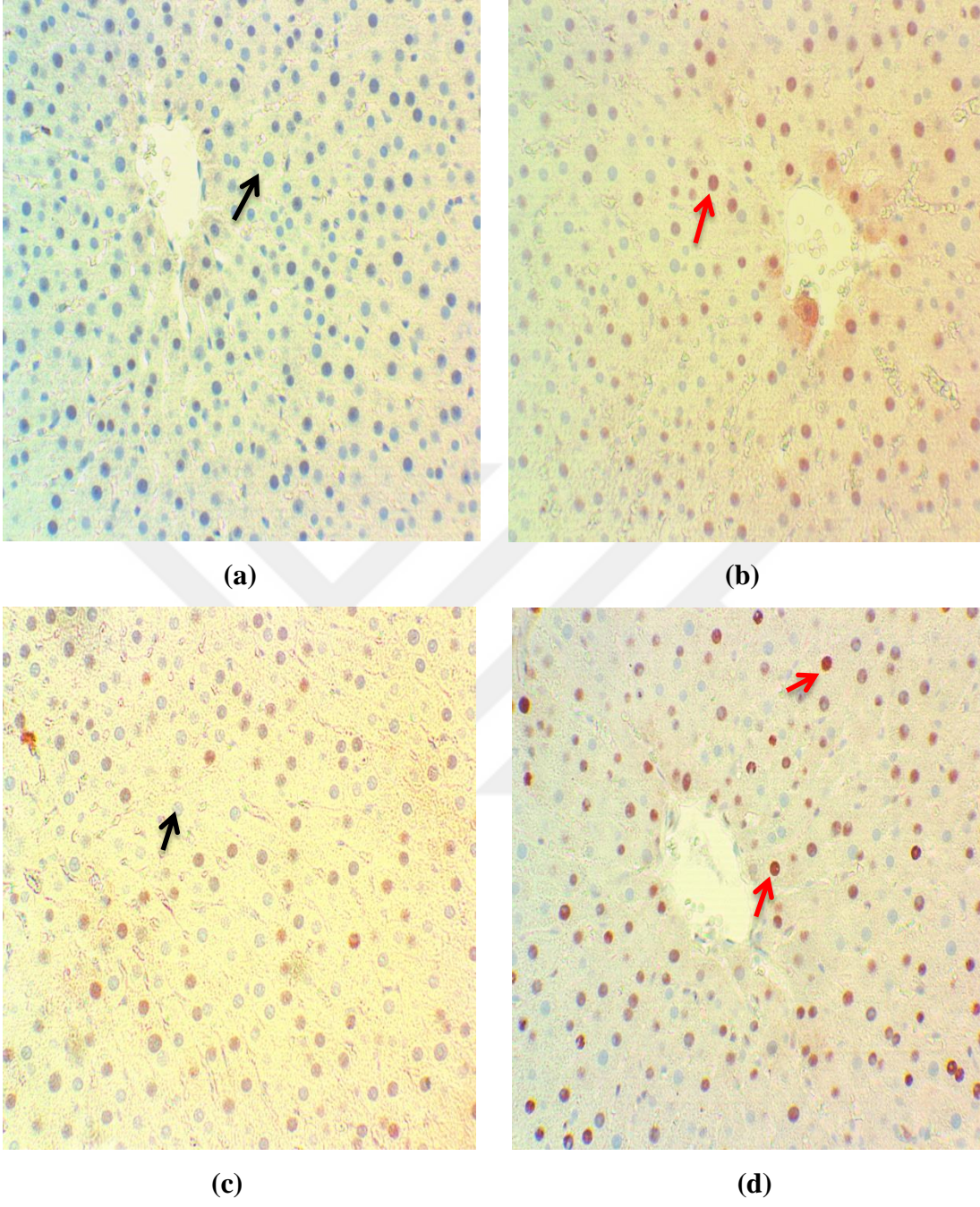
ERK1 (p44 MAPK) ve ERK 2 (p42 MAPK), hücre döngüsü proteinlerinin (p21, siklin D1, Cdk1) uyarılmasını sağlayan Elk-1, Ets-1, c-Fos, c-Jun, c-Myc, p53 gibi transkripsiyon faktörlerini içeren birçok moleküllü fosforlar. G1 den S fazına geçiş ve G2 den M fazına geçişte önemli role sahiplerdir. (Zhang ve Liu, 2002; Guégan vd., 2012).

ERK1 gen ifadesi Grup I, II, III ve IV'den oluşan SF Gruplarında ve Grup V, VI, VII ve VIII'den oluşan Safran gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı derecede farklılıklar göstermiştir. ERK1 gen ifadesinin Safran Grubu olan VIII. grupta önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Grup I; Grup III, VI ($p<0.05$) ve Grup VIII ($p<0.01$) ile, Grup II; Grup III, V, VII ($p<0.05$) ve Grup VIII ($p<0.001$) ile, Grup III; IV ve VI ($p<0.05$) ile, Grup IV; Grup VII ($p<0.05$) ve Grup VIII ($p<0.01$) ile, Grup V; Grup VIII ($p<0.05$) ile, Grup VI; Grup VII ($p<0.05$) ve Grup VIII ($p<0.01$) ile anlamlı ve ileri derecede anlamlı fark gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

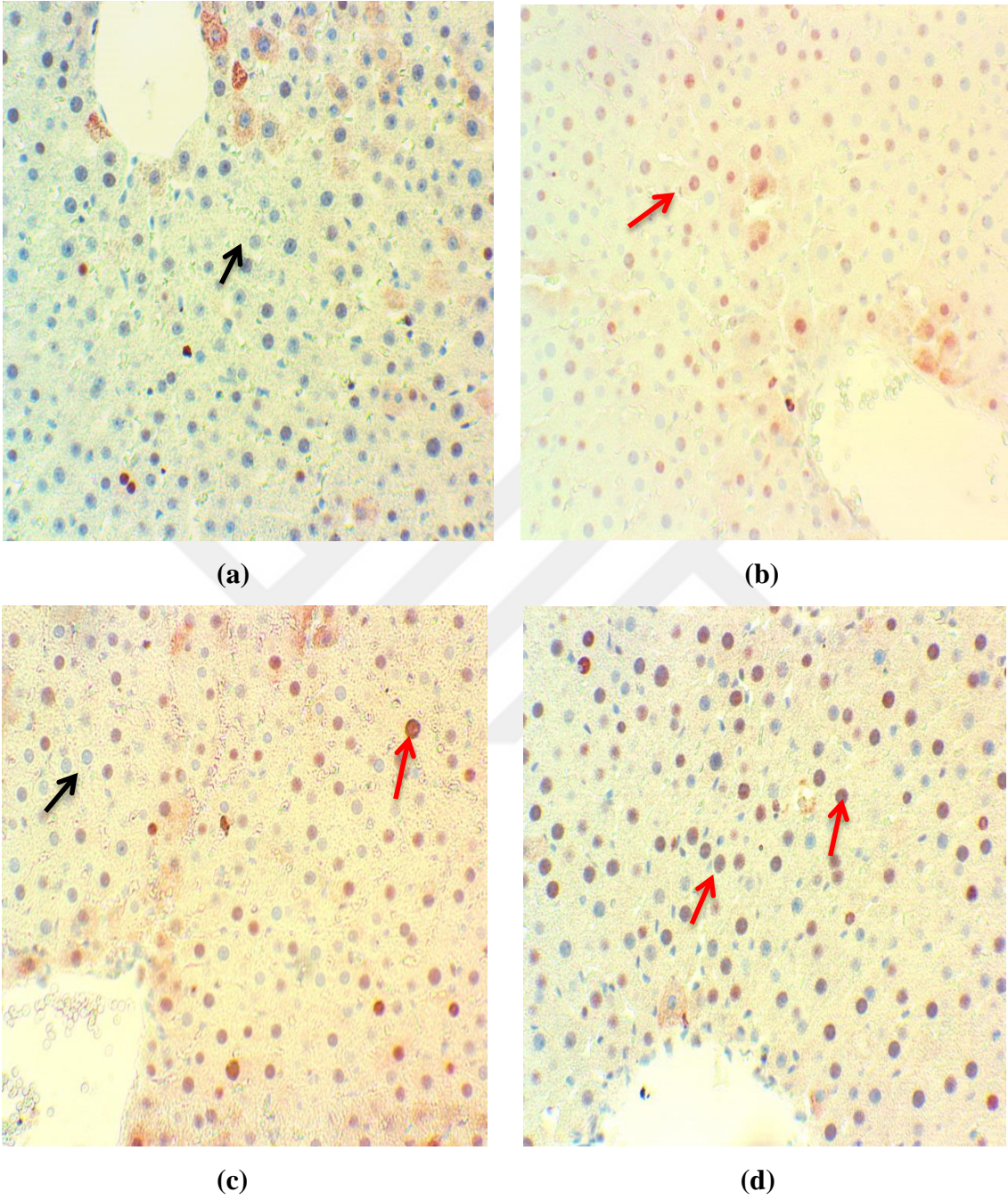


Şekil 4.14 Gruplara ait ERK gen ekspresyon seviyeleri. (Ortalama \pm Standart sapma)

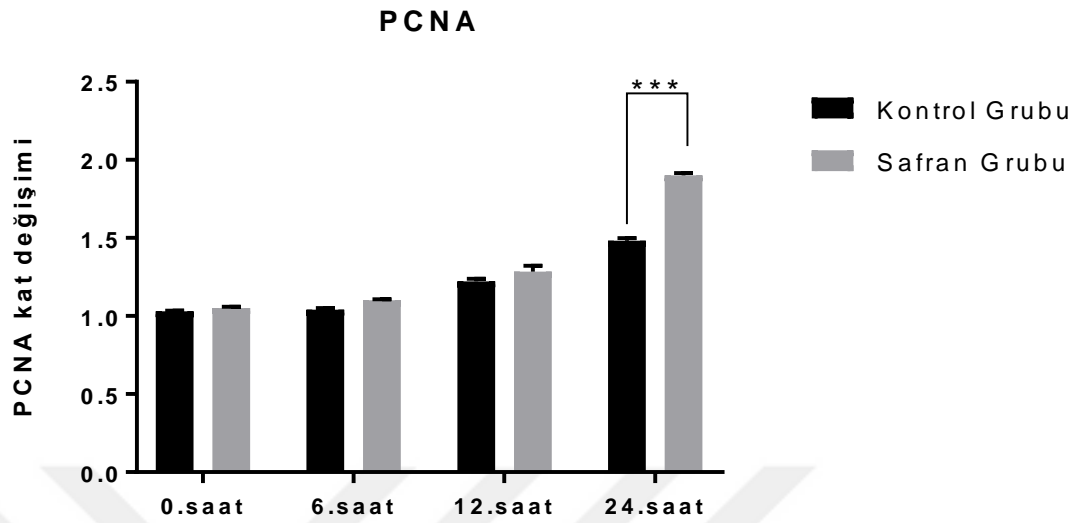
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ ve ***: $P<0.001$ SF'e göre anlamlı fark vardır.



Şekil 4.15 SF gruplarına ait karaciğer kesitlerinde PCNA pozitif (↗) ve PCNA negatif (↖) hepatosit görünüşleri. (a) SF 0. saat , (b) SF 6. saat, (c) SF 12. saat , (d) SF 24. saat. (X20)



Şekil 4.16 Safran gruplarına ait karaciğer kesitlerinde PCNA pozitif (↗) ve PCNA negatif (↖) hepatosit görünüşleri. (a) Safran 0. saat, (b) Safran 6. saat, (c) Safran 12. saat, (d) Safran 24. saat. (X20)



Şekil 4.17 Gruplara ait PCNA indeksi. (Ortalama \pm Standart sapma).

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ ve ***: $P < 0.001$

Yaygın antioksidan diyeti temelli çalışmalar, toksik kimyasalların oksidasyon mekanizmasını etkilenmesinden kaynaklanan karaciğer hasarlarına karşı koruma sağlayabilmektedir. Yapılan çalışmalarda *Picrorrhiza kurroa*, *Andrographis paniculata*, *Eclipta alba*, *Silibum marianum*, *Phyllanthus maderaspatensis* ve *Trichopus zeylanicus* gibi bitkilerin belirli hepatik toksinlere karşı karaciğeri koruduğu tespit edilmiştir. Birçok karaciğer hasarında, çoğu karaciğer hücresi ölür ya da fibrotik sürece geçer. Karaciğer hücre proliferasyonunu tetikleyici tedavi ajanları karaciğerin toksik hasarlara karşı korunması açısından büyük önem arz etmektedir (Kumar vd. 2011).

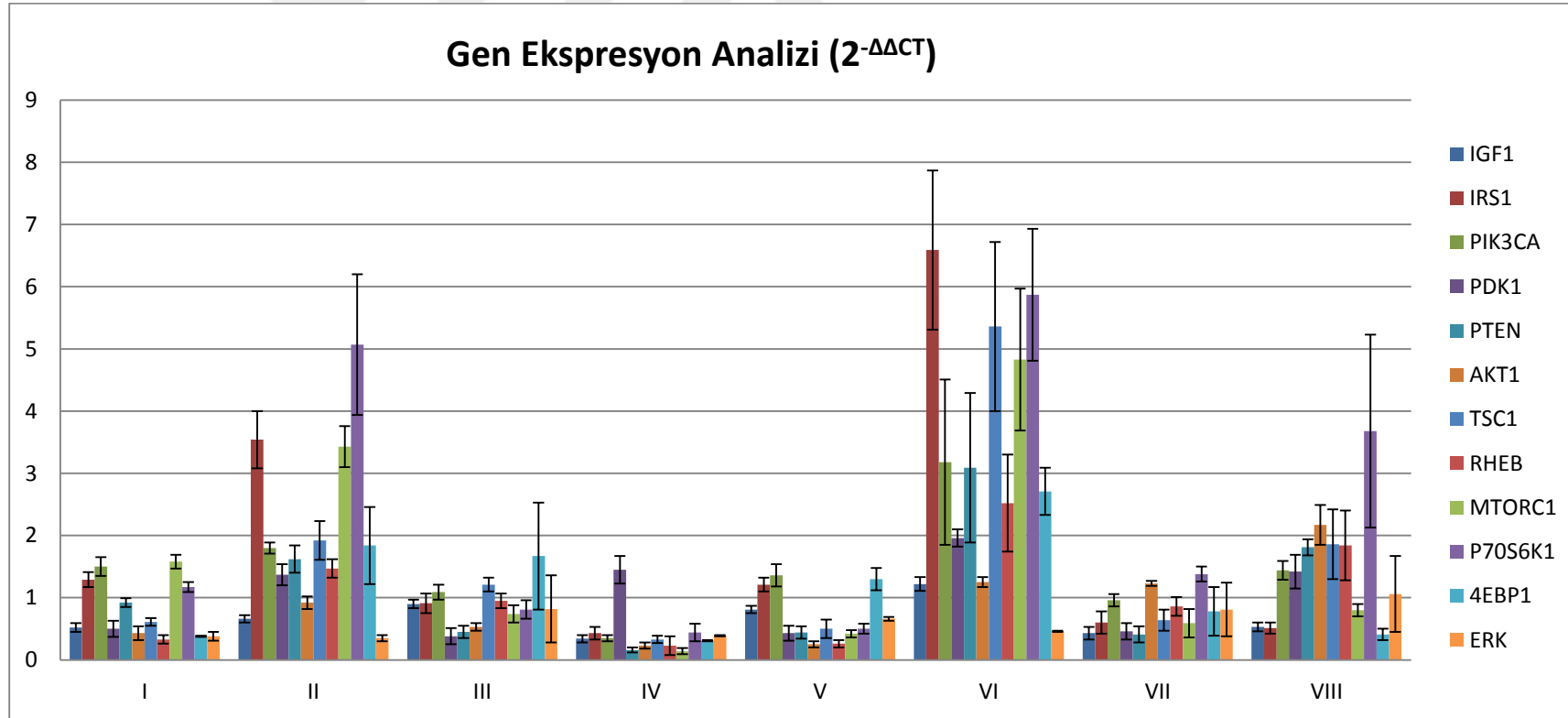
Kaihan Lou vd. (2016)'nin Rosmarik asit ile karaciğer rejenerasyonu üzerinde yaptıkları bir çalışmada, rosmarik asitin karaciğer rejenerasyonunu tetikleyici bir etki gösterdiği mTOR sinyal yolağı üzerinden belirtilmiştir. Rosmarik asit PHx sonrası intra peritoneal olarak verilip, rejenerasyon süreci gözlenmiştir. Çalışma sonucunda rosmarik asitin mTOR sinyal yolağının aktivasyonunun artması ile birlikte karaciğer rejenerasyonunu arttırdığı western blot ve PCNA sonuçları ile belirtilmiştir.

Karaciğer üzerinde yapılan çalışmalarda safran'ın hepatoprotektif etkisinin bulunduğu gösterilmiştir. Omid vd. (2014)'nin yaptıkları bir çalışmada, acetaminophen ile karaciğer hasarı oluşturulan hayvanlara safran bitki ekstraktı uygulanmış, çalışma sonucunda safran'ın hepatoprotektif etkisi ALT, AST ve histopatoloji sonuçları ile kanıtlanmıştır. Iranshi vd. (2011); CCl4 ile karaciğer hasarı oluşturarak suda ve alkolde çözünen safran ekstraktının etkisini incelemiştir. CCl4 ile plasmada artan ALT ve AST değerleri, hem su hem alkol safran ekstraktı ile tedavi sonucu ciddi oranda düşmüştür. Ayrıca sonuçlar histopatolojik olarak da kanıtlanmıştır.

Safran ekstraktının gavaj olarak uygulanması ile birlikte parsiyal hepatektomi sonrası; IGF-1 geni 0. Saatte ($P<.05$) ve 6. Saatte ($P<.01$); IRS-1 geni 6. Saatte ($P<.01$); PI3K geni 6. Saatte ($P<.05$); PDK1 geni 6. Saatte ($P<.05$); PTEN geni 6. ve 24. Saatlerde ($P<.05$); AKT geni 12. ve 24. Saatlerde ($P<.01$); TSC1 geni 6. Saatte ($P<.01$) ve 24. Saatte ($P<.05$); RHEB geni 6. Saatte ($P<.05$) ve 24. Saatte ($P<.01$); MTORC1 geninin 6. Saatte ($P<.05$) ekspresyon düzeylerinde SF grubuna göre anlamlı fark gösterdiği çalışmamızda tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda P70S6K1 ve 4EBP1'in antagonist çalıştığı ispatlandığı belirtilmiştir (Avruch J et al.; 2005 ; Sabatini DM et al.; 2004). Çalışmamızda 4EBP1 aktivasyonu ilk 0.6.12. saatlerde anlamlı fark gösterirken ($P<.05$) 24. Saatte ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Buna karşılık P70S6K1 gen ekspresyonu 24. Saatte ($P<.05$) anlamlı fark oluşturarak artış göstermiştir. Çalışmamızda ayrıca G1 den S fazı geçişte önemli olan ERK1 aktivasyonu ayrıca incelenmiştir. ERK1 gen ekspresyonunun 24. Saatte ($P<.01$) anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Safran ekstraktı uygulanan hayvanlarda hepatosit proliferasyonunun arttığı PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerinden tespit edilmiştir (Çizelge 1, Çizelge 2, Çizelge 3). Safran'ın karaciğer üzerinde koruyucu bir etkisinin olduğu histolojik olarak PCNA çalışması ile de gösterilmiştir (Şekil 4.15, Şekil 4.16). Yapılan PCNA çalışmasında Grup VIII' de anlamlı derecede ($P<.001$) farklılık gözlenmiştir (Şekil 4.17).

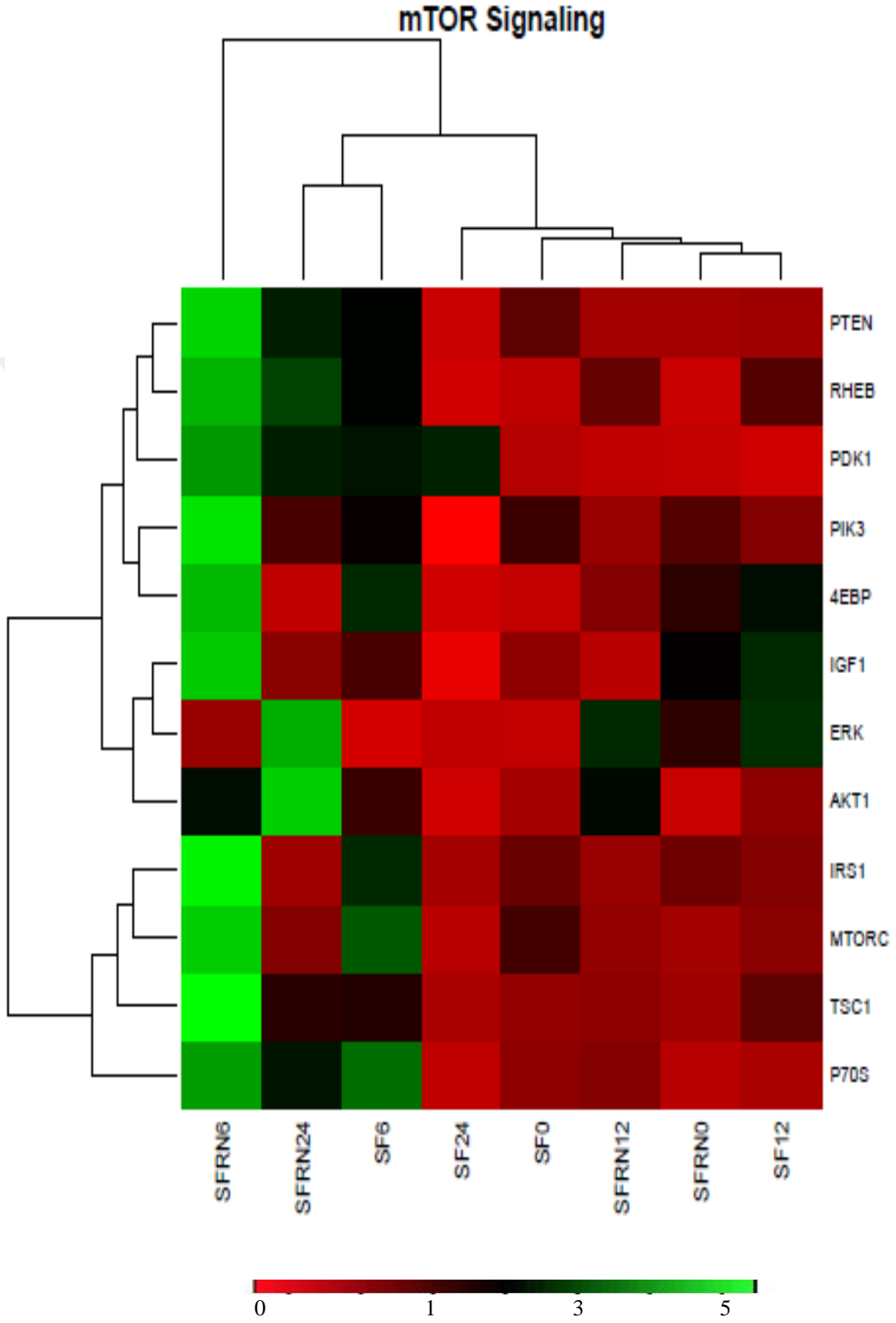
Çizelge 1. Çalışmada bulunan PI3K/Akt/mTOR yolağına ait genlerin fold değışikliklerine göre ($2^{-\Delta\Delta CT}$) oluşturulan gen ekspresyon analizi.



Çizelge 2. PI3K/Akt/mTOR yolağına ait genlerin Ortalama \pm Standart sapma değerleri.

	SF GRUPLARI								SAFRAN GRUPLARI							
	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII	
IGF-1	0,52	$\pm 0,07$	0,66	$\pm 0,06$	0,9	$\pm 0,07$	0,34	$\pm 0,06$	0,81	$\pm 0,06$	1,22	$\pm 0,11$	0,43	$\pm 0,1$	0,53	$\pm 0,07$
IRS-1	1,29	$\pm 0,12$	3,54	$\pm 0,46$	0,9	$\pm 0,16$	0,43	$\pm 0,1$	1,21	$\pm 0,11$	6,59	$\pm 1,28$	0,6	$\pm 0,18$	0,51	$\pm 0,09$
PIK3CA	1,5	$\pm 0,15$	1,8	$\pm 0,09$	1,1	$\pm 0,12$	0,35	$\pm 0,05$	1,36	$\pm 0,18$	3,18	$\pm 1,33$	0,96	$\pm 0,1$	1,44	$\pm 0,15$
PDK1	0,5	$\pm 0,13$	1,37	$\pm 0,17$	0,4	$\pm 0,13$	1,45	$\pm 0,22$	0,43	$\pm 0,12$	1,96	$\pm 0,14$	0,46	$\pm 0,13$	1,42	$\pm 0,27$
PTEN	0,92	$\pm 0,07$	1,62	$\pm 0,22$	0,5	$\pm 0,1$	0,16	$\pm 0,04$	0,44	$\pm 0,1$	3,09	$\pm 1,2$	0,41	$\pm 0,13$	1,81	$\pm 0,13$
AKT1	0,43	$\pm 0,11$	0,92	$\pm 0,1$	0,5	$\pm 0,06$	0,23	$\pm 0,05$	0,25	$\pm 0,05$	1,25	$\pm 0,08$	1,23	$\pm 0,04$	2,17	$\pm 0,32$
TSC1	0,61	$\pm 0,06$	1,92	$\pm 0,31$	1,2	$\pm 0,11$	0,33	$\pm 0,06$	0,5	$\pm 0,15$	5,36	$\pm 1,36$	0,64	$\pm 0,17$	1,86	$\pm 0,56$
RHEB	0,33	$\pm 0,07$	1,47	$\pm 0,15$	1	$\pm 0,12$	0,23	$\pm 0,15$	0,26	$\pm 0,06$	2,52	$\pm 0,78$	0,86	$\pm 0,15$	1,84	$\pm 0,56$
MTORC1	1,58	$\pm 0,11$	3,43	$\pm 0,33$	0,7	$\pm 0,14$	0,14	$\pm 0,05$	0,42	$\pm 0,06$	4,83	$\pm 1,14$	0,59	$\pm 0,23$	0,8	$\pm 0,1$
P70S6K1	1,17	$\pm 0,08$	5,07	$\pm 1,13$	0,8	$\pm 0,15$	0,44	$\pm 0,14$	0,5	$\pm 0,08$	5,87	$\pm 1,06$	1,38	$\pm 0,12$	3,68	$\pm 1,55$
4EBP1	0,38	$\pm 0,01$	1,84	$\pm 0,62$	1,7	$\pm 0,86$	0,31	$\pm 0,01$	1,3	$\pm 0,18$	2,71	$\pm 0,38$	0,78	$\pm 0,39$	0,41	$\pm 0,09$
ERK	0,38	$\pm 0,07$	0,35	$\pm 0,05$	0,8	$\pm 0,54$	0,39	$\pm 0,01$	0,66	$\pm 0,03$	0,46	$\pm 0,01$	0,81	$\pm 0,43$	1,06	$\pm 0,61$

Çizelge 3. PI3K/Akt/mTOR Yolağına ait gen ekspresyon analizinin heat-map haritasında gösterimi



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda PI3K/Akt/mTOR yolağı sinyal kaskadı üzerinde bulunan genlere göre yapılan araştırmada özellikle 6. ve 24. saatlerde önemli ölçüde gen ekspresyon artışı tespit edilmiştir.

Safran'ın karaciğer rejenerasyonunda PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağını özellikle 6. saatte önemli ölçüde uyardığı çalışmamızda tespit edilmiştir. 24. saatte oluşan artışın ise koruyucu etki sonrası rejenerasyon sürecinin hızlanmasına bağlı olarak hepatositlerin ikinci kez replikasyona gittiği düşünülebilir. Hepatositlerin birden fazla replikasyona gidebileceği belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre safran'ın karaciğerde glikojen/yağ ve protein metabolizmasına olumlu derecede etki ettiği görülmüştür. Gen ifade düzeylerindeki artış safranın karaciğer üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda 15 gün boyunca 100 mg/kg oral gavaj olarak verilen safranın %70' lik PHx sonrası karaciğer rejenerasyonuna olan/olabilecek etkisi PI3K/AKT/mTOR yolağı üzerinden incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre safran'ın karaciğeri koruduğu, proliferasyonu arttırıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir. İleriki çalışmalarda western blot çalışması genişletilerek karaciğer rejenerasyonu sürecinde B-aktin ve total AKT, mTOR proteinlerinin incelenmesi öngörülmektedir. Safran üzerinden daha detaylı inceleme yapılarak sinyal yolakları üzerindeki etki mekanizmasının farklı zaman ve dozlarda geniş çaplı araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Anantharaman, A.; Subramanian, B.; Chandrasekaran, R.; Seenivasan, R.; Siva, R. 2014. Colorants and cancer: A review. *Industrial Crops and Products* Volume 53, Pages 167–186.
- Apte, U., Gkretsi, V., Bowen, W.C., Mars, W.M., Luo, J.-H., Donthamsetty, S., Orr, A., Monga, S.P.S., Wu, C., Michalopoulos, G.K. 2009. Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology* 50, 844–51.
- Asai, A.; Nakano, T.; Takahashi, M.; Nagao, A. 2005. Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem.* 7;53(18):7302-6.
- Avruch J, Lin Y, Long X, Murthy S, Ortiz-Vega S. Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8:67-72.
- Azam Bolhassani, Afshin Khavari, S. Zahra Bathaie. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1845; 20–30
- Bai, L.; Wang S. 2014. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annu Rev Med.* 65:139-55. doi: 10.1146/annurev-med-010713-141310.
- Celton-Morizur, S.; Merlen, G.; Couton, D.; Desdouets C. 2010. Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling. *Cell Cycle.* Feb 1;9(3):460-6. Epub
- Chen P, Yan H, Chen Y, He Z. 2009. The variation of Akt/TSC1-TSC1/mTOR signal pathway in hepatocytes after partial hepatectomy in rats. *Exp Mol Pathol.* Apr;86(2):101-7.
- Chen, J., Ishac, E.J., Dent, P., Kunos, G., Gao, B. 1998. Effects of ethanol on mitogenactivated protein kinase and stress-activated protein kinase cascades in normal and regenerating liver. *Biochem. J.* 334, 669–76.
- Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., Haber, B.A., Taub, R. 1994. Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *J. Biol. Chem.* 269, 30429–35.
- Dhar, A.; Mehta, S.; Dhar, G.; Dhar, K.; Banerjee, S.; Van Veldhuizen, P.; Campbell, DR.; Banerjee, SK. 2009. Crocetin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and tumor progression in a xenograft mouse model. *Mol Cancer Ther.* Feb;8(2):315-23. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0762. Epub 2009 Feb 10

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Diehl, A.M., Yin, M., Fleckenstein, J., Yang, S.Q., Lin, HZ, Brenner, D.A., Westwick, J., Bagby, G., Nelson, S. 1994. Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am. J. Physiol.-Gastroint. Liver Physiol.* 267,G552–61.
- Diehl, A.M., Rai, R. 1996. Review: Regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 466–70.
- Edinger AL, Thompson CB. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* 2002;13:2276-2288.
- El-Serag, HB.; Hampel, H.; Javadi, F. 2006. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4(3):369–380
- Engelman, JA.; Luoand, J.; Cantley, LC. 2006. The evolution of Phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7(8):606–619
- Fausto, N.; Campbell, J.S., Riehle, K.J., 2006, Liver Regeneration, *Hepatology*, 43, 2, 45-53.
- Gao, T.; Furnariand, F.; Newton, AC. 2005. A Phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18(1):13–24
- Ghadroost, B.; Vafaei, AA.; Rashidy-Pour, A. et al. 2011. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *Eur J Pharmacol* 667: 222-229.
- Giaccio, M. 2004. Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44: 155–172.
- Gkretsi, V., Bowen, W.C., Yang, Y., Wu, C., Michalopoulos, G.K. 2007. Integrin-linked kinase is involved in matrix-induced hepatocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 638–43.
- Gulati, P.; Thomas, G. 2007. Nutrient sensing in the mTOR/S6K1 signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 2):236–8
- Gutheil, WG.; Reed, G.; Ray, A.; Anant, S.; Dhar, A. 2012. Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 13(1):173-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Haber, B.A., Mohn, K.L., Diamond, R.H., Taub, R. 1993. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 91, 1319–26.
- Haga S, Ogawa W, Inoue H, Terui K, Ogino T, Igarashi R, et al. Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice. *J Hepatol* 2005;43:799-807.
- Haga, S., Ozaki, M., Inoue, H., Okamoto, Y., Ogawa, W., Takeda, K., Akira, S., Todo, S. 2009. The survival pathways Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/Phosphoinositidedependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 49, 204–14.
- Hara, K.; Yonezawa, K.; Kozlowski, MT. et al. 1997. Regulation of eIF-4E BP1 Phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem* 272(42):26457–63
- He, SY.; Qian, ZY.; Wen, N.; Tang, FT.; Xu, GL.; Zhou, CH. 2007. Influence of Crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidamic-diet quails. *Eur J Pharmacol.* 12;554(2-3):191-5.
- Higashino, S.; Sasaki, Y.; Giddings, JC.; Hyodo, K.; Sakata, SF.; Matsuda, K.; Horikawa, Y.; Yamamoto, J. 2014. Crocetin, a carotenoid from *Gardenia jasminoides* Ellis, protects against hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Phytother Res.* 28(9):1315-9. doi: 10.1002/ptr.5130.
- Hsu, H.; Shu, HB.; Pan MG. et al. 1996. TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299–308
- Huang J, Rudnick DA. 2014. Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration. *Am J Pathol.* Feb;184(2):309-21. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.04.034.
- Ila D., Sukta D., Tapas S. Saffron suppresses oxidative stress in DMBA- induced skin carcinoma: A histopathological study. 2010. *Acta histochemica* 112; 317—327
- Inoue H, Ogawa W, Ozaki M, Haga S, Matsumoto M, Furukawa K, et al. Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat Med* 2004;10:168-174.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jaber, N.; Dou, Z.; Chen, JS.; Catanzaro, J.; Jiang, YP.; Ballou, LM. et al. 2012. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (6) , pp. 2003–2008
- Jackson, L.N., Larson, S.D., Silva, S.R., Rychahou, P.G., Chen, L.A., Qiu, S., Rajaraman, S., and Evers, B.M. 2008. PI3K/Akt activation is critical for early hepatic regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G1401–10.
- Jain, M.; Kasetty, S.; Khan, S., Desai A. 2014. An Insight to Apoptosis Review. IBIMA Publishing Vol. 2014 , Article ID 372284, 12 pages
- Janku, F.; Garrido-Laguna, I.; Tsimberidou, AM.; Naing, A.; Fu, S.; Falchook, GS. et al. 2011. Loss of PTEN expression in patients treated with PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors. *Cancer Res*, 71 (8)
- Kaihan L., Min Y., Erdan D., Jiahui Z., Cong Y., Rongping Z., Lanchun Z., Ming Z., Zhicheng X. 2016. Rosmarinic acid stimulates liver regeneration through the mTOR pathway. *Phytomedicine*, S0944-7113(16)30174-X
- Khamzina, L.; Veilleux, A.; Bergeron, S. et al. 2005. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146(3): 1473–1481
- Kim DH, Sabatini DM. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;279:259-270.
- Kim, T.H., Mars, W.M., Stolz, D.B., Petersen, B.E., Michalopoulos, G.K. 1997. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 26, 896–904.
- Kogure, J., Omata, W., Kanzaki, M., Zhang, Y., Yasuda, H., Mine, T., Kojima, I. 1995. A single intraportal administration of follistatin accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats. *Gastroenterology* 108, 1136–42.
- Kumar C. H., Ramesh A., Suresh Kumar J. N., Mohammed ishaq B. 2011. A Review On Hepatoprotective Activity of Medicinal Plants, *IJPSR*, 2011; Vol. 2(3): 501-515
- Lesage, G., Glaser, S.S., Gubba, S., Robertson, W.E., PHxinizy, J.L., Lasater, J., Rodgers, R.E., Alpini, G. 1996. Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal secretion. *Gastroenterology* 111, 1633–44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, B., Paranjpe, S., Bowen, W.C., Bell, A.W., Luo, J.-H., Yu, Y.-P., Mars, W.M., Michalopoulos, G.K. 2009. Investigation of the Role of Glypican 3 in Liver Regeneration and Hepatocyte Proliferation. *Am. J. Pathol.* 175, 717–24.
- Lindroos, P.M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. 1991. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 13, 743–50.
- Marchesini, G.; Moscatiello, S.; Di Domizio, S. et al. 2008. Obesity-associated liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11 Suppl 1):S74–S80
- Margarita, G.V.; Marta, G.C.; Arantxa, R.C., Ana R.M. 2013. Dietary Phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews* Volume 71, Issue 9, pages 585–599.
- Mars, W.M., Liu, M.L., Kitson, R.P., Goldfarb, R.H., Gabauer, M.K., Michalopoulos, G.K. 1995. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology* 21, 1695–1701.
- Mars, W.M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. 1993. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am. J. Pathol.* 143, 949–58.
- Martinez-Hernandez, A., Amenta, P.S. 1995. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J.* 9, 1401–10.
- Maryam M., Azrina A., Huzwah K., Barakatun N.M.Y., Sabariah M.N. 2013. Saffron: A Natural Potent Antioxidant as a Promising Anti-Obesity Drug. *Antioxidants* 2, 293-308; doi:10.3390/antiox2040293
- Meng, L.; Cui, L. 2008. Inhibitory effects of crocetin on high glucose-induced apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells and its mechanism. *Arch Pharm Res.* 31(3):357-63. doi: 10.1007/s12272-001-1164-y.
- Micheau, O.; Tschopp, J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181–190
- Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C. 1997. Liver regeneration. *Science* 276, 60–6.
- Minuk, G.Y., Kren, B.T., Xu, R., Zhang, X., Burczynski, F., Mulrooney, N.P., Fan, G., Gong, Y., Steer, C.J. 1997. The effect of changes in hepatocyte membrane potential on immediate-early proto-oncogene expression following partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 25, 1123–7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Miyaoka, Y.; Miyajima A. 2013. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Div.* 2013; 8: 8.
- Monga, S.P.S., Pediaditakis, P., Mule, K., Stolz, D.B., Michalopoulos, G.K. 2001. Changes in WNT/ β -catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology* 33, 1098–1109.
- Mora A, Lipina C, Tronche F, Sutherland C, Alessi DR. Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure. *Biochem J* 2005;385:639-648.
- Nam, KN.; Park, YM.; Jung, HJ. et al. 2010. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. *Eur J PHarmacol* 648: 110–116.
- Ochiai, T.; Shimeno, H.; Mishima, K. et al. 2007. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1770: 578–584.
- Oe, S., Lemmer, E.R., Conner, E.A., Factor, V.M., Levéen, P., Larsson, J., Karlsson, S., Thorgeirsson, S.S. 2004. Intact signaling by transforming growth factor β is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology* 40, 1098–1105.
- Oshiro, N.; Takahashi, R.; Yoshino, K. et al. 2007. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a Physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem* 282(28):20329–39
- Pende M, Kozma SC, Jaquet M, Oorschot V, Burcelin R, Le Marchand- Brustel Y, et al. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 2000;408:994-997.
- Ping, C., Xiaoling, D., Jin, Z., Jiahong, D., Jiming, D., Lin, Z. (2006). Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells Promote Hepatocyte Proliferation Early after Partial Hepatectomy in Rats. *Arch. Med. Res.* 37, 576–83.
- Polivka, J.; Janku, F. 2014. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *PHarmacol Ther.* 142(2):164-75.
- Romero-Gallo, J., Sozmen, E.G., Chytil, A., Russell, W.E., Whitehead, R., Parks, W.T., Holdren, M.S., Her, M.F., Gautam, S., Magnuson, M. et al. 2005. Inactivation of TGF-beta signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene* 24, 3028–41.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roselli, H.T., Su, M., Washington, K., Kerins, D.M., Vaughan, D.E., Russell, W.E. 1998. Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 275, G1472–9.
- Samuels, Y.; Diaz, L.A.; Schmidt-Kittler, O. et al. 2005. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7(6):561–573
- Sancak, Y.; Thoreen, C.C.; Peterson, T.R. et al. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25(6):903–15
- Schoen, J.M., Wang, H.H., Minuk, G.Y., Lutt, W.W. 2001. Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* 5, 453–64.
- Schneider-Brachert, W. et al. 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* 21:415–428
- Sheng, L.; Qian, Z.; Shi, Y. et al. 2008. Crocetin improves the insulin resistance induced by high-fat diet in rats. *Br J Pharmacol* 154: 1016–1024.
- Shimizu, H., Miyazaki, M., Wakabayashi, Y., Mitsuhashi, N., Kato, A., Ito, H., Nakagawa, K., Yoshidome, H., Kataoka, M., Nakajima, N. 2001. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J. Hepatol.* 34, 683–9.
- Stiles B, Wang Y, Stahl A, Bassilian S, Lee WP, Kim YJ, et al. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2082-2087.
- Sung, B.; Prasad, S.; Yadav, V.R.; Aggarwal, B.B. 2012. Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals. *Nutr Cancer.* 64(2):173-97. doi: 10.1080/01635581.2012.630551.
- Takeishi, T., Hirano, K., Kobayashi, T., Hasegawa, G., Hatakeyama, K., Naito, M. 1999. The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch. Histol. Cytol.* 62, 413–22.
- Taub, R. 2004. Liver Regeneration: from myth to mechanism, *Molecular Cell Biology*, 5, 836-847.
- Thompson, N.L., Mead, J.E., Braun, L., Goyette, M., Shank, P.R., Fausto, N. (1986). Sequential Protooncogene Expression during Rat Liver Regeneration. *Cancer Res.* 46, 3111–7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (son)

- Um, S.H.; D'Alessio, D.; Thomas, G. 2006. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* 3(6):393–402
- Wack, K.E., Ross, M.A., Zegarra, V., Sysko, L.R., Watkins, S.C., Stolz, D.B. 2001. Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 33, 363–78.
- Wang, H.H., Lutt, W.W. 1998. Evidence of nitric oxide, a flow-dependent actor, being a trigger of liver regeneration in rats. *Can. J. PHxysiol. Pharmacol.* 76, 1072–9.
- Yang, R.; Vernon, K.; Thomas, A.; Morrison, D.; Qureshi, N.; Van, C.W. 2011. Crocetin reduces activation of hepatic apoptotic pathways and improves survival in experimental hemorrhagic shock. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* Jan;35(1):107-13. doi: 10.1177/0148607110374058.
- Yang, J.; Cron, P.; Thompson, V. et al. 2002. Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydroPHxobic motif Phosphorylation. *Mol Cell* 9(6):1227–1240
- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J.J., and Fausto, N. 1997. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1441–6.
- Yoshino, F.; Yoshida, A.; Umigai, N.; Kubo, K.; Lee MC. 2011. Crocetin reduces the oxidative stress induced reactive oxygen species in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs) brain. *J Clin Biochem Nutr* 49: 182–187.
- Wang, L.; Harrisand, T.E.; Lawrence, J.C. 2008. Regulation of proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) function by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)- mediated Phosphorylation. *J Biol Chem* 283(23):15619–27
- Wymann, M.P.; Marone, R. 2005. PHxosPHxoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* 17(2):141–149
- Zheng, S.; Qian, Z.; Sheng, L.; Wen, N. 2006. Crocetin attenuates atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits through inhibition of LDL oxidation. *J Cardiovasc PHxarmacol* 47: 70–76.