

**T.C.  
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANKARA**

**DENEYSSEL OBEZ SIÇANLARIN KARACİĞER VE BÖBREKÜSTÜ BEZİNDE  
HMGB1 DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Muhammed ERDAL  
Doç.Hv.Tbp.Bnb.**

**TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
DOKTORA TEZİ**

**Ankara  
2016**

**T.C.  
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANKARA**

**DENEYSEL OBEZ SIÇANLARIN KARACİĞER VE BÖBREKÜSTÜ BEZİNDE  
HMGB1 DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Muhammed ERDAL  
Doç.Hv.Tbp.Bnb.**

**Gülhane Askeri Tıp Akademisi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Lisanüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin  
Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Programı  
için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.**

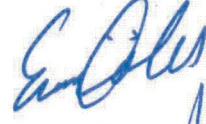
**TEZ DANIŞMANI  
Emin ÖZTAŞ  
Prof.Hv.Tbp.Alb.**

**Ankara  
2016**


Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

“Deneysel obez sıçanların karaciğer ve böbreküstü bezinde HMGB1 düzeylerinin araştırılması.” konulu bu çalışma jürimiz tarafından **Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı**’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Hv.Tbp.Alb. Emin ÖZTAŞ



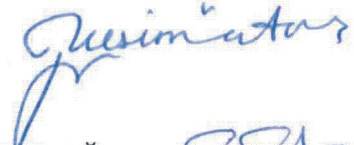
Üye (Başkan) : Prof.Tbp.Alb.M.Kemal IRMAK



Üye : Prof.Dr. Ahmet NACAR



Üye : Doç.Dr. Yeşim ER ÖZTAŞ



Üye : Yrd.Doç.Hv.Tbp.Yzb.Esra ERDOĞAN



ONAY :

Doç.Hv.Tbp.Bnb. Muhammed ERDAL’ın 23.06.2016 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.



Ömer AZAL

Prof.Hv.Tbp.Tuğgeneral

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Bu tezde deneysel obez sıçanların karaciğer ve böbreküstü bezinde HMGB1 düzeylerinin araştırılması başlıklı konu incelenmiştir.

Hem asistanlığım boyunca hem de konunun belirlenmesi ve çalışmanın yürütülmesinde verdiği değerli katkılardan dolayı Sayın Histoloji ve Embriyoloji AD. Başkanı. Prof.Hv.Tbp.Alb.Emin ÖZTAŞ'a derin bir minnet duygusu içerisinde teşekkürlerimi arz ederim.

Ayrıca doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Sayın Prof.Tbp.Alb.M.Kemal IRMAK ve Histoloji ve Embriyoloji AD personeline (Yrd.Doç.Hv.Tbp.Yzb. Esra ERDOĞAN, Tbp.Ütğm. Yasin ILGAZ, Hv.Sağ.Asb.Üçvş. Recep Gümüş'e) ve idari prosedürlerin yerine getirilmesi hususunda katkılarından dolayı Hv.Sağ.Asb.Bçvş. Ayhan KUTLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

İzinleri sayesinde doktora eğitimine devam edebildiğim akademik gelişimim için her türlü desteği veren ve motivasyonumun üst düzeyde kalmasını sağlayan Sayın Hv.Plt.Korgeneral Ziya Cemal KADIOĞLU ve Dr.Hv.Tümgeneral Ahmet CURAL'e şükranlarımı arz ederim.

Aldığım ünvanlar için harcadığım çaba sürecinde ihmal ettiğimi belki de hayatlarından çaldığımı bana hissettirmeyen fedakar aileme, anneme, merhum babama ve kardeşlerime en içten duygularla saygı ve sevgilerimi sunarım.

Muhammed ERDAL

Doç.Hv.Tbp.Bnb.

Ankara

Haziran 2016

## ÖZET

### **Deneyisel Obez Sıçanların Karaciğer ve Böbreküstü Bezinde HMGB1 Düzeylerinin Araştırılması**

Dünya Sağlık Örgütü tarafından en riskli on hastalıktan biri olarak tanımlanan obezite neredeyse vücuttaki tüm sistem ve organları etkilemektedir. Bu çalışmada, yüksek yağ içerikli diyet ile erişkin sıçanlar üzerinde obezite modeli geliştirilmesi ve bu obezitenin karaciğer ve böbreküstü bezleri üzerindeki etkilerini ve bu olası etkilerin high mobility group box 1 (HMGB1) düzeyleri ile ilişkisi olup olmadığının histolojik ve morfometrik yöntemlerle incelenmesi amaçlandı.

Bu amaçla Wistar albino cinsi erişkin sıçanlar (8 adet çalışma 8 adet kontrol) 10 hafta boyunca yüksek yağ içerikli diyetle beslenerek obezite modeli oluşturuldu. Deney sonunda, sıçanlardan elde edilen kan örneklerinde katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), total kolesterol ve glukoz düzeyleri biyokimyasal olarak değerlendirildi. Karaciğer ve böbrek üstü bezlerinde morfometrik, rutin histolojik ve immünohistokimyasal inceleme yapıldı. Işık mikroskopik inceleme için, doku örneklerinden hazırlanan parafin kesitlere Hematoksilin-eozin boyası ve Anti HMGB1 antikoru ile immünohistokimyasal boyama uygulandı. Morfometrik değerlendirme için Cavalieri metodu ile hacim değerlendirmesi fiziksel disektör ile hepatosit, Kupffer hücresi ve HMGB1 pozitif hücre sayımları yapıldı.

Deney sonrasında, deneklerin vücut ağırlıklarının, obezite oluşturulan grupta istatistiksel olarak anlamlı dercede arttığı gözlemlendi. Yine obezite grubunda karaciğer hacminde, Kupffer hücrelerinin ve HMGB1 pozitif hücrelerin sayısında anlamlı artış gözlenirken birim alanda hepatosit sayısal yoğunluğunun azaldığı tespit edildi. Böbreküstü bezinde ise total hacim artışının yanısıra zona glomeruloza hacimlerinin azaldığı, zona fasikülata tabakası ve medulla hacminin arttığı görüldü. Obez deneklerin medullasında HMGB1 pozitif hücrelerin sayısı da artmıştı. Işık mikroskopik olarak, obez grubuna ait karaciğerlerde ve böbreküstü bezlerinde inflamatuvar hücre infiltrasyonları, nekrotik odaklar, vasküler dilatasyon; hepatositlerde sitoplazmik büzüşme ve asidofil boyanmada artış, yağlı

değişiklik, bazı hepatosit nükleuslarında heterokromatik boyanma gibi bulgular saptandı.

Sonuç olarak bu çalışmada, yağlı diyet uygulamasının ışık mikroskopik düzeyde karaciğer ve böbreküstü bezlerinde hasar oluşturduğu ve ayrıca obezite durumunda karaciğer ve böbreküstü bezi medullasında pozitifliği artan HMGB1'in bu hasar ile ilişkisi olabileceği biyokimyasal, stereolojik, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile gösterildi.

**Anahtar Kelimeler** : Obezite, HMGB1, Karaciğer, Böbreküstü Bezi  
**Destekleyen Kurumlar** : GATA Araştırma Bilimsel Kurul Başkanlığı  
**Yazar Adı** : Doç.Hv.Tbp.Bnb. Muhammed ERDAL  
**Danışman** : Prof.Hv.Tbp.Alb. Emin ÖZTAŞ



## ABSTRACT

### **Investigation of HMGB1 Levels in Liver and Surrrenal Glands in Experimentally Obese Rats**

Obesity identified as one of the ten most dangerous diseases by the World Health Organization, affects almost all systems and organs in the body. In this study, we aimed to investigate the effects of obesity on liver and suprarenal glands in high-fat diet induced obese rats and whether there is a relationship between HMGB1 levels and these their effects by biochemical, morphometric, histological and immunohistochemical methods.

For this purpose, adult *Wistar albino* rats were fed on a high fat diet for 10 weeks and obesity model was induced. At the end of the experiment, blood samples were obtained from all subjects for the biochemical analyses of catalase, superoxide dismutase (SOD), cholesterol and glucose levels. Also, liver and suprarenal glands were evaluated by morphological, routine histological and immunohistochemical methods. For light microscopic examination with hematoxylin-eosin stain the prepared paraffin sections of tissue samples and anti-HMGB1 antibody immunohistochemical staining was performed. Volume assessments were made by Cavalieri method and physical disector was used for detecting the number of hepatocyte, Kupffer cells and HMGB1 positive cells.

After the experiment, body weight of the animals was, being more pronounced increases were observed in especially obese group. The average weights of the groups were statistically different from each other. A significant increase the volume of the liver, in the number of Kupffer cells and HMGB1-positive cells were found in the livers of the obese group. But, numerical density of the hepatocytes was decreased in the obese group. In the adrenal gland, as well as volume of the zona glomerulosa was decreased; the total volumes of the suprarenal gland, zona fasciculata layer and the suprarenal medulla were increased. In the suprarenal medulla of the obese rats, number of the HMGB1 positive cells was increased. In the light microscopic investigation, inflammatory cell infiltration in the liver and adrenal glands necrotic foci, vascular dilatation; acidophil staining of cytoplasm, cytoplasmic shrinkage, fatty changes and

heterochromatic staining of some nuclei were detected in livers and suprarenal glands of the obese group.

As a result of the study, high fat diet induced obesity caused to damage in the liver and adrenal glands of the rats. Also increased positivity of HMGB1 may be related to this damage. These results were shown by biochemical, stereological, histological and immunohistochemical methods.

**Keywords** : Obesity, HMGB1, liver, adrenal gland

**Supported.by** : Department of Scientific Research Committee, GATA

**Author** : Associated Professsor Muhammed ERDAL

**Counsellor** : Professor Emin ÖZTAŞ



## İÇİNDEKİLER

ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET.....	v
İNGİLİZCE ÖZET.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Obezite.....	2
2.1.1. Obezitenin Tanımı.....	2
2.1.2. Obezitenin Patogenezi.....	3
2.1.2.1. Genetik Faktörler.....	3
2.1.2.2. İnsülin Direnci ve Obezite.....	3
2.1.2.3. İnsülin direnci patofizyolojisi.....	4
2.1.2.4. Adipoz hipertrofi ve hiperplazi.....	4
2.1.2.5. Adiposit disfonksiyonu ve endoplazmik retikulum.....	5
2.1.2.6. Yağ Dokusu Mitokondrileri ve Oksidatif Stres.....	6
2.1.2.7. Adipokinler.....	6
2.1.2.8. Leptin.....	6
2.1.2.9. TNF-alfa.....	7
2.1.2.10. Adiponektin.....	7
2.1.2.11. Dolaşımdaki yağ asitleri.....	8
2.1.2.12. İnflamasyon ve obezite.....	8
2.1.2.13. Oksidatif stres ve obezite.....	9
2.1.2.14. Serbest radikal oluşumunun obeziteyle ilişkisi.....	9

2.1.2.14.1. Yağ doku.....	9
2.1.2.14.2. Yağ asit oksidasyonu.....	9
2.1.2.14.3. Aşırı oksijen tüketimi.....	9
2.1.2.14.4. Hücre hasarı yükü.....	9
2.1.2.14.5. Diyetin tipi.....	10
2.1.2.14.6. Mitokondrilerin rolü.....	10
2.2. HMGB1.....	10
2.2.1. HMGB1'in Yapısı.....	10
2.2.2. HMGB1'in Görevleri.....	13
2.2.2.1. İntrasellüler Fonksiyonları.....	13
2.2.2.2. Hücresel Salınımı.....	15
2.2.2.3. Ekstrasellüler Fonksiyonları.....	15
2.2.3. Malign Hastalıklardaki Rolü.....	17
2.2.3.1. Sınırsız Replikatif Potansiyel.....	17
2.2.3.2. Genom İnstabilitesi ve Mutasyon.....	17
2.2.3.3 Apoptozdan Kaçış.....	18
2.2.3.4. Büyüme Sinyallerinin Yeterliliği.....	18
2.2.3.5. Büyüme İnhibitörlerine Cevapsızlık.....	19
2.2.3.6. Hücresel Enerji Kontrolünden Kurtulma.....	19
2.2.3.7. Anjiyogenez.....	20
2.2.3.8. Metastaz ve Doku İnvazyonu.....	20
2.2.3.9. Mikroinflamatuvar Çevre.....	21
2.2.3.10. İmmün Yıkımdan Kaçış.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Etik Kurul Onayı.....	24
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	24
3.3. Deney Prosedürü.....	24
3.3.1.Yüksek Yağ İçerikli Diyetin Hazırlanması.....	24

3.3.2. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü.....	26
3.3.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü.....	26
3.3.4. Kolesterol.....	27
3.3.5. Glukoz.....	27
3.4. Işık Mikroskopik İşlemler.....	27
3.4.1. Parafin Kesitlerde Konvansiyonel Işık Mikroskopisi.....	27
3.5. Doku Takip İşlemleri.....	27
3.6. İmmünohistokimyasal İşlemler.....	28
3.7. Kesitlerden Görüntü Elde Edilmesi.....	30
3.8. Stereolojik İşlemler.....	31
3.8.1. Stereolojide Hacim Hesabı.....	31
3.8.2. Fiziksel Disektör ile Örnekleme ve Hücre Sayımı.....	33
3.8.3. HMGB1 Pozitif olan Hücrelerin Sayısının Hesaplanması.....	35
3.8.4. Toplam Hücre Sayısının Hesaplanması.....	36
3.9. İstatistik.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Obezitenin Değerlendirilmesi.....	39
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	40
4.3. Stereolojik Bulgular.....	45
4.3.1. Karaciğere Ait Stereolojik Bulgular.....	45
4.3.2. Böbreküstü Bezine Ait Stereolojik Bulgular.....	51
4.4. Konvansiyonel Işık Mikroskopik Bulgular.....	56
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	86
TARTIŞMA.....	96
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	102
KAYNAKLAR.....	103

## SİMGELER VE KISALTMALAR

BDNF Faktör)	: Brain-Derived Neurotrophic Factor (Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör)
CART	: Kokain-Amfetamin Düzenleyici Transkript
CK	: Sitokin Reseptör Kinaz
CRP	: C Reaktif Protein
DAMP Moleküler Model)	: Damage Associated Molecular Pattern (Hasar İlişkili Moleküler Model)
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ER	: Endoplazmik Retikulum
FTO İlişkili)	: Fat Mass And Obesity Associated (Yağ Kütle ve Obezite İlişkili)
HMG	: High Mobility Group (Yüksek Hızlı Grup)
HMGB	: High Mobility Group Box (Yüksek Hızlı Grup kutu)
IL	: İnterlökin
İGF	: İnsülin Like Growth Faktör (İnsülin Benzer Growth Faktör)
KC	: Karaciğer
Kont:	: Kontrol
LDL	: Low Density Lipoprotein (Düşük yoğunluklu lipoprotein)
MCP	: Monosit Kemoatraktan Protein
MC4R	: Melanocortin-4 Reseptör
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NAFLD	: Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
NER	: Nucleotid Excision Repair (Nükleotid Eksizyon Tamir)
Ob	: Obez
ODNs	: Oligodeoksinükleotidler
PPAR	: Peroksizom-Proliferasyon-Aktivasyon Reseptörü
PCSK1	: Prohormon Konvertaz
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
RAGE	: Receptor For Advanced Glycation End Products (Son Ürünlerin İleri Glikasyon Reseptörü)

ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SREBPs	: Sterol-Element Bağlayıcı Proteinler
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TURDEP	: Türkiye Diyabet Hipertansiyon Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması
UPR	: Unfolded Protein Response (Açılmış Protein Cevabı)
UCP	: Uncoupling Proteinler
VKI	: Vücut Kitle İndeksi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
3.1. Deneklerin tartımı ve anestezi uygulaması.....	25
3.2. İmmün boyama prosedürünün yapılışı.....	30
3.3. Olympus BX43 kameralı ışık mikroskobu yazılımı ile kesitlerin fotoğraflanmasına ilişkin örnek karaciğer ışık mikroskobik görüntüsü ve böbreküstü bezi seri kesitleri.....	31
3.4. A ve B' de sırası ile 10'luk ve 40'luk büyütmelemede karaciğer ışık mikroskobik görüntüleri. C' de söz konusu ışık mikroskobik görüntüler üzerinde tüm karaciğer hacmi ve hepatositlerin kapladığı hacim ölçümleri; D'de ise hepatositlerin kapladığı hacim değerlerinin ölçüm işlemleri.....	32
3.5. A' da 10'luk büyütmede böbrek üstü bezi ışık mikroskobik görüntüsü izlenmektedir. B' de ise söz konusu ışık mikroskobik görüntü üzerinde tüm böbreküstü bezi hacmi ve böbreküstü zonlarının kapladığı hacim ölçüm işlemleri.....	33
3.6. Disektör sayımında hepatosit nukleusu var olduğu zaman sayım kuralı.....	34
3.7. Disektör sayımında Kupffer hücresi nukleusu var olduğu zaman sayım kuralı.....	34
3.8. Disektör sayım kuralına göre HMGB1 pozitif hücrelerin sayımı.....	35
4.1. Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama haftalık ağırlık değerleri.....	39
4.2. Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama haftalık VKİ değerleri.....	40
4.3. Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki katalaz seviyeleri.....	41
4.4. Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama SOD seviyeleri.....	42
4.5. Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama glukoz seviyeleri .....	43
4.6. Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama kolesterol seviyeleri.....	44

4.7. Kont ve Ob gruplarındaki ortalama karaciğer hacim değerleri.....	45
4.8. Kont ve Ob gruplarındaki ortalama hepatositlerin kapladığı hacim değerleri.....	46
4.9. Kont ve Ob gruplarındaki ortalama sinüzoidlerin kapladığı hacim değerleri.....	47
4.10. Kont ve Ob gruplarındaki cm <sup>3</sup> başına düşen ortalama hepatosit sayısı değerleri.....	48
4.11. Kont ve Ob gruplarındaki ortalama total hepatosit sayısı değerleri.....	49
4.12. Kont ve Ob gruplarındaki ortalama total Kupffer hücresi sayısı.....	50
4.13. Kont ve Ob gruplarına ait ortalama böbreküstü bezi hacmi değerleri.....	51
4.14. Kont ve Ob gruplarına ait böbreküstü bezlerinde zona glomeruloza tabakasının kapladığı hacim değerleri.....	52
4.15. Kont ve Ob gruplarına ait böbreküstü bezlerinde zona fasikülata tabakasının kapladığı hacim değerleri.....	53
4.16. Kont ve Ob gruplarına ait böbreküstü bezlerinde zona retikularis tabakasının kapladığı hacim değerleri.....	54
4.17. Kont ve Ob gruplarına ait böbreküstü bezlerinde medulla kısmının kapladığı hacim değerleri.....	55
4.18. Kont grubuna ait karaciğer örneklerinin ışık mikroskopik görüntüsü....	56
4.19. Kont grubuna ait karaciğer örneklerinin ışık mikroskopik görüntüsü....	57
4.20. Kont grubuna ait karaciğer örneklerindeki sağlıklı hepatosit ve sinüzoidlerin yüksek büyütmede ışık mikroskopik görüntüsü.....	58
4.21. Ob grubuna ait karaciğer örneklerindeki santral ven dallarında dilatasyon.....	59
4.22. Ob grubuna ait karaciğer örneklerinde sinüzoidal dilatasyon.....	60
4.23. Ob grubundan elde edilen karaciğer örneklerinde düzeni bozulmuş hepatosit kordonları ve bu kordonlarda yer alan hücreler arasındaki bağlantı kayıpları.....	61
4.24. Ob grubunda normal boyutlu ve boyanmış hücreler arasında piknotik çekirdekleri ve eozinofil sitoplâzmaları ile hasara uğramış hücreler....	62
4.25. Ob grubunda piknotik çekirdekleri ve eozinofil sitoplazmaları ile hasara uğramış hücreler.....	63

4.26. Ob grubunda sitoplazma açısından fakir, glikojen içeriği artmış (kaballaşmış) ve sınırsızları düzensizleşmiş hücreler.....	64
4.27. Ob grubunda nekrotik odaklar oldukları düşünülen alanlar.....	65
4.28. Ob grubundaki hepatositlerde hücre içi yağ damlacıkları.....	66
4.29. Kontrol grubuna göre daha sık, iri ve lipofuksin pigmentleri açısından zengin Kupffer hücreleri.....	67
4.30. Ob grubunda portal ven içerisinde inflamatuvar hücreler.....	68
4.31. Ob grubunda portal ven etrafında inflamatuvar hücreler.....	68
4.32. Ob grubunda sinüzoidler içerisinde inflamatuvar hücreler.....	69
4.33. Ob grubunda portal ven dalı içerisinde birbirine ve damar duvarına oldukça yakın konumlu kan hücreleri.....	70
4.34. Ob grubunda, damar duvarında bulunan sitoplazmasını artırarak irileşen endotel hücreleri.....	71
4.35. Kont grubunda böbrek üstü bezinin ışık mikroskopik görüntüsü.....	72
4.36. Kont grubunda böbrek üstü bezinde zona glomeruloza tabakasının ışık mikroskopik görüntüsü.....	73
4.37. Kont grubunda böbrek üstü bezinde zona fasikülata tabakasının ışık mikroskopik görüntüsü.....	74
4.38. Kont grubunda böbrek üstü bezinde zona retikularis tabakasının ışık mikroskopik görüntüsü.....	75
4.39. Kont grubunda böbrek üstü bezinde medullanın ışık mikroskopik görüntüsü.....	76
4.40. Ob grubunda böbrek üstü bezinin ışık mikroskopik görüntüsü.....	77
4.41. Ob grubunda kapsülün hemen altında görünen aksesuar böbreküstü bezi.....	78
4.42. Ob grubunda, kalınlaşan kapsül genişleyen kapillerler, irileşerek steroid içeriği artmış zona fasikülata hücreleri (ok) ve hücreler arasında makrofaj.....	79
4.43. Ob grubunda zona fasikülata tabakasında iri ve steroid içeriği artmış hücreler arasındaki eozinofil sitoplazmaları ile bu tabakaya yeni katıldıkları düşünülen hücreler.....	80
4.44. Ob grubunda zona fasikülata da yağlı dejenerasyon ve nekroz odakları.....	81
4.45. Ob grubunda z.retikulariste inflamatuvar hücre infiltrasyonu.....	82
4.46. Ob grubunda medullada dilate damar dalları.....	83

4.47. Ob grubunda medulladaki damarlarda bulunan çok sayıda kan hücresi ve fibrin birikimi.....	84
4.48. Medullada sağlıklı gangliyon hücrelerinin yanında çekirdeği seçilemeyen küçülmüş ve eozinofil sitoplazmalı gangliyon hücreleri ve medullada hücre sınırları tam olarak seçilemeyen alanlar.....	85
4.49. Kontrol ve Ob gruplarındaki her tarafsız alan (2 cm <sup>2</sup> ) başına düşen ortalama HMGB1 pozitif hepatosit sayısı.....	86
4.50. Kontrol grubunda karaciğer santral ven etrafında HMGB1 proteini açısından pozitif boyanma olmaması.....	87
4.51. Kontrol grubunda karaciğer portal alan etrafında HMGB1 proteini açısından pozitif boyanma olmaması.....	87
4.52. Kontrol grubunda karaciğer zon 2 hepatositlerinde HMGB1 proteini açısından pozitif boyanma olmaması.....	88
4.53. Ob grubunda karaciğer santral ven etrafında HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma.....	89
4.54. Ob grubunda karaciğer portal alan etrafında HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma.....	90
4.55. Ob grubunda karaciğer zon 2 bölgesinde yer alan hepatositlerde HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma.....	91
4.56. Kontrol ve Ob gruplarındaki her tarafsız alan (2 cm <sup>2</sup> ) başına düşen ortalama HMGB1 pozitif hepatosit sayısı.....	92
4.57. Kont grubunda böbreküstü bezi medullasında HMGB1 proteini açısından herhangi bir pozitif boyanma görülmemesi.....	93
4.58. Ob grubunda böbreküstü bezi medullasında HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma görülmesi.....	94
4.59. Ob grubunda böbreküstü bezi medullasındaki sinir liflerinde (okbaşı) ve makrofajlarda (daire içinde) HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma.....	95

## 1. GİRİŞ

Kronik bir hastalık olarak tanımlanan obezite besin yoluyla alınan enerjinin harcanandan fazla olması ve vücuttaki yağ kitlesinin artması ile kendini gösterir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından en riskli on hastalıktan biri olarak tanımlanan obezite neredeyse vücuttaki tüm sistem ve organları etkiler (1).

Dünya Sağlık Örgütüne göre küresel bir epidemi olan obezite görülme oranı ülkemizde de oldukça fazladır. Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması (TURDEP) I ve TURDEP II çalışmalarına göre obezite sıklığı toplumumuzun 1/3'ünden fazlasını etkilemekte ve yaygınlığı artmaya devam etmektedir (2).

Obezitenin karaciğerde non alkolik yağlı karaciğer hastalığına (NAFLD) neden olduğu bilinmektedir (3). Yine obez bireylerde artan steroid sentezi de obezitenin böbreküstü bezi üzerinde de etkileri olabileceğini göstermektedir (4).

Bununla birlikte bu etkilerin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Elektroforetik hareket hızlarının yüksek olmasından dolayı yüksek hızlı grup (high mobility group (HMG)) olarak adlandırılan non-histon nükleer protein grubunun en bol bulunan üyesi olan HMGB1, hücre içinde hücrenin stres cevabının koordinasyonunda, hücre dışında ise inflamasyon ve immün cevabın yönetilmesinde rol oynar (5). HMGB1 proteinin obezite patogenezi ile olan ilişkisi de tam olarak belirlenmemiştir.

Bu çalışmada obezitenin karaciğer ve böbreküstü bezinde yaptığı değişiklikler ve HMGB1'in bu değişiklikler ile olası ilişkisi stereolojik, histolojik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal olarak araştırıldı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 OBEZİTE

#### 2.1.1 Obezitenin Tanımı

Besin yolu ile alınan enerjinin harcanandan fazla olması sonucu vücuttaki yağ kitlesinin artması ile ortaya çıkan obezite kronik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (6). Enerji tüketiminin hücresel boyutları, besin biyoyararlanımı, besinlerin depo edilmesi ve mobilizasyonu ile besinlerin utilizasyonunun hepsi feedback kontrol sistemi olarak nitelendirilen mekanizmalarla yönetilmektedir. Bu güne kadar tespit edilebilmiş, yeme davranışını yöneten sistemlerin çoğu enerji metabolizmasına iki yönlü etki etmektedir. Vücut yağ miktarının artması sonucu, beyindeki merkezlerce iştah azaltılarak alınan besin azaltılır ve vücut yağ tüketimi artırılır. Yağ miktarı azaldığında iştah artırılarak sistem ters yönde işlettirilir. Obezitedeki patolojik temel genel manada, yağ dokusu ile beyindeki yeme davranışını kontrol eden merkezler arasındaki ileti ve bu iletileri etkileyen faktörlerdeki kusurlardan kaynaklanmaktadır denilebilir. Bunun yanında beynin iştah merkezine iletilen sinyaller içerisinde yiyeceklerden kaynaklanan direk iştah açılmasına sebep olan kısa süreli sinyaller de bulunmaktadır. Bu sinyaller anabolik ve katabolik mekanizmalara etki ederek enerjinin tüketim, alım ve yağ dokusunda depolanma dengesine etki eder. Enerjinin vücutta yağ şeklinde depolanabilmesi, ihtiyaç duyulduğu zamanlarda kullanılabilmesi açısından yaşamsal değere sahiptir. Bunun yanında enerjiyi oluşturan besin öğelerinin oranı da önemlidir. Trigliseridler, glikojen ve proteinlerden farklı olarak su ve elektrolit desteğine ihtiyaç duymadan saf yağ şeklinde depolanabilir. Enerjinin yağ dokusunda etkili bir şekilde depolanabilme özelliği nedeniyle, normal vücut ağırlığındaki bir birey açlığa yaklaşık olarak iki ay süre dayanabilir (7). Avantajlı bir durum gibi görünen yağın bu şekilde kolay depolanabilir olması, aşırı besin alımı gibi durumlarda vücutta normalden fazla birikimine ve obeziteye yol açabilmektedir.

Teknolojinin gelişmesiyle besinlerin ucuz, lezzetli, bol yağlı ve yüksek kalorili hale gelmesi sağlıklı beslenmeye bu da gereğinden fazla enerji alımına, sonuç olarak obezite prevalansının artmasına neden olmaktadır (8).

## **2.1.2 Obezitenin Patogenezi**

### **2.1.2.1 Genetik Faktörler**

Kalıtım obezite üzerinde etkilidir ancak genlerin tam olarak ne kadar katkısı olduğunu belirleyebilmek zordur. Fat mass and obesity associated (FTO), melanocortin-4 receptor (MC4R), prohormon convertase 1/3 (PCSK1), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ve peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) genlerini de içeren obezite riski oluşturan birçok gen polimorfizmi belirlenmiştir (9).

Obeziteyle ilişkili olduğu bilinen Prader-Willi ve Bardet-Biedl gibi sendromların yanında, otozomal dominant 9, otozomal resesif 10 ve X'e bağlı geçiş gösteren 5 olmak üzere toplam 24 genetik hastalık bilinmektedir(10).

Obezite oluşumunda genetik etkilerin varlığı gösterilmiştir. Hatta birey başka bir çevrede büyüye bile ailesinin vücut kitle indeksiyle korelasyonu izlenmiştir. Ayrıca metabolizma hızı, gıda biyoyararlanımı ve fiziksel aktivitelerde de vücut ağırlığı gibi kalıtsallık gözlemlenmiştir (10).

### **2.1.2.2 İnsülin direnci ve obezite**

İnsülin hormonu, iki disülfid köprüsü ile bağlanmış iki polipeptid zinciri içerir ve 51 aminoasitten oluşur. Reseptörü ise disülfid bağlarıyla bağlı 2alfa ve 2 beta alt birimi içeren heterotetramerik yapıda bir membran glikoproteinidir. İnsülin, hedef dokuya ulaşmak için pankreastan salınarak portal dolaşıma geçer. Daha sonra, karaciğere gelir ve sistemik dolaşıma katılır. Hücre düzeyindeki etkisini, hücre zarındaki reseptörüne bağlanıp içeri alınarak gösterir. İnsülinin genel etkileri: Karaciğer (KC) glukoneogenezini ve glikojenolizini inhibe etmek, kas ve yağ dokusuna kandan glukoz girişini arttırmak (Zardaki taşıyıcı proteinleri artırır.) ve glikojen şeklinde depolanmasını sağlamaktır. İnsülin direnci durumunda kas, yağ ve KC dokusu üzerindeki bu anabolizan etkilerine karşı direnç gelişir. Bu durumu düzeltmek için pankreastan daha fazla insülin salgınır ve metabolik durum kompanse edilmeye çalışılır. Böylece kan glukoz değerleri normale indirilirken insülin değerleri normalin 1,5-2 katı arasında seyrederek (11).

### **2.1.2.3 İnsülin direnci patofizyolojisi;**

İnsülin reseptörlerinin insülin hormonuna olan duyarlılıklarının azalması sonucu ortaya çıkar. İnsülin direnci, vücudun enerji dengesindeki bozukluk sonucu meydana gelen, obezitenin yağ dokusunda hipertrofi ve hiperplazi gelişimine ve adipoz hücre disfonksiyonuna yol açması nedeniyle oluşan bir antitedir.

Pankreas, KC ve yağ dokusu beslenme sonrası alınan ihtiyaç fazlası glukoz ve yağın depo yerleridir. Trigliseritler adipoz hücrelerde yağ damlacığı olarak depolanır ve sonuçta yağ hücre hipertrofisi gelişir. Bu maruziyet dolaşımdaki serbest yağ asitlerinin artışı ile hücre disfonksiyonuna yol açan proinflamatuvar bir durum ortaya çıkarır. Bu serbest yağ asitleri iskelet kası, kalp kası ve endotelde birikerek hücrede fonksiyon bozukluğuna yol açar. İnsülin direnci; pankreas beta hücrelerinin aşırı glukoz maruziyeti sonucu apoptoza uğraması ve hepatositlerde yüksek miktarda karbonhidrat ve yağ depolanması sonucu hepatosteatoz gelişmesi nedeniyle meydana gelir. İnflamatuvar mediatörlerle birlikte oksidatif stresin de bu duruma katkı sağladığı bilinmektedir (12).

### **2.1.2.4 Adipoz hipertrofi ve hiperplazi**

Adipositlerdeki yağ birikiminin artması enerji dengesizliği sonucu ortaya çıkmaktadır. Adipositlerdeki bu birikim kendini hipertrofi ve hiperplazi ile göstermektedir. Yağ doku kitlesindeki artışın asıl nedeni hipertrofi olsa da hiperplazinin de katkısının olduğu bilinmektedir. Hiperplazi ve hipertrofiye yol açan nedenler arasında dolaşımdaki insülin ve glukokortikoidlerin yağ doku farklılaşmasını uyarması ve invitro şartlarda tümör nekrozis faktör alfa (TNF-alfa) ve insülin growth faktör (İGF-1)'in hiperplaziyi tetiklemesi sayılabilir. Hipertrofi ve hiperplazi tüm adipoz doku hücrelerinde aynı oranda görülmeyebilir. Örneğin yüksek deri altı yağ dokusunda hipertrofi ve hiperplazi aynı anda görülürken, omental yağ dokusunda hipertrofi ön plandadır. Buna dayanarak erken dönem obezitede subkutan yağ depolanmasının, geç dönem obezitede ise visceral yağ depolanmasının olduğu ileri sürülmektedir. Yine yapılan çalışmalarda monosit

kemoatraktan protein'in (MCP-1) omental dokuda subkutan dokuya göre fazla salgılandığı ve MCP-1'in insülin direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(13).

#### **2.1.2.5 Adiposit disfonksiyonu ve endoplazmik retikulum**

Obezite patofizyolojisinin temelinde lipid depolanmasındaki fazlalık nedeniyle hücre disfonksiyonuna yol açan mitokondrial ve endoplazmik retikuluma (ER) ait fonksiyon bozuklukları yatmaktadır. ER'nin protein ve lipit sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kolesterol yapımı gibi bir çok metabolik yolakta görevi vardır. mRNA'da translasyona uğrayan proteinin golgi cisimciğine verilmeden önc ER'de düzenlenmesi gerekmektedir. Proteinlerin bu hücre içi organel göçüne chaperon (refakatçi) proteinler kılavuzluk etmektedir. ER'nin lipit biyosentezindeki görevleri; fosfolipit sentezi, trigliserit depolanması ve yağ asit alımıdır. Yağ asidi sentez aktivasyonunda ER'den salınan insülin ve sterol-element bağlayıcı proteinlerin de (SREBPs) rolü vardır. Bazı hayvan modellerinde aşırı besin alımı ve adipoz doku hipertrofinine bağlı ER stresi olarak adlandırılan bir durumun geliştiği görülmüştür.

Bu durumda proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonu ve uygun bir şekilde katlanması ile yağ damlacığı oluşumu ve kolesterol algılaması inhibe olur. ER stresinin insülin direnci oluşturma mekanizması unfolded protein response (UPR) aracılığı ileidir. Aşırı besin alımında ve refakatçi protein yetersizliğinde hücre içinde anormal katlanmış proteinler birikerek hücre fonksiyonları bozar. Hücre bu durumda protein sentezini inhibe eder ve bu anormal katlanmış proteinleri hücre dışına atmaya çalışır. Eğer bu atım yeterince olmazsa hücre içi homeostazis bozularak UPR tarafından indüklenmiş apoptoz gerçekleşir. ER stresi serbest yağ asitlerinin ve inflamatuvar mediatörlerin artışıyla mitokondrial oksidatif stresi indükler.

Sonuç olarak serbest yağ asitlerinin artışı, inflamatuvar mediyatör salınımı ER stresini indüklemektedir. ER stresi oluştuğunda da, insülin direnci bu da glikoz ve lipid miktarında artışa neden olur. Böylece kısır bir döngü başlar (14).

### **2.1.2.6 Yağ Dokusu Mitokondrileri ve Oksidatif Stres**

Obezite endoplazmik retikulumda neden olduğu oksidatif stres ile meydana gelen reaktif oksidan üretimi gibi mekanizmalara benzer şekilde mitokondride de oksidan maddelerin üretimine neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROT) ile antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif strese; mitokondride artmış olan yağ asitlerinin sebep olduğu düşünülmektedir (15).

Pankreastan insülin salınımını olumsuz etkileyen ROT, hücre apoptozuna yol açar. Kronik olarak ROT üretimi, karaciğer ve kas hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyona neden olur. Bu da dokularda lipid birikimi ve insülin direncinin daha da artması sonucunu doğurur (16). Oksidatif stresi arttıran faktörlerden biri de inflamatuvar sitokinlerdir: İnsan hepatositlerinde TNF- $\alpha$ , ROT üretimini uyarmaktadır (17).

### **2.1.2.7 Adipokinler**

Adiposit disfonksiyonunu gösteren sistemik mediatörler; adipokinler, serbest yağ asitleri ve inflamatuvar mediatörlerdir. Adipositler tarafından üretilen adiponektin, leptin, rezistin ve ghrelin adipokinler arasında yer almaktadır. Bunlar; insülin direnci, aterosklerozis, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve tip II diyabet gibi obezitenin sebep olduğu patolojilerin gelişiminde enerji üretimi ve tüketimi arasındaki dengeyi etkileyerek merkezi bir rol oynarlar. Adipokinler inflamatuvar mediatör sentezini de etkilemektedirler. Mesela adiponektin, TNF- $\alpha$ 'nın hem etkisini hem de sentezini inhibe etmektedir. Leptin ve rezistin ise makrofajları uyarak TNF- $\alpha$  ve interlökin 6 (IL-6) sentezini artırır (18).

### **2.1.2.8 Leptin**

Yağ dokusunun trigliserid içeriği ve beslenme durumuna bağlı olarak yağ dokudan salgılanan bir hormon olan leptin; dolaşımda plazma proteinlerine bağlı olarak bulunur ve merkezi sinir sistemi'ne (MSS) difüzyonla girer. Hipotalamusun ventromediyal nükleusunda sitokin reseptör kinaz 2'yi (CK 2) uyarak melanosit

stimüle edici hormon ve Kokain-amfetamin regulated transkript (CART) molekülünün sentezini artırır ve tokluk hissi oluşmasını sağlar. Lipogenezi inhibe eden leptin, lipolizi stimüle eder, karaciğer, iskelet kası ve pankreasın  $\beta$  hücrelerinde hücre içi lipid düzeylerini düşürerek insülin duyarlılığını artırır. Limbik sistemden dopaminin geri alımını artırır böylece yeme isteğini baskılar. Ayrıca sempatik sinir sisteminin aktivasyonunu artırır böylelikle istirahat halindeki enerji tüketimi artar (19). Leptin sekresyonunu katekolaminler ve glukokortikoidler etkilese de ana belirleyici faktör glukoz metabolizmasıdır. Leptin konsantrasyonu besin alımını takiben artar (20). Obezlerde leptin konsantrasyonunun yüksek olması, iştah kesme ve kilo kaybettirme gibi olumlu etkilerine karşı direnç geliştiğini düşündürmektedir (19). İnflamasyonda, leptin makrofajların fagositik aktivitelerini artırır. Ayrıca T hücreleri, nötrofil, monosit ve endotelial hücrelerde de proinflamatuvar sitokin artmasına neden olur (21).

#### **2.1.2.9 TNF-alfa**

Obezite, insülin direnci ve diyabet gelişiminde rol oynayan TNF- $\alpha$ , sistemik inflamatuvar yanıtta ilk tanımlanan sitokindir. Lenfosit, monosit, yağ ve kas doku tarafından üretilebilen, TNF- $\alpha$  salınımdaki düzensizlik, obezite ilişkili metabolik sendroma yol açabilir. TNF- $\alpha$  adipositlerden serbest yağ asidi salınımını artırarak, adiponektin sentezini bloke ederek ve insülin reseptör substratın fosforilasyon aktivitesini önleyerek insülin direnci gelişimine katkıda bulunur. TNF- $\alpha$ , nükleer faktör- $\kappa\beta$ 'yi uyararak endotelial hücre ve vasküler düz kas hücrelerinden adezyon moleküllerinin salınımını artırır ve endotelial disfonksiyon gelişmesine neden olur (22).

#### **2.1.2.10 Adiponektin**

Yağ hücrelerinin farklılaşabilmesi için adiponektinin ekspresyonu ve sekresyonu gerekmektedir. Adiponektinin glikoz ve lipid metabolizması, enerji dengesi, ve antiinflamatuvar mekanizmalar üzerinde düzenleyici etkileri bulunmaktadır (23). İnsülin direnci ve obezite varlığında diğer adipokinlerin aksine adiponektinin plazma konsantrasyonu artmaz. Adiponektin seviyesi erkeklerde kadınlardan; obezlerde, Tip 2 Diyabetes Mellitus (DM) hastalarında ve koroner

arter hastalığı bulunanlarda ise sağlıklı bireylerden daha düşüktür. Adiponektin, insülin duyarlılığını artırır, lipid profilini düzenler karaciğer ve kastan kana glukoz salınımı azaltır, glukozun kullanımını ve yağ asidi oksidasyonunu uyarır (23). TNF- $\alpha$  ekspresyonunun inhibisyonu ve endotel hücrelerine monosit adezyonunun engellenmesi ile endotelde nitrikoksid üretimini arttırarak güçlü anti-inflamatuvar ve anti-aterosklerotik etki gösterir (24).

#### **2.1.2.11 Dolaşımdaki yağ asitleri**

Serbest yağ asitleri ve trigliseridlerin obeziteye bağlı dolaşımda artması (Yağ asitleri, gliserolle birleşerek triaçilgliserol oluşturur.) karaciğer, iskelet kası, kalp kası ve pankreas  $\beta$  hücrelerinde birikmesine neden olur. Bu dokuların lipid depo kapasitesi yağ dokusu kadar olmadığı için yağ asidi ve trigliserid konsantrasyonunun artmasından çok daha fazla olumsuz etkilenir. Hücre içi lipid birikimi, steatohepatit, iskelet kasının insüline duyarlılığının azalması ve hücre disfonksiyonuna neden olur.

Hayvan deneylerinde kardiyomiyositlerde, lipid birikiminin hücre hasara sebep olduğu ve ventriküler disfonksiyona yol açtığı gösterilmiştir (25). Çizgili kaslarda, serbest yağ asidinin birikmesi (Trigliserit (yağ damlacığı) olarak depolanır.) insülin reseptör substrat miktarının azalmasına ve insülin rezistansına neden olduğu bildirilmiştir. İnsülin direnci insülin miktarını, o da dolaşan serbest yağ asitlerinin artmasına ve pankreas  $\beta$  hücre disfonksiyonuna ve apoptozise neden olur. Bu durum pankreas lipotoksitesisi olarak tanımlanmaktadır (25).

#### **2.1.2.12. İnflamasyon ve obezite**

Obezitede görülen insülin direncinin nedeni olarak yağ dokusundan salınan bazı faktörler ileri sürülmüştür. Bu ürünler TNF- $\alpha$ , C reaktif protein (CRP), interlökin 6 (IL-6), interlökin 2 (IL-2), grelin, rezistin, leptin, ve adiponektin'dir (26). Genç erişkinlerde yapılan çalışmada (17-39 yaş) kilolu veya obez kişilerde düşük dereceli sistemik bir inflamasyonun varlığını düşündürecek şekilde VKİ arttıkça CRP'nin arttığı gösterilmiştir (27). Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6 karaciğerde CRP yapımını uyararak bir sitokindir.

### **2.1.2.13 Oksidatif stres ve obezite**

Oksidatif stres; oksidanların (ROT, serbest radikal ve peroksitler) zarar verici etkilerine karşı antioksidan sistemin yeterli ve dengeli bir cevap verememesi nedeniyle ortaya çıkar. Obezlerde, adipositokinin yağ dokudan düzensiz olarak üretimi oksidatif strese neden olur (28). Santral obezitesi bulunan kişilerde antioksidan seviyelerinin düşük olduğu; yine obezlerde oksidatif stres belirteçleri ve CRP'nin; VKİ, LDL ve trigliserit seviyeleri ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (29).

### **2.1.2.14 Serbest radikal oluşumunun obeziteyle ilişkisi**

#### **2.1.2.14.1 Yağ doku:**

Obezlerde adipositler tarafından salınan proinflamatuvar sitokinler, monosit ve makrofajların reaktif oksijen ve nitrojen üretmesi için güçlü bir uyarıcı görevi gördüğü ve artmış oksidatif strese neden olduğu düşünülmüştür (30).

#### **2.1.2.14.2 Yağ asit oksidasyonu**

Yağ asitlerinin mitokondri ve peroksizomlarda okside olması, karaciğerde serbest radikal üretimine sebep olmaktadır. Mitokondrideki oksidatif fosforilasyon mitokondriyal DNA'da değişikliklere bu da ATP'de azalmaya veya yapısında anormalliklerle yol açmaktadır (30).

#### **2.1.2.14.3 Aşırı oksijen tüketimi**

Obezlerde meydana gelen kilo artışı, vücudun mekanik yükünü arttırmakta bu durum kalbin iş yükü ve miyokardiyal metabolizmada artışa bu da oksijen tüketiminde artmaya neden olmaktadır. Bu artış mitokondriyal solunumda ROT ( süperoksit,  $(OH^-)$  hidroksil radikali ve  $(H_2O_2^-)$  hidrojen peroksit ) artmasına yol açar (31).

#### **2.1.2.14.4 Hücre hasarı yükü**

Obezitede yağın artması ve hücre içinde birikmesi hücre içinde hasara neden olmaktadır. Hücre hasarı ise bazı sitokinlerin artmasına (TNF- $\alpha$  vb) ve dokuda ROT üretimi ile yağların peroksidasyonunda artmaya neden olur (31).

#### **2.1.2.14.5 Diyetin tipi**

Diyetin içeriğinin de obezlerde ROT oluşumuna etki edebileceği düşünülmektedir. Yağ içeriği yüksek bir diyet ile beslenme oksijen metabolizmasını etkileyebilir. Eğer oluşan ROT hücrenin antioksidan kapasitesini aşar ise lipid peroksidasyonuna ve ateroskleroz gelişimine sebep olabilir (31).

#### **2.1.2.14.6 Mitokondrilerin rolü**

Hücrede gerçekleşen faaliyetler için enerji ihtiyacını karşılayan mitokondriler apoptozda hayati rol oynar. Obezite, ROT üretimini ve oksidatif stresi artırarak mitokondriyal metabolizmayı etkilemektedir. Ayrıca trigliserid seviyesinin artması mitokondriyal solunum zincirini etkilemekte, süperoksid üretimi artmakta ve adenin nükleotidlerin translokasyonu inhibe olmaktadır (32).

Oksidatif fosforilasyon mitokondriyal süreçte çok etkin olsa da erken dönemde elektronların ancak küçük bir yüzdesi serbest radikal oluşumuna ve mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına sebep olabilir. Proteinlerin yeniden mitokondri matriksine girmesine aracılık eden uncoupling proteinler (UCP), sahip oldukları aminoasit dizeleri sayesinde potansiyel mitokondriyal taşıyıcıları tespit edebilirler. Memeli mitokondrisi için üç çeşiti tanımlanmıştır: UCP-1, UCP-2 ve UCP-3. Kilo kontrolünden sorumlu olan protein UCP-1 dir. İnsanlarda sadece iskelet kasında bulunan UCP-3, mitokondriyi lipotoksik etkilerden korur (32). UCP-2, ATP sentezi ve yağ asidi metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynar. Bu sayede ROT sentezini kontrol eder (33).

Obezitenin kronik bir hal alması, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi enzimlerin aktivitesinde azalmaya bu da antioksidan kaynakların yetersizliğine yol açabilir (34).

## **2.2 HMGB1**

### **2.2.1 HMGB1'in Yapısı**

Bir çok hastalık ve bozukluğun patogenezi incelendiğinde temelde; kromozomal instabilite, yanlış differansiasyon, zamanından önce ölüme neden olan ve çevresel faktörler olarak bilinen kompleks fizyolojik ve genetik varyasyonların rol oynadığı görülür. Bu süreçlerin moleküler temelini anlaşılmaması

yeni tanısal biyomarkırlar ve tedavi hedeflerinin keşfedilmesine olanak sağlayacaktır. 1973'te elektroforetik hareket hızlarının yüksek olmasından dolayı high-mobility group (HMG) olarak adlandırılan non-histon nükleer proteinler keşfedildi. HMG protein ailesi HMGB, HMGN ve HMGA denen üç üst gruptan oluşur. High-mobility group box 1 (HMGB1) en bol bulunan ve en çok çalışılan proteindir. Hücrenin stres cevabının koordinasyonunda; sadece kromozom koruyucusu, DNA refakatçisi, otofaji sürdürücüsü ve apoptotik hücre ölümünü önleyici gibi hücre içi fonksiyonlar değil, hücre dışında da damage associated molecular pattern (hasar ilişkili moleküler model) (DAMP) prototipi olarak kritik rol oynar. Bu DAMP diğer faktörler ile etkileşime geçer böylece sitokin, kemokin ve büyüme faktörü aktivitesi kazanarak inflamasyon ve immün cevabı yönetir. Bütün bu karakteristik özellikler HMGB1'i, infeksiyon hastalıkları, iskemi, immün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar ve kanser için kritik moleküler hedef haline getirmektedir (5).

Ekstrasellüler HMGB1 uyarılmış immün hücrelerin hasarlı dokuları tanınması ve onarım cevabının başlaması için optimal nekrotik belirteçtir. Ekstrasellüler HMGB1 aynı zamanda hem inflamatuvar hem de enfeksiyon hastalıklarında güçlü bir proinflamatuvar gibi davranır. Son yıllarda artan sayıda çalışma deneysel iskemi reperfüzyon hasarında, akut respiratuvar distress sendromunda, romatoid artrit, sepsis ve kanserde terapötik başarı için hedef olarak kullanılabileceğini göstermiştir (35). HMGB1, immün ve inflamatuvar yanıtı düzenlemek için nekrotik hücrelerden pasif şekilde; bazı hücrelerden (makrofaj, monosit, dendritik hücre, nötrofil ve natural killer dahil uyarılmış immün hücrelerden) ise aktif şekilde salgılanır. Her iki durumda da ekstrasellüler HMGB1 miktarı büyük oranda artar. Nekrotik hücrelere göre apoptotik hücrelerden HMGB1 salınımı daha az olsa da makrofajlar tarafından salınımları anlamlı derecede fazladır (36).

HMGB1 fazla miktarda eksprese edilen ve hemen hemen tüm insan hücrelerinde bulunan HmG\_box ailesinin bir üyesidir. Başlangıçta DNA bağlayıcı ve bükücü fonksiyonları ile bir nükleer yapı proteini olarak bilinen HMGB1'in son yıllarda hücresel replikasyonda, transkripsiyonda, rekombinasyonda ve DNA tamirinde bir şaperon olarak rol oynadığı ortaya çıktı. Bununla birlikte son yıllarda

sadece kendi nükleer ve hücre içi fonksiyonları değil aynı zamanda bağışıklık sistemi, otoimmün hastalık, inflamasyon, doku homeostazı ve multiple ekstrasellüler etkileşimleri de ilgi odağı haline gelmeye başlamıştır. Ekstrasellüler HMGB1 düzeylerinin ve immün cevap ve hastalıkların şiddeti ile korelasyon göstermesi tanı, hastalık izleme ve tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi için HMGB1'in kullanılabilceğini düşündürmüştür (37).

HMGB1 A-box ve B- box olarak adlandırılan 2 DNA bağlayıcı alt birimden oluşur ve negatif yüklü asidik kuyruk özel hücre içi ve moleküller arası etkileşimler için gereklidir, örneğin histon veya nükleozom (38-40). HMGB1'in iki kutusu non-sekans bağımlı olarak bağlanır, fakat ters dönmüş, bükülmüş ve kıvrılmış DNA'ya özel bir afinitesi vardır ve katlanma ya da sarmalı açma gibi yapısal modülasyonları indükleyebilir (39-41). A-box'ın proinflamatuvar döngüyü doğurduğundan şüphe edilir, sadece B-box'ın CpG-A- oligodeoksinükleotidler (ODNs) ile immün aktivite kompleksi oluşturduğu gösterilmiştir (42, 43).

HMGB1'in genetik sekansı 13q12 kromozomu üzerinde yer almaktadır ve yaklaşık 25 kD molekül ağırlığı ile sonuçlanan, 214-216 amino asit için kodlanan, yaklaşık 10,000 baz çiftinden oluşur (44). Bu iki kutunun tersiyer yapısı, iyi bilinmesine rağmen, HMGB1'in yapısının tam olarak anlaşılması çok sayıda olası yapıya yol açan birçok etkileşimler için gerekli olan esneklik ve değişkenlik nedeniyle zordur (45). Ekspresyonu hücre ölümünde ve tümör büyümesinde önemli rolleri olduğu bilinen p53 ve c-myc gibi çok sayıda farklı ekspresyon faktörleri tarafından düzenlenir (46, 47). Post-translasyonel asetilasyon, fosforilasyon veya metilasyonu nükleer aktivasyona ve çeşitli hücre bölmelerine dağıtımına neden olur (48, 49). Yüksek hücre içi HMGB1 seviyelerinin gözlenmesinden dolayı (çoğu hücrede yaklaşık 1 milyon kopya) başlangıçta bir referans gen olarak kabul edildi ancak ekspresyonunun hücre tipleri arasında ve hücre içerisinde çok değişken olduğu gözlemlendi (50, 51). HMGB1'in hücre içi konsantrasyonu farklı dokularda 100 kata kadar değişen oranlarda değişkenlik gösterir. Dedifferansiye malign dokular için mükemmel bir belirteç olabileceği düşünülen HMGB1 İlginç bir şekilde diferansiyasyon ile negatif korelasyon gösterir (52).

## 2.2.2 HMGB1'in Görevleri

HMGB1'in fonksiyonları hücre içi ve hücre dışı olmak üzere ikiye ayrılabilir. Bir çok fonksiyonunu membran bağımlı son ürünlerin ileri glikasyonu reseptörünü (receptor for advanced glycation end products (RAGE) aktive ederek gösterir (37).

### 2.2.2.1 İntrasellüler Fonksiyonları

HMGB1'in intrasellüler fonksiyonları nükleer kompartman içinde DNA bağlayıcı ve katlayıcı refakatçisi gibidir. Yani transkripsiyon, rekombinasyon, replikasyon ve tamir gibi temel nükleer süreçlere aracılık eder. Kromatin katlama gibi intrinsik fonksiyonları sayesinde HMGB; düzenleyici sekansların mesafelerini daraltabilir ve transkripsiyon faktörlerinin genin ana promotorlerine bağlanmasını artırır (53). HMGB1'in karakteristik aminoasit sekansı olan C terminal kuyruğu, transkripsiyonun uyarılmasında majör rolü oynuyor gibi görünmektedir (40). Kuyruk genel olarak düzenleyici fonksiyonlara sahip olsa da Stros ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kuyruksuz modifiye HMGB1'e göre normal HMGB1 ile etkileşime girdiğinde (promote edildiğinde) topoisomerez II geni daha düşük aktivite göstermiştir (54). HMGB1 bir çok sekans spesifik proteinin DNA'ya bağlanma affinitesini artırır (53). Nükleosomlara direkt bağlanarak transkripsiyonu veya TATA-box kompleks proteinlerinin etkileşimini aktive eder(54, 55). HMGB1'den etkilenen transkripsiyon faktörlerinin arasında tümör baskılayıcı faktörler p53 veya p73 ve NF-kB bulunmaktadır (56-58). HMGB1 in protein-protein etkileşimi ile doz bağımlı olarak HOX-proteinlerini etkilediği gösterilmiştir(59). HMGB1'in retinoblastoma proteinlerine bağlanması hücre büyümesinin baskılanması sonucunu doğurur (60).

Parvovirüslerin replikasyonu için HMGB1 rolling-hairpin (bukletli saç tokası) olarak adlandırılan replikasyon orijini için güçlü bir kofaktördür (61). Bununla beraber HMGB1 nativ proteini asetilasyon, fosforilasyon ya da C terminal ucun eliminasyonu ile modifiye edilmezse invitro olarak replikasyon üzerinde inhibitör etkiye sahiptir (62).

Katlanmış ya da ters dönmüş DNA için HMGB1, kromatin yapı hasarının tespit (çift iplik kırıkları) ve düzeltilmesinde (histon deasetilasyonuna direkt etkisi gibi) özellikli bir aktiviteye sahiptir (63, 64).

Nükleozom kayması hasarlanmış DNA bölgelerinin kromatin remodeling faktörler ve onarım proteinleri için ilerlemesini sağladığından, DNA onarımı için önemli bir olaydır. Kayma, hasarlı bölgeyi faktörlere ve onarım proteinlerine doğru iletir. Dahası, HMGB1 ters dönmüş çengelli (kancalı, bağlanmış) DNA'ya daha yüksek bir affinite ile bağlanan ana tamir proteinlerinin DNA hasarını tanımasını kolaylaştırabilir (65). HMGB1in tamir proteinlerine kompleks bir şekilde bağlanması nükleotid eksizyon tamir (nucleotid excision repair (NER)) proteinlerinin koordinasyonu ve indüksiyonunu sağlayarak nükleotid eksizyon onarımını arttırdığı gösterilmiştir (65-67). HMGB1 genomik stabilitenin devamı ya da kaybında da önemli bir rol oynar. Enzim korelasyonu ile protein aktivasyonunu sağlayarak temel eksizyon onarımında modifikasyon yoluyla bunu yapar. İntermediate DNA yapılarının stabilizasyonu ya da CAG kodonlarının tekrarları tümör hücrelerinin gelişimi ya da nörodejeneratif süreçlerin gelişimine sebep olurken seçkin long-patch base excision repair'in (BER) stimülasyonu genomik yapının stabilizasyonunu sağlar (65). Pankreas spesifik HMGB1 eksik fare modeli ile yapılan çalışmada intrasellüler HMGB1'in nükleer hasarı sınırladığı ve nükleozomu serbestleştirdiği bununla birlikte akut pankreatitin klinik semptomlarını hafiflettiği gösterilmiştir (68). HMGB1'in total yokluğunun olduğu fare çalışmasında, HMGB1'in nükleer homeostazis ve stres cevabının indüklenmesi (otofaji gibi) için hayati önem taşıdığı gösterilmiştir (69).

Apopitoz ya da otofajinin düzenleyici mekanizmalarından birisi de sitozolik HMGB1'in otofajik proteinleri olan beclin 1 ve ATG 5 proteinlerini calpain aracılıklı yarıklanma ve parçalanmadan koruyarak, proapoptotik fragmanların oluşumunu inhibe etmesidir (70). HMGB1 in nükleustan sitozole olan translokasyonu çeşitli sinyallerle indüklenir; alkilasyona uğramış DNA hasarı, aktive olmuş poli(ADP)-riboz polimeraz (PARP-1), insan dendritik hücrelerinin dang ateşi virüsü ile enfeksiyonu ya da alveoler makrofajın içindeki FIP200, otofaji başlatan bir protein ya da psödomonas auroginosa enfeksiyonu sonrası (71-73). Aktive monositlerde

sitozolik HMGB1 asetilasyona ve fosforilasyona uğrar ve nüklusa geri alınmasının inhibe olmasıyla sitoplazmik birikim meydana gelir (74, 75).

### **2.2.2.2 HMGB1'in Hücresel Salınımı**

HMGB1 hasarlanmış veya nekrotik hücrelerden pasif şekilde; immün hücreler veya hipoksi altındaki hücrelerden aktif şekilde salınır (76). Bazı hücre tiplerinde nekroz belirtisi olmadan apoptotik hücrelerden HMGB1 salgılanabilir (77, 78). Ölmekte olan hücrelerde otofajinin durdurulması HMGB1 retansiyonuna neden olur (79). Apoptoz sırasında HMGB1 nükleer DNA'yla yakın bağlantıda durur böylece nükleozom kompleksleri ile salınır. Bu kompleks TLR-2 reseptörüne bağlanarak aktive ettiğinde immünojenik fonksiyonlar gösterir (77, 80). TNF, interlökinler, endotoksinler veya apoptotik hücreler tarafından uyarıldıktan sonra makrofajlar, aktif olarak HMGB1 salgılar (81, 82). Dendritik hücreler ve bazı diğer immün düzenleyici hücreler tarafından HMGB1 salgılanmadan önce veziküller içerisine taşınır (83). Hipoksik hepatositlerde HMGB1 sekresyonunun TLR-4 ve kalsiyum/kalmodulin bağımlı kinazın inhibisyonunu içeren ROS-bağımlı yol tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (84).

### **2.2.2.3 Ekstrasellüler Fonksiyonları**

Öncelikle HMGB1 ekstrasellüler boşlukta birçok reseptöre bağlanabilir ve fonksiyonunu bir DAMP olarak gösterir. HMGB1 ilk tanımlanmış ve en çok bilinen reseptörü olan RAGE'ye bağlanarak, RAS-RAF-MAP veya Rb2F gibi hücre siklüsünde ve transkripsiyonunda önemli rolü olan birçok sinyal yolağını aktive edebilir (85). Jak/STAT ve Rho GTP az yolak indüksiyon ilişkisine dair de birçok rapor vardır (86, 87). HMGB1 –RAGE sinerjistik etkisinin aynı zamanda immatür dendritik hücrelerin, TH1 tip hücrelerin gelişiminin düzenlendiği lenf nodlarına göçünde de önemli olduğu gösterilmiştir (88). RAGE bağımlı TNF- $\alpha$  salınım aktivasyonu ile HMGB1 e benzeyen DAMP lar ve nükleozom kompleksleri makrofaj sağkalımını sınırladığı gösterilmiştir (89). TLR-9 ile tek iplikli oligonükleotid RAGE'sinin etkileşimi CpG-ODN ile HMGB1 arasında kompleks oluşturur, bu da CpG-ODN'nin TLR-9'a karşı artmış prezentasyonuna ve MyD88 bağımlı yolla artmış sitokin üretimine yol açar (43, 90). Dahası HMGB1'in TLR-2

ve TLR-4 bağı ile RAGE'nin etkileşime geçmesi p53-MDM yolağını aktive eder ve aktivasyonun üç farklı reseptör bağımlı yolağı arasında manifold etkileşimi vardır (85). RAGE böylelikle basit bir reseptörden ziyade bir çeşit adaptör görevi görür (91). IL-1 ve CD24 gibi TLR-2, TLR-4 ve TLR-9 da HMGB1 in immünojenik fonksiyonunda önemli bağlayıcı partnerlerdir. HMGB1in nükleozomlarla kompleksi TLR-2 bağlanmasını aktive eder. IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-10 gibi proinflamatuvar sitokinlerin artmasına öncülük eder ve aynı zamanda MHC Class II, TNF- $\alpha$ , kostimülatör CD 86 ve DC matürasyon faktörü CD 83'ünde ekspresyonunu artırır. HMGB1 ve nükleozom kompleksinin salınımı apopitozda ve sekonder nekrozda daha da artar ki bu durumda HMGB1 kromatine sıkıca bağlıdır. Aksine nekrotik hücrelerden elde edilen HMGB1 hızlıca kromatinden ayrılır ve tek başına DAMP olarak davranır (92).

TLR 4 aktivasyonu iki farklı mekanizma ile olur. İlki HMGB1 in tek başına aktivasyonu veya dendritik hücrelerde (DC), HMGB1 ve TLR-4 etkileşiminin fagozom ve lizozom birleşimlerinde antijen yıkımının inhibisyonu ve sunumunun aktivasyonunun sağlanması ile olur (93). Diğer taraftan HMGB1 lipopolisakkaritlerin birleşme ve ayrılma kümelerinde gösterilmiştir. Buradaki HMGB1 CD14'lerle lipopolisakkaritlerin kompleks bağlanmalarına öncülük eder. Bu da HMGB1'in veya yalnızca lipopolisakkaritlerin tek başına stimülasyonuna kıyasla daha yüksek TNF- $\alpha$  seviyelerinin ölçülebilmesine yol açar (94). Her ne kadar intrasellüler mekanizmalar aynı gibi görünse de LPS/CD14 kompleksleri makrofajlardaki lizozom ve fagozom füzyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır (95).

HMGB1/RAGE/CpG-ODN aracılığıyla TLR-9/CpG-ODN tarafından indüklenmiş sitokin üretiminden anlatılanların dışında HMGB1 IL-1 $\beta$ 'ya bağlanarak IL-1 reseptör aktivasyonunu artırır (96). Hepatosellüler kanserde HMGB1 hipoksik hücrelerden salınan mitokondriyal DNA ya bağlanır ve TLR-9 aktivasyonu ile tümör hücre büyümesini artırır (97). Genelde HMGB1 proinflamatuvar ko-moleküllerle kompleks olarak bağlı olduğunda immün cevabı artırıyor görünse de tek başına iken tam tersine immün cevabı azaltır ve doku tamir sürecini hızlandırır (98). Böyle konak koruyucu fonksiyonlar CD 4 Siglec G yolağının HMGB1 bağımlı aktivasyonu aracılığıyla olan DAMP ve PAMP ların ilerlemiş ayrımlarında görülebilir (99). Etkilenen sıvılardaki HMGB1 in varlığına

bağlı olarak tanımlanmış olan bir mikro-RNA (miR-34c) periferik kan mononükleer hücrelerinde değişken seviyelerde ortaya çıkar. Daha ileri bulgular özellikle PAMPların etkisiyle ortaya çıkan diğer mikro RNA ların aksine miR-34c lerin DAMPlara cevap olarak inflamazom aktivasyonunu sağladığını öne sürmektedir (100). Lupus nefritinde sadece ekstra sellüler HMGB1 in self- DNA nın endozomlarda kümeleşmesini sağlayarak ve TLR -9 u aktive ederek patolojik immün cevabı (makrofaj aktivasyonunu) tetiklediği gösterilmiştir (101).

### **2.2.3 Malign Hastalıklardaki Rolü**

HMGB1 tümör gelişimi ve kanser oluşumu üzerindeki etkileri hem prokanserojenik hem de anti kanserojenik olarak düşünülebilir. Hanahan ve Weinberg sınırsız replikatif potansiyel için 6 kanser işareti olduğunu vurgulamaktadır. Bunlar; programlı hücre ölümünden (apoptoz) kaçma, kendi büyüme sinyallerini oluşturma, büyüme inhibitörlerine duyarsızlık, anjiyogenez yeteneği, doku invazyonu ve metastaz (102, 103). Bunlara ek olarak hücreler enerjiyi sınırları kaldırmak, immün yıkımdan kaçınmak, genom instabilitesi ve mutasyon ve tümör uyarıcı inflamasyon da kanseri tetikler (104). HMGB1'in tüm bu protümörojenik süreçlere dahil olması çok ilgi çekici bir olaydır.

### **2.3.1 Sınırsız Replikatif Potansiyel**

Telomerler her mitozda kısaldığı için ve maksimum mitoz sayısı hücre ömrünü kısıtladığı için ökaryot hücrelerde telomer uzunluğu replikatif potansiyel için kısıtlayıcı bir faktördür. Malign doku gelişiminde telomer uzama mekanizması ile bu kontrol prosesi devre dışı bırakılır (105). Yukarıda da bahsedildiği gibi HMGB1'in katlanmış ve kıvrılmış DNA üzerinde yüksek affinitesi vardır. Aynı zamanda parvovirüs telomerinin üzerindeki çengelli iğne yapısı ile de etkileşimde olduğu gösterilmiştir (61).

### **2.2.3.2 Genom İnstabilitesi ve Mutasyon**

DNA'yı modüle edici bir refakatçi olan HMGB1, bir başka kanser işareti olan genom instabilitesi ve mutasyonu etkileyebilir. HMGB1'in fizyolojik fonksiyonu genomik stabilitenin devamı için tamir mekanizmasını içerirken

yokluğu genomik instabiliteye yol açar (65, 106). Dahası HMGB1 topoizomeraz 2 α'nın etkisini ve onun DNA replikasyonundaki aktivitesini artırır. Bu etki üzerinde retinoblastom geninin (Rb) düzenleyici etkisi vardır (54). Bununla birlikte diğer çalışmalar Hmgb 'in belli durumlarda nükleotid eksizyon tamirini inhibe ettiğini, tek zincir kırıklarını arttırdığını, CAG trinükleotid tekrarlarını arttırdığını ve genomik insrabiliteye neden olduğunu ifade etmektedir (65, 107). HMGB1'in rolünün iki taraflı ve daha fazla çalışılmaya muhtaç olduğu anlaşılmaktadır.

### **2.2.3.3 Apoptozdan Kaçış**

Hasarlı ve mutant hücrelerin apoptoz ile yıkımda hedef olduğu gibi apoptozdan kaçış ta tümör gelişimi için önemli bir basamaktır. Kontakt inhibisyonu da içeren apoptotik mekanizmaların geç yıkımı bile tümör gelişiminde önemli bir faktördür. HMGB1in mantar hücrelerinin apoptozunun BAK spesifik indüksiyonunu inhibe ettiği ve ultraviyole radyasyon ve hücre ölüm mediyatörleri olan CD95, TRAIL, Cas-8 ve Bax tarafından indüklenmiş memeli hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (108). HMGB1in indirgenmiş formu merkezi rol oynar. İndirgenmiş form malign hücrelerde apoptozun önlenmesinde gösterilmişken, okside form apoptozu arttırarak sistemik kemoterapide iyileşme cevabını arttırabilir. HMGB1in indirgenmiş formu ikiye ayrılabilir. All-thiol HMGB1kemokin aktivitesinde, disülfid HMGB1ise sitokin aktivitesinin arttırımında rol alır. Disülfid HMGB1 nükleer faktör NF-κB yolağını aktive ederken ve fibroblast ve makrofajlardaki IL-6 ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokin üretimini arttırırken, all-thiol HMGB1'de fibroblastlarda kemoatraktan aktivite gösterir (109, 110). HMGB1aynı zamanda 'indirgenme sensörü' olarak ta adlandırılır. İndirgenmiş hali onun translokasyonunu, salınımını, aktivitesini ve stres cevabının da içinde olduğu çeşitli yolaklar arasındaki kompleks etkileşimin yansımalarını da tanımlar (111).

### **2.2.3.4 Büyüme Sinyallerinin Yeterliliği**

Büyüme sinyallerindeki yeterlilik sinyal trnsdüksiyon zincirindeki mutasyonlarla, bunların çoğunda da eksternal growth faktör reseptör aktivasyonunun taklidi ile elde edilen bir malign doku karakteristirk özelliğidir

(102). HMGB1 RAGE aktivasyonu ve NF-κB aracılığıyla sinyal zincirini düzenleyici hücre büyümesi ve sağkalımında önemli olan MAP-kinazları indükler ve RAGE, TLR-2 ve TLR-4 aracılığıyla da aynı sinyal yolağının bir parçasıdır (103). Dahası kolon kanser hücrelerindeki HMGB1 tarafından aktiflenen PIP-3/Akt yolağı gibi inflamatuvar cevapla sonlanan ve malign hücrelerdeki büyüme sinyallerinin bir parçası olan HMGB1 bağımlı TLR-4/Myd 88 yolağı da MAP-kinazı ve Akt sinyal zincirlerini indükler (112).

### **2.2.3.5 Büyüme İnhibitörlerine Cevapsızlık**

Her ne kadar hücre sel büyüme sinyalleri büyümenin dış inhibitörleri tarafından etkisiz hale getiriliyorsa da bu sinyallere karşı duyarsızlık tümör dokuları için bir başka sağkalım avantajıdır. Tümör hücreleri sürekli büyümede hızlanma ile sonuçlanan G2, S ve mitoz fazlarına girer, normal hücrelerse doku homeostazisinde veya belli hücre özelleşmesine eriştiğinde nonproliferatif G0 fazına girer. İn vitro şartlarda hücreler östrojen tarafından stimüle edildiğinde MCF-7 hücrelerindeki HMGB1 aşırı etkisi hızlanmış hücre siklüs progresyonuna öncülük eder (113). Buna zıt olarak LXCXE motif bağımlı mekanizması aracılığıyla HMGB1'in antiproliferatif mediyatör Rb (Retinoblastoma protein) ile etkileşimi hücre siklüs arrestine ve apoptozuna yol açar (60). Muhtemelen indirgenmiş hali ve/veya bağlayıcı partnerleri farklı fonksiyonlarının kavşağında, karar noktalarında da önemlidir.

### **2.2.3.6 Hücre sel Enerji Kontrolünün Kısıtlayıcı Etkisinden Kurtulma**

Hızlı büyüyen tümörler çok fazal oksijen ve besin kaynağına ihtiyaç duyar. ATP üretimi için kombine oksidatif ve glikolitik mekanizma yerine anaerobik laktat üretim mekanizmasının seçilmesi yaygın olarak warburg etkisi olarak bilinir. Sonradan Yang ve arkadaşları PKM2' nin bu etkiyi düzenlediğini ve simültane olarak HMGB1 salınımını arttırdığını gösterdi (114). Dahası HMGB1/RAGE etkileşimi pankreatik tümör hücrelerinde ATP üretimini de içeren mitokondriyal fonksiyonlarda önemli rol oynar. Aynı zamanda ekstrasellüler HMGB1in mitokondriyal etkileşimde RAGE'yi arttırıcı etkisi arasında pozitif feed-back döngüsü vardır. Bu da mitokondriyal kompleks 1 aktivitesini arttırır (115). Agresif

tümörlerde ileri glikasyon ürünlerinin formasyonunu inhibe eden ve laktattaki glikozun hızlı fermentasyonuna öncülük eden transketolaza benzeyen bir enzim olan transketolaz like 1 keşfedildi ki bu enzim RAGE'nin affinite gösterdiği ligandlardır (116).

### **2.2.3.7 Anjiyogenez**

Tüm tümör içi metabolik değişikliklere rağmen tümörü çevreleyen damarsal yapı oksijen ve besin kaynakları açısından yetersizse, tümör belli bir boyuta ulaşıp durur. Diffüzyon hücre metabolizmasını devam ettiremediğinde tümörün merkez bünyesinde nekroz meydana gelir ve bu hipoksik bölgelerden VEGF'e benzeyen anjiyogenetik growth faktörler salınır. VEGF aracılığıyla makrofajların aktivasyonu HMGB1'e benzeyen anjiyogenetik sitokinlerin daha fazla salınımına yol açar. İn vitro şartlarda bu durumun endotelial filizlenmeyi arttırdığı gösterilmiştir (117). TLR-4 aracılığıyla HMGB1 korneal neovaskülarizasyonu indükleyebilir (118). HMGB1 salınımı ile HMGB1 tarafından aktiflenmiş çeşitli proinflamatuvar sinyal zincirleri arasında kronik inflamasyonla ve artmış anjiyogenezle sonuçlanan bir pozitif feedback mekanizması bile olabilir (119). HMGB1 sadece anjiyogenezi desteklemez. Aynı zamanda lenfatik metastaz ile de ilişkili olabilecek şekilde invitro şartlarda doz bağımlı lenfatik damar filizlenmesini indüklediği de gösterilmiştir (120).

### **2.2.3.8 Metastaz ve Doku İnvazyonu**

HMGB1 ve RAGE'nin metastaz ve doku invazyonu ile çok güçlü ilişkisi vardır. Gastrik kanser dokusunun diferansiye hücrelerinde RAGE tercihen daha az eksprese edilir ve RAGE immün reaktivitesi aynı zamanda lenf nodu metastazı ve doku invazyonu ile koreledir. RAGE pozitif kanser hücreleri temel olarak tüm lenfatik metastazlarda ve aktif invazyon bölgelerinde konumlanır (121). TIAM 1 (T lenfoma invazyon ve metastaz 1) bir guanin nükleotid değişim faktör aktive edici RAC'ı ve trophinin gibi diğer invazyon arttırıcı moleküller de artmış HMGB1 ekspresyonunu indükler (122). HMGB1'i de içeren etkili bir pozitif feedback döngüsüne örnek olarak metastazı arttırıcı faktör E-selektinin ekstrasellüler aralıkta HMGB1 salınımını arttırması E-selektin etkinliğinin artmasına öncülük

eder (123). Metastazi arttırmanın bir başka yolu da immün defansı azaltmaktır. Aslında primer tümör hücrelerinden salgılanan HMGB1 lenf nodlarındaki makrofaj sayısını ve karaciğer spesifik antijen sunucu hücreler olan Kuppfer hücrelerini azaltır (124). Buna zıt olarak invitro şartlarda HMGB1/RAGE etkileşiminin tümör hücrelerinin migrasyonunu azalttığı ve bir akciğer kanser modelinde metastazın azalmasına öncülük ettiği gösterilmiştir (125). Bu durum hem RAGE'nin farklı bağlama noktaları ile (bu vakada –COOH terminal motifi aracılığıyla) hem de belki çok spesifik ve modüle edici tümöral çevrenin insan vücudunda yokluğu ile açıklanabilir.

### **2.2.3.9 Mikroinflamatuvar Çevre**

Tümörün özel çevresi ile ilgili lokal inflamatuvar reaksiyonlar 'mikroinflamatuvar çevre' olarak adlandırıldı ve bu, kanserde büyük bir rol alan yeni bir inflamatuvar belirteç olarak kabul edildi (37). Tümör gelişiminde olduğu gibi immün cevapta da HMGB1'in çeşitli fonksiyonları vardır. Genelde HMGB1 immün sistemde çift taraflı rol oynar; inflamatuvar mikroçevre varlığında tümör gelişimini arttırırken, efektif immün tanıma malign hücrelerde etkili eliminasyon ile sonuçlanır (91).

Kronik inflamasyon tümör gelişimi için gereklidir. Çeşitli gözlemlerle desteklenmiş bir teze göre: tümörler genelde kronik inflamasyon zeminlerinden ortaya çıkar, immün hücreler neredeyse tüm kanser tiplerinde bulunur, inflamatuvar mediyatörlerin deneysel blokajı kanser gelişimini engeller ve antiinflamatuvar ilaçların kullanımının belli tümör antitelerinde riski düşürdüğü rapor edilmiştir (126).

HMGB1, bu tümör mikroçevresi için proinflamatuvar sitokinlerin ( NF- $\kappa$ B aracılığıyla) indüksiyon ve aktivasyonu ve IL-1 $\beta$  gibi sitokinlerle etkileşimi ile anjiyogenezin arttırılmasının ve metastazın da içinde olduğu birçok proinflamatuvar fonksiyonlar görür (37).

Serbest radikal salınımı ve inflamatuvar sitokinler belli bir aşamaya ulaştığında inflamatuvar çevre pozitif feedback döngüsünü devam ettirmeye eğilimlidir. Serbest radikallerin uzun dönemde varlığı ve mutajenik faktörler hücre yıkımını ve dediferansiyasyonunu indükler ve bu da malign prosesleri başlatır.

Tümör dokusu kendi kendine sitokin salınımı ve çeşitli feedback döngülerle inflamasyonu devam ettirinceye kadar tümör büyümesi çeşitli inflamatuvar mediatörlerce desteklenir (126). Kronik lenfositik lösemi (KLL) nurse like cell(NLC)'leri de içeren bir mikroçevre desteğine çok güçlü oranda bağlı bir malign hastalıktır. KLL hücrelerinden salınan ekstraselüler HMGB1'in RAGE ve TLR-9 aracılığıyla belli bir zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak NLC diferansiyasyonunu artırdığı gösterilmiştir (127).

### **2.2.3.10 İmmün Yıkımdan Kaçış**

İmmün sistemin kronik düşük dereceli lokal aktivasyonu tümör büyümesini sürdürüp desteklese de yeterli bir immün cevapla ölü hücrelerin efektif taranması tümör eliminasyonuna öncülük eder. İmmün cevabın iki farklı yolu için anahtar HMGB1 tarafından gösterilebilir; düşük konsantrasyonlarda malign dokularda molekül sürekli tespit edilirken, masif salınım sistemik kemoterapi uygulamalarından sonra rapor edilmiştir. Görceli kısa bir zaman periyodu içinde böyle yüksek HMGB1 seviyeleri istenen immün cevabın efektif aktivasyonuna öncülük eder ki bu da spesifik T hücre cevabı için antijen sunumuyla sonuçlanan dendritik hücrelerin çevrelenmiş apoptotik tümör hücrelerini yıkması anlamına gelmektedir (91, 127). HMGB1 dendritik hücrelerden derive makrofaj apoptozunu indükleyerek vücudun kansere karşı immün cevabını zayıflatıp burada da yine çift yönlü rol alır (128). Tümör hücrelerinden salınan HMGB1 regülatör T hücrelerini immünsüpresif bir interlökin olan İL-10 üretmeleri yönünde aktifleyip istenen CD-8 T hücre antitümör cevabını doğal olarak baskılayabilir (129).

Neticede HMGB1'in tümör gelişimiyle çeşitli yollarla etkileşimde olduğu açıkça gösterilmiştir. Farklı pro ve antitümörük fonksiyonların belli maddelerin kombine karışımları tarafından başlatıldığı ve kontrol edildiği ve belli miktardaki tümör hücrelerinin mevcut çevresinde sunulduğu belki de tanımlanmış bir zaman-mekansal sekansta salındığı görülüyor. Bu HMGB1 ve ATP gibi insan vücudunda sürekli ve hazır bir şekilde bulunan hücre ölüm ve immün aktivasyon mediatörleri için mantıklı bir düşüncedir. Ama sinyal zincirleri sadece gerekli olduğunda aktiflenir. Bu alanda kompleks etkileşimleri anlamak ve HMGB1'in terapötik

amaçlı kullanımının fayda sağlayıp sağlamayacağını tespiti için hala birçok araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır (37).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)) sıklıkla obezite, tip 2 diyabet, ve hiperlipidemi ile ilişkili olan yaygın ve tehlikeli bir hastalıktır (3). Hastalığın prognozunda sırası ile steatoz, hafif inflamasyon ve değişen derecelerde fibrozis izlenmektedir. Obezite ile yakın ilişkisi bilinen NAFLD siroz ve hatta hepatosellüler karsinom gelişimine dahi yol açabilecek tehlikeli ve ilerleyici bir hastalıktır (130).

Obez bireylerde vücudun kitlesinin büyümesi; adrenal hormonlar ve adipositler tarafından üretilen adipokinler arasındaki bağlantılar ile açıklanabilir. Bu nedenle böbreküstü bezi ve yağ dokusu arasındaki metabolik ilişkilerin obezite patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (4, 131).

Bütün bu sayılan nedenlerden ötürü bu çalışmada yüksek yağ içerikli diyet ile oluşturulan obezitenin karaciğer ve böbreküstü bezi üzerindeki olası etkileri ve bu etkilerde daha önce çalışılmamış bir mediatör olan HMGB1'in bir ilişkisi olup olmadığı biyokimyasal, morfolometrik, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile araştırıldı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1. Etik Kurul Onayı

Bu tezin deneysel bölümü için “Deneysel Obez Sıçanların Karaciğer Ve Böbreküstü Bezinde HMGB1 Düzeylerinin Araştırılması” başlığı ile Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hayvan Etik Kurulunca 16/37 sayılı karar ile onay alınmıştır.

### 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada 18 adet 180-200 gr ağırlığında 8 haftalık dişi sıçan (*Wistar albino*) kullanılmıştır. Çalışma boyunca tüm denekler optimum laboratuvar koşullarında ( $22 \pm 1$  °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde) ve ad libitum (isteğe bağlı) olarak beslenmiştir. Çalışmada iki ayrı grup oluşturulmuştur. Kontrol grubunda 8 obez grubunda 10 denek kullanılmıştır. Gruplara uygulanan işlemler aşağıdaki gibi özetlenmiştir:

**I. Grup (Kontrol):** Sağlıklı ve hiçbir işlem yapılmamış kontrol grubunu oluşturmaktadır. Bu grup aynı laboratuvar şartlarında 10 hafta boyunca normal ticari sıçan diyeti ile beslenme sonrası hiçbir deneysel işlem uygulanmaksızın 18 haftalık iken perfüzyonla fiksasyon sonrası sakrifiye edildi.

**II. Grup (Obez):** Bu gruptaki denekler %40 yağ içeren özel bir diyetle 10 hafta boyunca beslenmenin ardından 18 haftalık iken perfüzyonla fiksasyon sonrası sakrifiye edildi.

### 3.3. Deney Prosedürü

#### 3.3.1. Yüksek Yağ İçerikli Diyetin Hazırlanması

Fabrikadan alınan standart yem üzerinde bir dizi işlem uygulandı. Öncelikle belirlenen rasyon programına göre standart yemin karbonhidrat içeriği ile aynı miktarda karbonhidrat içeren ve yağ içeriği % 40 olan bir rasyon hazırlandı. Bu işlem için hazır olarak toz halinde satın alınan standart kanatlı yemine, yem ağırlığının %40'ı oranında yağ (kasaptan satın alınarak daha iyi karışım oluşturulabilmesi için eritilmiş iç yağ) ilave edilerek ve karışım yoğurularak katı (pelet) haline getirildi. Daha sonra bu haliyle soğumaya bırakıldı. Yüksek yağlı diyet yemin taze olması için haftalık olarak hazırlandı ve deney grubuna verildi

(132). Hayvanlar standart ve yüksek yağlı diyet ile beslenirken, su ihtiyaçları çeşme suyundan serbest olarak karşılandı.

Sıçanlar deneyin başlangıcından sonuna kadar yağlı diyetle uyum sağladı. Çalışmaya başlarken tüm sıçanlar tartıldı ve tartım işlemi, deney boyunca haftada bir olacak şekilde tekrarlandı ve excel dosyasına kaydedildi. Çalışma, gruplarda herhangi bir ölüm olmadan 18 hayvan ile 10 hafta boyunca sürdü. Deney boyunca her iki gruptaki deneklerin VKİ (vücut kitle indeksi) hesaplamaları yapılarak obez olup olmadıkları değerlendirildi (132). VKİ hesaplamasında; burun ucundan kuyruk başlangıcı arası mesafe boy olarak kabul edildi. Ölçülen ağırlık ve boy parametreleri VKİ formülü kullanılarak hesaplandı ve VKİ sonuçları 5 kg/m<sup>2</sup>'den büyük olan deneklerin obez olduğu kabul edildi (132). Bu kapsamda çalışma grubunda yeterli kilo alımı olmayan iki denek çalışma dışı bırakıldı (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Deneklerin tartımı (solda) ve anestezi uygulaması (sağda) görülmektedir.

Deney sonucunda, tüm deneklere intraperitoneal olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.) % 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) ile anestezi uygulandı. Kalbin apeksinden kan örnekleri alındı. Söz konusu kan örneklerinde Katalaz, süperoksit dismutaz, glukoz ve kolesterol düzeyi ölçümleri yapıldı. Karaciğer ve böbreküstü bezleri çıkarılarak histolojik, stereolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi.

### 3.3.2. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Deneklerin kanlarındaki katalaz enziminin aktivitesi, Aebi, (1994) metodu ile değerlendirildi. Bu yöntem, serumda bulunan CAT enziminin dışarıdan eklenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi parçalaması ile 540 nm'de zamana bağlı olarak oluşturduğu absorbansın belli aralıklarla ölçülmesi esasına dayanır. Ölçümler CAYMAN (707002; USA) katalaz seviyeleri ölçüm kiti prosedürüne göre yapıldı. İstatistiki hesaplamalar için absorbans azalmasının en fazla olduğu aralıktaki değerler kullanıldı.

#### Deneyin Yapılışı:

Deneye başlamadan önce Kit prosedürüne göre Catalase assay buffer, Catalase Sample Buffer, Catalase Formaldehyde Standart ve Catalase Control solüsyonları hazırlandı. Kite yer alan protokole göre uygulama kuyucukları; Kan serumu, formaldehit ve pozitif kontrol örnekleri ile dolduruldu. Reaksiyonu başlatmak için kuyucuklara 20 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İşlem sonunda kuyucuklara 30 µL KOH eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve her kutucuğa kromojen eklenmesi yapılarak oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Daha sonra KIO<sub>4</sub> (potasyum periyodat) eklenerek 5 dk daha inkübe edildikten sonra 540nm de spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

### 3.3.3. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini oksijen ve hidrojen peroksit haline katalize eden enzimdir. Bu nedenle, tüm hücrelerde oksijen maruziyetine karşı önemli bir antioksidan olarak savunmada görev alır. Çalışmamızda süperoksit dismutaz aktivitesini ölçmek için CAYMAN (706002, USA) kiti kullanıldı.

#### Deneyin Yapılışı:

Deneye başlanmadan önce kit içerisinde bulunan assay buffer, sample buffer, radical detector ve SOD standartları uygun dilüsyonlar ile hazırlandı. Kite yer alan protokole uygun olarak plate kuyucuklarına serum, SOD standartları eklendi. Reaksiyonu başlatan 20 µL Xanthine oksidase ilavesinin ardından plateler çalkalayıcı (Nüve, Ankara; Türkiye) üzerinde çalkalanarak içerilerindeki solüsyonların birbirleri ile iyice karışmaları sağlandı. Örnekler 20 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve 440-460 nm de spektrofotometrik ölçümleri yapıldı.

Standartlar kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinden örneklerin SOD aktivitesi hesaplandı.

### **3.3.4. Kolesterol**

Ticari kit (Cayman Kat. No: 10007640) kullanılarak spektrofotometre yardımı ile yapıldı. Oluşan bileşik 540 nm'de okundu ve kolesterol miktarı tayin edildi.

### **3.3.5. Glukoz**

Ticari kit (Cayman kat. No: 10009582) kullanılarak spektrofotometre yardımı ile yapıldı. Oluşan pembe renkli bileşik 514 nm'de okunarak glukoz miktarı tayin edildi.

## **3.4 Işık Mikroskopik İşlemler**

### **3.4.1. Parafin Kesitlerde Konvansiyonel Işık Mikroskopi**

### **3.5. Doku Takip İşlemleri:**

Alınan doku örnekleri % 4'lük formaldehit içeren şişelere konularak aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu.

#### **Akarsuda yıkama (24 saat)**

#### **Dehidratasyon işlemi:**

- %70'lik Alkolde 24 saat,
- %80'lik Alkolde 1 saat,
- %96'lık Alkolde 1 saat,
- %100'lük Alkolde 1 saat bekletildi.

#### **Şeffaflaştırma işlemi:**

- Ksilende 10 dakika,
- Ksilende 10 dakika bekletildi.

#### **İnfiltrasyon işlemi:**

- Ksilen + paraplast karışımında 60°C'lik etüvde 1 saat,
- Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 1 saat,
- Paraplast içerisinde 60°C'lik etüvde 2 saat bekletildi.

#### **Dokuların Parafin Bloklara Gömülme İşlemi:**

Dokular paraplast bloklara gömülerek kesit alınması işlemine hazır hale getirildi.

### **Blokların Kesilmesi:**

Paraplast bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT, Nussloch; Germany) ile kesilen 5 µm'lik kesitler cam lamlar üzerine alındı.

### **Kesitlerin Boyanma İşlemleri:**

Bu amaçla kesitler aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu.

Hemotoksilen–Eozin Boyama

1. Ksilol'de (20 dak.)
2. Ksilol'de (10 dak.)
3. %80'lik Alkol (10 dak.)
4. %96'lık Alkolde (5 dakx2)
5. Çeşme suyunda yıkama
6. Hematoksilen boyasında (1 dak.)
7. Asit-Alkol karışımına batırılıp çıkarma
8. Eozin solüsyonunda (1 dak.)
9. Suda (1 dak.) yıkama
10. %80'lik Alkolde (10 dak.)
11. %96'lık Alkolde (10 dakx2)
12. Ksilol'de(20 dakx3)
13. Entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi

### **3.6. İmmünohistokimyasal İşlemler:**

İmmünohistokimyasal değerlendirme için yukarıda belirtilen yöntemler ile hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler Avidin-Biotin (ABC) metodu kullanılarak Anti-HMGB1 (Abcam®, Rabbit polyclonal antibody, 1/50 dilüsyon) antikoru ile boyandı. Boyama işlemleri aşağıda özetlendiği gibi yapıldı.

1. Ksilol 4x10 dk
2. %100 Alkol 10 dk
3. %96 Alkol 10 dk
4. %80 Alkol 10 dk
5. Distile Su 2x3 dk
6. % 10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in dH<sub>2</sub>O) 20 dk

Endojen Peroksidaz aktivitesini durdurmak için uygulandı

7. PBS ile Yıkama 2x5 dk

8. Süper block 7 dk

Nonspesifik immünoreaktiviteyi ortadan kaldırmak için kullanıldı.

11. Antikor Dilüsyonu 2 saat

Anti HMGB1 antikor, antibody diliuent (Zymed) ile 1/50 oranında seyreltildi.

12. Primer antikor ile İnkübasyon 60 dk

Prepatlar nemli ortamı sağlayan bir kap içerisine yerleştirilerek +37 °C'de bekletildi ve primer antikorun bağlanması sağlandı.

13. PBS ile Yıkama 3x5 dk

14. Sekonder Antikor 30 dk

Preparatlar biotinlenmiş sekonder antikor ile oda sıcaklığında inkübe edildi.

15. PBS ile Yıkama 3x5 dk

16. Streptavidin Peroxidase 20 dk

Streptavidin-HRP ile preparatlar oda sıcaklığında inkübe edildi.

17. PBS ile Yıkama 4x1

18. Substrat-Kromojen (DAB) 30 dk

Preparatlar DAB substrat-kromojen solüsyonunda kahverengi renk alıncaya kadar tutuldu.

19. PBS ile Yıkama 3x5 dk

20. Zıt boyama

Boyama öncesinde preparatlar distile su içinde 5 dakika tutuldu. Daha sonra Mayer-Hemotoksilen ile 30 saniye zıt boyama yapıldı. (Bu işlem süresince dokular mikroskopta incelendi, eğer çekirdekler yeteri kadar mavileşmemiş ise tekrar hematoksilene alındı ya da amonyaklı suya batırılarak fazla boyanmış çekirdeklerin boyası solduruldu).

21. PBS ile yıkama 3x5 dk

22. Alkol Serilerinden Geçirilmesi

%70 Alkol 1 X 3 dk

%80 Alkol 1 X 3 dk

% 96 Alkol 2 X 3 dk

%100 Alkol 2 X 3 dk

23. Havada kurut 15-20 sn  
24. Distile su batır 2-3 sn

Su bazlı kapatma medyumundan 1 damla damlatılarak lamel ile kapama yapılır (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** İmmün boyama prosedürünün yapılışı görülmektedir.

### **3.7. Kesitlerden Görüntü Elde Edilmesi:**

İncelemeye hazır hale gelen kesitler Olympus BX 43 (Olympus, Tokyo; Japan) marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** A ve B'de sırası ile Olympus BX43 kameralı ışık mikroskobu yazılımı ile kesitlerin fotoğraflanmasına ilişkin örnek karaciğer ışık mikroskopik görüntüsü ve böbreküstü bezi seri kesitleri izlenmektedir.

### 3. 8. Stereolojik İşlemler

Bu çalışmada; karaciğer ve böbreküstü bezine ait hacim ölçümleri stereolojik olarak Cavalieri Prensibi ile yapıldı. Karaciğer için total hacim, hepatositlerin kapladığı hacim ve sinüzoidlerin kapladığı hacim değerlendirmeleri yapılırken böbreküstü bezi için total hacim, zona glomeruloza, fasikülata ve retikularis kısımlarının ve ayrıca medullanın hacimleri ayrı ayrı hesaplandı. Ek olarak karaciğerde bulunan hepatosit ve Kupffer hücrelerinin sayısı fiziksel disektör yöntemi ile stereolojik olarak hesaplandı. Bu kombinasyona göre sayı hesaplamaları için aşağıda anlatılacağı gibi belirli stratejiler belirlendi.

#### 3.8.1. Stereolojide Hacim Hesabı:

Düzgün bir şekli olan nesnelerin hacimleri (küp, silindir, prizma v.b.)  $V=t.a$  ( $V$ =Hacim,  $t$ = yükseklik,  $a$ =taban alanı) formülü ile kolayca hesaplanabilir. Hacimleri rutin aritmetik formülleri ile hesaplanmayan düzensiz şekilli yapıların hacimlerin hesaplanmasında ise **Cavalieri metodu** kullanılmaktadır. Cavalieri metodu ile düzenli bir şekli olmayan üç boyutlu biyolojik yapıların eşit kalınlıkta ve birbirine paralel dilimlerinin yüzey alanları, dilim kalınlığı ile çarpılırsa her bir dilimin hacmi bulunur. Tüm dilimlerin hacimleri birbirleriyle toplanarak yapının toplam hacmi hesaplanmış olur.

$$V=tx a/p \times \sum P$$

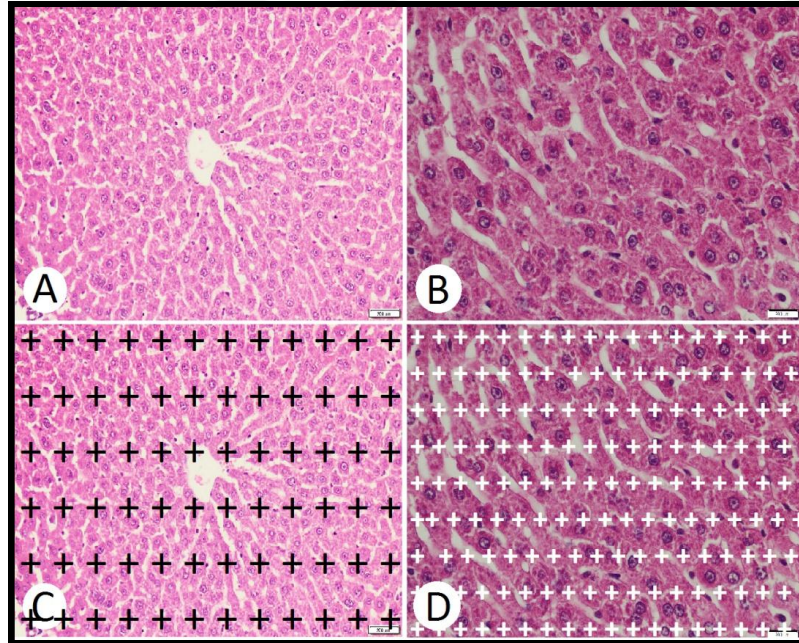
$V$ = İlgilenilen kesitin hacmi

**P=** Kesit yüzey alanlarında sayılan nokta sayısı

**T=** Ortalama kesit kalınlığı(cm)

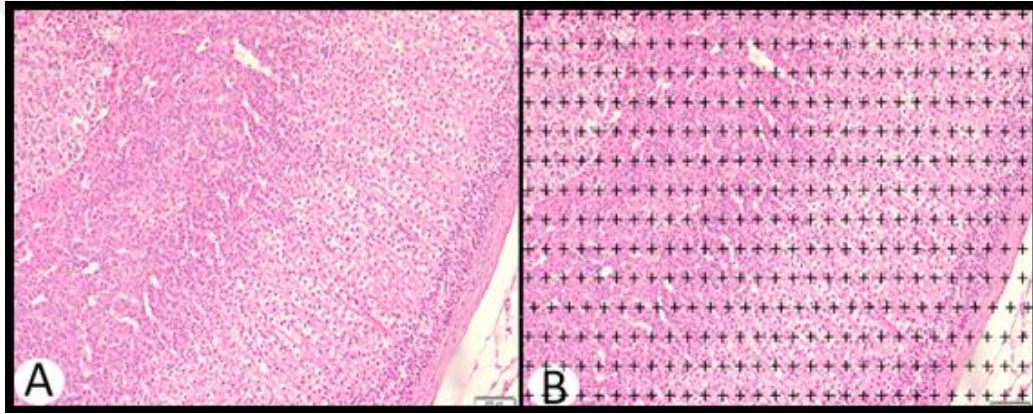
**a/p =** Herbir noktanın gerçekte temsil ettiği alan

Kesitlerde karaciğer (Şekil 3.3) ve böbreküstü bezine (Şekil 3.4) ait çeşitli parametrelerin hacmini hesaplamak için farklı boyutlarda noktalı alan ölçüm cetvelleri (NAÖC) kullanıldı (total karaciğer hacmi ve hepatositlerin kapladığı hacim ölçümü için, d=2,5 mm; sinüzoidler ve böbreküstü bezi için, d= 1 mm). NAÖC de nokta yerine + kullanılır. Noktalar uzayda iki çizginin kesişmesi sonucu elde edilir ve sıfır boyutludur. Bu nedenle NAÖC'ndeki + ların kollarının kesiştiği köşe yüzey alanı ölçüm hesaplaması amacı ile kullanılan noktadır. Bu noktaların her biri dört adet noktanın arasında kalan bir birim alanına karşılık gelir ve bu alan a/p ile gösterilir. Bu şekilde oluşturulan noktalı alan ölçüm cetvelinde her bir nokta arasındaki sabit mesafe bilinmektedir. Karaciğer ve böbreküstü bezi kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri üzerine düşen toplam nokta sayıları bu birim alan değeri ile çarpıldığında, ilgili kesitlerin alanı elde edilir. Bu şekilde alan hesabı yapmak basit olduğu gibi istatistiksel olarak da güvenilir sonuçlar vermektedir (Şekil 3.4).



**Şekil 3. 4:** A ve B' de sırası ile 10'luk ve 40'luk büyütmelemlerde karaciğer ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. C' de söz konusu ışık mikroskopik görüntüler üzerinde tüm karaciğer hacmi ve hepatositlerin kapladığı hacim ölçümleri; D'de ise hepatositlerin kapladığı hacim değerlerinin ölçüm işlemleri şematize edilmiştir.

Bu çalışmada tüm deneklerden elde edilen karaciğer ve böbreküstü bezi kesitleri arasında pilot çalışma ile karaciğer için 1/20, böbrek üstü bezi için ise 1/6 oranında bir örnekleme aralığının uygun olabileceğine karar verilmesinin ardından, ilk kesit rastgelelik prensibi gereği 1.–20. ya da 1-6. numaralı kesitler arasından rastgele, diğer kesitler ise başlangıçta seçilen kesit üzerine 19 kesit atlanıp 20. kesitin alınmasıyla yada ilk 5. kesitin atlanıp 6. Kesitin alınmasıyla gerçekleştirildi. Yukarıda belirtilen esaslar gereği karaciğer (Şekil 3.3) ve böbrek üstü bezi (Şekil 3.4) morfolojisini değerlendirilmek üzere en az 20 şer kesit elde edilmiş oldu. Elde edilen kesitler Olympus BX43 marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu yardımı ile değerlendirildi (Şekil 3.4, 5).

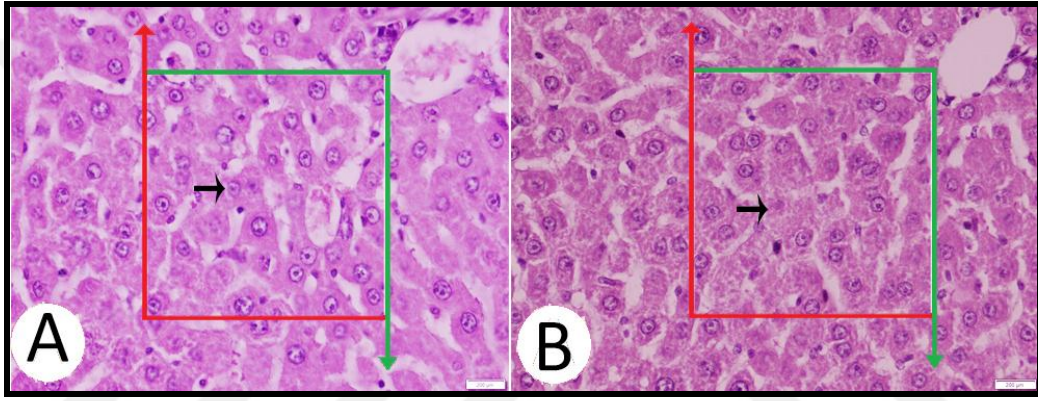


**Şekil 3. 5:** A' da 10'luk büyütmede böbrek üstü bezi ışık mikroskobik görüntüsü izlenmektedir. B' de ise söz konusu ışık mikroskobik görüntü üzerinde tüm böbreküstü bezi hacmi ve böbreküstü zonlarının kapladığı hacim ölçüm işlemleri şematize edilmiştir.

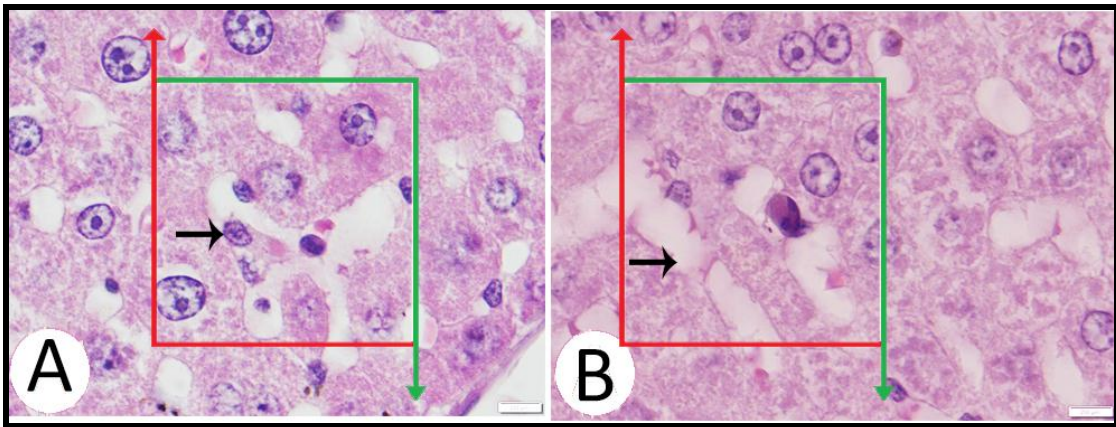
### 3. 8. 2. Fiziksel Disektör ile Örnekleme ve Hücre Sayımı

Fiziksel disektör kuralına (Sterio, 1984) göre hepatositlerin ve Kupffer hücrelerinin sayımı bilgisayar monitöründe Power point programında gerçekleştirildi. Eşdeğer sayım alanları yan yana görüntülendikten sonra, üzerlerine bu programda hazırlanan tarafsız sayım çerçevesi (Gundersen, 1977) düşürüldü. Disektör sayım kuralına göre, önce referans alanında çerçeve içerisinde kabul edilen hücre çekirdekleri belirlendi. Şöyle ki: çerçevenin içerisinde olsa bile, çerçevenin sol ve alt kenarlarına (yasak kenar) temas eden çekirdekler örneklemeğe dâhil edilmedi. Çerçevenin dışında olsa bile, çekirdeği çerçevenin sağ ve üst kenarlarına temas eden hücre çekirdekleri de sayıma dahil edildi.

Sayım dahil edilmenin bir diğer kuralı da bu çekirdeklerin çerçevenin sol ve alt kenarı ile bunların uzantılarına temas etmemesidir. Referans kesitinde örneklenen bu sayılabilir hücre çekirdeklerinden gözlem kesitinde yer almayanlar o alan çiftine ait hücre sayısı olarak kaydedildi. Çalışmanın etkinliğini artırmak için disektör çiftlerindeki referans ve gözlem alanları literatürde önerildiği şekilde (133) ters çevrilerek de kullanıldı. Yani gözlem alanı referans olarak alınırken, önceki referans alanı gözlem alanı konumunda ele alındı. Bu şekilde tamamen farklı görüntü ve değerler elde edileceğinden, çalışmanın etkinliği çok az bir ek çalışmayla artırılmış oldu (Şekil 3.6, 7).



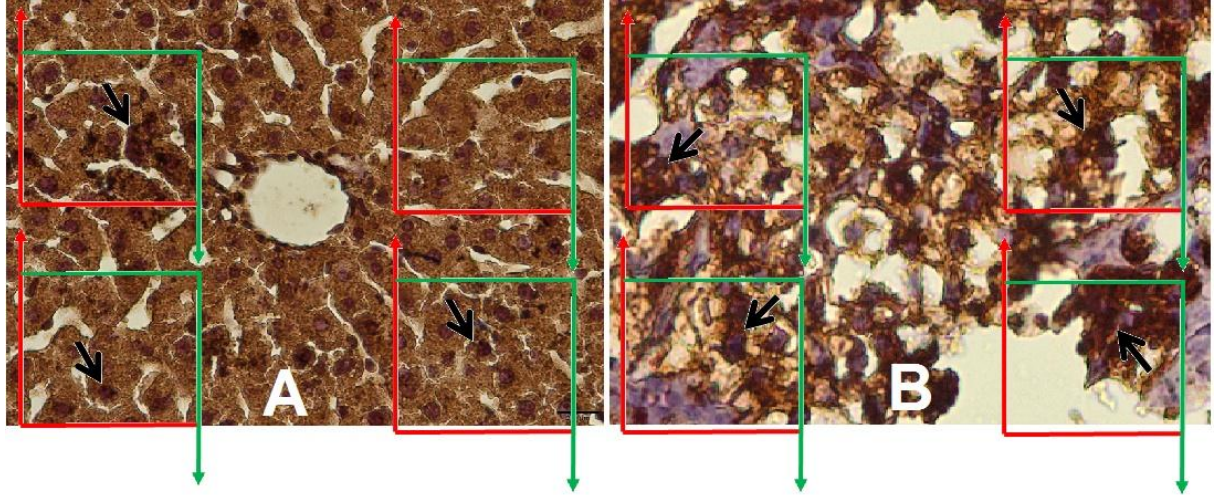
**Şekil 3. 6:** Disektör sayımında hepatosit nukleusu var olduğu zaman sayım kuralı kullanılır. Eğer hepatosit nukleusu disektör çerçevesi içinde yada üst yada sağ (yeşil kenar) sınırdaki ise sayılır, eğer disektör çerçevesi içinde değilse yada alt yada sol (kırmızı kenar) sınırdaki ise sayılmaz.



**Şekil 3. 7:** Disektör sayımında Kupffer hücresi nukleusu var olduğu zaman sayım kuralı kullanılır. Eğer Kupffer hücresi nukleusu disektör çerçevesi içinde yada üst yada sağ (yeşil kenar) sınırdaki ise sayılır, eğer disektör çerçevesi içinde değilse yada alt yada sol (kırmızı kenar) sınırdaki ise sayılmaz.

### 3.8.3. HMGB1 Pozitif olan Hücrelerin Sayısının Hesaplanması

Yine yukarıda anlatılan şekilde örnekleme ile hazırlanan ve HMGB1 antikor ile boyanan karaciğer ve böbreküstü bezi kesitleri üzerinde söz konusu antikor açısından pozitif olarak boyanmış hücrelerin yoğunluğu tarafsız sayım çerçevesi ile hesaplandı (Şekil 3.8). bu metoda göre Kont ve Ob gruplarından elde edilen HMGB1 antikor ile boyanmış kesitler üzerine eşit aralıklarla (1/2 örnekleme oranı ile) tarafsız sayım çerçevesi yerleştirildi ve HMGB1 pozitif hücreler tarafsız sayım çerçevesi kuralına göre sayıldı (Şekil 3.8)



**Şekil 3. 8:** Disektör sayım kuralına göre HMGB1 pozitif hücrelerin sayımı görülmektedir. Eğer pozitif hücreler disektör çerçevesi içinde yada üst yada sağ (yeşil kenar) sınırdaki ise sayılır, eğer disektör çerçevesi içinde değilse yada alt yada sol (kırmızı kenar) sınırdaki ise sayılmaz.

### 3. 8. 4. Toplam Hücre Sayısının Hesaplanması

Fiziksel disektörde, birim hacimdeki hepatosit ve Kupffer hücrelerinin sayısı ( $N_v$ ), sayım yapılan ardışık kesit çiftinin birinde olup diğerinde olmayan hücrelerin ( $Q$ =disektör taneciği) sayılması ile hesaplanır. İki komşu kesitin yöndeş yüzeyleri arasındaki mesafe ( $t$ , kesit kalınlığı) ve örneklenen kesitlerin üzerine yerleştirilen tarafsız sayım çerçevesinin alanı ( $a$ ), disektörün hacminin ( $V_{(dis.)}$ ) tespit edilmesi için kullanılır. Buradan karaciğerde bulunan toplam hepatosit ve Kupffer hücresi sayıları için aşağıdaki eşitliği yazabiliriz:

$$NV = \frac{\sum Q}{\sum V_{(Dis)}} = \frac{\sum Q}{h \cdot \sum a}$$

Daha sonra, her deneğin karaciğerinde bulunan toplam hepatosit ve Kupffer hücrelerinin toplam sayılarını hesaplamak için, sayısal yoğunluk,  $N_v$ , ortalama hacmi  $V(\text{ref})$  ile çarpılır.

$$N = N_v \cdot V_{\text{ref}}$$

$a$  = Sayım çerçevesinin alanı

$t$  = Her kesit çifti arasındaki mesafe

$N$  = Hesaplanan toplam sayı

$N_v$  = Sayısal yoğunluk

$V_{\text{ref}}$  = Yapının toplam(referans) hacmi

### 3.9. İstatistik

Bu çalışmadan elde edilen tüm bulguların istatistiksel analizleri SPSS (Version 15.0 for Windows®, IBM corp, NY; USA) programı ile yapıldı. Denek sayısı parametrik testler için yeterli olmadığından nonparametrik testler kullanıldı. İki bağımsız grubun verileri karşılaştırıldığı için Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık açısından  $p < 0,01$  ve  $p < 0,001$  değerleri ileri derecede anlamlı,  $p < 0,05$  olan değerler ise anlamlı olarak kabul edildi.



#### 4. BULGULAR

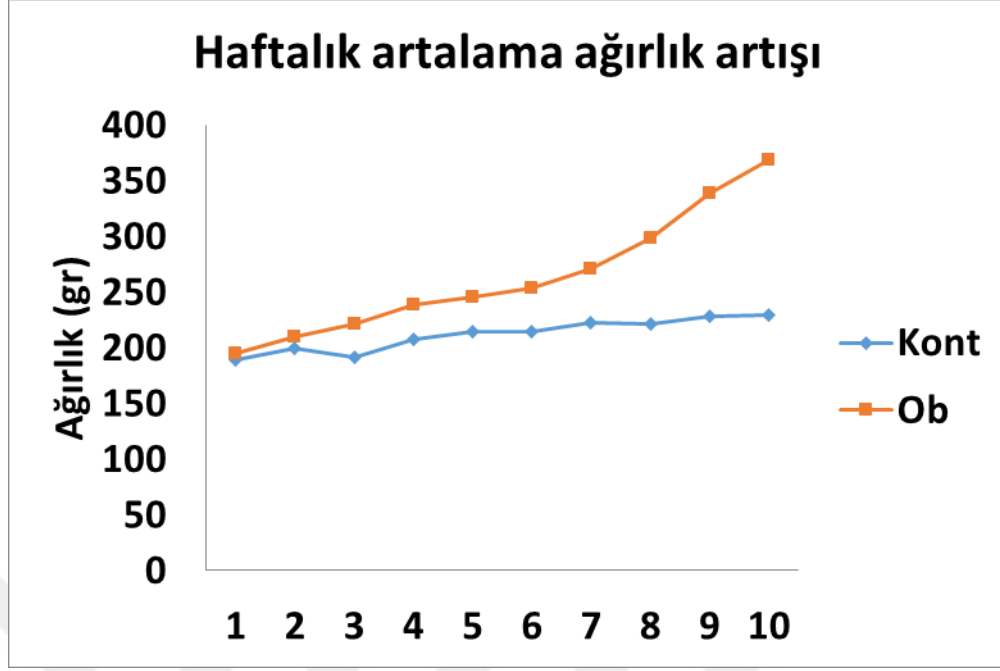
Bu çalışmada sağlıklı ve obez deneklerden elde edilen kan serumlarında antioksidan savunma sistemini değerlendirmek için katalaz ve SOD düzeyleri metabolizmayı değerlendirmek için ise glukoz ve kolesterol düzeyleri spektrofotometre yardımı ile kalorimetrik olarak ölçüldü. Ayrıca, karaciğer ve böbreküstü bezi örneklerinin hacim parametreleri, karaciğerdeki hepatosit ve Kupffer hücresi sayıları ve ayrıca her iki organdaki HMGB1 pozitif hücrelerin sayısı stereolojik olarak hesaplandı. Ayrıca, karaciğer ve böbreküstü bezleri ışık mikroskopik düzeyde histopatolojik açıdan değerlendirildi. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur:

##### 4.1. Obezitenin Değerlendirilmesi

Tüm gruptaki deneklerin haftalık kilo alımları izlendi. Toplam 10 hafta boyunca süren bu takip sonucunda her deneğin VKİ hesaplamaları yapılarak obez olup olmadıkları değerlendirildi (132). VKİ hesaplamasında; burun ucundan kuyruk başlangıcına kadar olan mesafe boy olarak kabul edildi. Ölçülen ağırlık ve boy parametreleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$VKİ=Ağırlık (kg) /Boy^2(m^2)$$

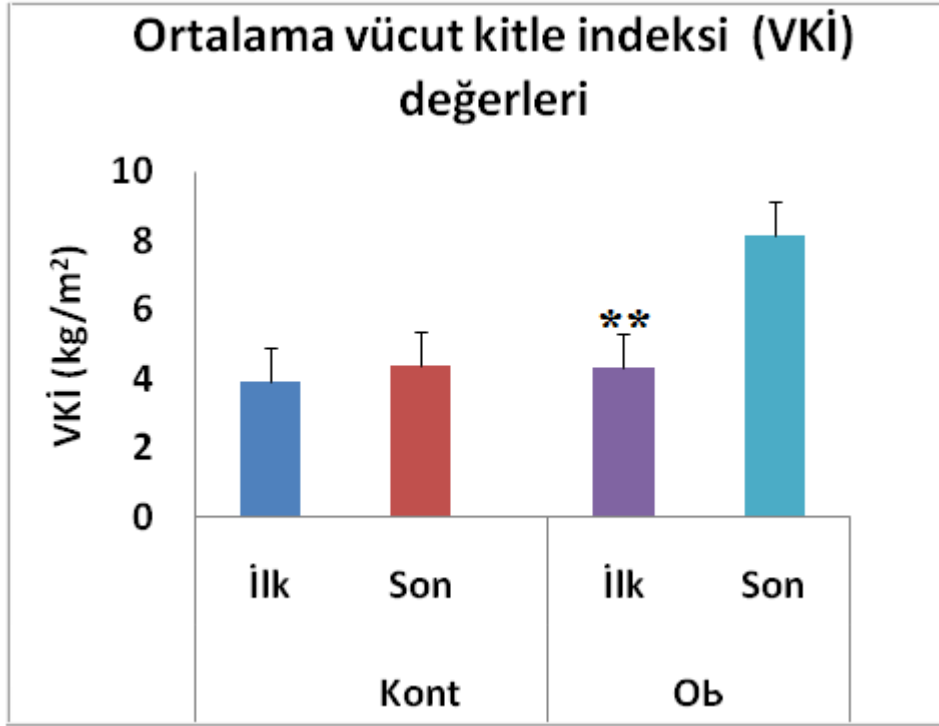
VKİ sonuçları 5 kg/m<sup>2</sup>'den büyük olan deneklerin obez olduğu kabul edildi. Obez olarak değerlendirilen grupta kontrol grubuna oranla daha hızlı kilo alımı gözlemlendi (Şekil 4.1).



#### Hafta 1

**Şekil 4.1.** Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama haftalık ağırlık değerleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama ağırlık değerlerinin özellikle son haftalarda kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede arttığı görülmektedir (\*\*;  $p < 0,01$ ) (Mann Withney U Testi).

Ek olarak tüm deneklerin deney başındaki ve sonundaki VKİ değerleri incelendiğinde; Kont ve Ob gruplarının başlangıç VKİ değerleri arasında fark gözlenmezken her iki grubun son VKİ değerleri arasındaki farkın çok anlamlı olduğu görüldü ( $p < 0.01$  Şekil 4.2).



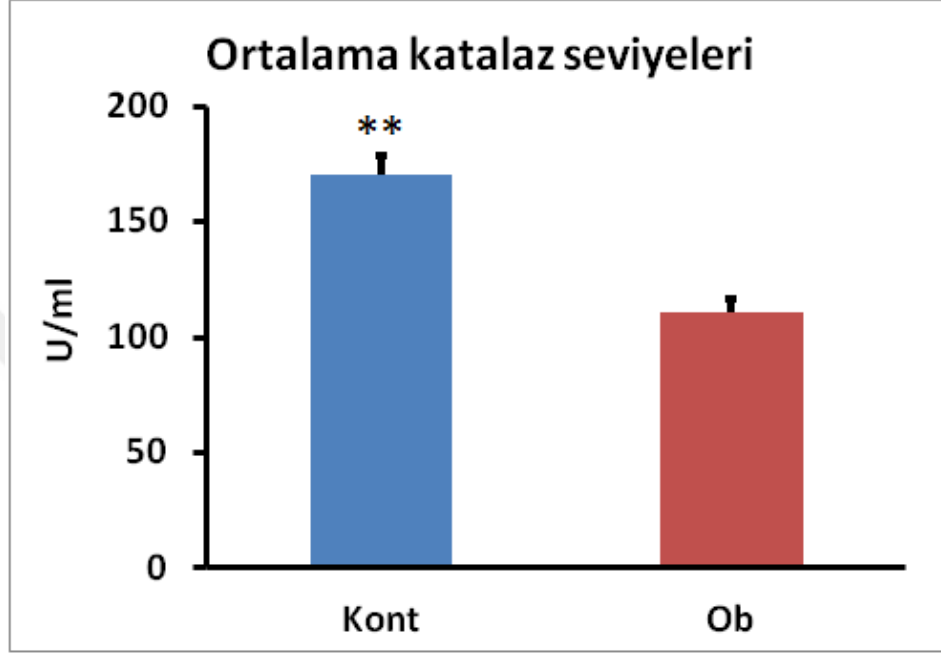
**Şekil 4.2.** Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama haftalık VKİ değerleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama VKİ değerlerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede arttığı görülmektedir (\*\*;  $p < 0,01$ ) (Mann Withney U Testi).

#### 4.2. Biyokimyasal Bulgular

Tüm gruplara ait kan örneklerinin biyokimyasal analizlerinde elde edilen katalaz, SOD, glukoz ve kolesterol seviyeleri aşağıdaki şekillerde sunulmuştur (Şekil 4.3-4.6):

**a. Katalaz seviyesi bulguları:**

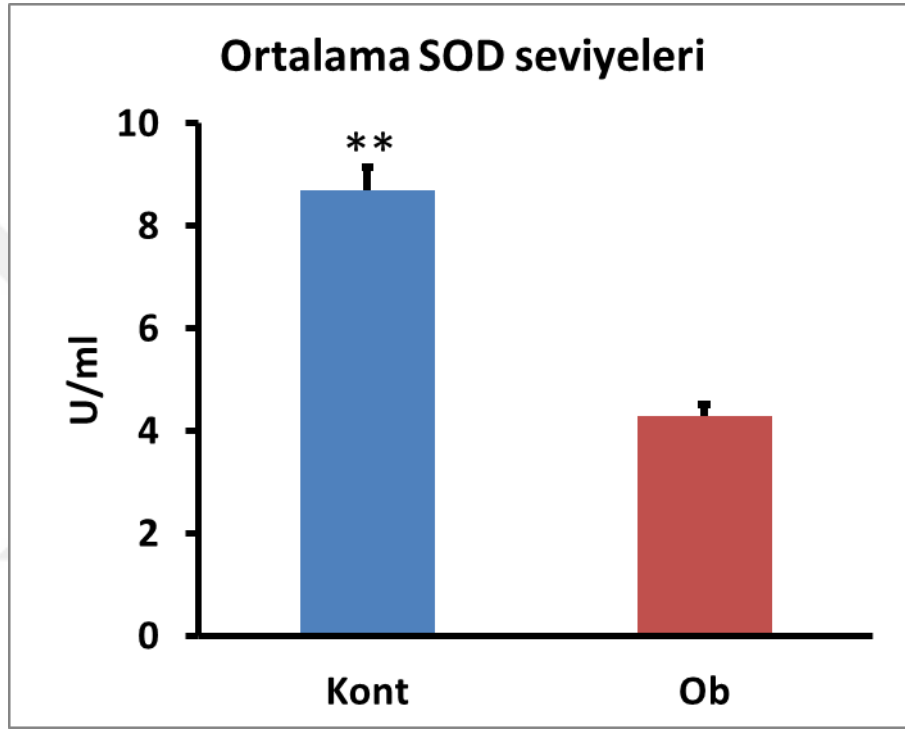
Tüm gruplara ait kan örneklerindeki Katalaz seviyesi bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.3):



**Şekil 4.3.** Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki katalaz seviyeleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama katalaz seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede azaldığı görülmektedir (\*\*;  $p < 0,01$ ) (Mann Withney U Testi).

**b. SOD seviyeleri bulguları:**

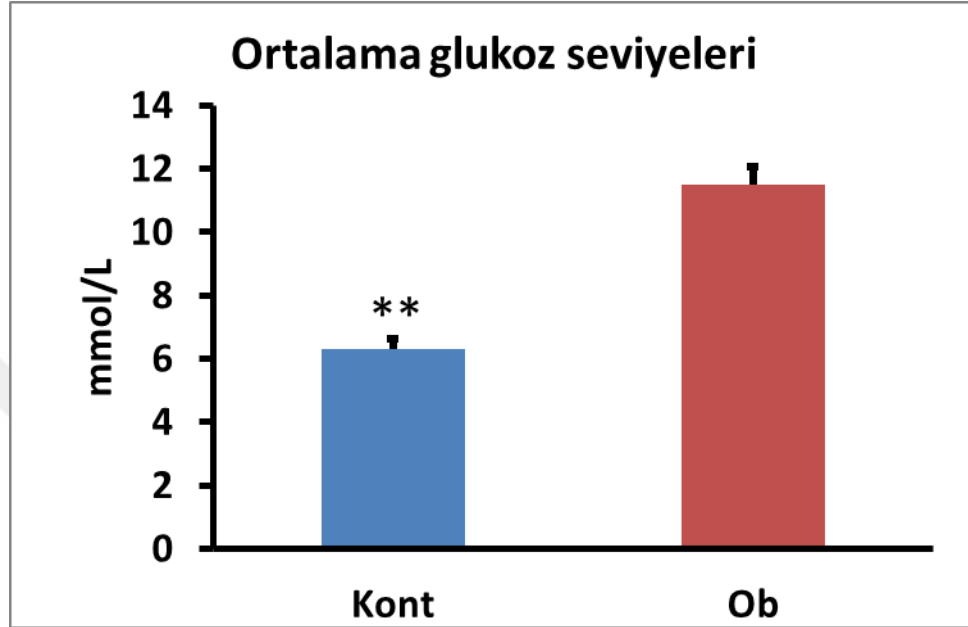
Tüm gruplara ait kan örneklerinden elde edilen SOD seviyeleri aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.4):



**Şekil 4.4.** Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama SOD seviyeleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama SOD seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede azaldığı görülmektedir (\*\*;  $p < 0,01$ ) (Mann Withney U Testi).

### c. Glukoz seviyeleri bulguları:

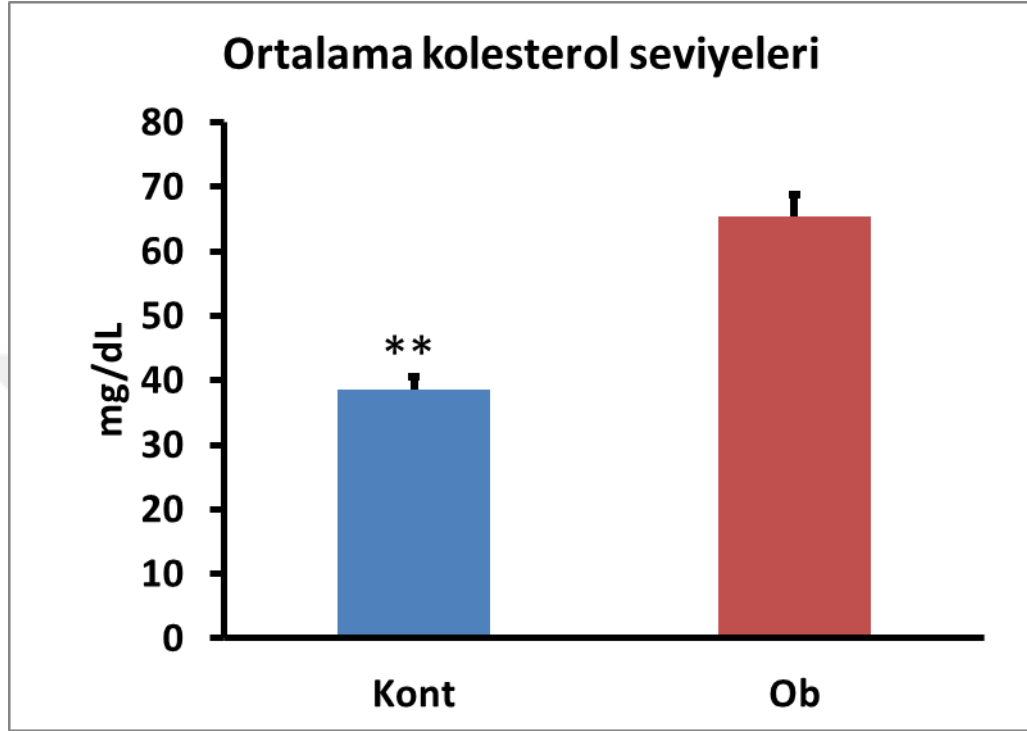
Tüm gruplara ait kan örneklerinden elde edilen glukoz seviyeleri aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.5):



**Şekil 4.5.** Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama glukoz seviyeleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama glukoz seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede arttığı görülmektedir (\*\*;  $p < 0,01$ ) ( Mann Withney U Testi).

#### d. Kolesterol seviyeleri bulguları:

Tüm gruplara ait kan örneklerinden elde edilen kolesterol seviyeleri aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.6):



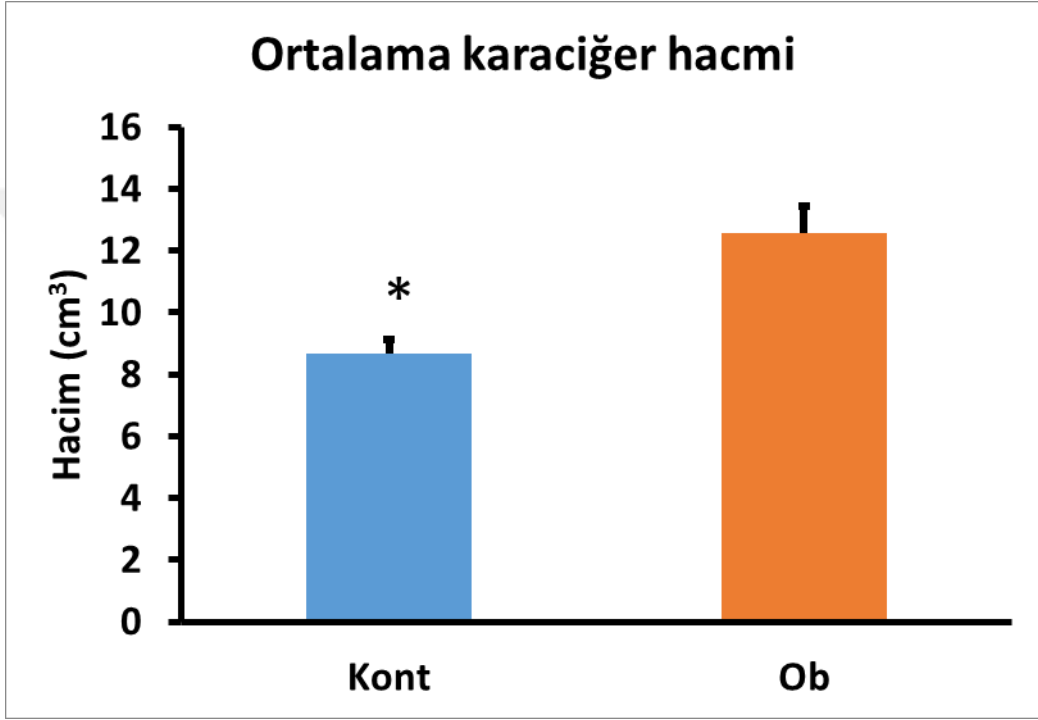
**Şekil 4.6.** Kont ve Ob gruplarına ait kan örneklerindeki ortalama kolesterol seviyeleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama kolesterol seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede arttığı görülmektedir (\*\*;  $p < 0,01$ ) (Mann Withney U Testi).

### 4.3. Stereolojik Bulgular

#### 4.3.1. Karaciğere Ait Stereolojik Bulgular:

##### A. Karaciğer Hacmi Bulguları:

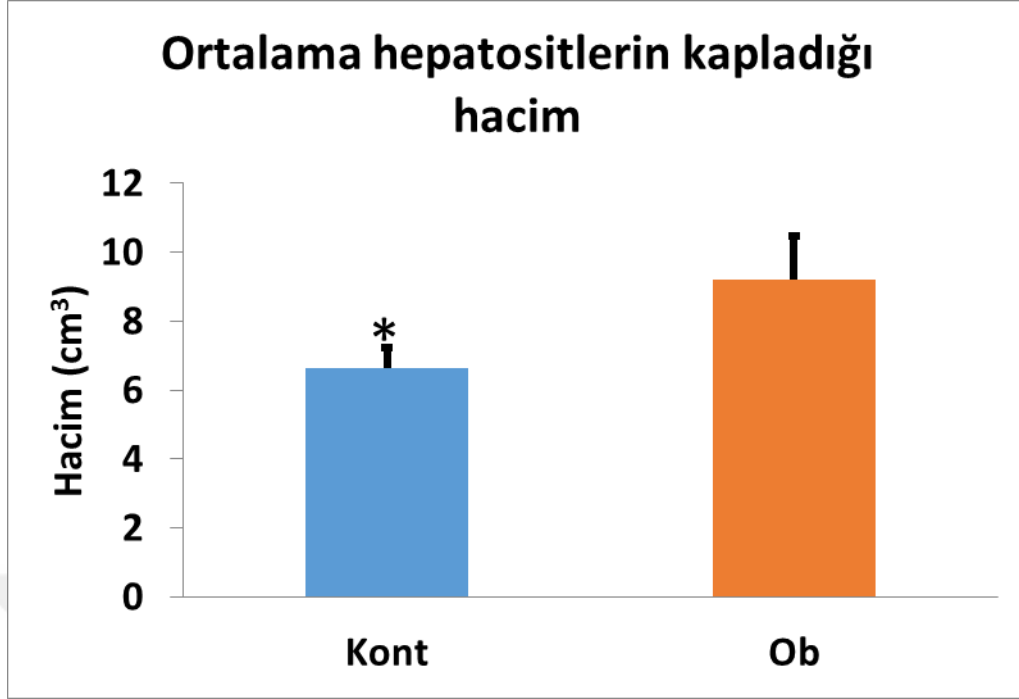
Tüm gruplardaki deneklerin karaciğerlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen karaciğer hacmi bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.7):



**Şekil 4.7.** Kont ve Ob gruplarındaki ortalama karaciğer hacim değerleri görülmektedir. \*, gruplar arasındaki  $p < 0,05$  düzeyindeki istatistiksel anlamlılık seviyelerini göstermektedir (Mann Withney U Testi).

##### b. Hepatositlerin Kapladığı Hacim Bulguları

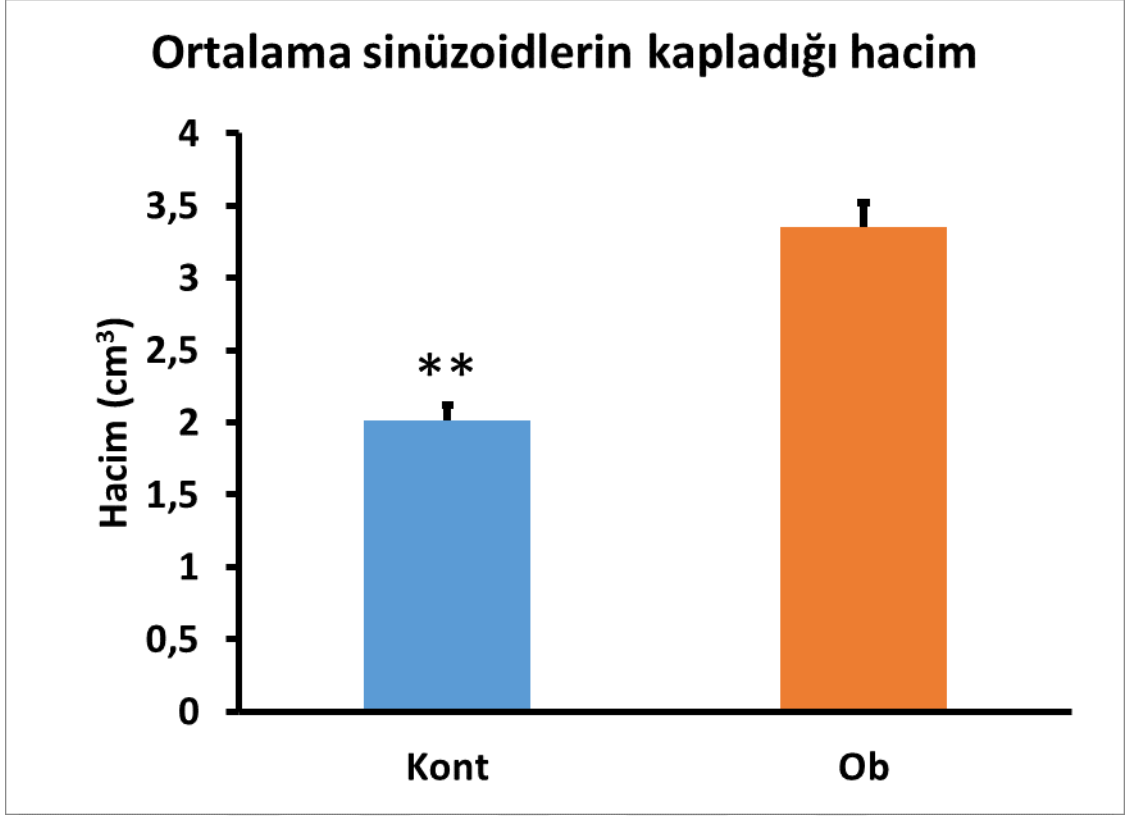
Tüm gruplardaki deneklerin karaciğerlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde yapılan hesaplamalarda elde edilen hepatositlerin kapladığı hacim bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.8):



**Şekil 4.8.** Kont ve Ob gruplarındaki ortalama hepatositlerin kapladığı hacim değerleri görülmektedir. \*, gruplar arasındaki  $p < 0,05$  düzeyindeki istatistiksel anlamlılık seviyelerini göstermektedir (Mann Withney U Testi).

**c. Sinüzoidlerin kapladığı hacim bulguları:**

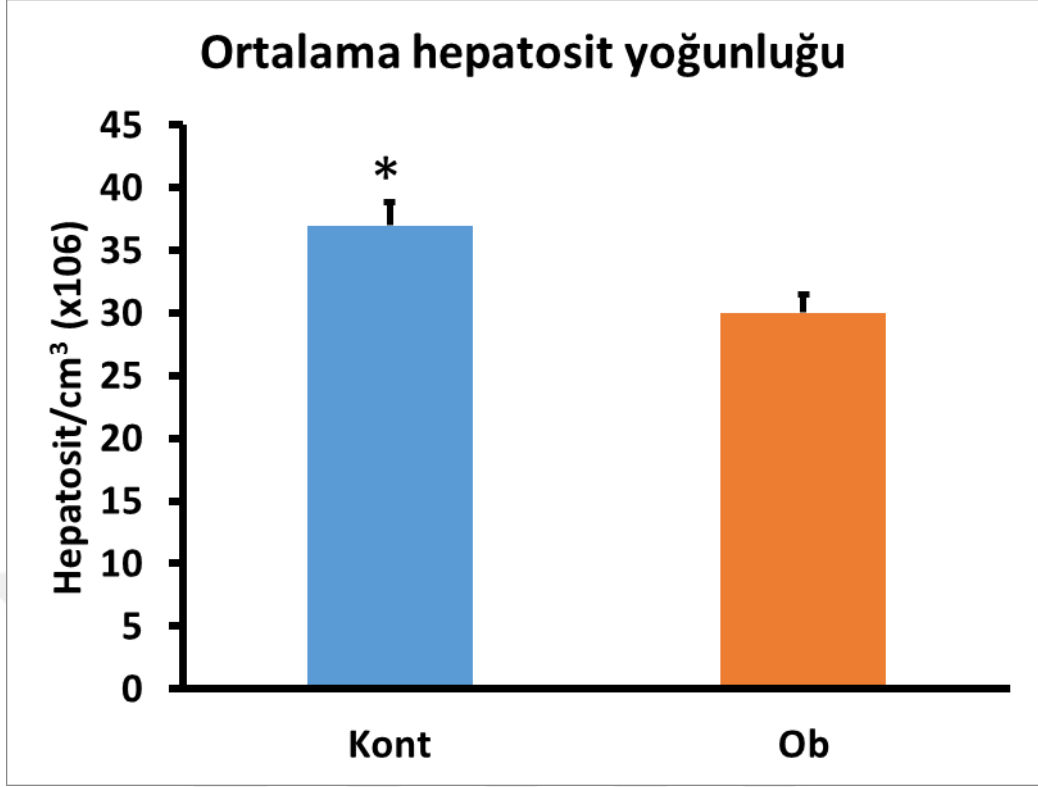
Tüm gruplardaki deneklerin karaciğerlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde yapılan hesaplamalarda elde edilen sinüzoidlerin kapladığı hacim bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.9):



**Şekil 4.9.** Kont ve Ob gruplarındaki ortalama sinüzoidlerin kapladığı hacim değerleri görülmektedir. \*\*, gruplar arasındaki  $p < 0,01$  düzeyindeki istatistiksel anlamlılık seviyelerini göstermektedir (Mann Withney U Testi).

#### **d. Ortalama Hepatosit Yoğunluğu Bulguları**

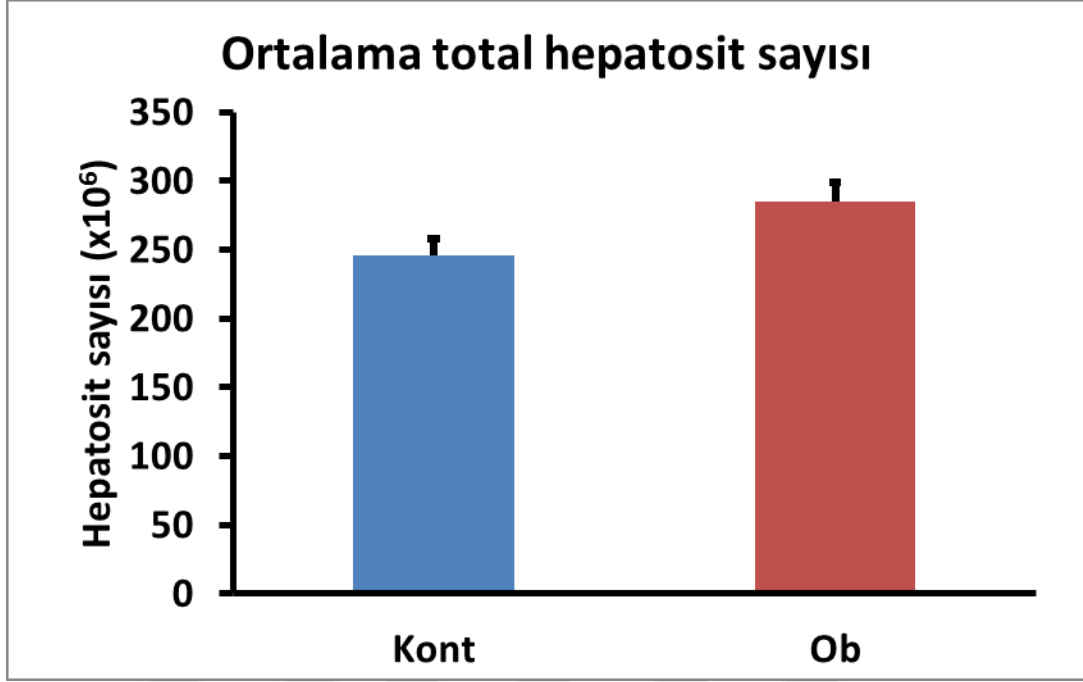
Bu çalışmada tüm gruplardaki deneklerin karaciğerlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde fiziksel disektör yöntemi ile yapılan hesaplamalarda elde edilen ortalama hepatosit yoğunluğu (karaciğerde  $\text{cm}^3$  başına düşen ortalama hepatosit sayısı) bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.10):



**Şekil 4.10.** Kont ve Ob gruplarındaki cm<sup>3</sup> başına düşen ortalama hepatosit sayısı değerleri görülmektedir. \*, gruplar arasındaki p < 0,05 düzeyindeki istatistiksel anlamlılık seviyelerini göstermektedir (Mann Withney U Testi).

#### e. Ortalama Total Hepatosit Sayısı Bulguları

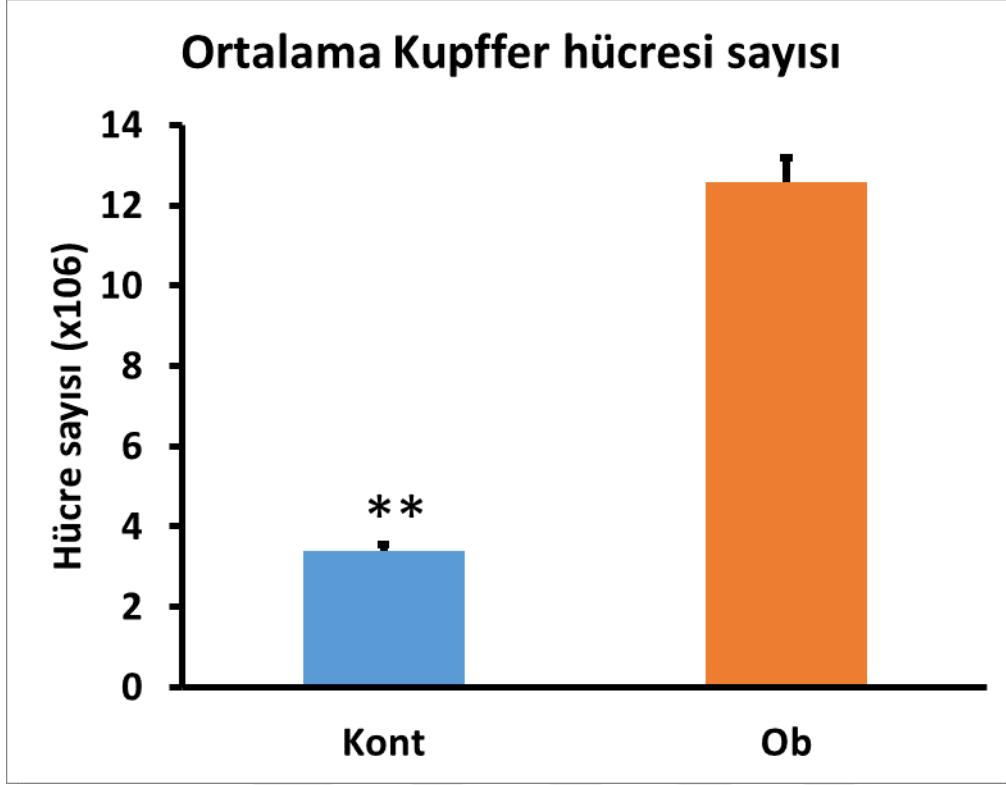
Tüm gruplardaki deneklerin karaciğerlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde fiziksel disektör yöntemi ile yapılan hesaplamalarda elde edilen diğer bir bulgu olan total hepatosit sayısı (karaciğerde bulunan toplam hepatosit sayısı) bulgularının grup ortalaması değerleri ile yapılan grafik aşağıdaki sunulmuştur (Şekil 4.11):



**Şekil 4.11.** Kont ve Ob gruplarındaki ortalama total hepatosit sayısı değerleri görülmektedir. Kont ve Ob grupları arasında ortalama total hepatosit sayısı değerleri açısından herhangi bir fark ( $p>0,05$ ) görülmemektedir (Mann Withney U Testi).

#### **f. Ortalama Kupffer Hücresi Sayısı Bulguları**

Tüm gruplardaki deneklerin karaciğerlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde fiziksel disektör yöntemi ile yapılan hesaplamalarda elde edilen Kupffer hücresi sayısı (karaciğerde bulunan toplam Kupffer hücresi sayısı) bulgularının grup ortalaması değerleri ile yapılan grafik aşağıdaki sunulmuştur (Şekil 4.12):

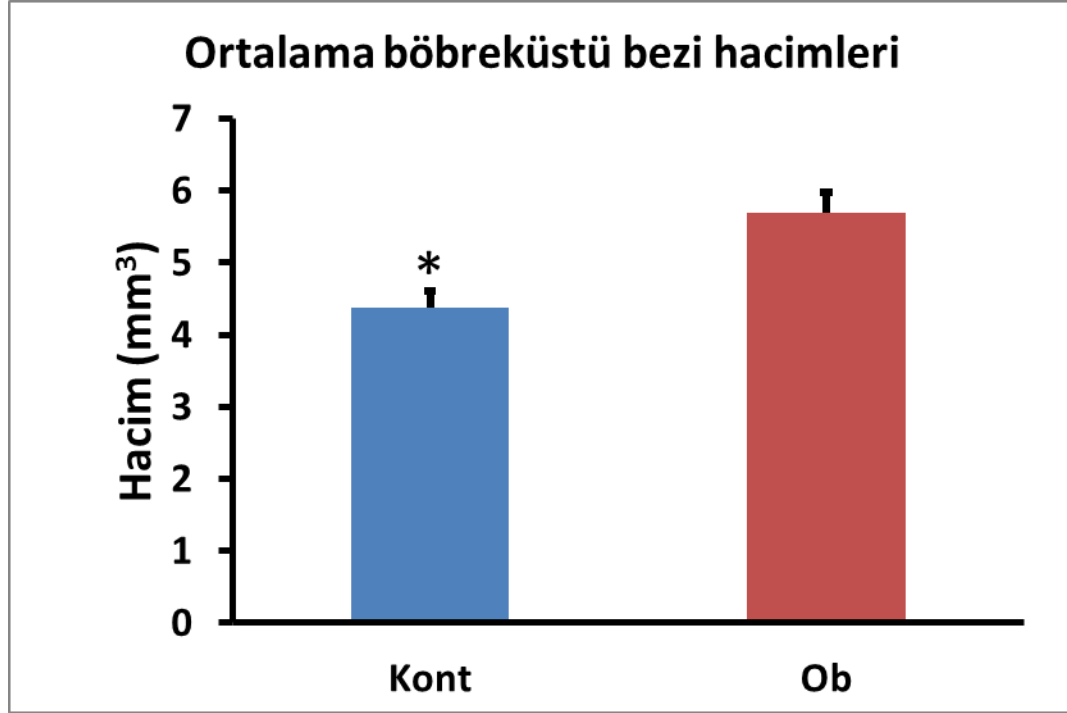


**Şekil 4.12.** Kont ve Ob gruplarındaki ortalama total Kupffer hücresi sayısı değerleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama Kupffer hücresi sayısı değerlerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede arttığı (\*\*;  $p < 0,01$ ) görülmektedir (Mann Withney U Testi).

#### 4.2.2. Böbreküstü Bezine Ait Stereolojik Bulgular

##### A. Böbreküstü Bezi Hacmi Bulguları:

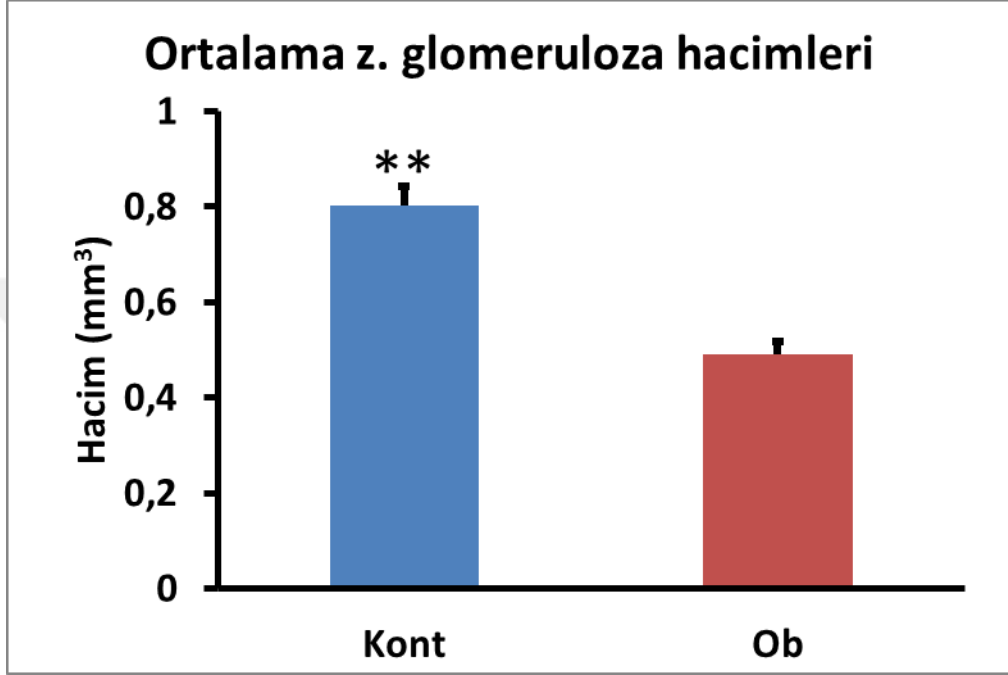
Tüm gruplardaki deneklerin böbreküstü bezlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen böbreküstü bezi hacmi bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.13):



**Şekil 4.13.** Kont ve Ob gruplarına ait ortalama böbreküstü bezi hacmi değerleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama böbreküstü bezi hacim değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı seviyede arttığı (\*;  $p < 0,05$ ) görülmektedir (Mann Withney U Testi).

### b. Zona Glomeruloza Hacmi Bulguları:

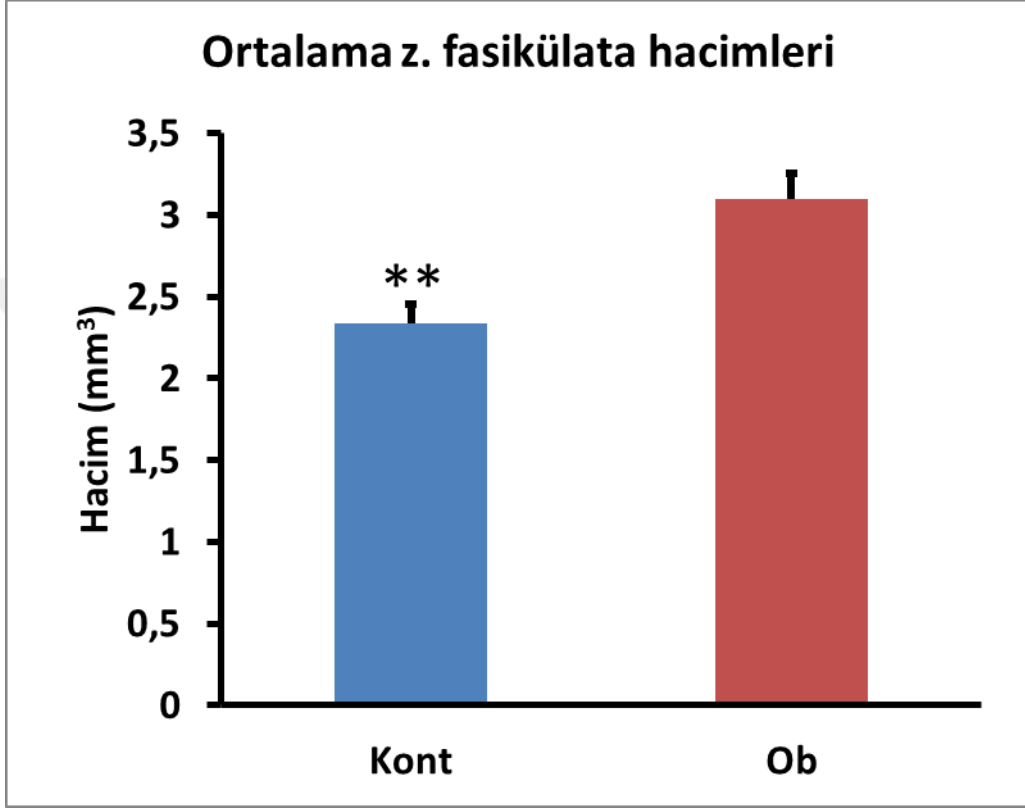
Tüm gruplardaki deneklerin böbreküstü bezlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen zona glomeruloza tabakasının kapladığı hacim bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.14):



**Şekil 4.14.** Kont ve Ob gruplarına ait böbreküstü bezlerinde zona glomeruloza tabakasının kapladığı hacim değerleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama zona glomeruloza tabakasının hacim değerlerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede azaldığı (\*\*;  $p < 0,01$ ) görülmektedir (Mann Withney U Testi).

### b. Zona Fasikülata Hacmi Bulguları

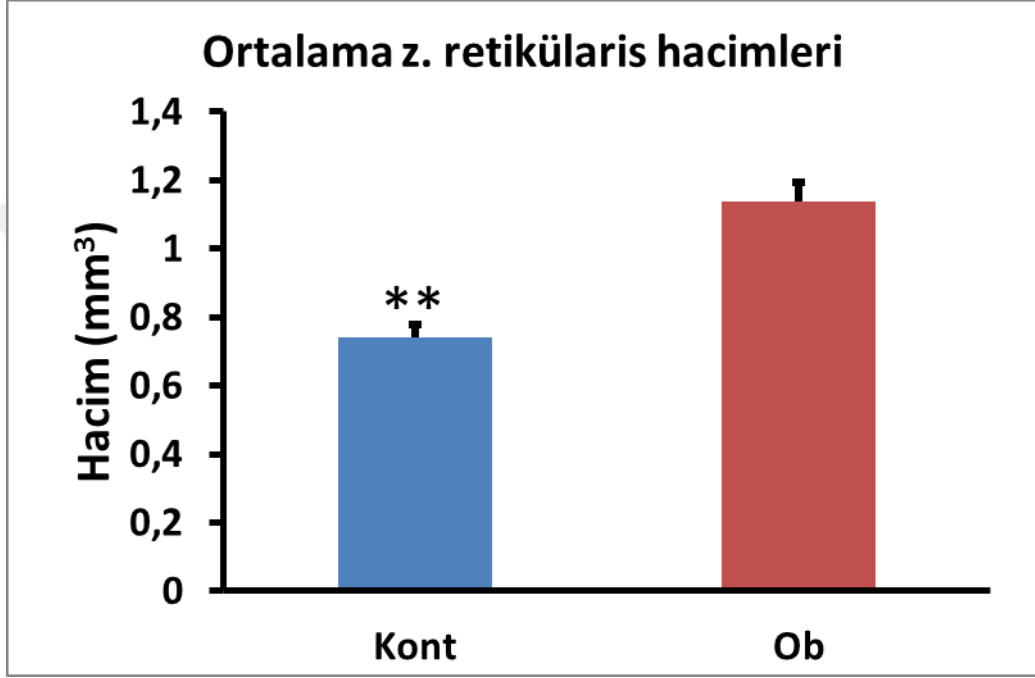
Tüm gruplardaki deneklerin böbreküstü bezlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen zona fasikülata tabakasının kapladığı hacim bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.15):



**Şekil 4.15.** Kont ve Ob gruplarına ait böbreküstü bezlerinde zona fasikülata tabakasının kapladığı hacim değerleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama zona fasikülata hacmi değerlerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede arttığı (\*\*;  $p < 0,01$ ) görülmektedir (Mann Withney U Testi).

### C. Zona Retikularis Hacmi Bulguları

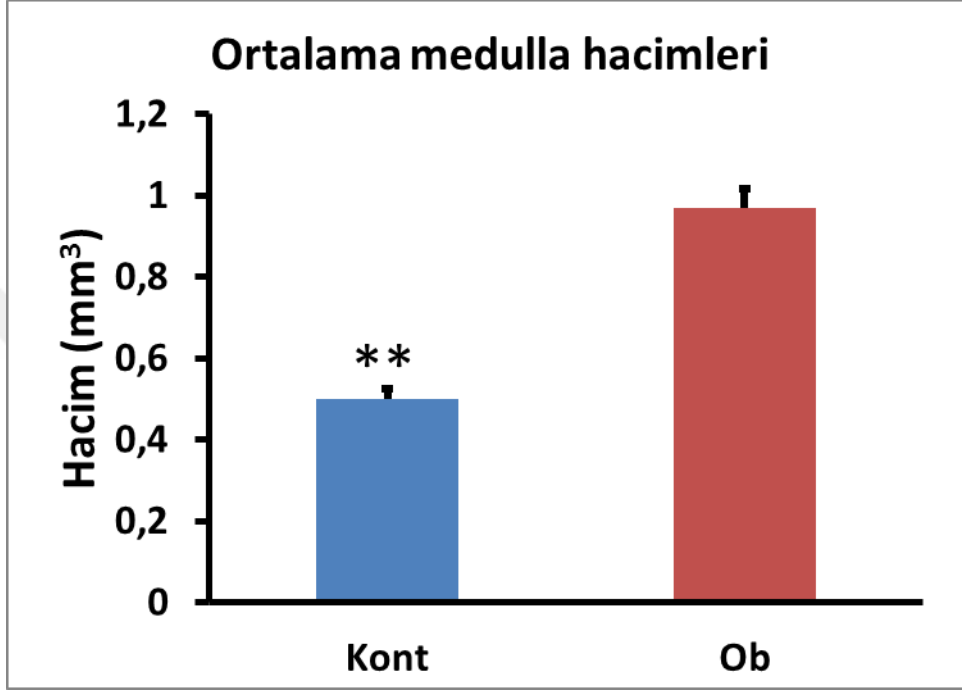
Tüm gruplardaki deneklerin böbreküstü bezlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen zona retikularis tabakasının kapladığı hacim bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.16):



**Şekil 4.16.** Kont ve Ob gruplarına ait böbreküstü bezlerinde zona retikularis tabakasının kapladığı hacim değerleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama zona retikularis hacmi değerlerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede arttığı (\*\*;  $p < 0,01$ ) görülmektedir (Mann Withney U Testi).

#### D. Medulla Hacmi Bulguları

Tüm gruplardaki deneklerin böbreküstü bezlerine ait ışık mikroskopik kesitler üzerinde yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen medulla kısmının kapladığı hacim bulguları aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 4.17):

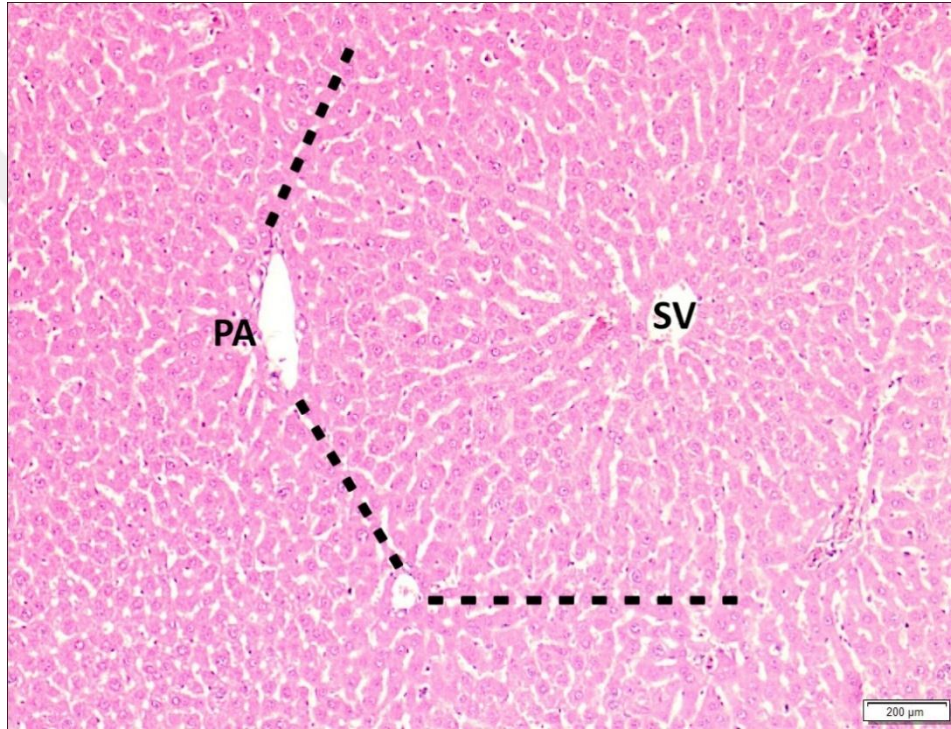


**Şekil 4.17.** Kont ve Ob gruplarına ait böbreküstü bezlerinde medulla kısmının kapladığı hacim değerleri görülmektedir. Ob grubunda ortalama medulla kısmı hacmi değerlerinin kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı seviyede arttığı (\*\*;  $p<0,01$ ) görülmektedir (Mann Withney U Testi).

#### 4.4. Konvensiyonel Işık Mikroskopik Bulgular

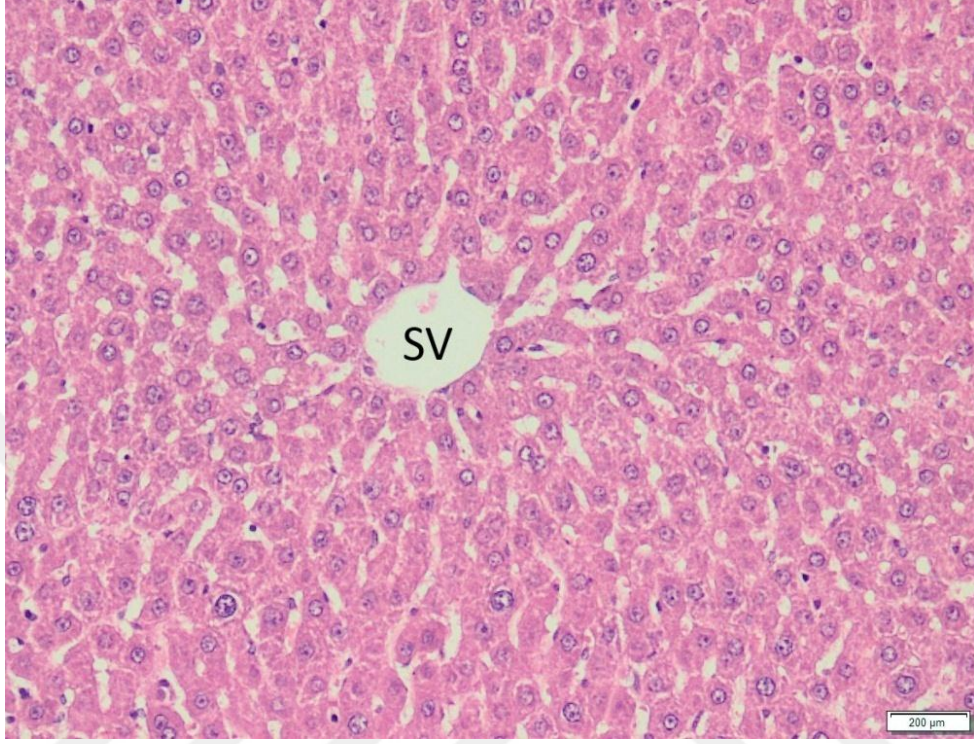
##### A. Karaciğere Ait Bulgular:

Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde, genel olarak parankimden zengin ve bağ dokusu açısından fakir bir organ olduğu gözlemlendi (Şekil 4.14). Kontrol karaciğer dokusu sağlıklı yapıdaki klasik altıgen şeklindeki lobüllerden meydana geliyordu. Bu lobüllerin merkezinde santral venler; köşelerinde ise portal alanlar yer almaktaydı (Şekil 4.18).



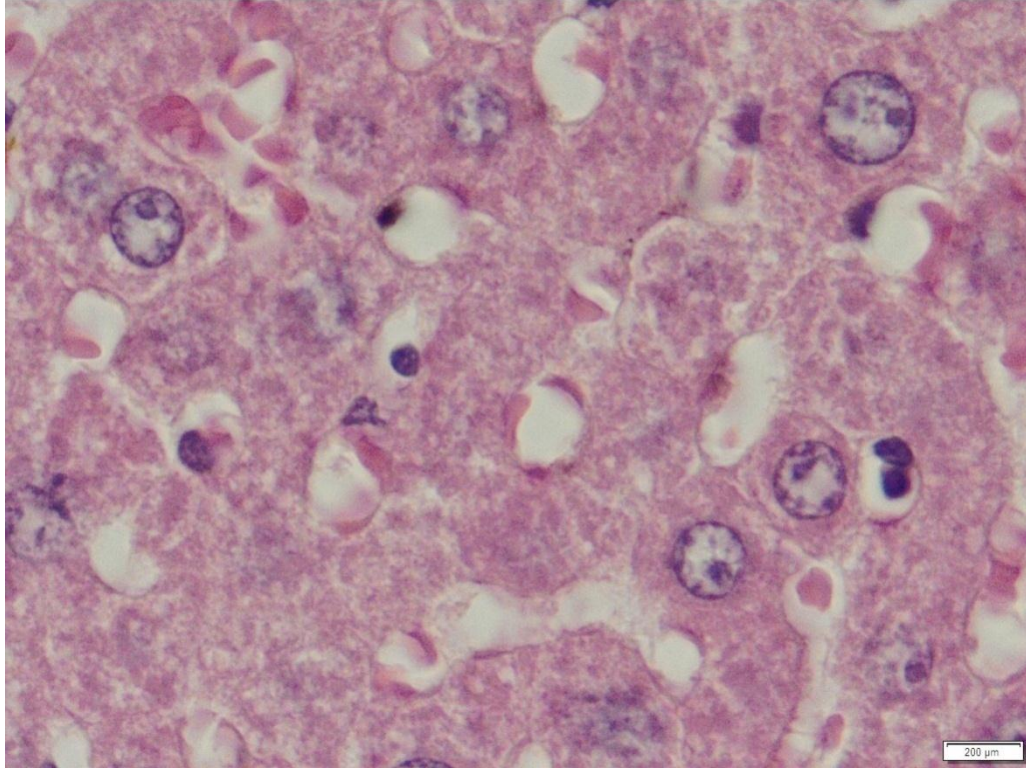
**Şekil 4.18.** Kont grubuna ait karaciğer örneklerinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. SV, santral ven; PA, portal alan; kesikli çizgiler klasik karaciğer lobülünün sınırlarını göstermektedir.

Santral ven dalları snormal görünümü ile izlendi. Santral venden başlayarak klasik karaciğer lobülünün dışına doğru ışınsal olarak uzanan hepatosit kordonları ise sağlıklı görünümdeydi (Şekil 4.19).



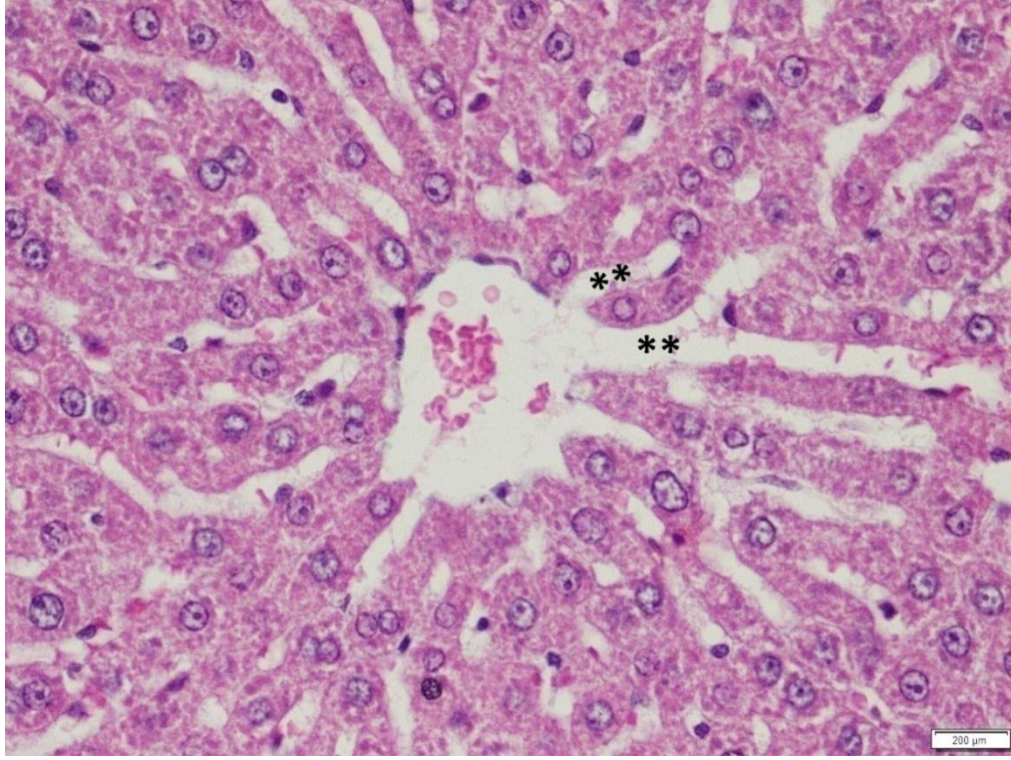
**Şekil 4.19.** Kont grubuna ait karaciğer örneklerinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. SV, santral veni göstermektedir.

Kont grubuna ait karaciğer örnekleri ışık mikroskobu altında yüksek büyütmede incelendiğinde hepatositlerin ökromatik çekirdekleri, düzenli hücre sınırları ve normal boyanmış sitoplazmaları ile sağlıklı görünümde oldukları izlendi. Söz konusu sağlıklı hepatositler arasında bulunan sinüzoidlerin de yerleşimi düzenli ve genişlikleri normal boyutta idi (Şekil 4.20).

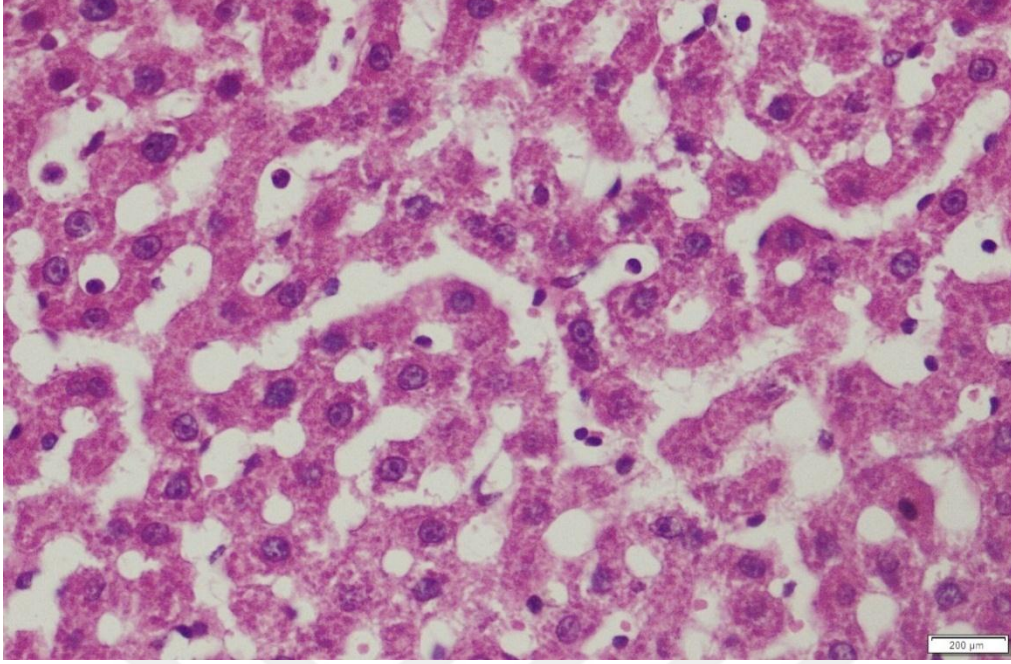


**Şekil 4.20.** Kont grubuna ait karaciğer örneklerindeki sağlıklı hepatosit ve sinüzoidlerin yüksek büyütmede ışık mikroskobik görüntüsü izlenmektedir.

Ob grubuna ait karaciğer örnekleri ışık mikroskobu yardımı ile incelendiğinde ilk dikkati çeken bulgu büyük damar dalları ve sinüzoidlerdeki dilatasyon idi (Şekil 4.21-22).

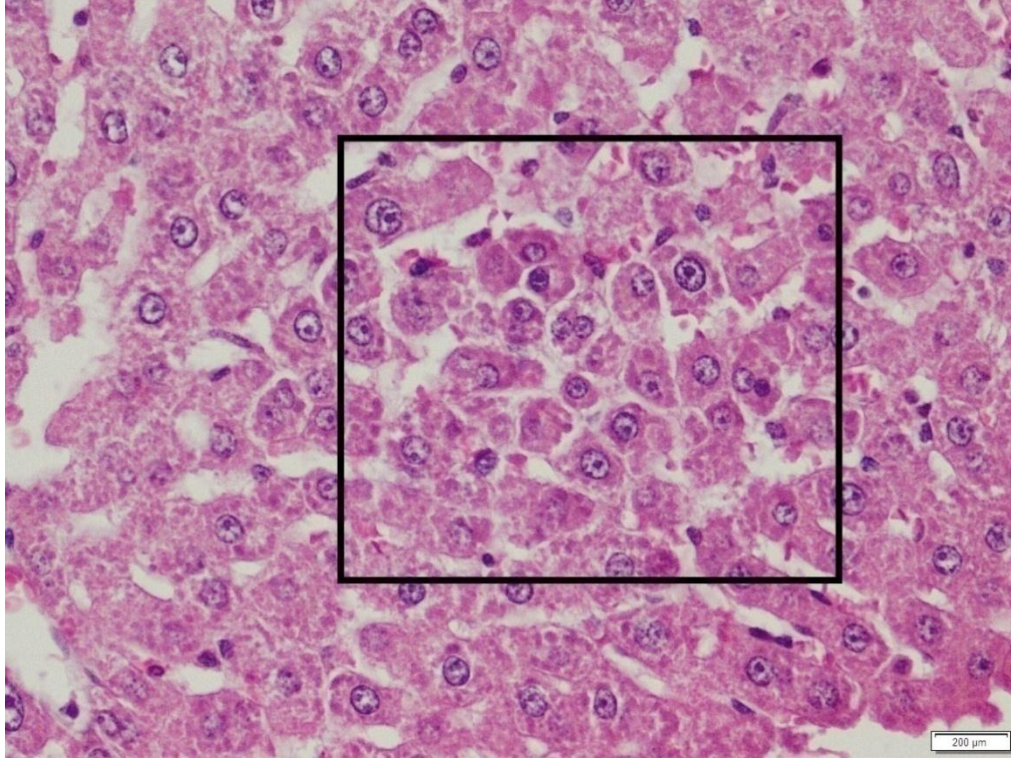


**Şekil 4.21.** Ob grubuna ait karaciğer örneklerindeki santral ven dallarında dilatasyon izlenmektedir.



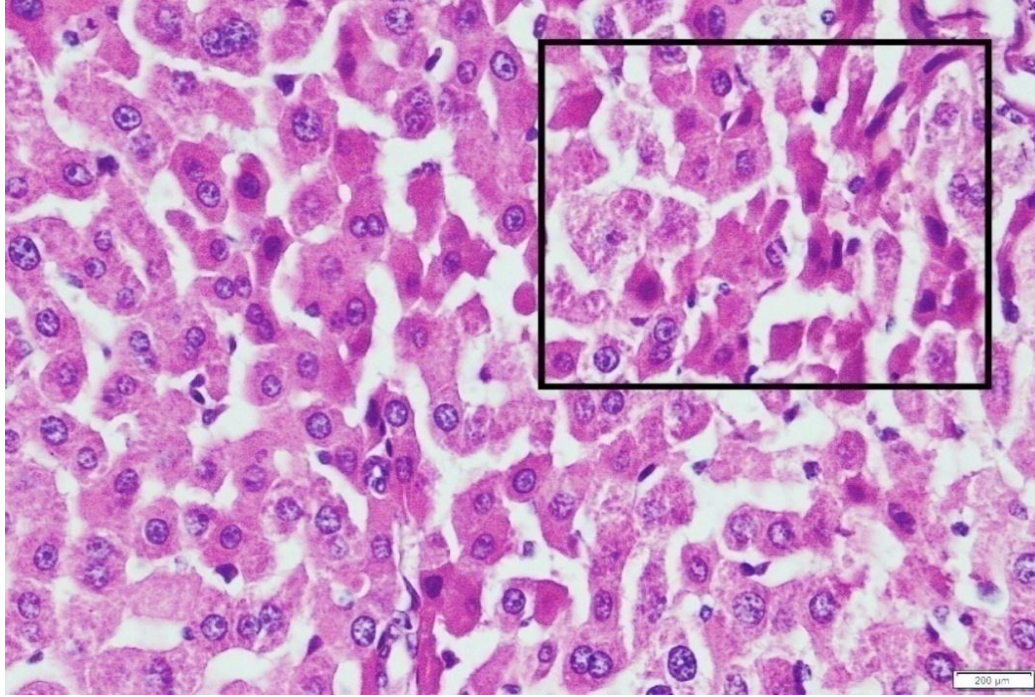
**Şekil 4.22.** Ob grubuna ait karaciğer örneklerinde sinüzoidal dilatasyon izlenmektedir.

Yine Ob grubuna ait karaciğer örneklerinde, hepatosit kordonlarının ışınsal yerleşim düzeninin bozulmuş olduğu gözlemlendi. Ayrıca bu düzeni bozulmuş kordonların hücreleri arasında bağlantı kayıpları olduğu da izlenmekteydi (Şekil 4.23)



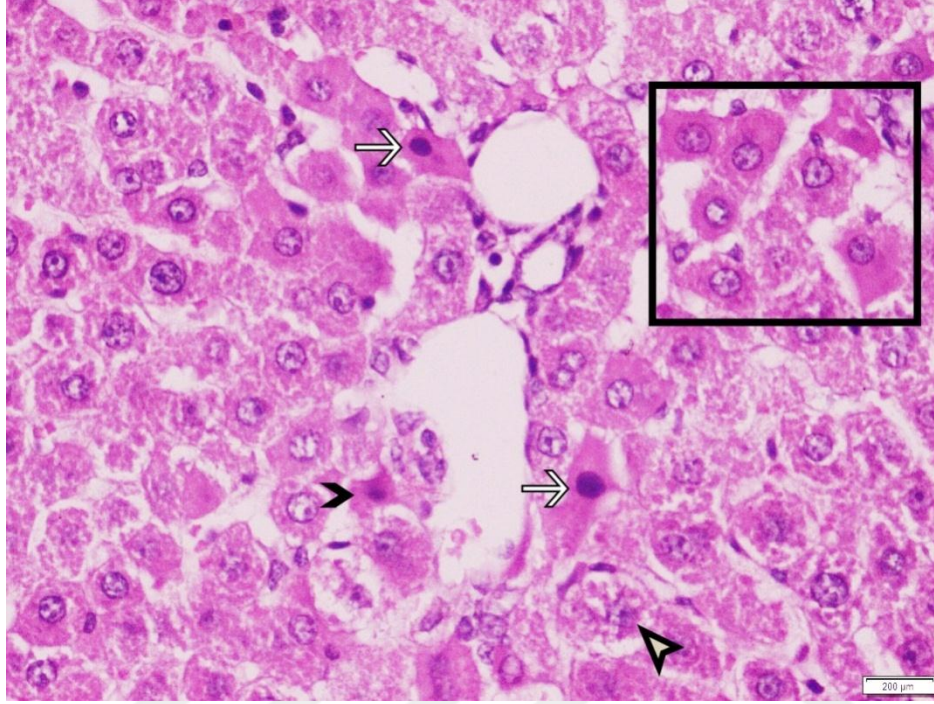
**Şekil 4.23:** Ob grubundan elde edilen karaciğer örneklerinde düzeni bozulmuş hepatosit kordonları ve bu kordonlarda yer alan hücreler arasındaki bağlantı kayıpları çerçeve içerisinde görülmektedir.

Ob grubundan elde edilen karaciğer örneklerindeki hepatositlerin yapısı değerlendirildiğinde; normal boyutlu ve boyanma özelliğindeki hücreler arasında piknotik çekirdekleri ve eozinofil sitoplazmaları ile hasara uğradığı düşünülen hücreler görülmekteydi (Şekil 4.24).



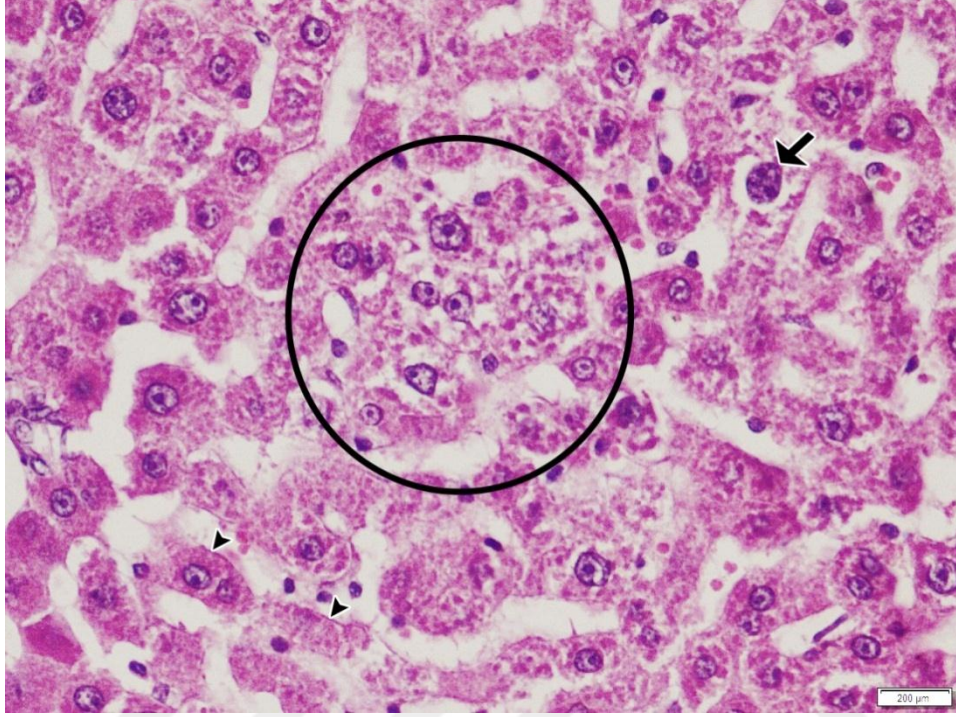
**Şekil 4.24.** Ob grubunda normal boyutlu ve boyanmış hücreler arasında piknotik çekirdekleri ve eozinofil sitoplâzmaları ile hasara uğramış hücreler çerçeve içerisinde görülmektedir.

Bu piknotik çekirdekleri ve eozinofil sitoplâzmaları ile hasara uğramış hücreler portal ven komşuluğunda da yaygın olarak gözlenmekteydi. Bu hücrelerden bazılarının çekirdeğini ve düzenli sitoplâzma sınırlarını kaybettiği ve ölüme gittiği düşünöldü (Şekil 4.25).



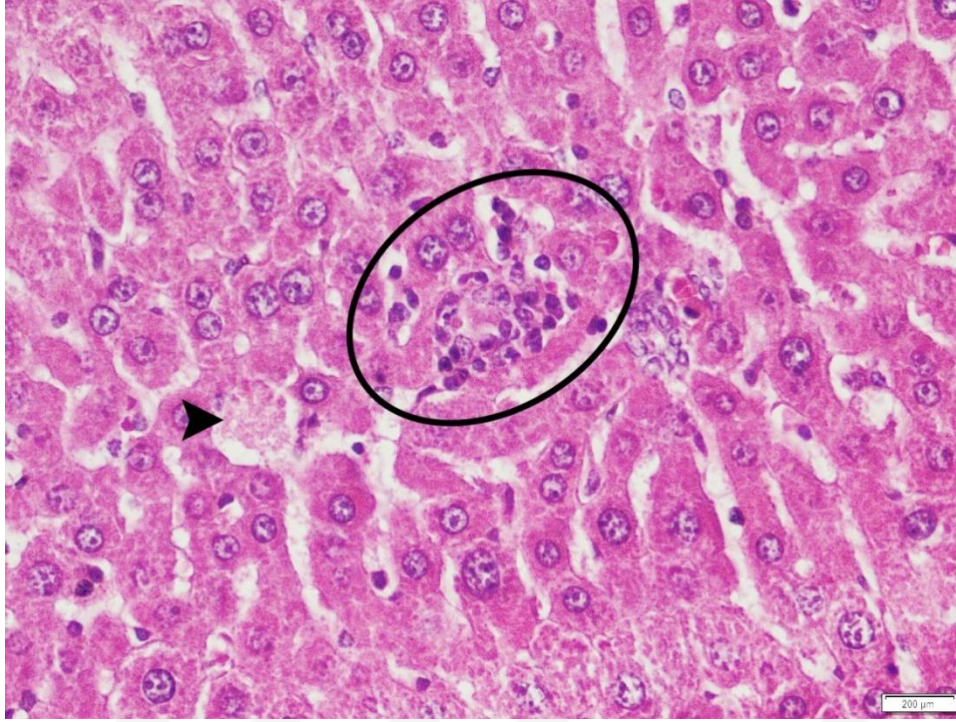
**Şekil 4.25:** Ob grubunda piknotik çekirdekleri ve eozinofil sitoplazmaları ile hasara uğramış hücreler gözlenmektedir (**Beyaz ok**); **çerçeve** içerisinde eozinofil sitoplazmalı hücreler görölmektedir. **Beyaz dolgulu Okbaşı**, çekirdeğini ve düzenli sitoplazma sınırlarını kaybetmiş ölüme gittiği düşünölen hücre; **Siyah Okbaşı**, çekirdeği oldukça küçölmüş ve sitoplazması yoğunlaşmış ve azalmış apoptoza gittiği düşünölen hücreyi göstermektedir.

Ob grubundaki hepatositlerin bir kısmı ise sitoplazma açısından fakir, glikojen içeriği artmış (kabalaşmış) ve sınırları düzensizleşmiş olarak izlendi. Bazı hücrelerin çekirdekleri ise komşularınıninkilere göre oldukça irileşmişti (Şekil 4.26).



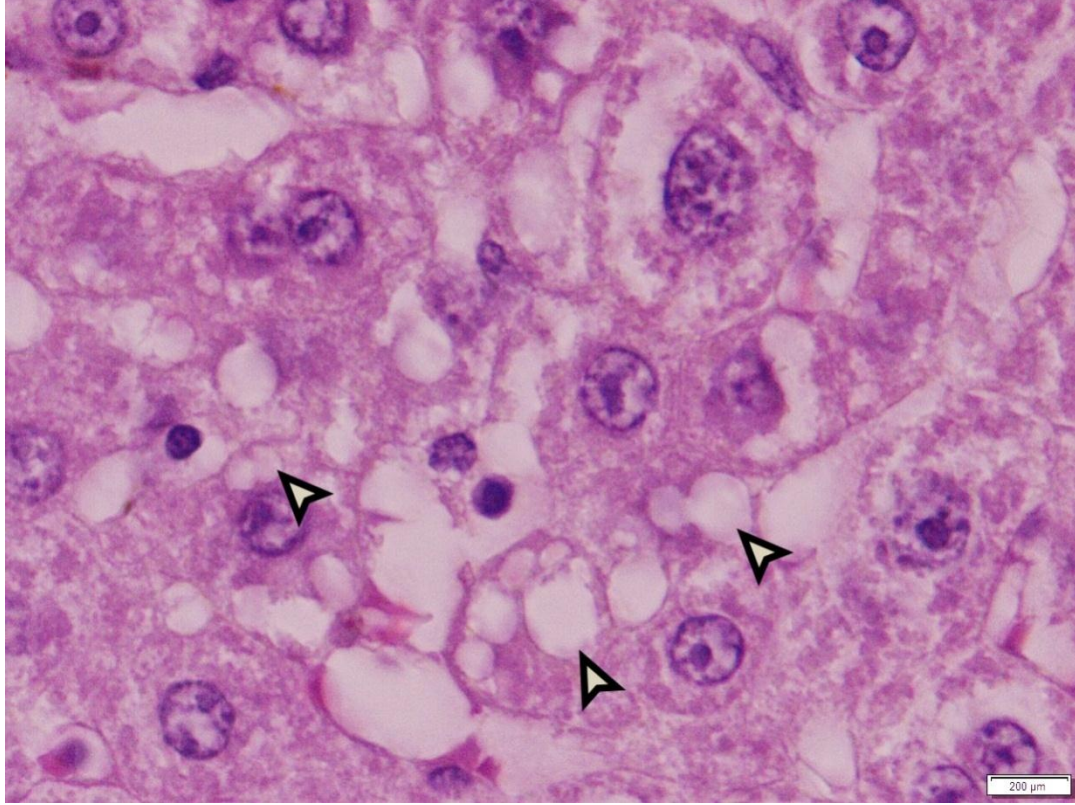
**Şekil 4.26:** Ob grubunda sitoplazma açısından fakir, glikojen içeriği artmış (kabalaşmış) ve sınırsızları düzensizleşmiş hücreler izlendi (**daire içinde**). Bazı hücrelerin çekirdekleri ise komşularına göre oldukça irileşmişti (**ok**).

Ob grubunda yer alan normal görünümlü hepatosit kordonları arasında düzenli sınırlarını kaybetmiş hepatositler ve inflamatuvar hücreler içerdiğinden; nekrotik odaklar oldukları düşünülen alanlar bulunmaktaydı (Şekil 4.27).



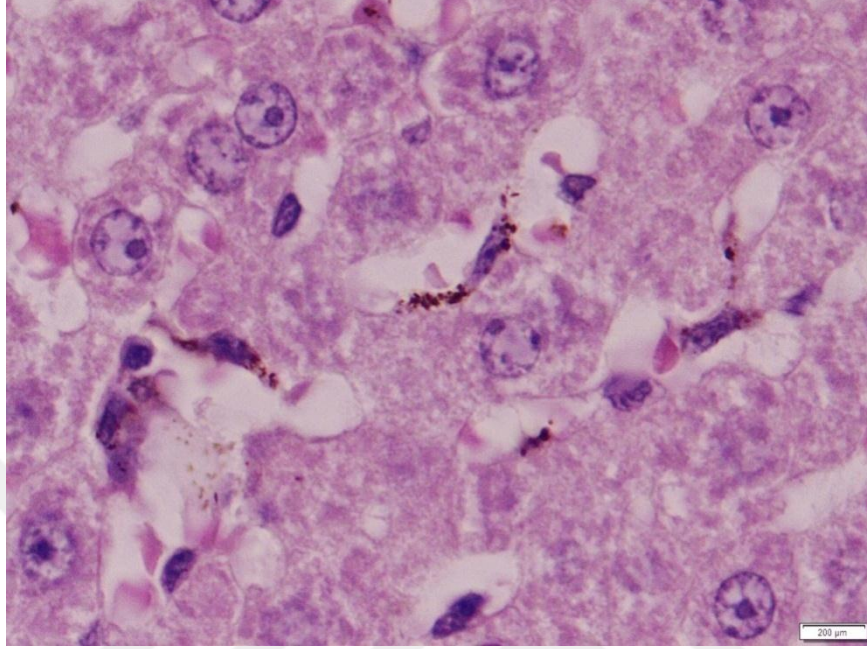
**Şekil 4.27:** Ob grubunda nekrotik odaklar oldukları düşünülen alanlar bulunmaktaydı (**Elipsin içerisinde**). **Okbaşı**, çekirdeği ve düzenli sitoplazma sınırlarını kaybetmiş ölüme gittiği düşünülen hücreyi göstermektedir.

Ob grubundaki hepatositlere yüksek büyütmede bakıldığında hücrelerin içerisinde iri yağ damlacıklarına rastlandı (Şekil 4.28).



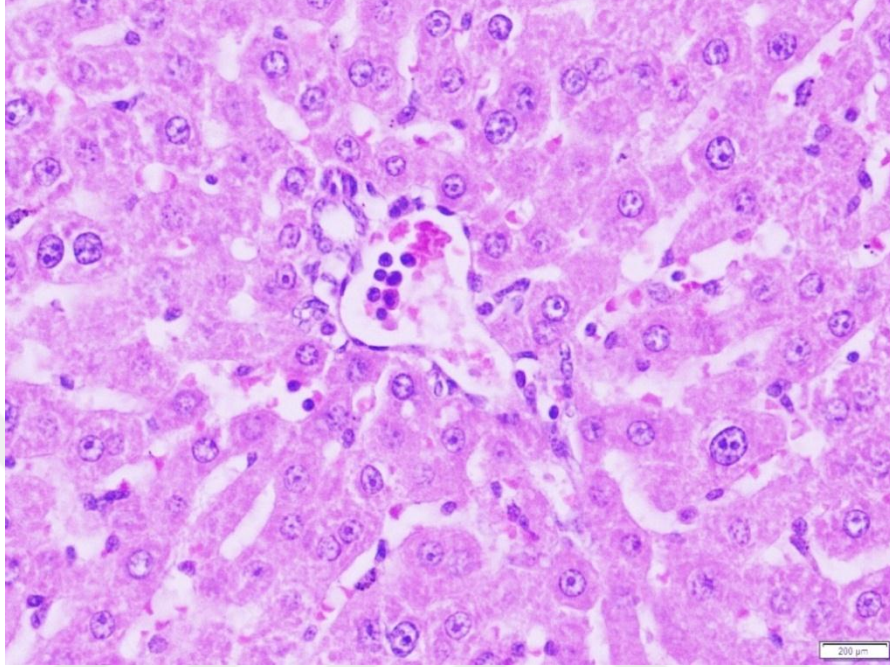
**Şekil 4.28:** Ob grubundaki hepatositlerde hücre içi yağ damlacıklarına rastlandı (beyaz dolgulu okbaşı).

Bu grupta yer alan sinüzoidlerin duvarında bulunan Kupffer hücrelerinin kontrol grubuna göre daha sık gözlendiği, irileŖtiđi ve lipofuksin pigmentleri açısından zengin olduğu tespit edildi (Ŗekil 4.29).

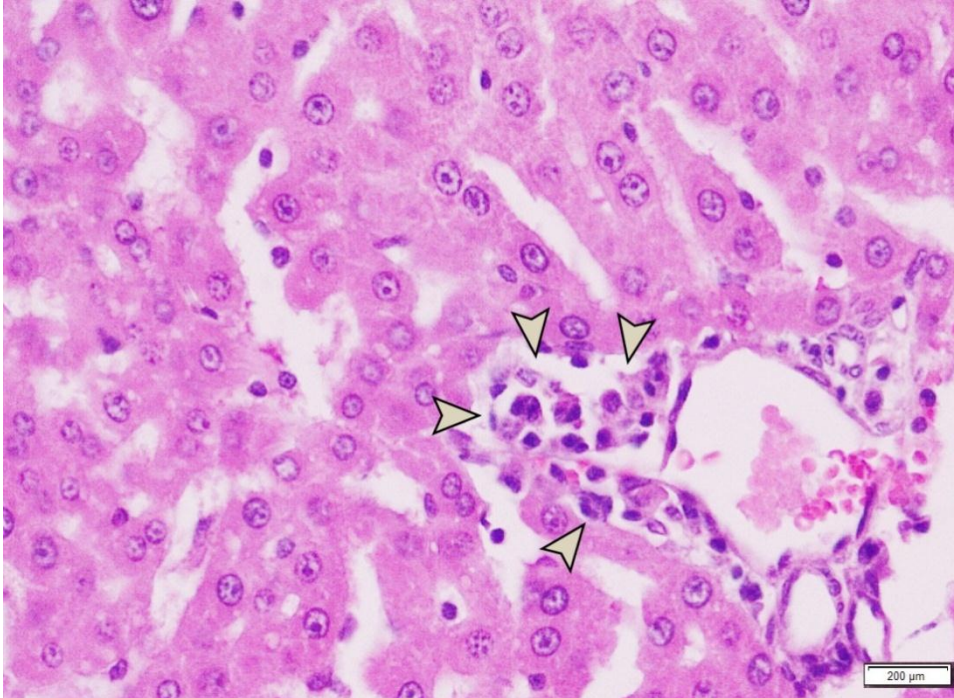


**Ŗekil 4.29:** Kontrol grubuna göre daha sık, iri ve lipofuksin pigmentleri açısından zengin Kupffer hücreleri görülmektedir.

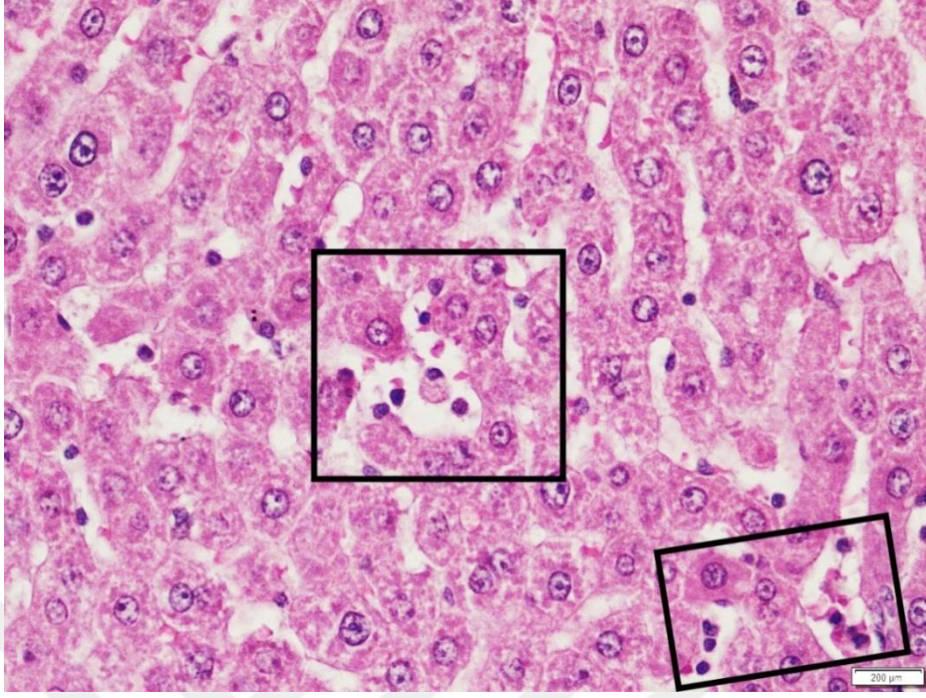
Ob grubunda gerek büyük damar dalları içerisinde (Şekil 4.30) ve etrafında (Şekil 4.31) gerekse sinüzoidler içerisinde (Şekil 4.32) inflamatuvar hücreler görülmekteydi.



**Şekil 4.30:** Ob grubunda portal ven içerisinde inflamatuvar hücreler görülmektedir.

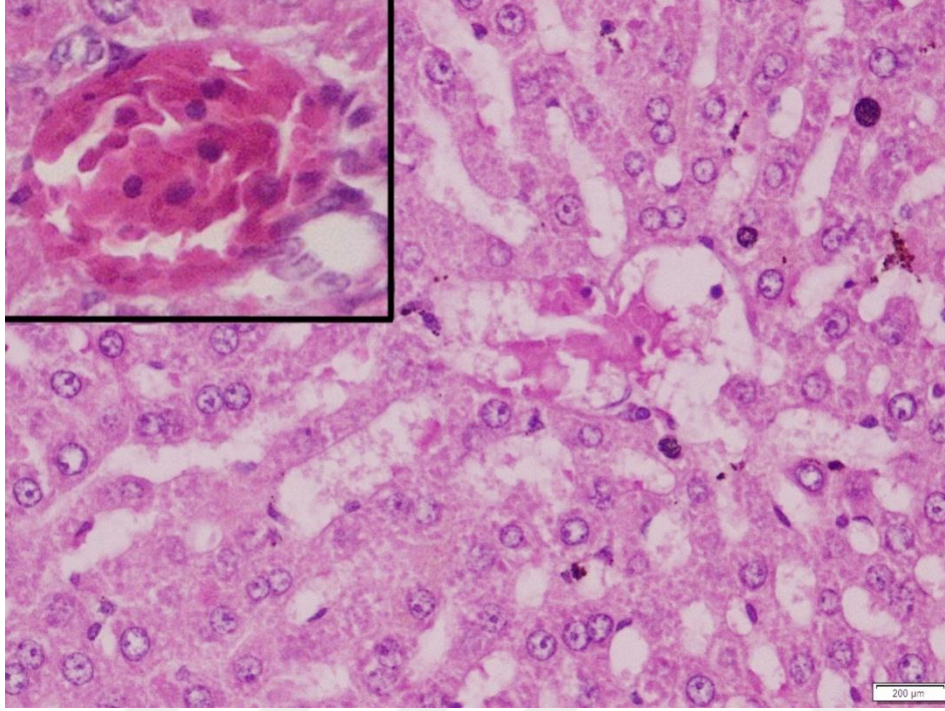


**Şekil 4.31:** Ob grubunda portal ven etrafında inflamatuvar hücreler görülmektedir (beyaz dolgulu okbaşı).



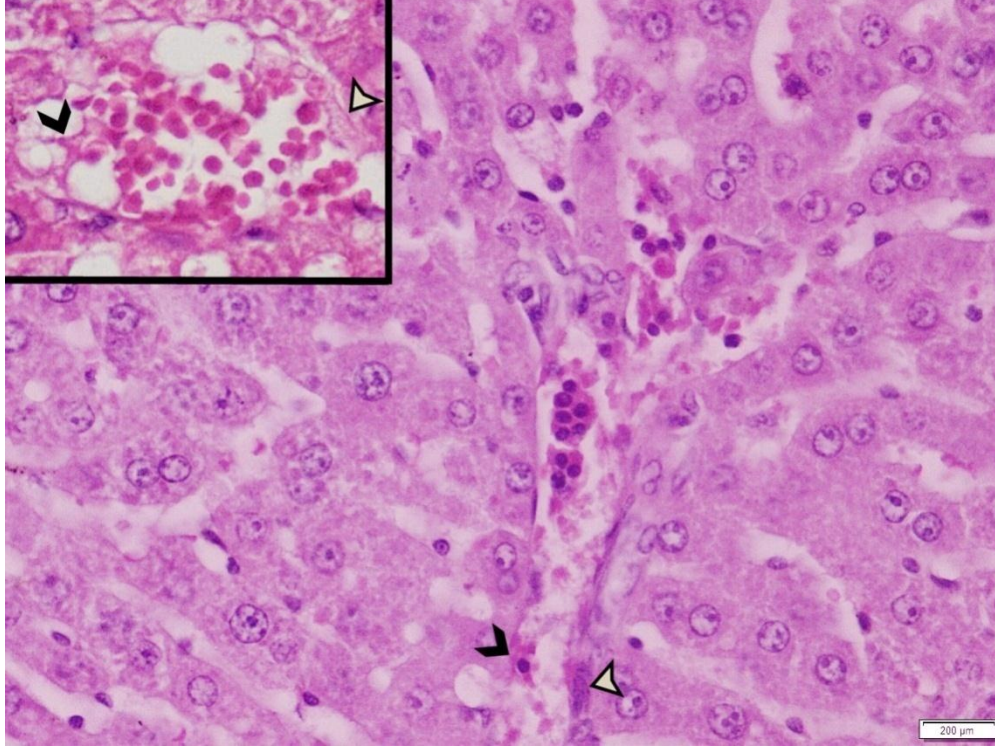
**Şekil 4.32:** Ob grubunda sinüzoidler içerisinde inflamatuvar hücreler görülmektedir (Çerçevelerin içerisinde).

Ob grubundaki damar dalları içerisinde bulunan kan hücrelerinin birbirine ve damar duvarına oldukça yakın oldukları gözlemlendi. Ayrıca yine damar dalları içerisinde fibrin olası birikimlere de rastlandı (Şekil 4.33).



**Şekil 4.33:** Ob grubunda portal ven dalı içerisinde birbirine ve damar duvarına oldukça yakın konumlu kan hücreleri (küçük resimde, aynı büyütmede); büyük resimde santral ven içerisinde fibrin olası birikimler görülmektedir.

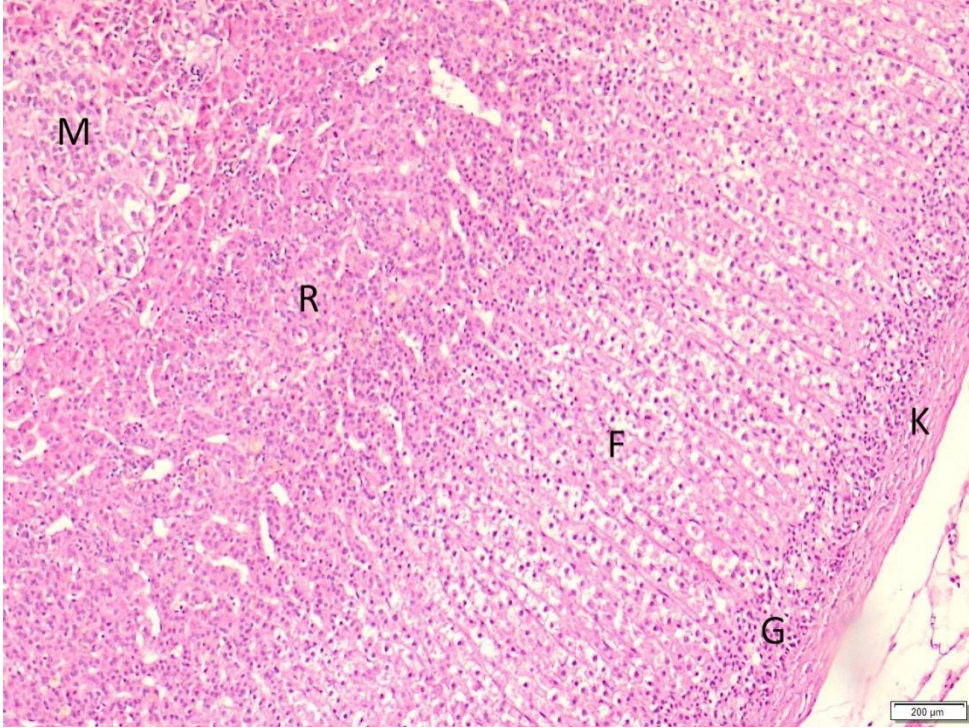
Yine Ob grubunda, damar dallarının birkismında, damar duvarında bulunan endotel hücrelerinin sitoplâzmasını artırarak irileştiği; damar içerisinde bulunan kan hücrelerinin ise damar duvarı ile ilişkide oldukları gözlendi (Şekil 4.34).



**Şekil 4.34:** Ob grubunda, damar duvarında bulunan sitoplazmasını artırarak irileşen endotel hücreleri (**beyaz dolgulu okbaşı**), damar duvarına bağlı kan hücreleri (siyah okbaşı) görülmektedir.

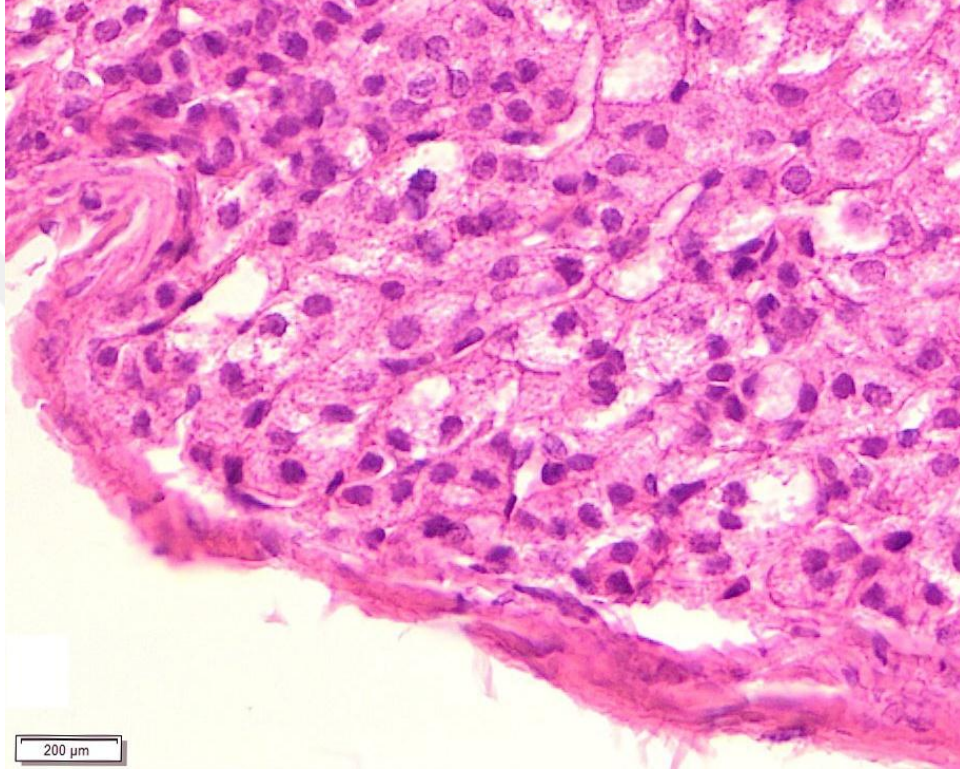
## B. Böbreküstü Bezine Ait Bulgular:

Kontrol grubundaki deneklerden elde edilen böbreküstü bezleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde, korteks ve medulla şeklinde iki farklı bölümden oluştuğu izlendi. Korteks, dıştan sıkı bağ dokusu görünümünde olan kapsül ile çevrili idi. Yapısına bakıldığında; kapsül altında dıştan içe; zona glomeruloza, zona fasikülata ve zona retikularisten oluştuğu gözlemlendi. Medulla ise kan damarları ve kromaffin hücreler açısından zengindi. Nadiren sağlıklı görünümdeki gangliyon hücre ve uzantıları dikkati çekmekte idi (Şekil 4.35).



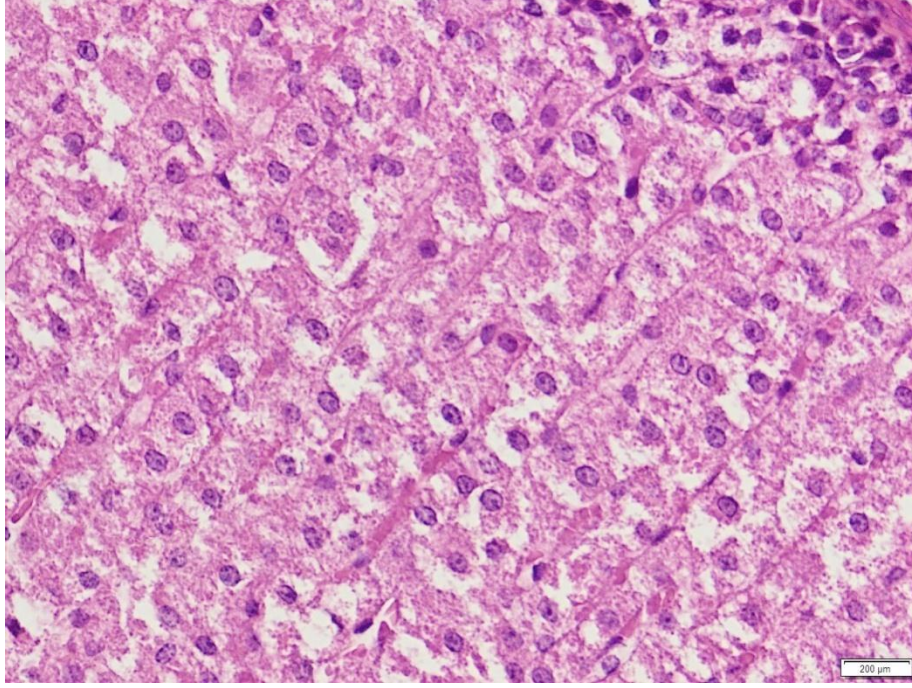
**Şekil 4.35:** Kontrol grubunda böbrek üstü bezinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. K, kapsül, G, zona glomeruloza, F, zona fasikülata; R, zona retikularis; M, medullayı göstermektedir.

Kontrol grubundan elde edilen böbrek üstü bezlerinde zona glomeruloza tabakası değerlendirildiğinde bu tabakanın kapsülün hemen altına yerleşmiş olduğu tespit edildi. Söz konusu bu tabaka ince yapıdaydı ve konsantrik veya glomerular halkalar oluşturan parankimal hücrelerden oluşmaktaydı. Bu küçük pirizmatik hücreler, 1 ve 2 nukleolus içeren küçük koyu nukleusları ve asidofil sitoplazmaları ile sağlıklı görünümdelerdi (Şekil 4.36).



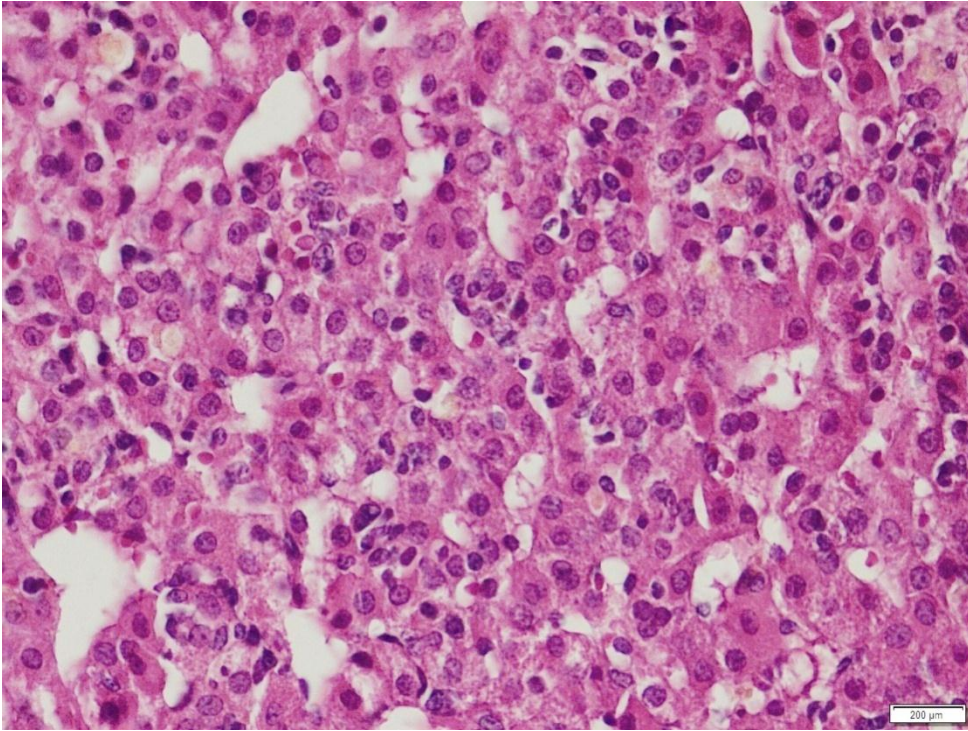
**Şekil 4.36:** Kont grubunda böbrek üstü bezinde zona glomeruloza tabakasının ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir.

Kont grubunda, böbreküstü bezinin korteksindeki hücrelerin ara tabakası olan zona fassiklata, korteksin en kalın tabakası olarak izlenmekteydi. Bu tabakada birbirine paralel hücre kolonları arasında longitudinal olarak konumlanan sinüzoidal tipte kılcal damarlar içermekteydi. Bu tabakada yer alan poligonal hücreler soluk asidofilik boyanma özelliğine sahip olup ve yer yer vakuollü grnmektedirlerdi (Şekil 4.37).



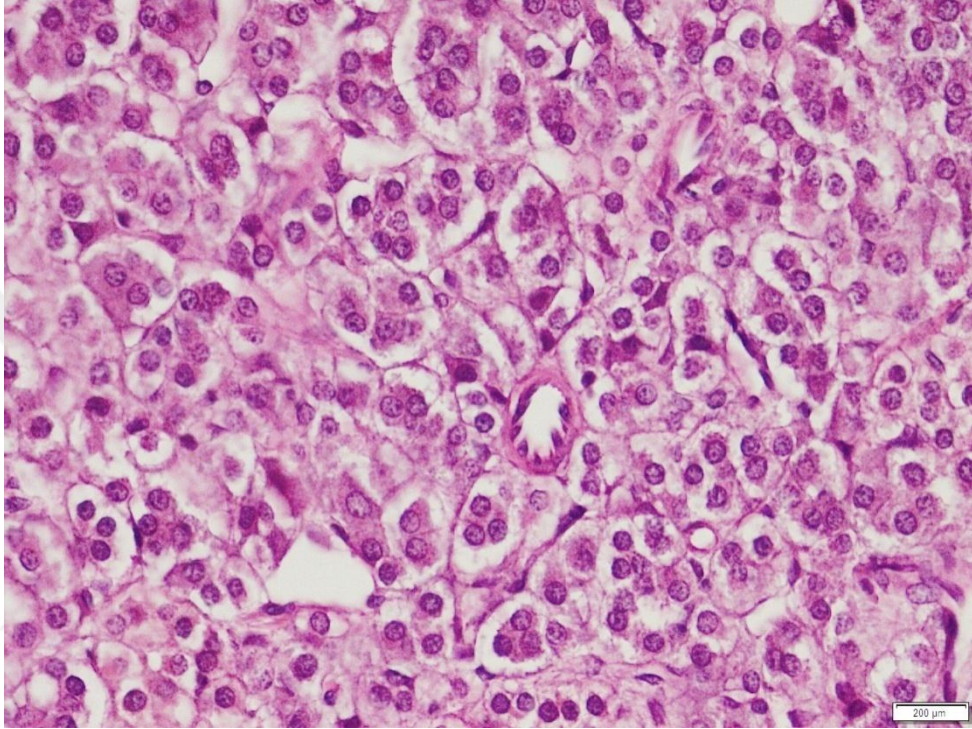
**Şekil 4.37:** Kont grubunda böbrek üstü bezinde zona fassiklata tabakasının işık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir.

Kont grubundan elde edilen böbreküstü bezlerinde korteksin en iç tabakasında bulunan zona retikularis hücreleri koyu asidofil boyanan ve birbirleriyle anastomozlaşan kordonlar şeklinde düzenlenmekteydi. Bu hücreler zona fasikülataninkilerden daha küçük olup ve daha az lipid damlacıkları içermektedirlerdi (Şekil 4.38).



**Şekil 4.38:** Kont grubunda böbrek üstü bezinde zona retikularis tabakasının ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir.

Kont grubundan elde edilen böbreküstü bezlerinin merkezi kısmı olan medulla, böbreküstü bezi korteksi tarafından tamamen çevrelenmişti. Bu alanda kümeler veya kısa kordonlar şeklinde düzenlenmiş büyük epiteloid hücreler olan kromoffin hücreler ve bağ dokusu içine dağılmış sempatik gangliyon hücreleri sağlıklı olarak izlenmekteydi (Şekil 4.39).



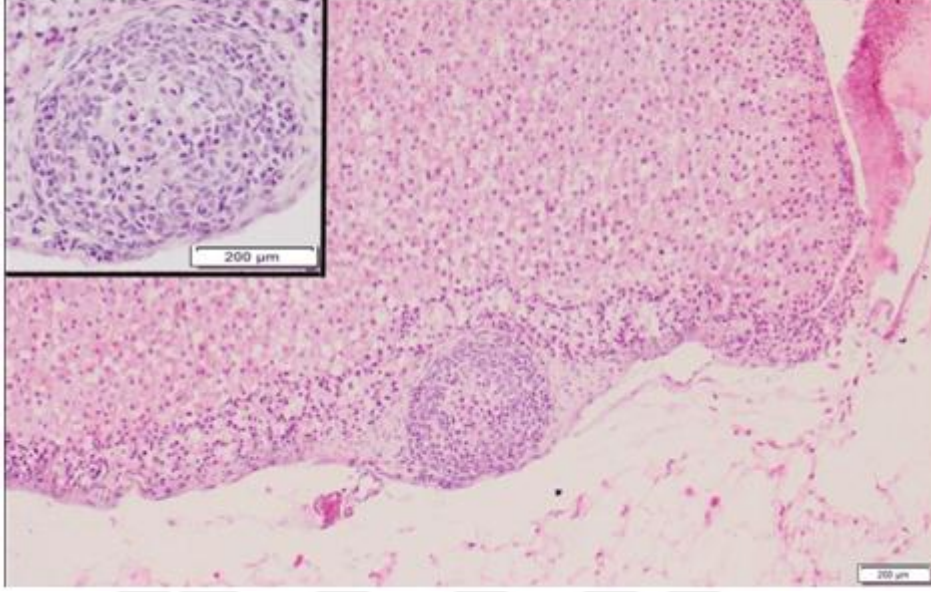
**Şekil 4.39:** Kont grubunda böbrek üstü bezinde medullanın ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir.

Ob grubundaki deneklerden elde edilen böbreküstü bezleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde, böbreküstü bezini saran kapsülün kontrol grubununkine kıyasla daha kalın olduğu kapsülün etrafındaki yağ dokusu hücrelerinin ise kontrol grubundakinden daha fazla ve irice oldukları görüldü. Korteksin zona glomeruloza tabakasının kontrol grubundakine kıyasla daha ince yapıda olduğu zona fasikülata tabakasının ise kontrol grubundakine kıyasla oldukça kalın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.40).



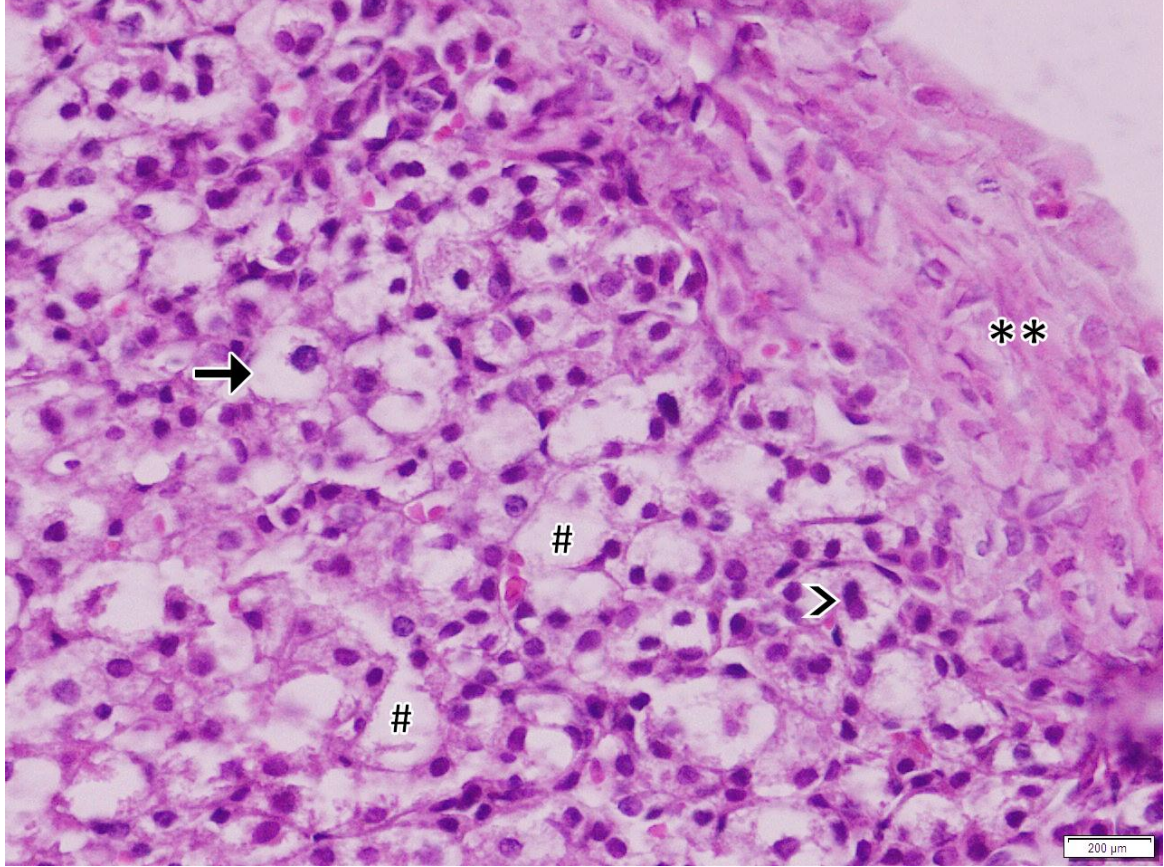
**Şekil 4.40:** Ob grubunda böbrek üstü bezinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. K, kapsül, G, zona glomeruloza, F, zona fasikülata; YD, yağ dokusunu göstermektedir.

Ob grubuna ait böbreküstü bezlerinin birinde kapsülün hemen altında aksesuar böbreküstü bez olası bir yapıya rastlandı (Şekil 4.41).



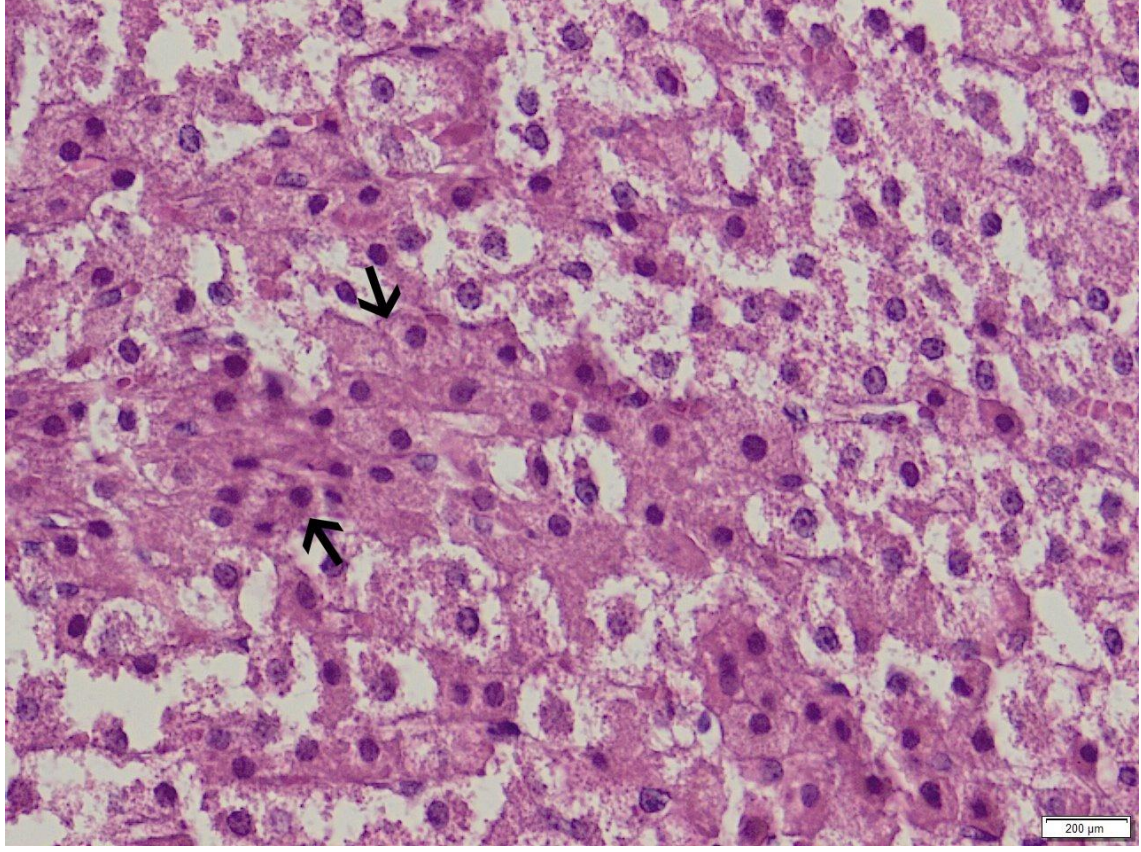
**Şekil 4.41:** Ob grubunda kapsülün hemen altında aksesuar böbreküstü bezi görülmektedir (çerçeve).

Kalınlaşan kapsülün hemen altındaki zona glomeruloza tabakasının hücreleri nadiren seçilirken), kapillerlerin genişlediği, zona fasikülata hücrelerinin irileşerek steroid içeriğinin arttığı gözlemlendi. Yine bu tabakadaki hücreler arasında makrofaj olası hücrelere rastlandı (Şekil 4.42).



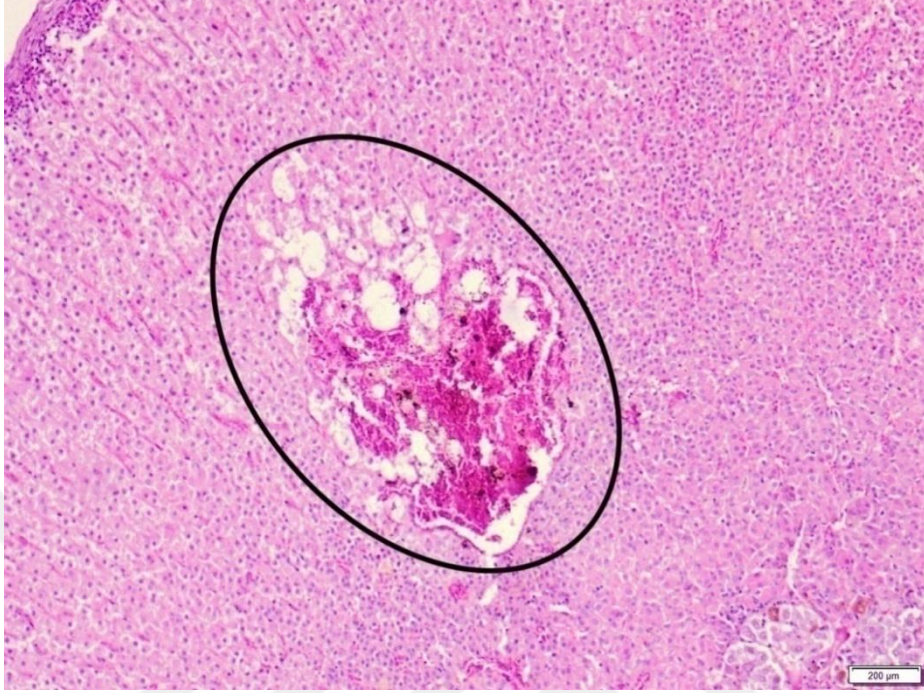
**Şekil 4.42:** Ob grubunda, kalınlaşan kapsül (\*\*), genişleyen kapillerler (#), irileşerek steroid içeriği artmış zona fasikülata hücreleri (ok) ve hücreler arasında makrofaj (okbaşı) görülmektedir.

Ob grubundan elde edilen böbreküstü bezlerinin zona fasikülata tabakasında iri ve steroid içeriği artmış hücreler arasında eozinofil sitoplazmaları ile bu tabakaya yeni katıldıkları düşünülen hücrelere rastlandı (Şekil 4.43).



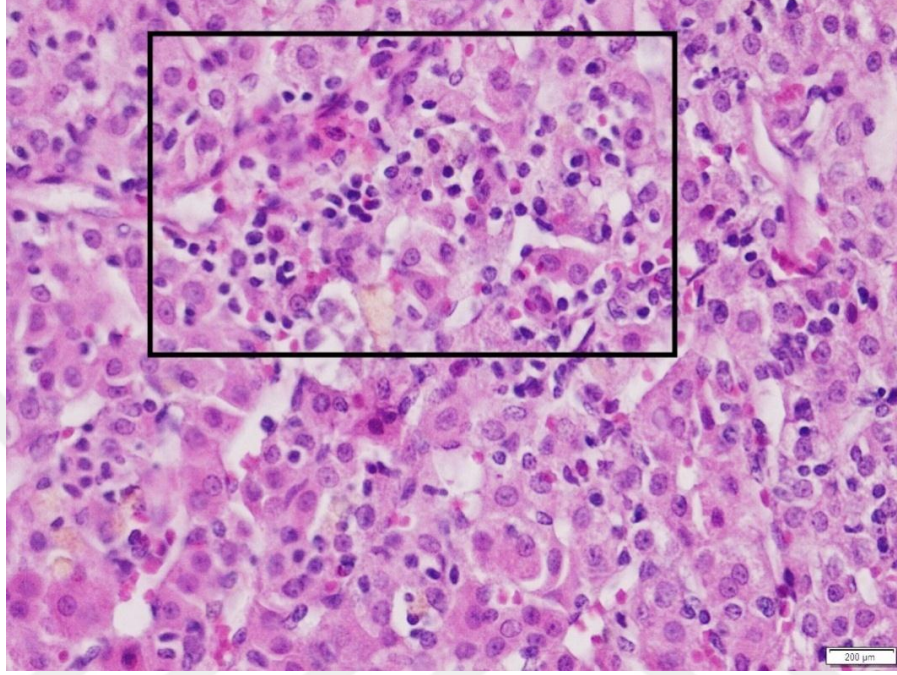
**Şekil 4.43:** Ob grubunda zona fasikülata tabakasında iri ve steroid içeriği artmış hücreler arasındaki eozinofil sitoplazmaları ile bu tabakaya yeni katıldıkları düşünülen hücreler (oklar) görülmektedir.

Yine Ob grubuna ait böbreküstü bezlerinin zona fasikülata tabakası içerisinde yağlı dejenerasyon ve nekroz odakları tespit edildi (Şekil 4.44).



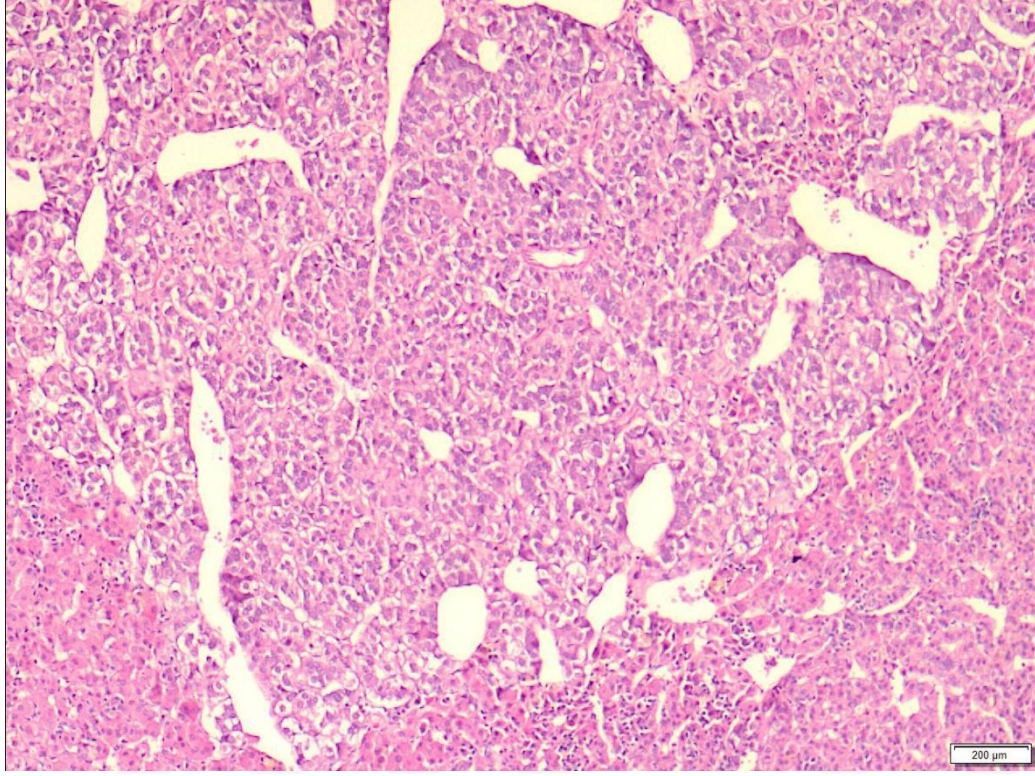
**Şekil 4.44:** Ob grubunda zona fasikülata da yağlı dejenerasyon ve nekroz odakları (daire içinde) izlenmektedir.

Ob grubundaki deneklerden elde edilen böbreküstü bezi kortekslerinin zona retikularis tabakası incelendiğinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu dikkati çekmekteydi (Şekil 4.45).



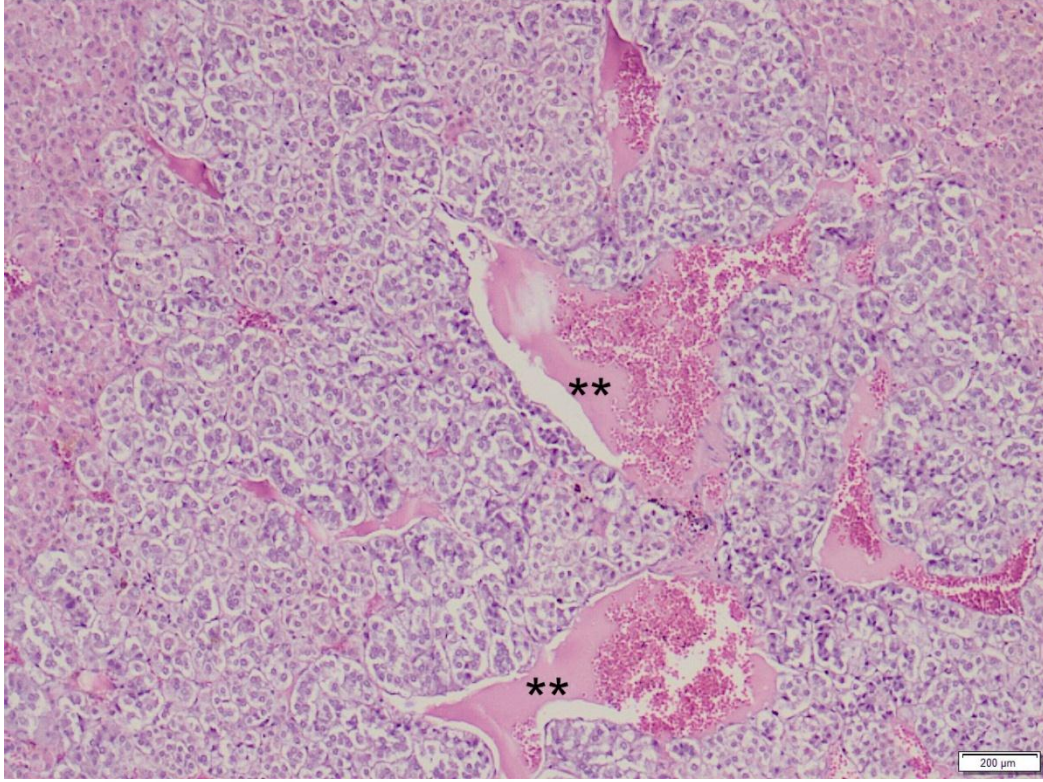
**Şekil 4.45:** Ob grubunda z.retikulariste inflamatuvar hücre infiltrasyonu (çerçevede) görülmektedir.

Ob grubundan elde edilen böbreküstü bezlerinin medullasına bakıldığında ilk dikkati çeken bulgu damar dallarının kontrol grubundakine kıyasla genişlemiş olması idi (şekil 4.46).



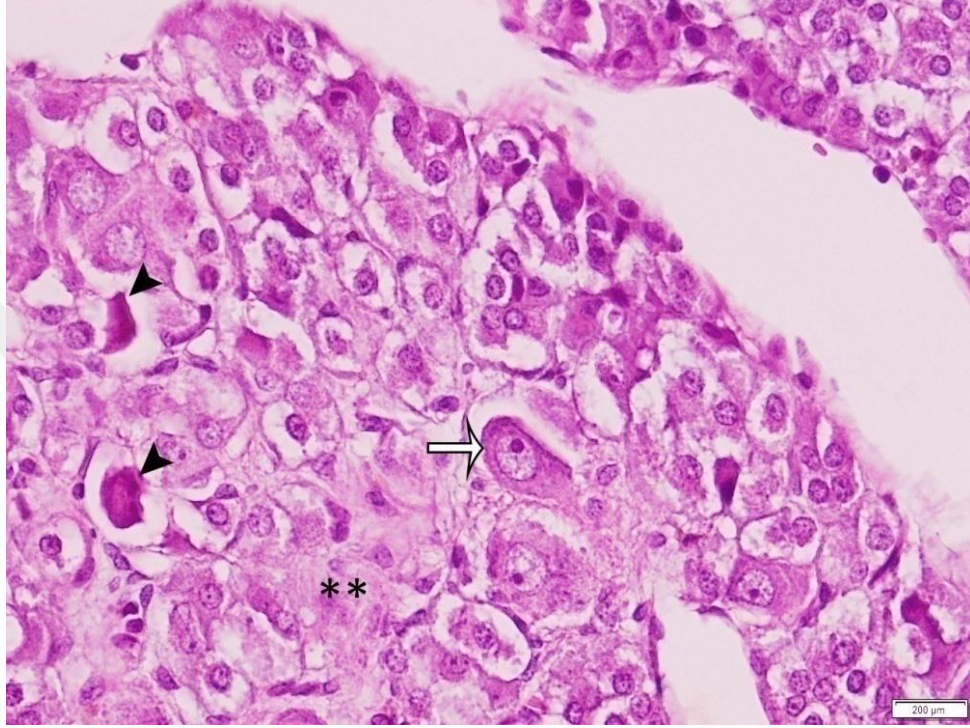
**şekil 4.46:** Ob grubunda medullada dilate damar dalları görülmektedir.

Yine bu damarların bir kısmında venöz dönüşün yavaşladığı gözlemlendi. Hatta, sözkonusu bu damarların bir kısmının içerisinde fibrin olası birikimlere rastlandı (Şekil 4.47).



**Şekil 4.47:** Ob grubunda medulladaki damarlarda bulunan çok sayıda kan hücresi ve fibrin birikimi (yıldızlar) görülmektedir.

Ek olarak; Ob grubundan elde edilen böbreküstü bezlerinin medullasındaki gangliyon hücrelerinin bir kısmı sağlıklı iken diğer bir kısmı eozinofil sitoplazmaları ve küçülmüş hücre sınırları ile hasarlı görünümdeydi. Ayrıca medullada hücre sınırları tam olarak seçilemeyen bazı alanlar da dikkati çekmekteydi (Şekil 4.48).

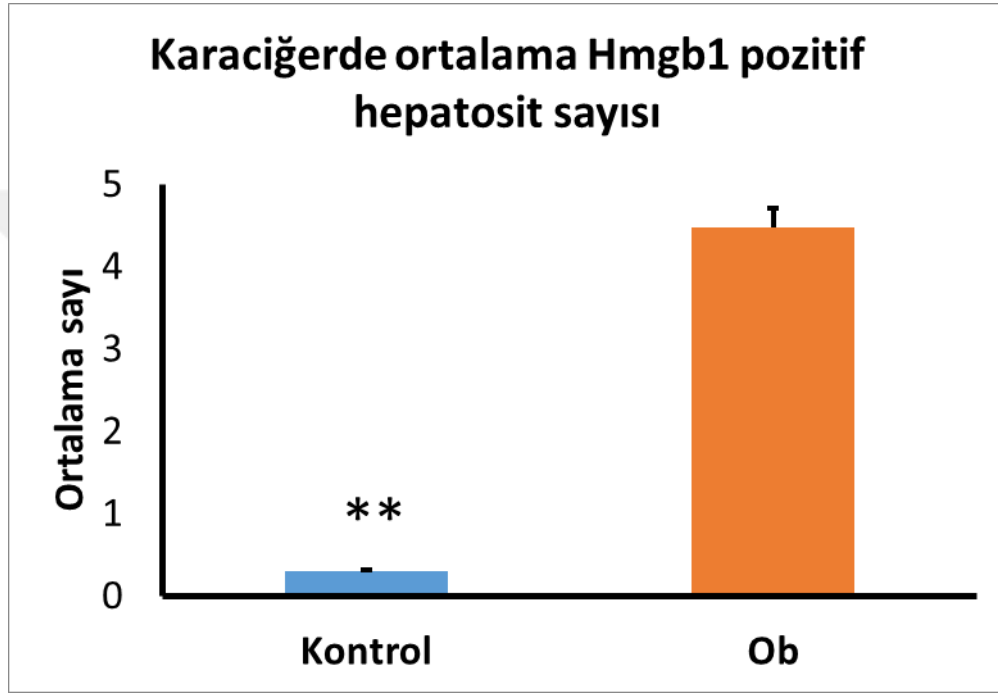


**Şekil 4.48:** Medullada sağlıklı gangliyon hücrelerinin (ok) yanında çekirdeği seçilemeyen küçülmüş ve eozinofil sitoplazmalı gangliyon hücreleri (okbaşı) ve medullada hücre sınırları tam olarak seçilemeyen alanlar (\*\*) görülmektedir.

#### 4..4. İmmünohistokimyasal Bulgular

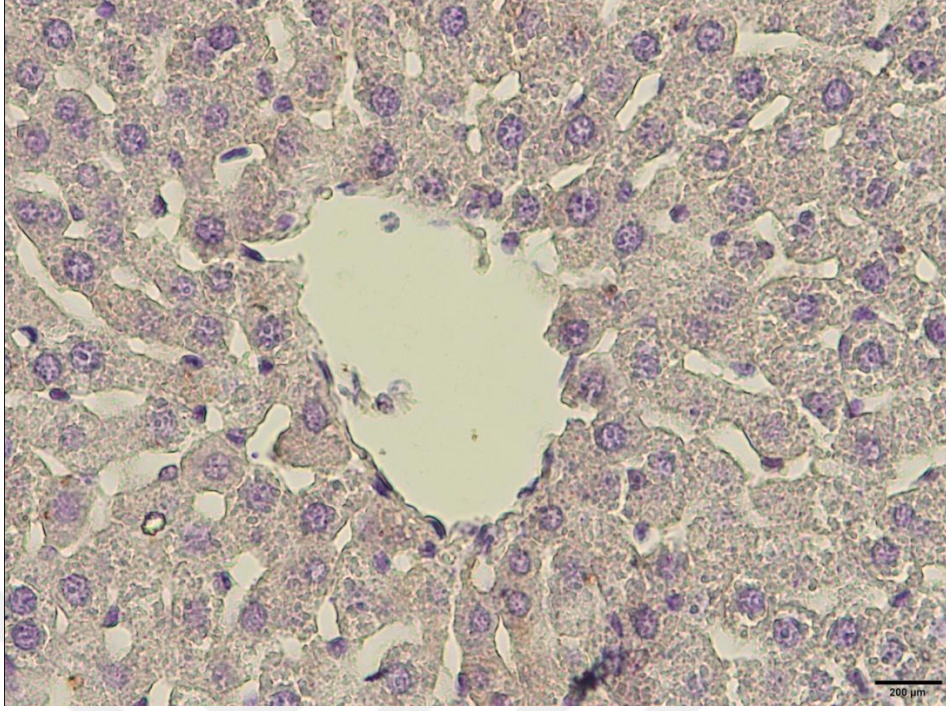
##### A. Karaciğere Ait İmmünohistokimyasal Bulgular

Hem kontrol hem de deney grubundan elde edilen karaciğer örnekleri Anti-HMGB1 antikoru ile boyandı (Abcam; Cat.No: 18256). Her iki grupta da pozitif boyalı hücreler stereolojik olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında ileri düzeyde anlamlı fark tespit edildi ( $p < 0.01$ ; Şekil 4.49)

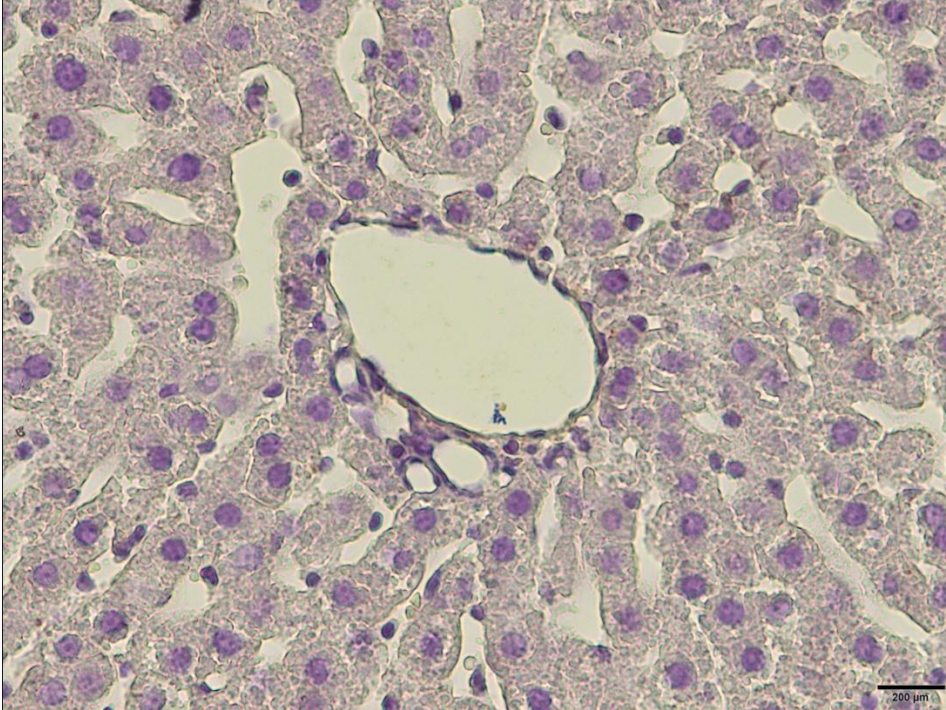


**Şekil 4.49.** Kontrol ve Ob gruplarındaki her tarafsız alan ( $2 \text{ cm}^2$ ) başına düşen ortalama HMGB1 pozitif hepatosit sayısı değerleri görülmektedir. \*\*, gruplar arasındaki  $p < 0,01$  düzeyindeki istatistiksel anlamlılık seviyelerini göstermektedir (Mann Whitney U testi).

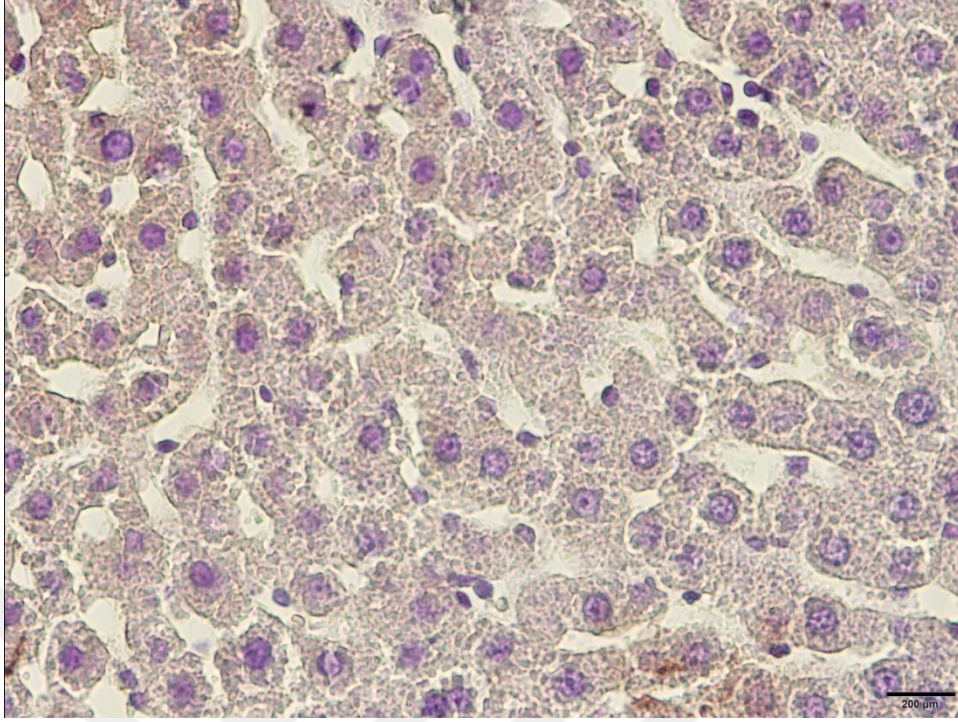
Hem kontrol hem de deney grubundan elde edilen karaciğer örnekleri Anti-HMGB1 antikoru ile boyandı (Abcam; Cat.No: 18256). Buna göre kontrol grubunda ne büyük damar dallarının etrafında ne de bunların arasındaki zon 2 bölgesinde kalan hepatositlerde HMGB1 proteini açısından herhangi bir pozitifliğe rastlanmadı (Şekil 4.50-52).



**Şekil 4.50:** Kontrol grubunda karaciğer santral ven etrafında HMGB1 proteini açısından herhangi bir pozitiflik görülmemektedir.

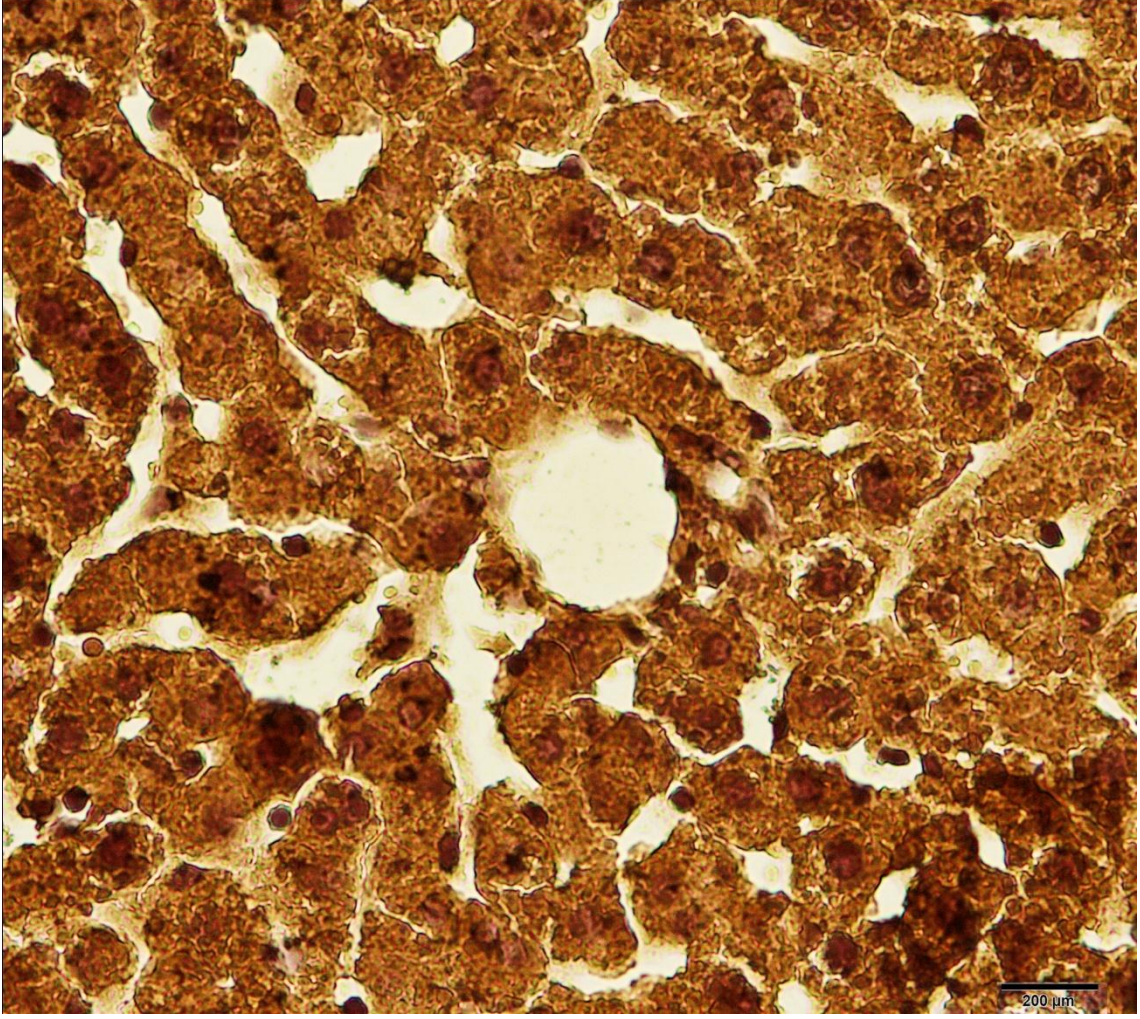


**Şekil 4.51:** Kontrol grubunda karaciğer portal alan etrafında HMGB1 proteini açısından herhangi bir pozitiflik görülmemektedir.

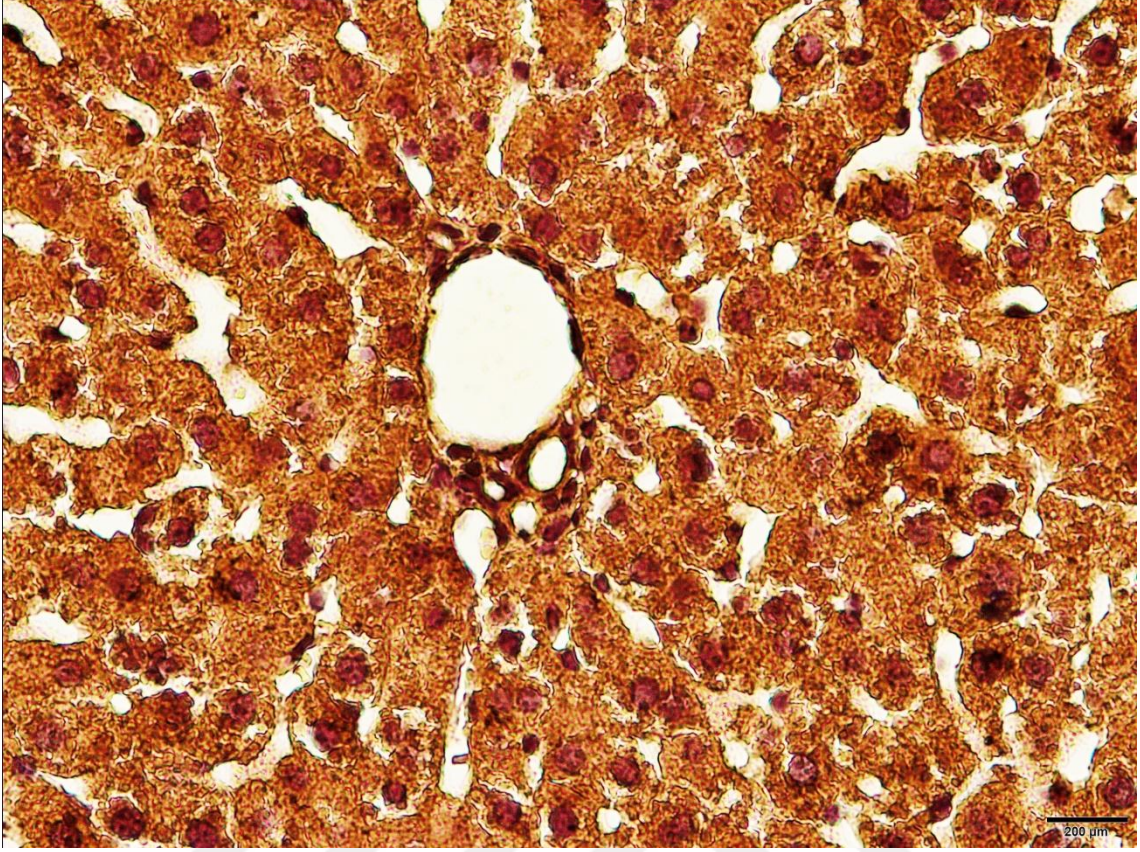


**Şekil 4.52:** Kontrol grubunda karaciğer zon 2 hepatositlerinde HMGB1 proteini açısından herhangi bir pozitiflik görülmemektedir.

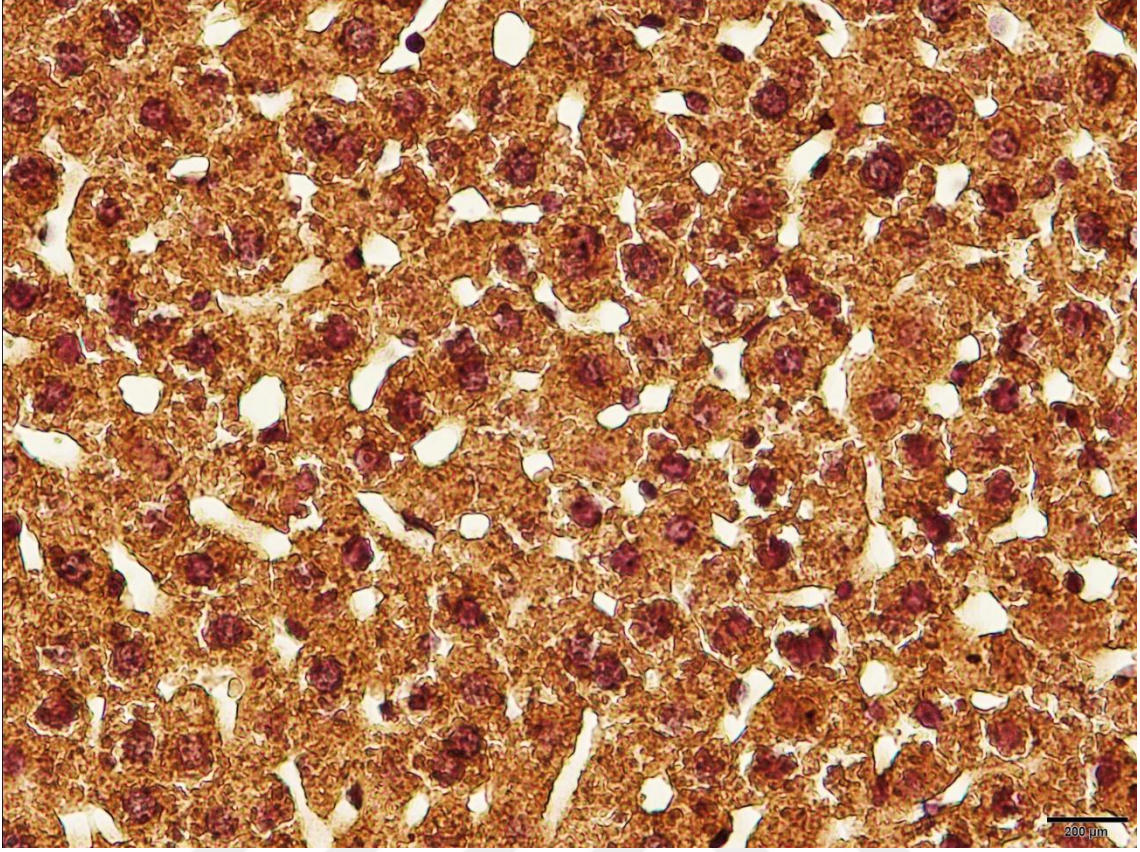
Ob grubundan elde edilen karaciğerlerin anti-HMGB1 antikoru ile boyanması sonucunda hem büyük damar dalları etrafında hem de zon 2 bölgesinde kalan hepatositlerde güçlü pozitif boyanma gözlemlendi. Bu boyanma hem çekirdek hem de sitoplazmada belirgin olarak izlenmekteydi (Şekil 4.53-55)



**Şekil 4.53:** Ob grubunda karaciğer santral ven etrafında HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma görülmektedir.



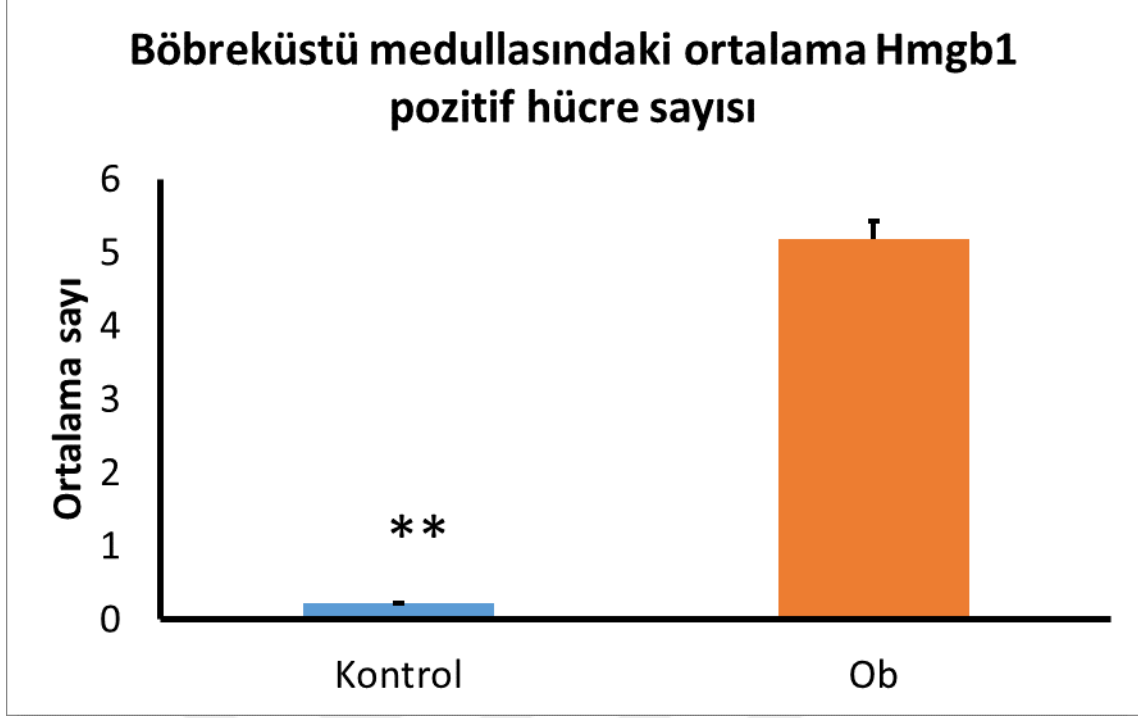
**Şekil 4.54:** Ob grubunda karaciğer portal alan etrafında HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma görülmektedir.



**Şekil 4.55:** Ob grubunda karaciğer zon 2 bölgesinde yer alan hepatositlerde HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma görülmektedir.

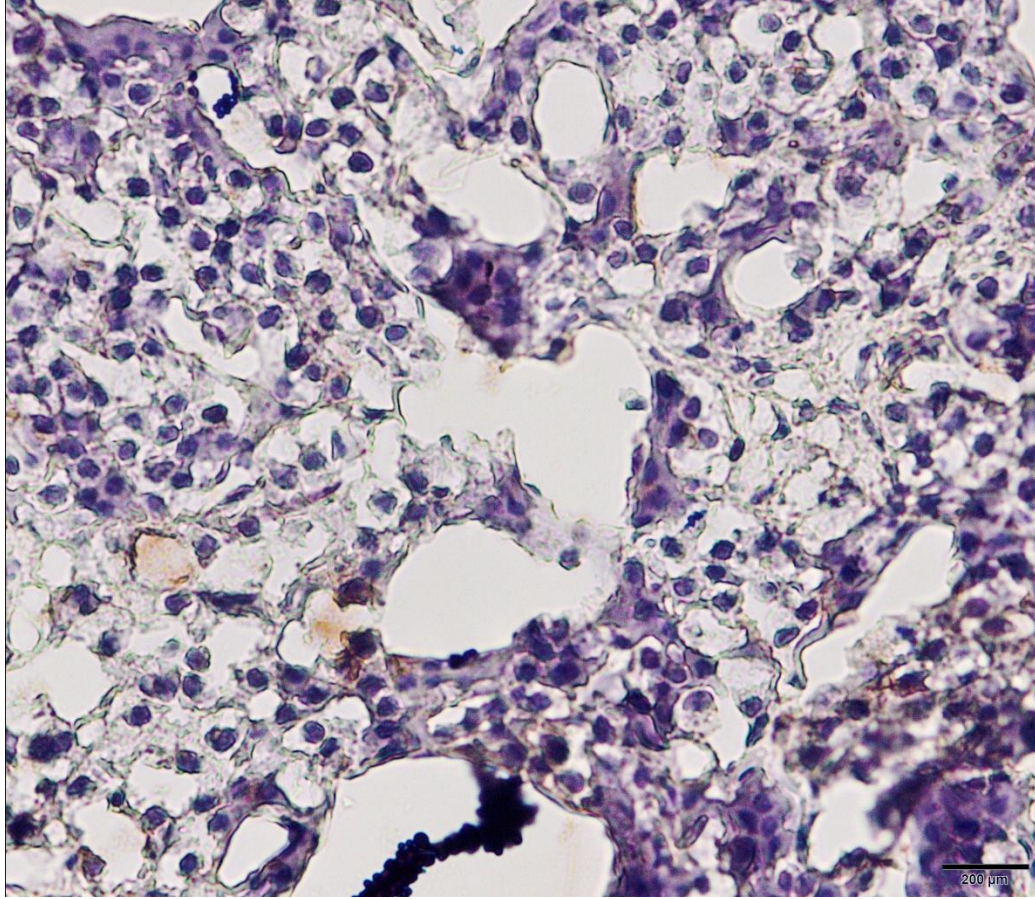
### **B. Böbreküstü Bezine Ait İmmünohistokimyasal Bulgular**

Hem kontrol hem de deney grubundan elde edilen böbreküstü bezi örnekleri Anti-HMGB1 antikoru ile boyandı. Her iki grupta da pozitif boyalı hücreler stereolojik olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında ileri düzeyde anlamlı fark tespit edildi ( $p < 0.01$ ; Şekil 4.46).



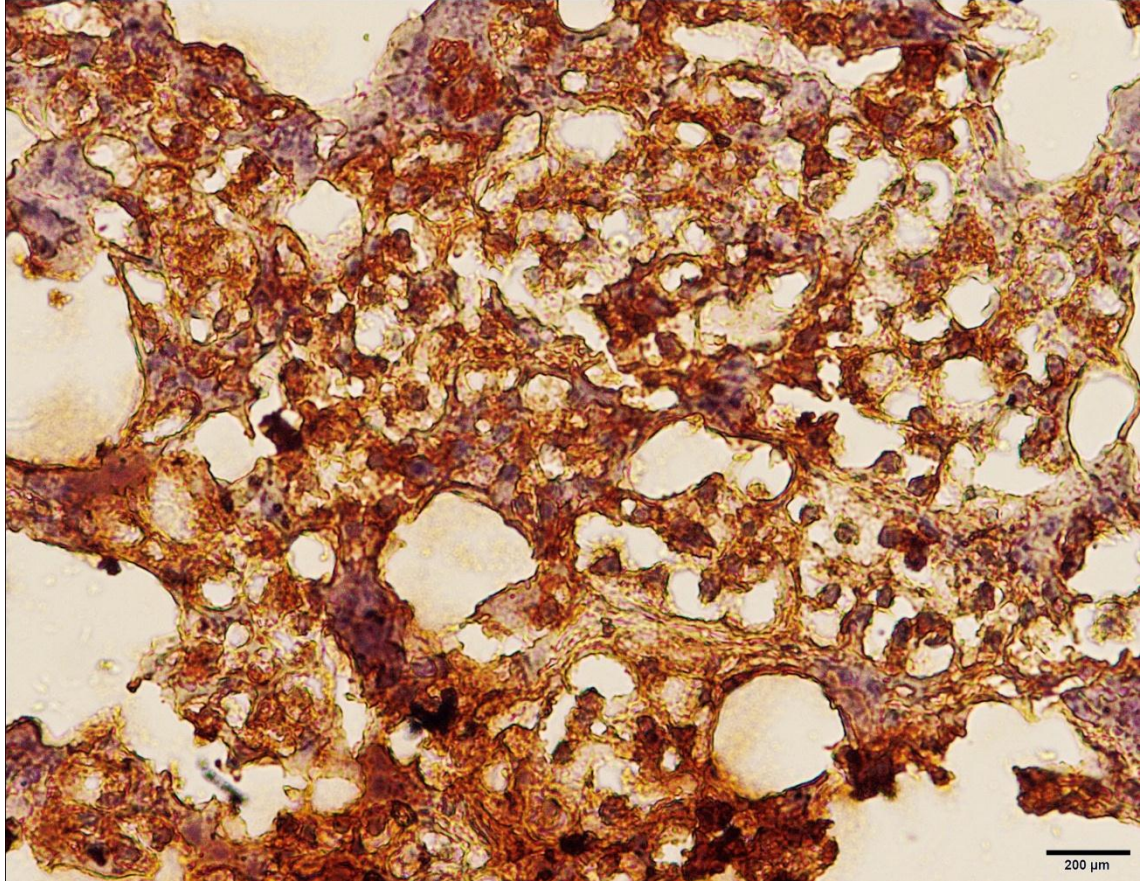
**Şekil 4.56.** Kontrol ve Ob gruplarındaki her tarafsız alan (2 cm<sup>2</sup>) başına düşen ortalama HMGB1 pozitif hücre sayısı değerleri görülmektedir. \*\*, gruplar arasındaki p < 0,01 düzeyindeki istatistiksel anlamlılık seviyelerini göstermektedir (Mann Whitney U testi).

Buna göre kontrol grubunda ne korteks tabakalarında ne de medullada HMGB1 proteini açısından herhangi bir pozitifliğe rastlanmadı (Şekil 4.57).



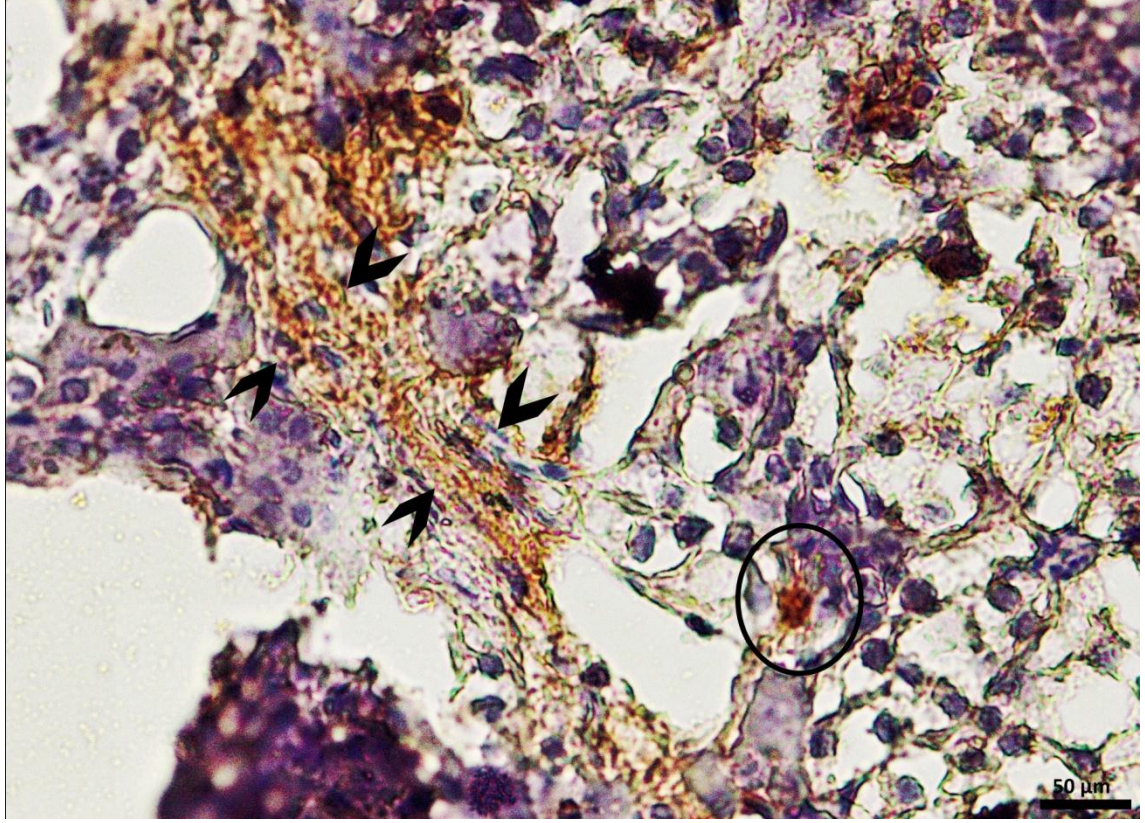
**Şekil 4.57:** Kont grubunda böbreküstü bezi medullasında HMGB1 proteini açısından herhangi bir pozitif boyanma görülmemektedir.

Ob grubundan elde edilen böbreküstü bezi örneklerinin medullasında hem bağ dokusu hücreleri hem de kromaffin hücrelerde HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma izlendi (Şekil 4.58).



**Şekil 4.58:** Ob grubunda böbreküstü bezi medullasında HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma görülmektedir.

Yine Ob grubunda böbreküstü bezi medullasındaki sinir liflerinde ve makrofaj olası hücrelerde de güçlü HMGB1 pozitifliği tespit edildi (Şekil 4.59).



**Şekil 4.59:** Ob grubunda böbreküstü bezi medullasındaki sinir liflerinde (okbaşı) ve makrofajlarda (daire içinde) HMGB1 proteini açısından güçlü pozitif boyanma görülmektedir.

## TARTIŞMA

Genel olarak yapılan araştırmalarda kronik olarak yüksek yağ içerikli diyet tüketenlerde obezitenin ortaya çıkma olasılığı yüksektir (134). Biz de bu nedenle çalışmamızda obezite modeli oluşturmak amacı ile kalori içeriği çoğunlukla yağdan gelen %40 yağ içerikli özel bir diyet kullandık (135). Diyet uygulama süresi olarak ise literatür ile uyumlu olarak 10 haftanın yeterli olabileceğini düşündük (136). Çalışmanın başında gruplar arasında VKİ açısından anlamlı fark bulunmazken; deneyin 10. haftası sonunda kontrol ve obez gruplardaki deneklerin hem ağırlık artışları hem de VKİ değerleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir fark elde edildi. Bu durum, obez grubun yağlı diyete uyum sağladığı yani obezite modelinin başarıya ulaştığı ve böylece obezite ile ilgili değerlendirilecek diğer verilerin sağlıklı şekilde ele alınabileceği şeklinde yorumlandı.

Obezite ile insülin direnci arasındaki bağlantı iyi bilinmektedir ve obezite oranının arttığı batı toplumlarında diyabet ve diğer hastalıkların sıklığının yükseldiği gözlenmektedir (137). Obez grupta kan glikoz ve kolesterol seviyelerinin literatürle uyumlu şekilde yüksek olması çalışmamızın obezite ile ilgili metabolik durumların monitorizasyonu sağlama açısından başarılı olduğunu göstermektedir (138)

Genellikle iyi bir seyir gösteren karaciğer yağlanması, küçümsenmeyecek bir oranda histolojik ilerleme göstererek karaciğerde fibrozis ve siroza yol açabilmektedir. Yapılan çalışmalarda non alkolik karaciğer yağlanmasının kriptojenik sirozun önemli bir nedeni olabileceği gösterilmiştir (139). Deney hayvanları üzerinde yapılan birçok çalışmada da non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının yüksek yağ içerikli diyetlerle uyarılabileceği gösterilmiştir (140). Bu çalışmada yüksek yağ içerikli diyet ile obezite modeli oluşturulan deneklerde ışık mikroskopik olarak elde edilen bulgulardan biri vasküler dilatasyondur. Bu dilatasyon hem sinüzoidlerde hem de daha büyük damar dallarında gözlenmekteydi. Bu çalışmada da gösterildiği gibi farklı çalışmalarda da yağ içerikli diyetle beslenmenin sinüzoidal dilatasyona neden olabileceği bildirilmiştir (141). Buna ek olarak bu çalışmada elde edilen diğer bir bulgu da hepatosit kordonları arasında ve damarlar etrafında gözlenen inflamatuvar hücre

infiltrasyonlarıdır. Bu infiltrasyonların nedeni ise tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar bu odaksal ya da diffüz olarak gözlenebilen infiltratif hücrelerin yağlı beslenme sonucu ortaya çıkan sitokin salınmasından kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir (142). Bazıları ise bu durumun yağlı karaciğer hastalığında ortaya çıkan nekrotik değişikliklere cevap olarak geliştiğini bildirmişlerdir (143).

Obezitenin karaciğer üzerindeki etkileri tam olarak bilinmese de; yüksek yağ içerikli diyet ile oluşturulan obezitenin karaciğerde hepatomegaliye neden olduğu tespit edilmiştir (144). Bizim çalışmamızda da yüksek oranda (%40) yağ içerikli yemle beslenen deneklere ait karaciğer hacimlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı seviyede arttığı gözlemlendi. Bu büyümenin nedeni ışık mikroskopik düzeyde gözlenen hepatosellüler yağlanma, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve sinüzoidal dilatasyon olabilir. Yine obez deneklere ait karaciğer kesitlerinde hepatosit kordonlarının düzeni kontrol grubuna kıyasla bozulmuş görüldü. Bu olay hepatosellüler proteinlerde ortaya çıkması olası oksidatif hasardan ya da hepatositlerde görülen nekrotik değişikliklerden kaynaklanabilir (145). Ayrıca obez gruba karaciğerlerinde nekrotik odaklar saptadık. Bu bilgiyi destekler şekilde çalışmamızın stereolojik kısmında tespit edilen birim alandaki hepatosit yoğunluğunun azalması da nekrotik hücre ölümünün bir sonucu olarak düşünülebilir. Bununla birlikte toplamda hepatosit miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememesi de obezitenin karaciğer hacmini arttırmasının bir sonucu olabilir.

NAFLD hastalığında gözlenen oksidatif stresin TNF, kemokin ve adhezyon molekülleri gibi preinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırdığı bilinmektedir (146). Gelişen inflamatuvar aktivite ise Kupffer hücrelerini uyararak bağışıklık yanıtını oluşturmaktadır. Obezlerde inflamatuvar mediyatörlerin artmış olması (CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6 vb.) düşük dereceli sistemik bir inflamasyon varlığını gösterebilir. Çalışmamızda Kupffer hücrelerinin sayısal olarak artmış olması söz konusu inflamasyona cevap olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca Kupffer hücrelerinin yüzeyinde insülin ve glukagona ait özel reseptörlerin var olduğu göz önüne alınacak olursa obez grupta glikozun yükselmiş olması beraberinde insülin artışını doğuracağından bu sonucun oluşmasına katkı sağlamış olabilir. Kupffer hücreleri

karaciğer İto hücreleri ile sitokinler vasıtasıyla etkileşime girerek bu hücrelerin fibroblastik hücrelere dönüşmesine neden olduğu bildirilmiştir. Bu durumda Kupffer hücre sayısının artması; çalışmanın daha uzun süreli planlanması halinde fibroblastik hücre sayılarının da artmasına neden olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Primer tümör hücrelerinin salgıladığı HMGB1'in kuppfer hücrelerini azalttığı gösterilmiştir (124). Çalışmamızda ise hem HMGB1 hem de kuppfer hücreleri arttı. Bu durumun tümöral hücrelerden salınan HMGB1 ile obezitede salgılanan HMGB1 arasında yapısal ya da fonksiyonel bir farklılıktan veya obezlerde HMGB1'in kuppfer hücreleri üzerindeki etkisini değiştirebilecek başka faktörlerden kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü.

Adrenal bez mineral kortikoidler, glukokortikoidler ve seks steroidleri üreten bir korteks ve nöroektodermal orjini ile katekolaminleri üreten medulladan oluşur. Bu hormonlardan herbiri sistemik enerji homeostazi, vücut ağırlığı, vasküler biyoloji, inflamasyon, glukoz ve lipid metabolizmasında rol oynayan adipokinlerin regülasyonunu sağlar (147). Yeni bilimsel araştırmalarla adrenal bezin obezite patofizyolojisindeki rolünün araştırılması bu kompleks ilişkilerin aydınlatılmasını sağlayacaktır. Çalışmamızda bu amaçla yüksek yağ içerikli diyet ile indüklenen obez sıçanlardan elde edilen böbrek üstü bezleri morfometrik, histolojik ve çok yönlü fonksiyonları olan HMGB1 açısından immünohistokimyasal olarak değerlendirilerek böbreküstü bezi, obezite ve obezitenin yol açtığı inflamatuvar süreç arasındaki ilişki değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen stereolojik bulgulara göre obez deneklerin total böbrek üstü bezi, zona fasikülata ve zona retikularis tabakaları ve ayrıca medulla hacimleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmıştı. Bununla birlikte obez deneklerin zona glomeruloza tabakası hacimlerinde anlamlı bir azalma gözlemlendi. Bu durumda obez deneklerdeki bu hacim artışının başlıca zona fasikülata, zona retikularis ve medulla tabakasındaki değişikliklerden kaynaklandığı söylenebilir. Bu hacim artışı adrenal bezin artan yağ dokusundan üretilen adipokinler ile şiddetli olarak uyarılması; özellikle korteksin zona fasikülata, zona retikularis tabakalarında hacim artışı ile kendini gösteren hücresel hiperplazi ve hipertrofiye kaynaklanabilir. Bunun yanında zona retikularis tabakasında gözlenen

inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve medullada izlenen damar dilatasyonu da söz konusu hacim artışına katkıda bulunmuş olabilir. Bu bağlamda literatürde, yağ dokudan sentezlenen bir adipokin olan adiponektin düzeylerinin artmasının böbreküstü bezi korteks hücrelerinde proliferasyona ve kortikosteroid sentezinde artmaya neden olduğu bildirilmiştir (148). Ayrıca çalışmamızda da meydana gelen medulladaki hacim artışını da açıklar şekilde yağ dokusundan sentezlenen adipokinlerin, böbreküstü bezi medullasını katekolamin sentezlemek üzere uyardığı literatürde bildirilmiştir (149).

Çalışmamızda, obez gruptaki deneklerden elde edilen böbreküstü bezleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde, böbreküstü bezini saran kapsülün kontrol grubununkine kıyasla daha kalın olduğu görüldü. Bu durum fibröz kapsülün iç kısmında bulunması olası rezerv hücrelerin kortekste gerçekleşen hiperplazi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim obez gruptaki deneklerden elde edilen bazı böbreküstü bezi kesitlerinde izlenen aksesuar böbreküstü bez olası yapılar ve zona fasikülata tabakasında bulunan iri ve steroid içeriği artmış hücrelerin arasındaki eozinofil sitoplazmaları ile bu tabakaya yeni katıldıkları düşünülen hücrelerin de gözlenmesi de bu yorumumuzu desteklemektedir.

Çalışmamızda böbreküstü bezi korteksinin diğer tabakalarında belirgin hacim artışı gözlenirken zona glomeruloza tabakasının kontrol grubundakine kıyasla daha ince yapıda olduğu gözlemlendi. Bu durum zona glomeruloza tabakasından salgılanan aldosteron hormonu ile yağ dokusu arasındaki kompleks ilişkiden kaynaklanıyor olabilir. Bu konuda literatürdeki çalışmalara bakıldığında bir kısım araştırmalarda yağ dokusundan derive faktörlerin direkt zona glomerulozayı stimüle ederek aldosteron ürettirdiği ve zona glomerulozanın hipertrofisine neden olduğunu gösterirken (150) diğer bir grup çalışmada ise aşırı oranlarda artan yağ dokusunda meydana gelebilecek fonksiyon bozukluğunun zona glomerulozada yapılması gereken aldosteron hormonu sentezini bloke edebileceği bildirilmektedir (151).

Çalışmamızda oluşturulan obezite modelinde de hem karaciğer hem de böbreküstü bezinde gözlenen inflamatuvar hücre infiltrasyonları obezitenin inflamatuvar bir hastalık olduğu tezi ile uyumludur.

HMGB1 fazla miktarda eksprese edilen ve hemen hemen tüm insan hücrelerinde bulunan HmG\_box ailesinin bir üyesidir. Başlangıçta DNA bağlayıcı ve bükücü fonksiyonları ile bir nükleer yapı proteini olarak bilinen HMGB1'in son yıllarda hücrel replikasyonda, transkripsiyonda, rekombinasyonda ve DNA tamirinde bir refakatçi olarak rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte son yıllarda sadece kendi nükleer ve hücre içi fonksiyonları değil aynı zamanda bağışıklık sistemi, otoimmün hastalık, inflamasyon, doku homeostazı ve multiple ekstrasellüler etkileşimleri de ilgi odağı haline gelmeye başlamıştır. Stres, hücre ölümü ve inflamasyon durumlarında bu proteinin ekspresyonu artar ve hücreden salıverilerek hasarı gösteren moleküler bir sinyale dönüşür (152). Ayrıca HMGB1 düzeylerinin oksidatif strese arttığı ve makrofajları hem proinflamatuvar sitokinleri üretmek için aktive ettiği tespit edilmiştir (153). Literatürde belirtilen tüm bu bilgiler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ile uyumludur. Karaciğer ve böbreküstü bezinde artan HMGB1 düzeylerinin hem biyokimyasal hem de ışık mikroskopik incelemelerimizde etkileri görülen oksidatif strese bağlı meydana gelen doku hasarına cevap olarak ortaya çıktığı düşünülebilir. Yine HMGB1 artışı her iki sözü edilen ortanda da makrofaj aktivitesini artırmış; tüm bu mekanizmalarla ilişkili olarak karaciğerde Kupffer hücrelerinin sayısı ve aktivitesi artarken böbreküstü bezinde çok ta sık gözlenmeyen adrenal makrofajlar ışık mikroskopik olarak dikkati çeker hale gelmiştir.

Obezlerde yağ dokusu artmıştır. Lipositlerden salınan proinflamatuvar sitokinler monosit ve makrofajlardan reaktif oksijen ve nitrojen salınımını uyarır. Yağ asitlerinin mitokondriyal ve peroksizomal oksidasyonu neticesinde mitokondriyal DNA değişikliklerine neden olur. HMGB1 DNA tamirinde bir refakatçi (chaperon) olarak görev alır (33). Çalışmamızda karaciğerde ve böbreküstü bezi medullasında HMGB1 artışının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi DNA'daki bu değişikliklere karşı düzeltici bir cevap olarak değerlendirilebilir.

HMGB1'in ters dönmüş, bükülmüş kıvrılmış DNA'ya karşı özel bir affinitesi vardır ve katlanma ya da sarmalı açma gibi yapısal modülasyonları indükleyebilir (35-37). Kromatin yapı hasarının tespiti ve düzeltilmesinde özellikli bir aktiviteye sahiptir. Karaciğer dokusunda HMGB1'in artmış olması obezitenin hepatositlerde yaptığı hasarı düzeltmeye yönelik bir onarım faaliyeti olarak düşünüldü.

Apopitoz ya da otofajinin düzenleyici mekanizmalarından birisi de sitozolik HMGB1'in otofajik proteinleri olan beclin 1 ve ATG 5 proteinlerini calpain aracılıklı yarıklanma ve parçalanmadan koruyarak, proapoptotik fragmanların oluşumunu inhibe etmesidir (70). Çalışmamızda apopitoz belirtileri gösteren (hasarlanmış) hepatosit sayısında artma tespit edilmiştir. Birim alanda hepatosit yoğunluğunda azalma görülmüştür. Bu da hücrelerde hasarlanma olduğunun bir belirtisidir. HMGB1'in artmış olması hücre hasarını (muhtemelen apopitozu) önlemeye yönelik bir çaba olabileceği şeklinde değerlendirildi.

Böylece bu çalışmada sunulan bazı bulgular literatürde ilk kez tespit edilmiştir. Obezite ve HMGB1 proteini ilişkisini karaciğerde tüm yapısal elemanlar ile detaylı olarak ele alan bir çalışma literatürde bulunmazken; aynı şekilde obezitede böbreküstü bezi HMGB1 protein düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren herhangi bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu nedenle yapılan çalışmanın literatüre önemli katkılar sağlayacağını düşünüyoruz.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Yağ içrikli diyet ile obezite modeli oluşturulan deneklerde ışık mikroskopik olarak elde edilen bulgulardan biri vasküler dilatasyondur. Bu dilatasyon hem sinüzoidlerde hem de daha büyük damar dallarında gözlenmektedir.

Hepatosit kordonları arasında ve damarlar etrafında inflamatuvar hücre infiltrasyonları gözlemlendi.

Birim alandaki hepatosit yoğunluğu azaldı. Karaciğer hacmi arttı.

Kupffer hücreleri sayısal olarak arttı.

Obez deneklerin total böbrek üstü bezi, zona fasikülata ve zona retikularis tabakaları ve ayrıca medulla hacimleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttı.

Işık mikroskop görüntüsünde obez grupta böbreküstü bezini saran kapsülün kontrol grubununkine kıyasla daha kalın olduğu, zona glomeruloza tabakasının kontrol grubundakine kıyasla daha ince yapıda olduğu gözlemlendi.

Karaciğer ve böbreküstü bezi medullasında HMGB1 artışı immünohistokimyasal olarak gösterildi. Bununla birlikte adrenal kortekste HMGB1 artışı olmadı. Bu durumun nedenleri yeni bir çalışma konusu olabilir.

HMGB1 artışı obezite ile sıklıkla beraber görülen glukoz ve insüline mi bağlı olarak gerçekleşti yoksa sadece obezitenin etkisi ile mi oldu sorusunun tam olarak cevaplanabilmesi için farklı çalışmalar planlanabilir.

Primer tümörden salgılanan HMGB1 ile obezitede salgılanan HMGB1 arasında yapısal veya fonksiyonel farklılıkların olup olmadığının araştırılması için yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu değerlendirildi.

## KAYNAKLAR

1. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 894, i-xii, 1-253, 2000.
2. Satman, I., Omer, B., Tutuncu, Y., Kalaca, S., Gedik, S., Dinccag, N., Karsidag, K., Genc, S., Telci, A., Canbaz, B., Turker, F., Yilmaz, T., Cakir, B., Tuomilehto, J., Group, T.-I.S. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol.* 28(2), 169-180, 2013.
3. Lonardo, A., Ballestri, S., Marchesini, G., Angulo, P., Loria, P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis.* 47(3), 181-190, 2015.
4. Peckett, A.J., Wright, D.C., Riddell, M.C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism.* 60(11), 1500-1510, 2011.
5. Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., Huang, J., Yu, Y., Fan, X.G., Yan, Z., Sun, X., Wang, H., Wang, Q., Tsung, A., Billiar, T.R., Zeh, H.J., 3rd, Lotze, M.T., Tang, D. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med.* 40, 1-116, 2014.
6. Aslan, H., Altunkaynak, B.Z., Altunkaynak, M.E., Vuraler, O., Kaplan, S., Unal, B. Effect of a high fat diet on quantitative features of adipocytes in the omentum: an experimental, stereological and ultrastructural study. *Obes Surg.* 16(11), 1526-1534, 2006.
7. Li, X., Handee, W., Kuo, M.H. The slim, the fat, and the obese: guess who lives the longest? *Curr Genet.* 2016.
8. Schrauwen, P., Westerterp, K.R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr.* 84(4), 417-427, 2000.
9. Hudgins, L.C., Baday, A., Hellerstein, M.K., Parker, T.S., Levine, D.M., Seidman, C.E., Neese, R.A., Tremaroli, J.D., Hirsch, J. The effect of dietary carbohydrate on genes for fatty acid synthase and inflammatory cytokines in adipose tissues from lean and obese subjects. *J Nutr Biochem.* 19(4), 237-245, 2008.
10. Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., Walts, B., Perusse, L., Bouchard, C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring).* 14(4), 529-644, 2006.
11. Kido, Y., Nakae, J., Accili, D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(3), 972-979, 2001.
12. de Ferranti, S., Mozaffarian, D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem.* 54(6), 945-955, 2008.
13. Vazquez-Vela, M.E., Torres, N., Tovar, A.R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 39(8), 715-728, 2008.
14. Gregor, M.F., Hotamisligil, G.S. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res.* 48(9), 1905-1914, 2007.
15. Wojtczak, L., Schonfeld, P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1183(1), 41-57, 1993.
16. Qatanani, M., Lazar, M.A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 21(12), 1443-1455, 2007.
17. Nishikawa, T., Kukidome, D., Sonoda, K., Fujisawa, K., Matsuhisa, T., Motoshima, H., Matsumura, T., Araki, E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 77 Suppl 1, S161-164, 2007.
18. Tilg, H., Moschen, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 6(10), 772-783, 2006.

19. Fonseca-Alaniz, M.H., Takada, J., Alonso-Vale, M.I., Lima, F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. 83(5 Suppl), S192-203, 2007.
20. Dulloo, A.G., Jacquet, J., Solinas, G., Montani, J.P., Schutz, Y. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*. 34 Suppl 2, S4-17, 2010.
21. Steffes, M.W., Gross, M.D., Lee, D.H., Schreiner, P.J., Jacobs, D.R., Jr. Adiponectin, visceral fat, oxidative stress, and early macrovascular disease: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Obesity (Silver Spring)*. 14(2), 319-326, 2006.
22. Ellulu, M.S., Khaza'ai, H., Abed, Y., Rahmat, A., Ismail, P., Ranneh, Y. Role of fish oil in human health and possible mechanism to reduce the inflammation. *Inflammopharmacology*. 23(2-3), 79-89, 2015.
23. Sikaris, K.A. The clinical biochemistry of obesity. *Clin Biochem Rev*. 25(3), 165-181, 2004.
24. Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 11(2), 85-97, 2011.
25. Schaffer, J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*. 14(3), 281-287, 2003.
26. Kopelman, P.G. Medical management of obesity. *Br J Hosp Med (Lond)*. 68(2), 89-93, 2007.
27. Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H., Harris, T.B. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 282(22), 2131-2135, 1999.
28. Esposito, K., Ciotola, M., Schisano, B., Misso, L., Giannetti, G., Ceriello, A., Giugliano, D. Oxidative stress in the metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest*. 29(9), 791-795, 2006.
29. Pihl, E., Zilmer, K., Kullisaar, T., Kairane, C., Magi, A., Zilmer, M. Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes. *Int J Obes (Lond)*. 30(1), 141-146, 2006.
30. Fernandez-Sanchez, A., Madrigal-Santillan, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-Gonzalez, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sanchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C., Morales-Gonzalez, J.A. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 12(5), 3117-3132, 2011.
31. Khan, N.I., Naz, L., Yasmeen, G. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pak J Pharm Sci*. 19(1), 62-65, 2006.
32. Monteiro, R., Azevedo, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm*. 2010, 2010.
33. Maiese, K., Morhan, S.D., Chong, Z.Z. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr Neurovasc Res*. 4(1), 63-71, 2007.
34. Amirkhizi, F., Siassi, F., Djalali, M., Foroushani, A.R. Evaluation of oxidative stress and total antioxidant capacity in women with general and abdominal adiposity. *Obes Res Clin Pract*. 4(3), e163-246, 2010.
35. Ulloa, L., Messmer, D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev*. 17(3), 189-201, 2006.
36. Yang, H., Tracey, K.J. Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 1799(1-2), 149-156, 2010.
37. Pilzweger, C., Holdenrieder, S. Circulating HMGB1 and RAGE as Clinical Biomarkers in Malignant and Autoimmune Diseases. *Diagnostics (Basel)*. 5(2), 219-253, 2015.

38. Bustin, M., Lehn, D.A., Landsman, D. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim Biophys Acta.* 1049(3), 231-243, 1990.
39. Saito, K., Kikuchi, T., Yoshida, M. The mechanism of sequence non-specific DNA binding of HMG1/2-box B in HMG1 with DNA. *Protein Eng.* 12(3), 235-242, 1999.
40. Ueda, T., Chou, H., Kawase, T., Shirakawa, H., Yoshida, M. Acidic C-tail of HMGB1 is required for its target binding to nucleosome linker DNA and transcription stimulation. *Biochemistry.* 43(30), 9901-9908, 2004.
41. Bustin, M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol.* 19(8), 5237-5246, 1999.
42. Ohndorf, U.M., Rould, M.A., He, Q., Pabo, C.O., Lippard, S.J. Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature.* 399(6737), 708-712, 1999.
43. Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., Hua, J., An, L.L., Audoly, L., La Rosa, G., Bierhaus, A., Naworth, P., Marshak-Rothstein, A., Crow, M.K., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Kiener, P.A., Coyle, A.J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 8(5), 487-496, 2007.
44. Kornblit, B., Munthe-Fog, L., Petersen, S.L., Madsen, H.O., Vindelov, L., Garred, P. The genetic variation of the human HMGB1 gene. *Tissue Antigens.* 70(2), 151-156, 2007.
45. Stros, M., Stokrova, J., Thomas, J.O. DNA looping by the HMG-box domains of HMG1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* 22(6), 1044-1051, 1994.
46. Uramoto, H., Izumi, H., Nagatani, G., Ohmori, H., Nagasue, N., Ise, T., Yoshida, T., Yasumoto, K., Kohno, K. Physical interaction of tumour suppressor p53/p73 with CCAAT-binding transcription factor 2 (CTF2) and differential regulation of human high-mobility group 1 (HMG1) gene expression. *Biochem J.* 371(Pt 2), 301-310, 2003.
47. Rothermund, K., Rogulski, K., Fernandes, E., Whiting, A., Sedivy, J., Pu, L., Prochownik, E.V. C-Myc-independent restoration of multiple phenotypes by two C-Myc target genes with overlapping functions. *Cancer Res.* 65(6), 2097-2107, 2005.
48. Pogna, E.A., Clayton, A.L., Mahadevan, L.C. Signalling to chromatin through post-translational modifications of HMGN. *Biochim Biophys Acta.* 1799(1-2), 93-100, 2010.
49. Ito, I., Fukazawa, J., Yoshida, M. Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem.* 282(22), 16336-16344, 2007.
50. Sun, N.K., Chao, C.C. The cytokine activity of HMGB1--extracellular escape of the nuclear protein. *Chang Gung Med J.* 28(10), 673-682, 2005.
51. Muller, S., Ronfani, L., Bianchi, M.E. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med.* 255(3), 332-343, 2004.
52. Mosevitsky, M.I., Novitskaya, V.A., Iogannsen, M.G., Zabezhinsky, M.A. Tissue specificity of nucleo-cytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions. *Eur J Biochem.* 185(2), 303-310, 1989.
53. Stros, M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta.* 1799(1-2), 101-113, 2010.
54. Stros, M., Polanska, E., Struncova, S., Pospisilova, S. HMGB1 and HMGB2 proteins up-regulate cellular expression of human topoisomerase IIalpha. *Nucleic Acids Res.* 37(7), 2070-2086, 2009.

55. Bonaldi, T., Langst, G., Strohner, R., Becker, P.B., Bianchi, M.E. The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J.* 21(24), 6865-6873, 2002.
56. McKinney, K., Prives, C. Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein. *Mol Cell Biol.* 22(19), 6797-6808, 2002.
57. Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H., Nakagawara, A. HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *J Biol Chem.* 277(9), 7157-7164, 2002.
58. Lv, B., Wang, H., Tang, Y., Fan, Z., Xiao, X., Chen, F. High-mobility group box 1 protein induces tissue factor expression in vascular endothelial cells via activation of NF-kappaB and Egr-1. *Thromb Haemost.* 102(2), 352-359, 2009.
59. Zappavigna, V., Falciola, L., Helmer-Citterich, M., Mavilio, F., Bianchi, M.E. HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J.* 15(18), 4981-4991, 1996.
60. Jiao, Y., Wang, H.C., Fan, S.J. Growth suppression and radiosensitivity increase by HMGB1 in breast cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 28(12), 1957-1967, 2007.
61. Cotmore, S.F., Christensen, J., Tattersall, P. Two widely spaced initiator binding sites create an HMG1-dependent parvovirus rolling-hairpin replication origin. *J Virol.* 74(3), 1332-1341, 2000.
62. Topalova, D., Ugrinova, I., Pashev, I.G., Pasheva, E.A. HMGB1 protein inhibits DNA replication in vitro: a role of the acetylation and the acidic tail. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(8), 1536-1542, 2008.
63. Stros, M., Cherny, D., Jovin, T.M. HMG1 protein stimulates DNA end joining by promoting association of DNA molecules via their ends. *Eur J Biochem.* 267(13), 4088-4097, 2000.
64. Lange, S.S., Mitchell, D.L., Vasquez, K.M. High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(30), 10320-10325, 2008.
65. Liu, Y., Prasad, R., Wilson, S.H. HMGB1: roles in base excision repair and related function. *Biochim Biophys Acta.* 1799(1-2), 119-130, 2010.
66. Reddy, M.C., Christensen, J., Vasquez, K.M. Interplay between human high mobility group protein 1 and replication protein A on psoralen-cross-linked DNA. *Biochemistry.* 44(11), 4188-4195, 2005.
67. Lange, S.S., Reddy, M.C., Vasquez, K.M. Human HMGB1 directly facilitates interactions between nucleotide excision repair proteins on triplex-directed psoralen interstrand crosslinks. *DNA Repair (Amst).* 8(7), 865-872, 2009.
68. Kang, R., Zhang, Q., Hou, W., Yan, Z., Chen, R., Bonaroti, J., Bansal, P., Billiar, T.R., Tsung, A., Wang, Q., Bartlett, D.L., Whitcomb, D.C., Chang, E.B., Zhu, X., Wang, H., Lu, B., Tracey, K.J., Cao, L., Fan, X.G., Lotze, M.T., Zeh, H.J., 3rd, Tang, D. Intracellular HMGB1 inhibits inflammatory nucleosome release and limits acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology.* 146(4), 1097-1107, 2014.
69. Tang, D., Kang, R., Van Houten, B., Zeh, H.J., Billiar, T.R., Lotze, M.T. High mobility group box 1 (HMGB1) phenotypic role revealed with stress. *Mol Med.* 20, 359-362, 2014.
70. Zhu, X., Messer, J.S., Wang, Y., Lin, F., Cham, C.M., Chang, J., Billiar, T.R., Lotze, M.T., Boone, D.L., Chang, E.B. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *J Clin Invest.* 125(3), 1098-1110, 2015.
71. Ditsworth, D., Zong, W.X., Thompson, C.B. Activation of poly(ADP)-ribose polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. *J Biol Chem.* 282(24), 17845-17854, 2007.

72. Kamau, E., Takhampunya, R., Li, T., Kelly, E., Peachman, K.K., Lynch, J.A., Sun, P., Palmer, D.R. Dengue virus infection promotes translocation of high mobility group box 1 protein from the nucleus to the cytosol in dendritic cells, upregulates cytokine production and modulates virus replication. *J Gen Virol.* 90(Pt 8), 1827-1835, 2009.
73. Li, Y., Gan, C.P., Zhang, S., Zhou, X.K., Li, X.F., Wei, Y.Q., Yang, J.L., Wu, M. FIP200 is involved in murine pseudomonas infection by regulating HMGB1 intracellular translocation. *Cell Physiol Biochem.* 33(6), 1733-1744, 2014.
74. Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., Bianchi, M.E. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 22(20), 5551-5560, 2003.
75. Youn, J.H., Shin, J.S. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol.* 177(11), 7889-7897, 2006.
76. Kang, R., Zhang, Q., Zeh, H.J., 3rd, Lotze, M.T., Tang, D. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? *Clin Cancer Res.* 19(15), 4046-4057, 2013.
77. Bell, C.W., Jiang, W., Reich, C.F., 3rd, Pisetsky, D.S. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291(6), C1318-1325, 2006.
78. Yamada, Y., Fujii, T., Ishijima, R., Tachibana, H., Yokoue, N., Takasawa, R., Tanuma, S. The release of high mobility group box 1 in apoptosis is triggered by nucleosomal DNA fragmentation. *Arch Biochem Biophys.* 506(2), 188-193, 2011.
79. Thorburn, J., Horita, H., Redzic, J., Hansen, K., Frankel, A.E., Thorburn, A. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ.* 16(1), 175-183, 2009.
80. Urbonaviciute, V., Furnrohr, B.G., Meister, S., Munoz, L., Heyder, P., De Marchis, F., Bianchi, M.E., Kirschning, C., Wagner, H., Manfredi, A.A., Kalden, J.R., Schett, G., Rovere-Querini, P., Herrmann, M., Voll, R.E. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med.* 205(13), 3007-3018, 2008.
81. Qin, S., Wang, H., Yuan, R., Li, H., Ochani, M., Ochani, K., Rosas-Ballina, M., Czura, C.J., Huston, J.M., Miller, E., Lin, X., Sherry, B., Kumar, A., Larosa, G., Newman, W., Tracey, K.J., Yang, H. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med.* 203(7), 1637-1642, 2006.
82. Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K.R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P.E., Abumrad, N.N., Sama, A., Tracey, K.J. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 285(5425), 248-251, 1999.
83. Dumitriu, I.E., Baruah, P., Valentinis, B., Voll, R.E., Herrmann, M., Nawroth, P.P., Arnold, B., Bianchi, M.E., Manfredi, A.A., Rovere-Querini, P. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* 174(12), 7506-7515, 2005.
84. Tsung, A., Klune, J.R., Zhang, X., Jeyabalan, G., Cao, Z., Peng, X., Stolz, D.B., Geller, D.A., Rosengart, M.R., Billiar, T.R. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med.* 204(12), 2913-2923, 2007.
85. Gong, H., Zuliani, P., Komuravelli, A., Faeder, J.R., Clarke, E.M. Analysis and verification of the HMGB1 signaling pathway. *BMC Bioinformatics.* 11 Suppl 7, S10, 2010.
86. Hudson, B.I., Kalea, A.Z., Del Mar Arriero, M., Harja, E., Boulanger, E., D'Agati, V., Schmidt, A.M. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1

- is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem.* 283(49), 34457-34468, 2008.
87. Kim, J.Y., Park, H.K., Yoon, J.S., Kim, S.J., Kim, E.S., Ahn, K.S., Kim, D.S., Yoon, S.S., Kim, B.K., Lee, Y.Y. Advanced glycation end product (AGE)-induced proliferation of HEL cells via receptor for AGE-related signal pathways. *Int J Oncol.* 33(3), 493-501, 2008.
  88. Manfredi, A.A., Capobianco, A., Esposito, A., De Cobelli, F., Canu, T., Monno, A., Raucci, A., Sanvito, F., Doglioni, C., Nawroth, P.P., Bierhaus, A., Bianchi, M.E., Rovere-Querini, P., Del Maschio, A. Maturing dendritic cells depend on RAGE for in vivo homing to lymph nodes. *J Immunol.* 180(4), 2270-2275, 2008.
  89. Chen, R., Fu, S., Fan, X.G., Lotze, M.T., Zeh, H.J., 3rd, Tang, D., Kang, R. Nuclear DAMP complex-mediated RAGE-dependent macrophage cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 458(3), 650-655, 2015.
  90. Ivanov, S., Dragoi, A.M., Wang, X., Dallacosta, C., Louten, J., Musco, G., Sitia, G., Yap, G.S., Wan, Y., Biron, C.A., Bianchi, M.E., Wang, H., Chu, W.M. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood.* 110(6), 1970-1981, 2007.
  91. Campana, L., Bosurgi, L., Rovere-Querini, P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr Opin Immunol.* 20(5), 518-523, 2008.
  92. Tang, D., Kang, R., Cheh, C.W., Livesey, K.M., Liang, X., Schapiro, N.E., Benschop, R., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Tracey, K.J., Zeh, H.J., Lotze, M.T. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene.* 29(38), 5299-5310, 2010.
  93. Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., Mariette, C., Chaput, N., Mira, J.P., Delaloge, S., Andre, F., Tursz, T., Kroemer, G., Zitvogel, L. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev.* 220, 47-59, 2007.
  94. Youn, J.H., Oh, Y.J., Kim, E.S., Choi, J.E., Shin, J.S. High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol.* 180(7), 5067-5074, 2008.
  95. Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Takeuchi, O., Akira, S., Nakanishi, Y. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J Immunol.* 172(4), 2039-2047, 2004.
  96. Sha, Y., Zmijewski, J., Xu, Z., Abraham, E. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J Immunol.* 180(4), 2531-2537, 2008.
  97. Liu, Y., Yan, W., Tohme, S., Chen, M., Fu, Y., Tian, D., Lotze, M., Tang, D., Tsung, A. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. *J Hepatol.* 63(1), 114-121, 2015.
  98. Bianchi, M.E. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol.* 86(3), 573-576, 2009.
  99. Chen, G.Y., Tang, J., Zheng, P., Liu, Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science.* 323(5922), 1722-1725, 2009.
  100. Unlu, S., Tang, S., Wang, E., Martinez, I., Tang, D., Bianchi, M.E., Zeh, H.J., 3rd, Lotze, M.T. Damage associated molecular pattern molecule-induced microRNAs (DAMPmiRs) in human peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One.* 7(6), e38899, 2012.
  101. Li, X., Yue, Y., Zhu, Y., Xiong, S. Extracellular, but not intracellular HMGB1, facilitates self-DNA induced macrophage activation via promoting DNA

- accumulation in endosomes and contributes to the pathogenesis of lupus nephritis. *Mol Immunol.* 65(1), 177-188, 2015.
102. Hanahan, D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1), 57-70, 2000.
  103. Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J., 3rd, Lotze, M.T. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1799(1-2), 131-140, 2010.
  104. Hanahan, D., Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5), 646-674, 2011.
  105. Blasco, M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 6(8), 611-622, 2005.
  106. Giavara, S., Kosmidou, E., Hande, M.P., Bianchi, M.E., Morgan, A., d'Adda di Fagagna, F., Jackson, S.P. Yeast Nhp6A/B and mammalian HMGB1 facilitate the maintenance of genome stability. *Curr Biol.* 15(1), 68-72, 2005.
  107. Malina, J., Kasparkova, J., Natile, G., Brabec, V. Recognition of major DNA adducts of enantiomeric cisplatin analogs by HMG box proteins and nucleotide excision repair of these adducts. *Chem Biol.* 9(5), 629-638, 2002.
  108. Brezniceanu, M.L., Volp, K., Bossler, S., Solbach, C., Lichter, P., Joos, S., Zornig, M. HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB J.* 17(10), 1295-1297, 2003.
  109. Tang, D., Billiar, T.R., Lotze, M.T. A Janus tale of two active high mobility group box 1 (HMGB1) redox states. *Mol Med.* 18, 1360-1362, 2012.
  110. Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D.J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., Shams, S.S., Yang, H., Varani, L., Andersson, U., Tracey, K.J., Bachi, A., Uguccioni, M., Bianchi, M.E. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med.* 209(9), 1519-1528, 2012.
  111. Li, G., Tang, D., Lotze, M.T. Menage a Trois in stress: DAMPs, redox and autophagy. *Semin Cancer Biol.* 23(5), 380-390, 2013.
  112. Fan, J., Li, Y., Levy, R.M., Fan, J.J., Hackam, D.J., Vodovotz, Y., Yang, H., Tracey, K.J., Billiar, T.R., Wilson, M.A. Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. *J Immunol.* 178(10), 6573-6580, 2007.
  113. Yoon, S., Lee, J.Y., Yoon, B.K., Bae, D.S., Choi, D.S. Effects of HMGB-1 overexpression on cell-cycle progression in MCF-7 cells. *J Korean Med Sci.* 19(3), 321-326, 2004.
  114. Yang, L., Xie, M., Yang, M., Yu, Y., Zhu, S., Hou, W., Kang, R., Lotze, M.T., Billiar, T.R., Wang, H., Cao, L., Tang, D. PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. *Nat Commun.* 5, 4436, 2014.
  115. Kang, R., Tang, D., Schapiro, N.E., Loux, T., Livesey, K.M., Billiar, T.R., Wang, H., Van Houten, B., Lotze, M.T., Zeh, H.J. The HMGB1/RAGE inflammatory pathway promotes pancreatic tumor growth by regulating mitochondrial bioenergetics. *Oncogene.* 33(5), 567-577, 2014.
  116. Wittig, R., Coy, J.F. The role of glucose metabolism and glucose-associated signalling in cancer. *Perspect Medicin Chem.* 1, 64-82, 2008.
  117. Schlueter, C., Weber, H., Meyer, B., Rogalla, P., Roser, K., Hauke, S., Bullerdiek, J. Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am J Pathol.* 166(4), 1259-1263, 2005.
  118. Lin, Q., Yang, X.P., Fang, D., Ren, X., Zhou, H., Fang, J., Liu, X., Zhou, S., Wen, F., Yao, X., Wang, J.M., Su, S.B. High-mobility group box-1 mediates toll-like receptor 4-dependent angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(5), 1024-1032, 2011.
  119. van Beijnum, J.R., Buurman, W.A., Griffioen, A.W. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end

- products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*. 11(1), 91-99, 2008.
120. Qiu, Y., Chen, Y., Fu, X., Zhang, L., Tian, J., Hao, Q. HMGB1 promotes lymphangiogenesis of human lymphatic endothelial cells in vitro. *Med Oncol*. 29(1), 358-363, 2012.
  121. Kuniyasu, H., Oue, N., Wakikawa, A., Shigeishi, H., Matsutani, N., Kuraoka, K., Ito, R., Yokozaki, H., Yasui, W. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J Pathol*. 196(2), 163-170, 2002.
  122. Liu, L., Zhao, L., Zhang, Y., Zhang, Q., Ding, Y. Proteomic analysis of Tiam1-mediated metastasis in colorectal cancer. *Cell Biol Int*. 31(8), 805-814, 2007.
  123. Aychek, T., Miller, K., Sagi-Assif, O., Levy-Nissenbaum, O., Israeli-Amit, M., Pasmanik-Chor, M., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., Witz, I.P. E-selectin regulates gene expression in metastatic colorectal carcinoma cells and enhances HMGB1 release. *Int J Cancer*. 123(8), 1741-1750, 2008.
  124. Luo, Y., Ohmori, H., Fujii, K., Moriwaka, Y., Sasahira, T., Kurihara, M., Tatsumoto, N., Sasaki, T., Yamashita, Y., Kuniyasu, H. HMGB1 attenuates anti-metastatic defence of the liver in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 46(4), 791-799, 2010.
  125. Huttunen, H.J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A.J., Rauvala, H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res*. 62(16), 4805-4811, 2002.
  126. Balkwill, F., Charles, K.A., Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 7(3), 211-217, 2005.
  127. Jia, L., Clear, A., Liu, F.T., Matthews, J., Uddin, N., McCarthy, A., Hoxha, E., Durance, C., Iqbal, S., Gribben, J.G. Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 123(11), 1709-1719, 2014.
  128. Kusume, A., Sasahira, T., Luo, Y., Isobe, M., Nakagawa, N., Tatsumoto, N., Fujii, K., Ohmori, H., Kuniyasu, H. Suppression of dendritic cells by HMGB1 is associated with lymph node metastasis of human colon cancer. *Pathobiology*. 76(4), 155-162, 2009.
  129. Liu, Z., Faló, L.D., Jr., You, Z. Knockdown of HMGB1 in tumor cells attenuates their ability to induce regulatory T cells and uncovers naturally acquired CD8 T cell-dependent antitumor immunity. *J Immunol*. 187(1), 118-125, 2011.
  130. Neuschwander-Tetri, B.A., Caldwell, S.H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 37(5), 1202-1219, 2003.
  131. Marzolla, V., Armani, A., Zennaro, M.C., Cinti, F., Mammi, C., Fabbri, A., Rosano, G.M., Caprio, M. The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol Cell Endocrinol*. 350(2), 281-288, 2012.
  132. Altunkaynak, M.E., Ozbek, E., Altunkaynak, B.Z., Can, I., Unal, D., Unal, B. The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. *J Anat*. 212(6), 845-852, 2008.
  133. Gundersen, H.J., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A., et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 96(5), 379-394, 1988.
  134. Cabanne, F. [Pierre Masson. A precursor and re-discoverer (1880-1959)]. *Ann Pathol*. 3(1), 95-97, 1983.
  135. Tufek, N.H., Altunkaynak, M.E., Altunkaynak, B.Z., Kaplan, S. Effects of thymoquinone on testicular structure and sperm production in male obese rats. *Syst Biol Reprod Med*. 61(4), 194-204, 2015.

136. Bekar, E., Altunkaynak, B.Z., Balci, K., Aslan, G., Ayyildiz, M., Kaplan, S. Effects of high fat diet induced obesity on peripheral nerve regeneration and levels of GAP 43 and TGF-beta in rats. *Biotech Histochem.* 89(6), 446-456, 2014.
137. Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 444(7121), 840-846, 2006.
138. McGuire, S. Frayar, D.C., Ervin, R.B. Caloric intake from fast food among adults: United States, 2007-2010. NCHS Data Brief, No. 114, February 2013. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics, 2013. *Adv Nutr.* 4(5), 578, 2013.
139. Moon, K.W., Leem, J.M., Bae, S.S., Lee, K.M., Kim, S.H., Chae, H.B., Park, S.M., Youn, S.J. [The prevalence of metabolic syndrome in patients with nonalcoholic fatty liver disease]. *Korean J Hepatol.* 10(3), 197-206, 2004.
140. Zhang, Y., Tang, C.L., Tian, Y., Yuan, H.Z., Yang, H., Tang, N.Z., Gao, R.Q., Cao, J. [Effect of Electroacupuncture on ERp57 in NAFLD Rats]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 47(2), 208-213, 2016.
141. Ferrell, L., Bass, N., Roberts, J., Ascher, N. Lipopeliosis: fat induced sinusoidal dilatation in transplanted liver mimicking peliosis hepatis. *J Clin Pathol.* 45(12), 1109-1110, 1992.
142. Feldstein, A.E., Werneburg, N.W., Canbay, A., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Rydzewski, R., Burgart, L.J., Gores, G.J. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology.* 40(1), 185-194, 2004.
143. Te Sligte, K., Bourass, I., Sels, J.P., Driessen, A., Stockbrugger, R.W., Koek, G.H. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. *Eur J Intern Med.* 15(1), 10-21, 2004.
144. Altunkaynak, B.Z., Ozbek, E. Overweight and structural alterations of the liver in female rats fed a high-fat diet: a stereological and histological study. *Turk J Gastroenterol.* 20(2), 93-103, 2009.
145. Abraham, P., Wilfred, G., Ramakrishna, B. Oxidative damage to the hepatocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. *Clin Chim Acta.* 325(1-2), 117-125, 2002.
146. Diehl, A.M. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282(1), G1-5, 2002.
147. Ronconi, V., Turchi, F., Bujalska, I.J., Giacchetti, G., Boscaro, M. Adipose cell-adrenal interactions: current knowledge and future perspectives. *Trends Endocrinol Metab.* 19(3), 100-103, 2008.
148. Paschke, L., Zemleduch, T., Rucinski, M., Ziolkowska, A., Szyszka, M., Malendowicz, L.K. Adiponectin and adiponectin receptor system in the rat adrenal gland: ontogenetic and physiologic regulation, and its involvement in regulating adrenocortical growth and steroidogenesis. *Peptides.* 31(9), 1715-1724, 2010.
149. Than, A., Ye, F., Xue, R., Ong, J.W., Poh, C.L., Chen, P. The crosstalks between adipokines and catecholamines. *Mol Cell Endocrinol.* 332(1-2), 261-270, 2011.
150. Ehrhart-Bornstein, M., Lamounier-Zepter, V., Schraven, A., Langenbach, J., Willenberg, H.S., Barthel, A., Hauner, H., McCann, S.M., Scherbaum, W.A., Bornstein, S.R. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(24), 14211-14216, 2003.
151. Hirata, A., Maeda, N., Hiuge, A., Hibuse, T., Fujita, K., Okada, T., Kihara, S., Funahashi, T., Shimomura, I. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc Res.* 84(1), 164-172, 2009.
152. Czura, C.J., Wang, H., Tracey, K.J. Dual roles for HMGB1: DNA binding and cytokine. *J Endotoxin Res.* 7(4), 315-321, 2001.

153. Dragomir, A.C., Laskin, J.D., Laskin, D.L. Macrophage activation by factors released from acetaminophen-injured hepatocytes: potential role of HMGB1. *Toxicol Appl Pharmacol.* 253(3), 170-177, 2011.

