

Sıçanlarda Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Regenerasyonuna Geraniolün
Etkisinin NF-κB Yolağı Üzerinden Belirlenmesi

Emre Ceyhan

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2013

Determination of effect of geraniol on liver regeneration through NF- κ B pathway after
partial hepatectomy

Emre Ceyhan

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

June 2013

Sıçanlarda Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Regenerasyonuna Geraniolün
Etkisinin NF- κ B Yolağı Üzerinden Belirlenmesi

Emre Ceyhan

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

Danışman: Doç. Dr. Mediha Canbek
Doç. Dr. Azmi Yerlikaya

Haziran 2013

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Emre CEYHAN'ın DOKTORA tezi olarak hazırladığı “**Sıçanlarda Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonuna Geraniolün Etkisinin NF-κB Yolağı Üzerinden Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mediha CANBEK

İkinci Danışman : Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye : Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Üye : Doç. Dr. Adnan AYHanci

Üye : Doç. Dr. Filiz SUSUZ ALANYALI

Üye : Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

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

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda kilit bir role sahip olan NF- κ B, rejenerasyon, apoptozis ve genlerin regülasyonunda görev alan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Doğada bulunan çok sayıda bitkisel materyal tamamlayıcı tıp tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Bunlardan biriside geranioldür ve karaciğer rejenerasyonu üzerine in vivo etkisi ile ilgili araştırmalar bulunmamaktadır. Bu sebeple çalışmamızda, geraniolün Wistar albino türü erkek sıçanlarda %70 parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerini in vivo olarak ortaya koymayı amaçlandık ve n=6 olacak şekilde 8 grup oluşturuldu. Grup I ve grup II sham kontrol grubu iken, diğer 6 grup hayvana parsiyel hepatektomi işleminden hemen sonra tek doz serum fizyolojik, silymarin ve geraniolün intraperitoneal enjeksiyonu tek tek yapıldı. Cerrahi işlemlerden 24 ve 48 saat sonra karaciğer kütle endeksi hesaplandı. RT-PCR ve Western Blot analizlerinde NF- κ B, TNF- α ve IL-6 gen ekspresyon düzeylerine ve protein miktarlarına bakıldı. Ayrıca ısı şok proteinlerinden HSP27 ve HSP60'ın Western blot yöntemiyle gruplardaki ekspresyon düzeylerine bakıldı.

Elde ettiğimiz verilere göre intraperitoneal olarak verilen geraniolün karaciğer rejenerasyon oranını artırma sürecinde anlamlı bir role sahip olduğunu ve karaciğeri koruduğu histolojik bilgilerle ve HSP protein miktar analizleriyle ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Geraniol, NF- κ B, HSP, Hepatektomi

SUMMARY

NF- κ B is a dimeric transcription factor, involved in the regulation of regeneration and apoptosis genes, and has a key role liver regeneration after partial hepatectomy. Complementary medicine is used as a medicine to treat various diseases obtained from a large number of plants, which were found in nature. One of them is geraniol, and there are as yet no studies about its in vivo effects on liver regeneration. For this reason, we aimed to determine in our study, the effects of geraniol on liver regeneration in Wistar albino male rats after 70% partial hepatectomy in vivo and 8 groups with $n = 6$ were formed. Group I and Group II are the sham control groups while a single dose of saline, silymarin or geraniol was injected intraperitoneally to the other 6 groups immediately after partial hepatectomy. Liver mass index was calculated at 24 and 48 hours after surgical procedures. RT-PCR and Western blot analysis of NF- κ B, TNF- α and IL-6 gene expression levels and the amounts of protein were measured. Moreover, the expression levels of the heat shock proteins HSP27 and HSP60 protein amounts by Western blot analysis groups were examined.

According to the data obtained, it was found that geraniol has a significant role in increasing the process of liver regeneration when given intraperitoneally and it was also revealed to protect the liver by analysis of histological information and of HSP protein amount.

Keywords: Geraniol, NF- κ B, HSP, Hepatectomy

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın hazırlanması, teorik ve pratik konulardaki yapıcı eleştirileri, bilgi ve deneyimi ile araştırmanın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde büyük yardımlarını gördüğüm danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mediha CANBEK'e, en içten saygılarımla teşekkür ederim. Benzer şekilde çalışmamın şekillenmesinde ve değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen ikinci danışman hocam Dumlupınar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya teşekkür etmeyi kendime görev bilirim.

Doktora tezimin gerçekleştirilmesinde, çalışma ortamı ve imkanı sağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölüm Başkanlığına teşekkür ederim. Çalışmamın deneysel kısmında bilgi ve emekleriyle büyük katkılarını gördüğüm sayın Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU'na ve sayın Arş. Gör. Dr. Hakan ŞENTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın deneysel uygulamalarında bana zaman ve emek konusunda desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Ahmet ÖZEN'e, Dr. Özgül ÖZALP'e, Doktora öğrencisi Başak DURMUŞ'a, Doktora öğrencisi Özge TURGAK'a, Arş. Gör. Emrah OKUR'a, Arş. Gör. Ayşe ÖZMEN'e, Arş. Gör. Öge BAŞOĞLAN ARTAGAN'a, Biyolog-Kimyager Handan ÇİFÇİ'ye ve Biyolog Burak BERBER'e minnet duygularıyla beraber teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim yaşamım boyunca bana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Annem Fatma CEYHAN'a ve babam merhum Galip CEYHAN'a tüm içtenliğimle sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Emre CEYHAN

Haziran 2013

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ONAY.....	IV
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIV
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Karaciğer.....	4
2.1.1 Karaciğerin yapısı	4
2.1.2 Karaciğerin Fonksiyonları.....	7
2.2 Karaciğer Rejenerasyonu	8
2.2.1 Karaciğer rejenerasyonunun moleküler mekanizması	14
2.3 Geraniol.....	27
3. MATERYAL ve METOD	30
3.1 Deney Hayvanları	30

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2 Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları	30
3.3 Deney Grupları.....	31
3.4 Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar	33
3.5 Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi	37
3.5.1 Karaciğer Dokusu	37
3.5.2 Karaciğer Rejenerasyon Oranı	37
3.5.3 Karaciğer Doku Takibi ve Histolojik İncelemeler	38
3.5.4 Real-Time PCR analizi	38
3.5.5 Wester Blott Analizi.....	43
3.6 İstatistiksel Değerlendirme	50
 4. BULGULAR.....	 51
4.1 Real-Time PCR analiz sonuçlarının değerlendirilmesi.....	51
4.1.1 NF- κ B ₁ Gen Ekspresyonu.....	51
4.1.2 IL-6 Gen Ekspresyonu	54
4.1.3 TNF- α Gen Ekspresyonu	56
4.2 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi	59
4.3 NF- κ B ₁ için Western Blot analiz sonuçları.....	60
4.3.1 IL-6 Western Blot Analiz Sonuçları	62
4.3.2 TNF- α Western Blot Analiz Sonuçları	64
4.3.3 HSP27 Western Blot Analiz Sonuçları	66
4.3.4 HSP60 Western Blot Analiz Sonuçları	67

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4 Karaciğer Regenerasyon Oranı	69
4.5 Histolojik Analiz Sonuçları.....	71
5. TARTIŞMA SONUÇ	74
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	84
ÖZGEÇMİŞ	
EKLER.....	
Ek 1: Etik Kurul Raporu	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Adı	Sayfa
Şekil 2.1 Sıçan karaciğer anatomisi.....	5
Şekil 2.2 Karaciğer genel görüntüsü H&E.	6
Şekil 2.3 Karaciğerde histolojik yapı.....	6
Şekil 2.4 Parsiyel Hepatoktemi sonrası rejenerasyon.....	9
Şekil 2.5 Karaciğer yüzdesi ve rejenere karaciğer ağırlığı arasındaki ilişki.....	10
Şekil 2.6 Karaciğer rejenerasyon süreci	11
Şekil 2.7 Priming ve progresyon fazları	13
Şekil 2.8 TNF Reseptörleri	20
Şekil 2.9 NF- κ B ile TNF- α 'nın aktivasyonu	22
Şekil 2.10 Stres cevabında ısı şok proteinleri (HSP)	27
Şekil 2.11 Geraniolün açık kimyasal formülü	28
Şekil 3.1 PH öncesi batın bölgesi	34
Şekil 3.2 Orta hat kesisi	34
Şekil 3.3 Karaciğerin sağ orta ve sol yan loplara ayrılması-1.....	35
Şekil 3.4 Karaciğerin sağ orta ve sol yan loplara ayrılması-2.....	35
Şekil 3.5 Hepatik arter, ven ve safra kanallarının bağlanması.....	36
Şekil 3.6 Hepatektomi işlemi.....	36
Şekil 4.1 NF- κ B ₁ gen ekspresyon ifadesi	53
Şekil 4.2 IL-6 gen ekspresyon ifadesi.....	55
Şekil 4.3 TNF- α gen ekspresyon ifadesi.....	58
Şekil 4.4 Proteinlerin membrana transferi	59
Şekil 4.5 NF- κ B ₁ proteinine ait bant görüntüleri.....	61
Şekil 4.6 IL-6 proteinine ait bant görüntüleri	63
Şekil 4.7 TNF- α proteinine ait bant görüntüleri	65
Şekil 4.8 HSP27 proteinine ait bant görüntüleri	67
Şekil 4.9 HSP60 proteinine ait bant görüntüleri.....	68
Şekil 4.10 Karaciğer kütle artışı grafiği.....	70
Şekil 4.11 Karaciğer kesitlerinde vena sentralis çevresindeki hepatositler.	72
Şekil 4.12 Hepatositlerde mitotik aktivite	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge Adı	Sayfa
Çizelge 2.1 Karaciğer rejenerasyonunda etkili faktörler.....	14
Çizelge 2.2 Gen aktivitesi zinciri.....	17
Çizelge 2.3 NF- κ B ailesine ait proteinler	19
Çizelge 2.4 Bazı HSP'lerin yerleşim yerleri ve işlevleri.....	24
Çizelge 3.1 Her bir kuyucuk için 2X RT master mix hazırlanması.....	42
Çizelge 3.2 Termal Cycle protokolü.....	42
Çizelge 3.3 RT-PCR reaksiyon karışımının hazırlanması	43
Çizelge 3.4 PCR reaksiyonu	43
Çizelge 3.5 Ayırıcı jel monomer konsantrasyonu	45
Çizelge 3.6 Paketleyici jelin hazırlanışı.....	45
Çizelge 4.1 NF- κ B1 gen ekspresyonu	52
Çizelge 4.2 IL-6 gen ekspresyonu	55
Çizelge 4.3 TNF- α gen ekspresyonu	57
Çizelge 4.4 NF- κ B ₁ protein band yoğunlukları	61
Çizelge 4.5 IL-6 protein band yoğunlukları.....	63
Çizelge 4.6 TNF- α protein band yoğunlukları.....	65
Çizelge 4.7 HSP 27 protein band yoğunlukları	66
Çizelge 4.8 HSP 60 protein band yoğunlukları	68
Çizelge 4.9 Karaciğer kütle artışı	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
μ	Mikrometre
cm	Santimetre
dL	Desilitre = 10^{-1} litre
kg^{-1}	1 / kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
n	Denek sayısı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
Pg	Pikogram
rpm	Devir/dakika
U	Unit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
DNA	Deoksiribonükleik asit
GS	Glutamin sentetaz
H&E	Hematoksilin ve Eosin
HSS	Hepatosit Uyarıcı Madde
IEG _s	Acil erken faz genleri
IKK	İnhibitör kappa B kinaz
IL-1	Interleukin-1
IκB	Inhibitor Kappa B
L	Leflunomid
mRNA	Haberci ribonükleik asit
PBS	Fosfat tuzu tamponu
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PMNL	Polimorf nüklear lökosit
RO	Rejenerasyon Oranı
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TNFR1	Tip 1 TNF- reseptör
TNFR2	Tip 2 TNF- reseptör

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Simge
LD₅₀

Açıklama
Lethal Dose 50

NF-Kb

Nükleer faktör kappa B

G₀

Durağan faz

G₁

Bölünme başlangıç fazı

STAT3

Signal Transducers Activator
of Transcription 3

STAT

Signal Transducers Activator
of Transcription

IL-6

İnterlökin-6

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Karaciğer vücudun en büyük organıdır ve metabolizma fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli görev alır. Plazma proteinleri, safra sentezi ve sekresyonu, kan glikozunun dengelenmesi, lipid ve lipoprotein sentezi, vitamin depolanması, endojen ve ekzojen bileşiklerin biyotransformasyonu gibi birçok temel fizyolojik olaylarda merkezi bir rolü bulunmaktadır (Andreoli et al., 2001). Karaciğerde meydana gelebilecek herhangi bir yapısal ya da fonksiyonel bozukluk vücuttaki tüm sistemleri de etkiler.

Karaciğer kendisini onarabilme yeteneği ile vücuttaki diğer tüm organlardan daha fazla avantaja sahiptir. Karaciğer çeşitli nedenlerle zarar görmesi karşısında, fonksiyonel kütlesini tamamlama yönünde proliferasyon ve replikasyona başlayabilir (Fausto, 2000). Karaciğer loblarının bir kısmının cerrahi olarak çıkarılması (parsiyal hepatektomi - PH) ve hepatositlerin virüs ya da kimyasallardan zarar görmesi gibi durumlarda hepatosit replikasyonunun arttığı görülür. Normalde nadiren bölünen hepatositler için bu özellik son derece önemlidir. Karaciğer, önemli doku kaybı durumlarında kendisini birkaç hafta içerisinde onarabilecek hücreler arası eşsiz bir etkileşim ve karmaşık bir mediatör sistemine sahiptir (Bismuth et al., 1982). İnsanlarda ve ratlarda parsiyel hepatektomiden sonra, rejenerasyon ve karaciğerin yeniden yapılanabilmesi için endokrin, parakrin ve otokrin etkileşimler gereklidir (Tang et al., 1997).

Deneyisel olarak parsiyel hepatektomi, karaciğerin yaklaşık %67-70' inin çıkartılması şeklinde tanımlanmaktadır (Borowiak et al., 2004). Parsiyel hepatektomiden sonra kalan karaciğer dokusunda gen ekspresyonu ve rejenerasyon başlar. Günümüzde bilgisayarlı tomografi, anjiyografi ve sintigrafi gibi yöntemlerle yapılan çalışmalarda, karaciğer rezeksiyonu sonrası erişkinlerde üç ile altı ayda,

çocuklarda üç aydan daha kısa bir sürede karaciğerin eski boyutuna ulaştığı gözlenmiştir (Hamanoue et al., 1992; Perek ve Kapan, 2000). Nagasue ve arkadaşları tarafından insan karaciğerinin %80-85'e varan rezeksiyonları bile tolere edilebildiği bildirilmiştir (Nagasue et al., 1987). Rezeksiyon %10'dan az bile olsa rejenerasyon gerçekleşmektedir (Michalopoulos and DeFrances, 1997). Hepatosit büyüme faktörlerinin etkilerinin araştırılması ve rejenerasyonun farklı evrelerinde gen ekspresyonunun gösterilmesi karaciğer rejenerasyonunu anlamamızda önemli ilerlemelere sebep olmuştur. Parsiyel hepatektomi sonrası geride kalan karaciğer dokusunda rejenerasyonun ilk günden itibaren başladığı ve DNA sentezinin, hepatektomiden sonra 24-48 saat içerisinde maksimuma ulaştığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (LaBrecque and Steele, 1987).

Tıbbi olarak, hasar görmüş karaciğerin daha hızlı iyileştirilmesi için çeşitli ilaçların kullanımına başvurulmaktadır. Fakat birçok kimyasal ilaç tedavisinde olduğu gibi, yan etkiler kaçınılmazdır. Bu nedenle, son günlerde doğal maddelerin kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Bu maddelerin büyük çoğunluğu doğadaki bitkilerden elde edilmektedir ve bunlar normal olarak halk tarafından kullanılmaktadır. Karaciğer sağlığı için kullanılan ve bilimsel olarak yararları kanıtlanmış bir madde olan silymarin bunlardan bir tanesidir. Silymarin'in parsiyal hepatektomiden sonraki karaciğer rejenerasyonu sırasında DNA ve protein sentezini arttırdığı ve rejenerasyon oranını yükselttiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Magliulo et al., 1973; Luper, 1998). Jacobs ve ark tarafından yapılan bir çalışmada sıçanlara oral olarak verilen sıvı haldeki silymarin çözeltisinin %70 parsiyal hepatektomiden sonraki karaciğerde mitotik indeksi artırdığı ve hepatosit rejenerasyonunu hızlandırdığı bildirilmiştir (Farghalı, et al., 2000; Oliveira et al., 2001; Jacobs et al., 2002; Ramadan et al., 2002; Rolo et.al., 2003; Soto et al., 2003). Karvakrolde, silymarin gibi antioksidan özellik gösteren bir flavonoidtir (Kulisic et al., 2004; Sökmen et al., 2004). Uyanoğlu ve ark. yaptıkları bir çalışmada, sıçanlara intraperitoneal olarak verilen karvakrolün karaciğer rejenerasyonunu hızlandırdığını ve mitotik indeksi arttırdığını bildirilmişlerdir (Uyanoğlu et al., 2008).

Çalışmamıza konu olan geraniol monoterpenoid bir alkoldür. Geraniolle yapılan in vivo çalışmalarda iyi bir antioksidan olduğu ve ROS hasarına karşı mitokondri membranını koruduğu ayrıca serbest radikal bağlayıcı özelliğinin bulunduğu ortaya konmuştur (Choi ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki geraniolün antibakteriyel ve karaciğer koruyucu etkileri de bulunmaktadır (Banthorpe 1972; Lapczynski et al., 2008, Chen ve Viljoen, 2010; Cardozo v et al., 2011). Ancak geraniolün karaciğer rejenerasyonu üzerine etkisini gösteren araştırmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, geraniolün sıçanlarda %70 parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerini in vivo olarak, NF-κB yolağı üzerinden araştırdık. Ayrıca bu çalışmamızdan elde edilen veriler rejeneratif etkisi iyi bilinen silymarin ile karşılaştırılarak yorumlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Karaciğer

2.1.1 Karaciğerin yapısı

Karaciğer karın boşluğunun sağında bulunan bir organdır. Sıçan karaciğeri sağ lob, sol lob, quadrat lob ve kuyruk lobu olmak üzere 4 lobtan oluşur (Şekil 2.1). Karaciğer dıştan periton ile örtülüdür. Peritonun altında organı tümüyle dıştan kuşatan elastik liflerden zengin bir bağ doku olan karaciğer kapsülü (Glisson kapsülü) bulunur. Glisson kapsülü organ içine girerek karaciğeri lobüllere ayırır. Lobüllerin birleştiği yerlerde bağ dokusu artar.

Normal karaciğerin histolojisine bakıldığında hekzagonal ve poligonal lobüller görülür. Bu lobüllerin ortasında santral ven bulunur. Lobül içerisinde hepatositler santrale doğru yönelim gösteren tek sıralı dizilim halindedirler. Yan yana gelen hepatositler safra kanaliküllerini meydana getirirler. Kan akımı, portal venül ve hepatik arteriöl ile bağlantılı olan ve de hepatosit dizilimleri arasında bulunan sinüzoidal boşluklardan olur. Sinüzoidler özelleşmiş endotel hücreleri ile döşelidir ve karaciğerin doku makrofajları olan Kupffer hücreleri sinüzoidler içerisinde bulunurlar. Endotel hücreleri ile hepatositler arasında ise Disse aralıkları uzanır ve kan ile hepatosit arasındaki madde alışverişi bu boşluklarda gerçekleşir. Disse aralığı içinde hem Kupffer hem de endotel hücrelerinden türeyebilen İto hücreleri bulunmaktadır. Bu hücreler farklı uzunlukta sitoplazmik çıkıntılara sahip yıldızsı hücrelerdir. Portal kan akışını düzenlerler (Burtis and Ashwood, 2005). İto hücrelerinin iki farklı fonksiyonu vardır. Bunlar dinlenme durumunda karaciğerde yağ depolamaktır, aktif hale geldiklerinde doku rejenerasyonu için gerekli kollajen gibi proteinleri üretmektir. Karaciğer hasarı sırasında İto hücrelerinin aşırı aktivasyonu, fibrozisin bir özelliği olan skar dokusunun oluşumuna neden olur (Neuman, 2003). Kan portal venül ve hepatik arteriolden, sentraldeki hepatik arteriole doğru akar. Hepatositler tarafından üretilen ve kanaliküller içine salınan safra ise portal bölgedeki interlobüler safra kanalına doğru

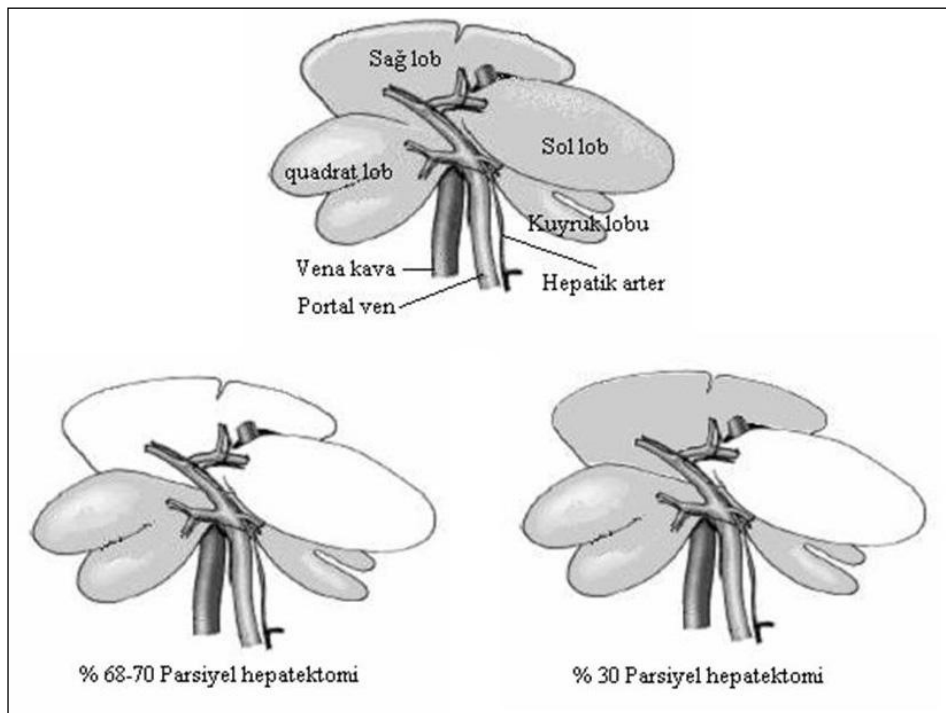
akar. Periportal bölgelerde safra kanalikülü ile safra kanalı arasındaki geçiş bölgeleri Hering kanalları olarak adlandırılır ve bunlar hücresel rejenerasyonun gerçekleştiği bölgelerdir (Şekil 2.2, Şekil 2.3).

Karaciğer lobülü parenkim sınırları keskin olmayan 3 bölgeye ayrılır (Şekil 2.2):

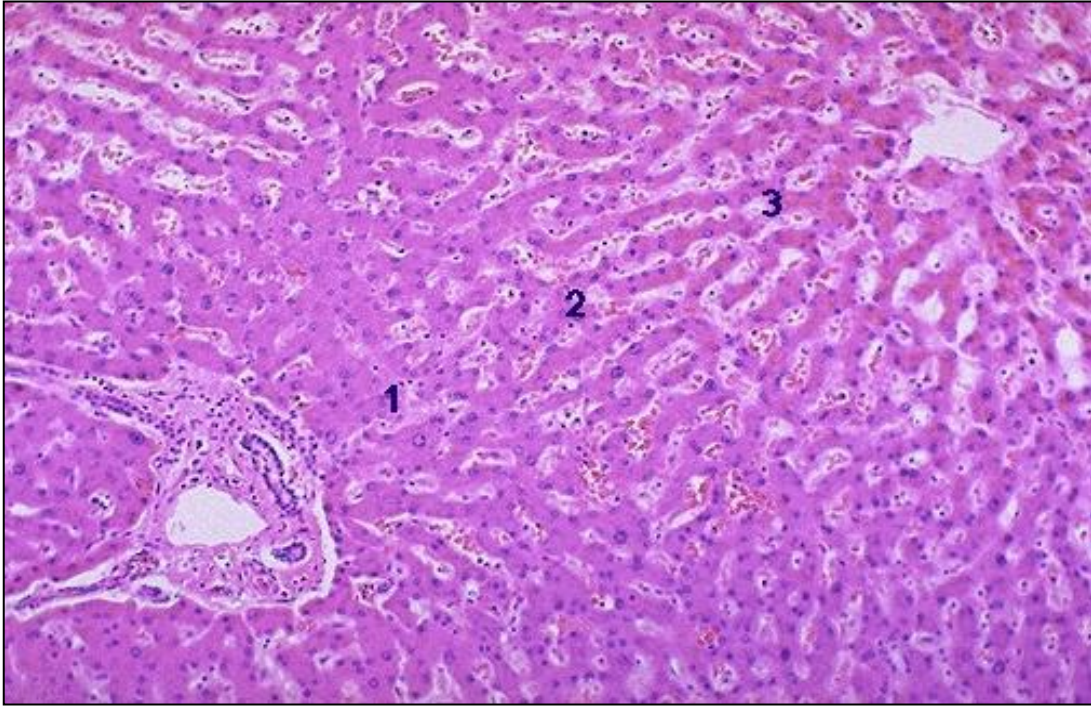
Periportal bölge: Bölge 1 (Zon 1)

Perivenüler bölge (santral bölge): Bölge 3 (Zon 3)

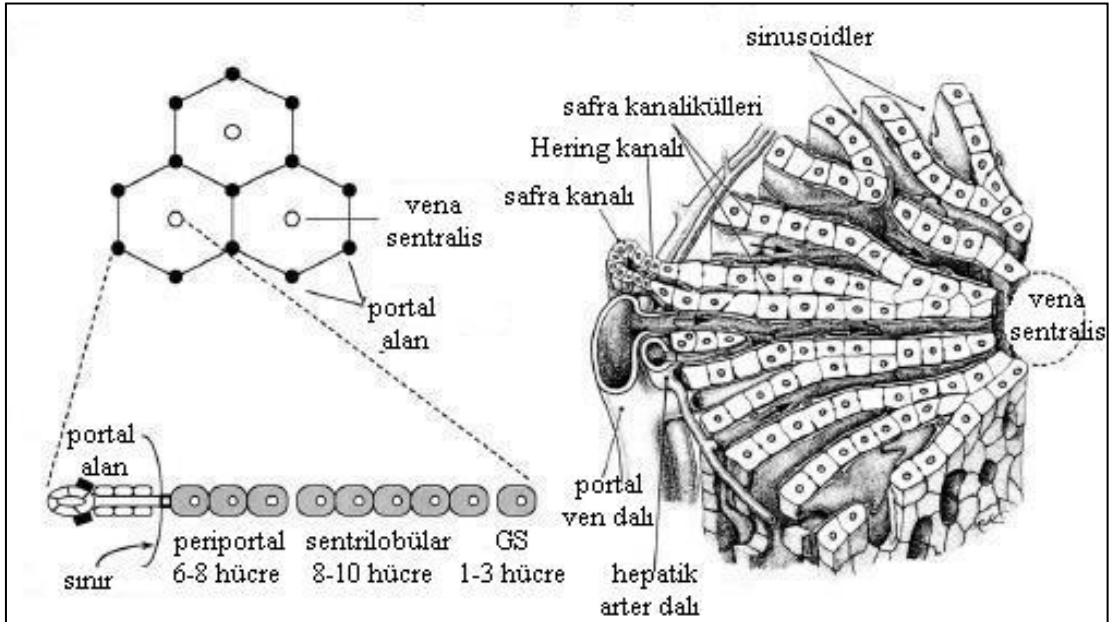
İki bölge arasındaki ara bölge: Bölge 2 (Zon 2)



Şekil 2.1 Parsiyel hepatektomi oranına göre sıçan karaciğer anatomisi. Gri renkle gösterilen; fonksiyonel karaciğer lobları, beyaz renkle gösterilen; fonksiyonel olmayan karaciğer lobları (Palmer and Spiegel, 2004).



Şekil 2.2 Karaciğer genel görüntüsü H&E.



Şekil 2.3 Karaciğerde histolojik olarak altıgen yapıda görülen lobüller ve lobül yapısı (Fausto and Campbell, 2003).

2.1.2 Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğer hücresi vücudun çok yönlü bir hücresidir. Bu hücreler hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonludur (Nagasue et al., 1987). Karaciğerin fonksiyonları genel olarak dört ana başlık altında incelenebilir. Bunlar;

1. Atılım fonksiyonu
2. Sentez fonksiyonu
3. Depolama fonksiyonu
4. Metabolik fonksiyon

Atılım Fonksiyonu: Organik bileşiklerin biyotransformasyonu karaciğerde gerçekleşir ve sinizoidal kandan safra ve idrar yoluyla atılır.

Sentez Fonksiyonu: Karbonhidrat, lipid ve proteinlerin sentez ve metabolizmasının regülasyonunda önemli bir rol oynar.

Depolama Fonksiyonu: Glikojen ve bütün yağda eriyen vitaminler ve B₁₂ vitamini gibi suda eriyen vitaminlerin depolandığı yer karaciğerdir.

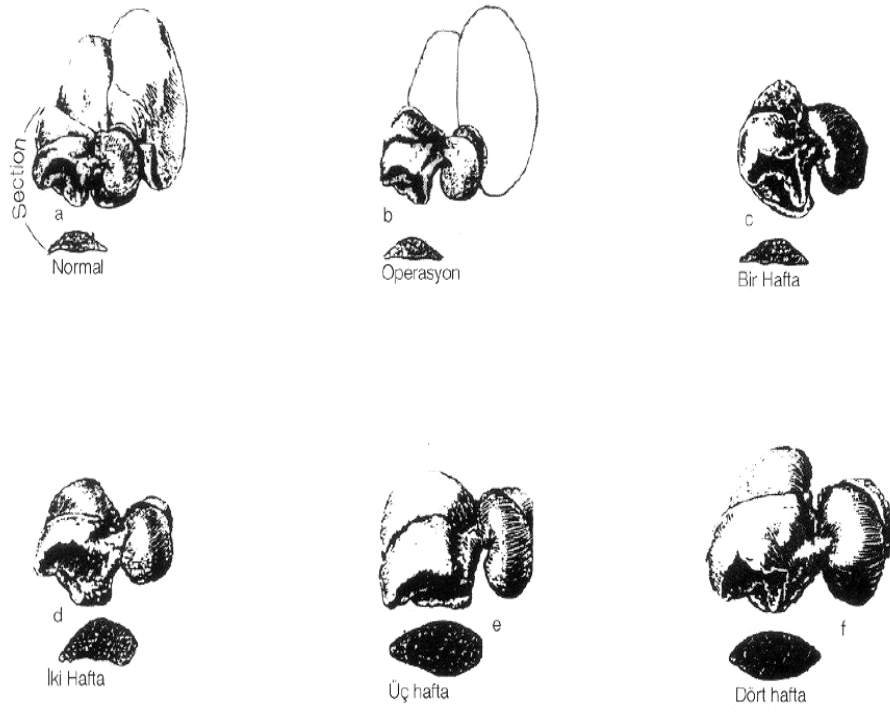
Metabolik Fonksiyon: Karaciğerde iki önemli metabolizma olayı gerçekleşmektedir. Bunlar, amonyak ve karbonhidrat metabolizmasıdır. Amonyak vücuttaki aminoasit ve nükleik asit metabolizmasının son ürünü olarak karaciğerde üretilir. Glikoz karaciğerde glikojene çevrilir ve büyük kısmı karaciğerde depolanır.

2.2 Karaciğer Rejenerasyonu

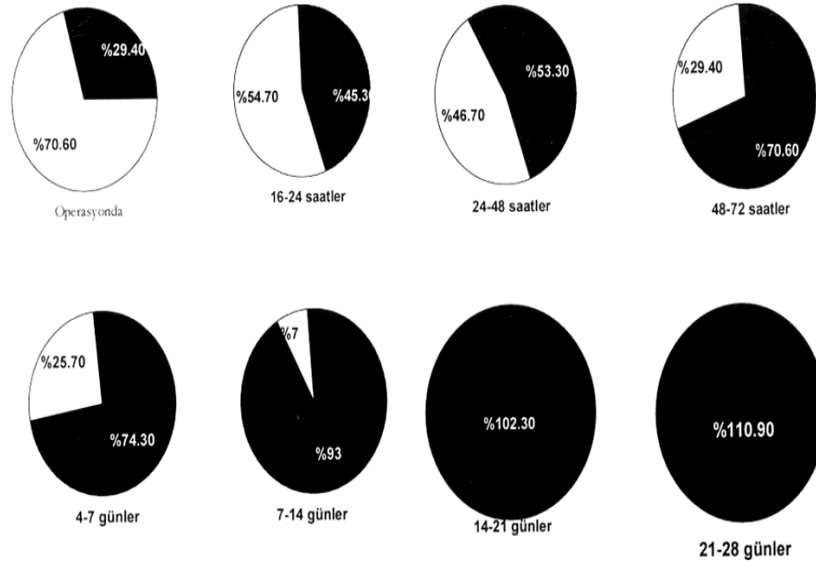
Karaciğer güçlü rejenerasyon kapasitesi ve karmaşık fonksiyonları ile farklı özellikleri olan bir organdır. Yaralanma veya rezeksiyondan sonra karaciğerin kendini onarabilme kabiliyeti uzun süredir bilim adamlarının ilgisini çekmektedir (Taub, 2004).

Gerçek anlamda karaciğer rejenerasyonu fikrini ilk kez ortaya atan bilim adamı 1833'te Cruveilhier olmuştur (Nuzzo et al., 1996). İlk deneysel çalışmalarda 1900'lü yıllarda Amerikalı bilim adamı Higgins ve Anderson tarafından sıçanlarda eter anestezi altında subtotal lobektomiyle (%75-80) orta ve sol lobu çıkartmıştır. Sonuç olarak %75'lik karaciğer kütlelerinin kaybının bir ayda giderildiğini rapor etmişlerdir (Higgins and Anderson, 1931; Bartel et al., 1972).

Karaciğer rejenerasyonu esas olarak kompanse edilebilir bir hiperplazidir (Şekil 2.4, Şekil 2.5). Organın morfolojisi parsiyel hepatektomi sonrası orijinal şekline dönmez. Rezeksiyondan sonra karaciğer rejenerasyonunu düzenleyen mekanizmaların bazıları değişebilir bu işlem anatomik olmaktan ziyade fonksiyoneldir (Fausto, 2000; Fausto et al., 2006).

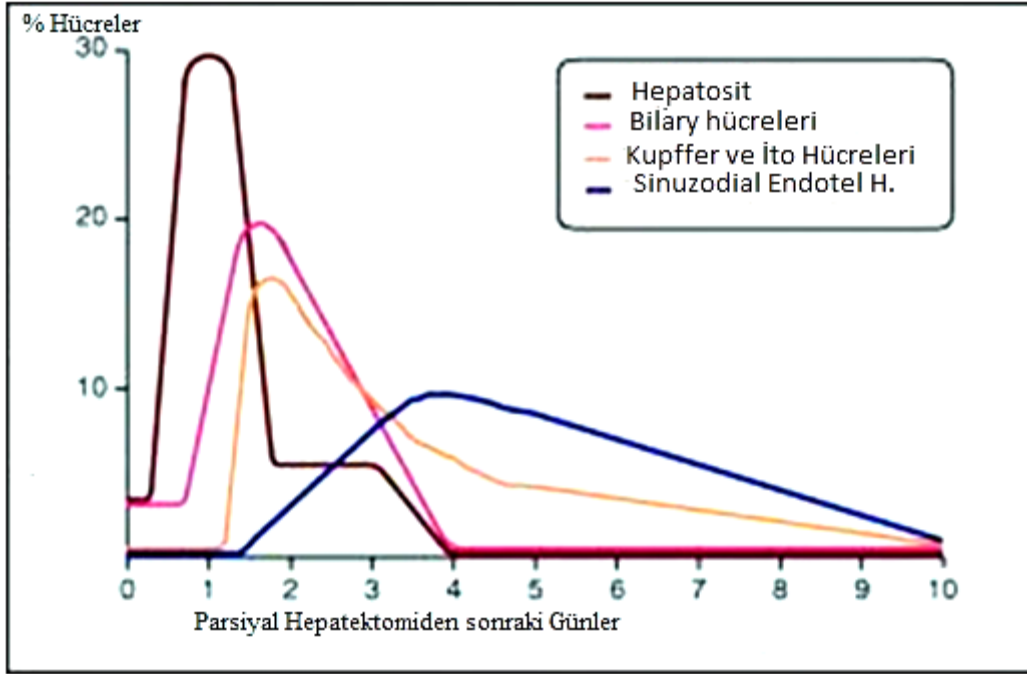


Şekil 2.4 Parsiyel Hepatektomi sonrası haftalar sürecinde gerçekleşen rejenerasyon (Higgins and Anderson, 1931)



Şekil 2.5 Rejenerasyon süresince çıkarılan karaciğer yüzdesi ile rejenere olan karaciğer dokusunun toplam ağırlığı arasındaki ilişki (Higgins and Anderson, 1931)

Karaciğerin 2/3'ü rezekte edilen sıçanlarda rejenerasyon cevabı maksimumdur (Higgins and Anderson, 1931). Daha küçük oranlarda parankim çıkarıldığında ise onarım daha yavaş ilerler. 2/3'ü aşan rezeksiyonlarda DNA sentezi ve mitotik aktivitede bozulma gerçekleşir. Sıçanlarda %90 oranında hepatektomi rejenerasyon olmaksızın ölüme yol açabilir (Tuczek and Rabes, 1971; Eguchi et al., 1996). Rejenerasyon, kalan karaciğer dokusunun asiner yapısının proliferasyonuna bağlıdır. Parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 24 saat içerisinde aktif hücre replikasyonu başlar ve organın ilk ağırlığına erişinceye kadar devam eder. İlk on gün içinde büyük ölçüde rejenerasyon oluşur ve bu olay dört haftada tamamlanır (Şekil 2.5, Şekil 2.6). Rejenerasyon daha çok yeni lobüller oluşması ve artık lobüllerin genişlemesi şeklinde olur (Şekil 2.4) (Bucher, 1995). Kalan hepatositlerde DNA sentezi sıçanlarda ilk 24 saat içerisinde pik yapar ve dokudaki mitotik aktiviteyi artırır (Şekil 2.6).



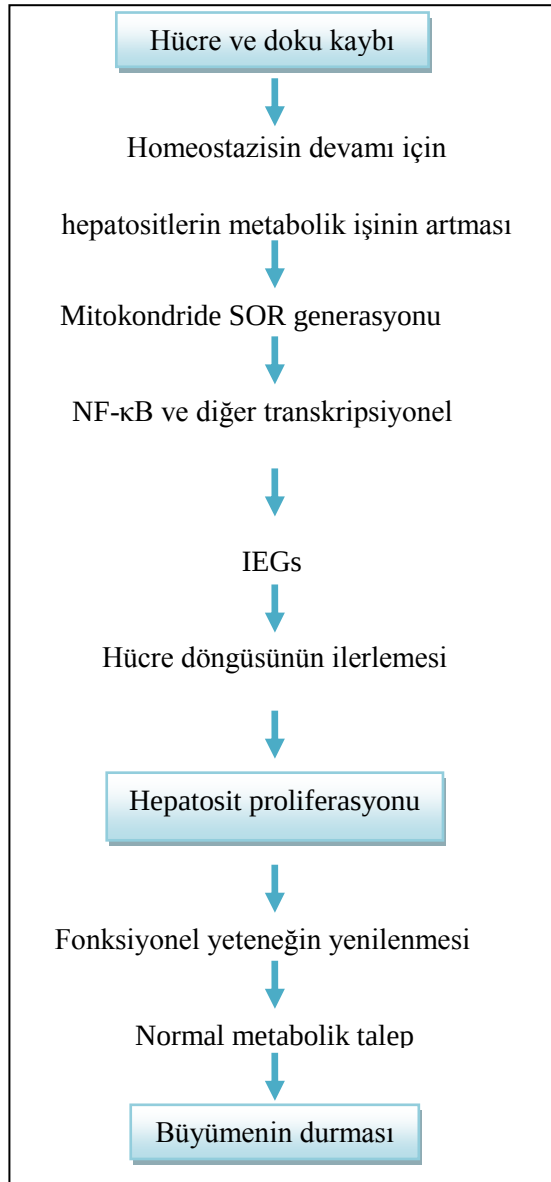
Şekil 2.6 Karaciğer rejenerasyon süreci (Micholopoulos and De Frances, 1997).

Rejenerasyon esnasında hepatositlerin büyük çoğunluğu 1 veya 2 sefer proliferasyon olmaktadır (Akça ve Dinçer, 2004; Taub, 2004). Parsiyal hepatektomiden sonra karaciğerin yapısını oluşturan hücreler içerisinde, hepatositler hücre siklusuna en hızlı başlayan hücrelerdir. Bu hücrelerdeki değişiklikler dakikalar içerisinde meydana gelmektedir (Mars et al., 1995; Laurent et al., 2001). Hepatositlerdeki en üst DNA sentezi 24. saatte görülmektedir. Hepatositleri sırasıyla epitelyum hücreleri, kupffer hücreleri, ve endotel hücreleri izlemektedir. Hepatosit proliferasyonu lobülün periportal alanından perisentral alanına doğru mitoz dalgası şeklinde yayılır (Widmann and Fahimi, 1975; Tanaka et al., 1990). Sentral ven çevresindeki glutamin sentetaz enzimi içeren hepatositler hücre replikasyonuna en son katılan hücrelerdir.

Normal koşullar altında hepatositler hücre döngüsünün G_0 fazındadırlar. Doku hasarı veya kaybı sonrasında hepatositler hücre siklusundaki sakin fazdan (G_0) pre-replikatif faza (G_1) girerek hücre bölünmesine yol açar. Bunu takiben DNA sentezi (S) ve mitoz (M) ile hücre bölünme olayları başlar. DNA sentezi için gereken proteinlerin yapım dönemi G_1 fazında tamamlanır. Daha sonra hücre DNA replikasyonunu gerçekleştirir (S fazı). Bu fazı proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA) ve Ki-67 (proliferasyon marker) gibi artan S fazı proteinlerinin ekspresyonlarını göstererek tanımlamak mümkündür (Theocharis et al., 1994). Replikasyon sonrası hücre bölünmesi için gereken moleküllerin sentezi G_2 fazında tamamlanır. Daha sonra mitoz gerçekleşerek yeni hücreler ortaya çıkar (Court et al., 2002). PH sonrası hücrelerin G_0 fazından G_1 fazına geçmesine sebep olan olaylar “priming” daha sonra hücre döngüsünün tamamlanması ise “progresyon” olarak tanımlanır (Şekil 2.7).

PH’a yanıt olarak kalan hepatositlerde düşük DNA sentez oranı yaklaşık 12 saat devam eder ve takiben hepatositlerin bir kısmı S fazına girmeye başlar. Mitoz DNA sentezinden 6-8 saat sonrasına kadar devam eder (Ankoma-Sey, 1999; Fausto, 2000).

Rejenerasyon süreci bir takım sitokin ve büyüme faktörlerinin rol aldığı sinyallerle gerçekleşir. Bu saptamalardan yola çıkarak karaciğer rejenerasyonu için kabul gören genel görüş, organizmada meydana gelen sinyallerin düzenleyici etkisi ile karaciğerin optimum boyutuna gelene kadar devam eden ve ileri derecede organize olmuş bir olaylar zinciridir (Ankoma-Sey, 1999; Fausto, 2000).



Şekil 2.7 Karaciğer rejenerasyon sürecinde priming ve progresyon fazları (Akça ve Dinçer, 2004).

2.2.1 Karaciğer rejenerasyonunun moleküler mekanizması

Karaciğer rejenerasyonunun bir takım stimilatör ve inhibitör uyanların karşılıklı karmaşık ilişkileri sonucu düzenlendiği kabul edilmektedir (Michalopoulos and DeFrances, 1997; Fausto ve ark., 2006). Büyüme yanıtının başlaması hepatositler ve non-parankimal hücreler, ekstra sellüler matriks, endokrin, otokrin, parankim ve nöroregülatör faktörler, serbest oksijen radikalleri, metabolitler ve besinler arasındaki kompleks etkileşimler sonucu olmaktadır. Başlatıcı sinyaller; EGF, TNF, IL-6, insülin ve matriks değişikliklerini içerirken, iletici sinyaller ise HGF, TGF, EGF, insülin olarak görülmektedir (Çizelge 2.1) (Ankoma-Sey, 1999).

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

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

Parsiyel hepatektomi ya da kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarından sonra Kupffer ve endotel hücreleri tarafından TNF- α ve IL-6 üretimi başlatılır. IL-6 üretimi TNF- α tarafından uyarılmaktadır. IL-6 ve özellikle TNF- α ile birlikte karaciğerden salınan Hepatosit Growth Factor (HGF) ve çevre organlardan gelen büyüme faktörlerinin etkisiyle SOR üretimi gerçekleşir (Fausto, 2000). IL-6 ve diğer büyüme faktörleri varlığında sitoplazmada aktivite kazanmış bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve signal transducer activator of transcription (STAT₃), hücre çekirdeğine göç eder. DNA molekülüne bağlamasının ardından hepatosit proliferasyonunda gerçekleşen iki aşamalı gen ekspresyonunun ilk fazı IEG “*Immediate early genes*” olarak da bilinen acil erken genler c-fos, c-myc, c-jun, jun-B, Gadd45 gibi proto-onkogenlerin ekspresyonu başlatılır ve 4. saatte sonlanır (Fausto, 2000; Debonera ve ark., 2001; Kurinna and Barton, 2011). IEG’ler lösün ailesinin üyelerinden proteinleri kodlar ve bu proteinler hücre onarımında görev yapmaktadırlar (Tsuchiya et al., 2000). “*Delayed early genes*” gecikmiş erken genler olarak bilinen ve apoptoza engel olan Bcl-XL geninin örnek gösterildiği gen ekspresyonunun ikinci fazıdır. Gecikmiş erken faz genleri parsiyal hepatektomi sonrası birkaç saat içerisinde tetiklenir ve G₀ dan G₁ fazına geçiş sürecinde eksprese olurlar. Bunlar hepatosit rejenerasyonunun kritik düzenleyicileri olup Bcl-2, p53, H-ras ve K-ras genlerini içerir. Bu genler, rejenere olan karaciğerde G₁ fazı sırasında geç erken gen yapımını düzenleyicisidirler. Ayrıca Bcl-XL geni hepatosit proliferasyonu sırasında mitokondrilerde meydana gelmiş olan SOR’a karşı antioksidan etki de gösterir (Ankoma-Sey, 1999; Fausto, 2000).

Birçok hücre tipinde bulunduğu gibi hepatositlerde de var olan ve p65-p50 protein alt ünitelerinden oluşmuş NF- κ B normalde inaktiftir. Bu durum molekülün p65 ünitesine bağlı I κ B inhibitöründen kaynaklanmaktadır. SOR aracılığıyla IKK enzim kompleksi tetiklenerek I κ B molekülünü katalizlemesi ve NF- κ B’den kopması sağlanır. Böylece, hepatosit sitoplazmasında fosforilasyondan sonra aktivite kazanan NF- κ B hücre çekirdeğine göç eder. Molekülün çekirdeğe geçişi engellendiğinde karaciğerde apoptoz başlar (Fausto ve ark., 2006). Parsiyel hepatektomiden sonra öncelikle transkripsiyon faktörlerinden NF- κ B, AP-1, C/EBP ve bunların hemen arkasından da

STAT 3'ün DNA'ya bağlanması artış olur. NF- κ B operasyondan 10-15 dakika sonra ölçülebilir ve 1-2 saat içinde de normal seviyeye düşer (Gerald et al., 1995; Taub, 2004; Fausto ve ark., 2006).

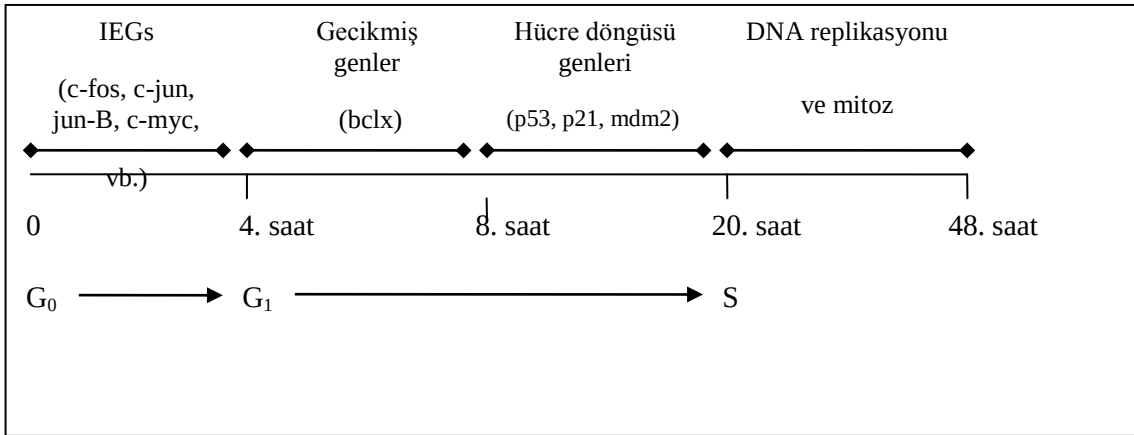
STAT3 de parsiyal hepatektomi sonrası aktive olmaktadır ancak bu aktivasyon NF- κ B'den daha yavaş ve farklı mekanizmalarla gerçekleşir. STAT3 parsiyel hepatektomi sonrası karaciğerde 1-2 saat içerisinde saptanmakta ve bu aktivasyon 4-6 saatte sonlanmaktadır (Haber et al., 1993; Taub, 2004). Bir dizi olay sonunda fosforile ve transloke olan STAT3; inflamasyon, akut faz yanıtı ve proliferasyona katılan çok sayıda genin üretimini regüle etmektedir (Gerald et al., 1995; Taub, 2004).

Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve primer genlerin ekspresyonu sonucunda hepatositler, hücre döngüsünün G₁ fazına girerler. Bu olay parsiyal hepatektomiden sonraki dördüncü saate denk gelmektedir (Fausto, 2000). Hücre siklusunda görev alan p21, p53, Mdm-2 genleri ile siklinler ve siklin bağımlı kinazlar olarak da bilinen hücre içi enzimler parsiyal hepatektomi uyarısıyla aktif hale geçerler. Siklin D1'in kinaz ile oluşturduğu kompleks, hücre döngüsündeki bazı faktörleri fosforlar ve rejenerasyonun yirminci saatinde döngünün G₁ fazından S fazına geçmesini ve replikasyonun başlamasını sağlarlar (Çizelge 2.2) (Ebrenfried et al., 1997; Fausto, 2000; Kurinna and Barton, 2011). Bu süreçte siklin D, E, C ve B'nin ekspresyonlarına da ihtiyaç duyulur ve sonuç olarak DNA molekülü replikasyona başlar (Kay and Fausto, 1997; Fausto, 2000).

Hepatosit hücre döngüsünde, siklin D1'den siklin E'ye geçiş önemli bir noktadır. İn vivo ve in vitro koşullarda, bu iki siklini eksprese edebilen adenovirüs vektörleri, hepatosit DNA replikasyonunu uyarabilir ve bu aşamadan itibaren, büyüme faktörleri olmaksızın replikasyon ilerleyebilir (Fausto and Campbell, 2003). Siklin bağımlı kinazlar ve bunların yapılarına katılarak aktivasyonlarını yönlendiren siklin

proteinleri sadece hepatosit hücre döngüsünde değil aynı şekilde tüm ökaryot hücrelerin döngülerinde de düzenleyici rol oynamaktadır (Andreeff and Goodrich, 2000).

Çizelge 2.2 Parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda gen aktivitesi zinciri (Fausto, 2000).



2.2.1.1 Karaciğer Rejenerasyonunu Aktive Eden Faktörler

TNF: Polipeptid yapıda bir sitokindir. TNF- α ve TNF- β olmak üzere iki biçimi bulunmaktadır. TNF- α başlıca makrofajlardan salınan klasik formdur ve kaşetin olarakta bilinmektedir. TNF- β ise lenfosit kaynaklıdır. Reseptörleri (TNFR_I ve TNFR_{II}) ve etki mekanizmaları aynıdır. Birçok doku ve hücre üzerinde farklı etkileri bulunmaktadır. TNF doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre regülasyonu, farklılaşma ve apoptozis sürecinde önemli rollere sahiptir. Başta makrofajlar ve lenfositler olmak üzere çeşitli immun ve somatik hücrede sentezlenirler. Prohormon şeklinde membrana entegre halde bulunur. Uyarılara yanıt olarak membranöz TNF (m-TNF), TNF dönüştürücü enzim (TACE) tarafından yıkılır ve bu yıkım sonucu matür (olgun) ve soluble (çözünür) form (s-TNF) oluşur. TNF ekspresyonu uyarı sonucu yarım saat içerisinde başlar, 90-120 dakika arasında pik yapar. Daha sonra salınan IL-1 ve IL-6 TNF'nin ekspresyonunu inhibe eder. Dört saat içerisinde TNF ekspresyonu sıfıra düşer. TNF koşullara bağlı olarak NF- κ B tarafından aktivasyonları düzenlenen hücreler

üzerinde promitojenik etkiye sahiptir (Şekil 2.8) (Krillova et al., 1999; Muriel, 2009). Genetik olarak TNFR_I reseptör defektli sıçanların parsiyel hepatektomiye yanıtlarının yavaş ve eksik olduğu gözlemlenmiştir (Yamada and Fausto, 1998). TNF aynı zamanda iNOS'un regülasyonunda rol oynar, iNOS defekti bulunan sıçanlarda karaciğer rejenerasyonlarıda hatalıdır (Boyer et al., 2003). TNF hepatositler için direkt mitojen değildir. HGF gibi direkt mitojenlerin etkisini artırır (Zimmermann, 2004; Fausto ve ark., 2006).

İnterlökin-6 (IL-6): Kaynağı T ve B hücreleri, makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar ve hepatositlerdir. Salgılanmasında majör etkiyi IL-1 ve TNF- α sağlar, IL-4, IL-10, ve IL-13 tarafından baskılanır (Sakamoto et al., 1999; Zimmermann, 2004). Parsiyal hepatektomiden sonraki 60 dakika içerisinde dolaşımdaki düzeyi ölçülebilir. 4 ile 6 saat içinde pik yapar ve dolaşımda kalma süresi 10 güne kadar uzayabilir. Ulaştığı kan düzeyi direk doku hasarı ile bağlantılıdır. IL-1 ve IL-6 travma sırasındaki hepatik akut faz protein yanıtının önemli mediatörleridir ve C-reaktif protein (CRP), fibrinojen, haptoglobulin, α_1 -antitripsin ve kompleman yapımını da artırır. Sağlıklı bireylerde serum IL-6 düzeyleri saptanmazken inflamatuvar olaylarda serum seviyeleri artar. IL-6 sıçanlarda parsiyel hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonunu uyaran önemli bir mitojen ve anti-apoptotik faktördür (Fausto, 2000; Galun ve Axelrod, 2002). IL-6, TNF- α uyarısıyla etkinlik kazanır ve farklı hücre tipleri üzerine çok yönlü biyolojik aktiviteler gösteren pleiotropik bir sitokindir (Scotte ve ark., 1993). Bu sitokin, hemapoietik sistem düzenlenmesinde, lenfosit fonksiyonlarında ve hücre farklılaşmasında görev alan önemli bir mediatördür. Sıçanlarda parsiyel hepatektomiden sonraki 24-48 saatler arasında IL-6'nın serum konsantrasyonunun seviyesi artar (Ankoma-Sey, 1999; Salazar-Montes et al., 1999; Borowiak ve ark., 2004). IL-6'nın fizyolojik miktarı rejenerasyon için gereklidir ancak fazla IL-6 büyüme durdurucu onkogenleri uyarak rejenerasyonun bozulmasına neden olabilir (Kaya ve ark., 2002). İnflamatuvar sitokinlerin önemli kaynağı kupffer hücreleri (Ankoma-Sey, 1999) ve sinusoidlerdeki epitelyum hücreleridir (Aoki et al., 2001). IL-6 sitokininin hepatosit büyümesi üzerine etkisi otokrin mekanizma ile olabilir. Ayrıca IL-6'nın karaciğeri toksik hasarlardan korumada önemli rolü vardır (Debonera ve ark., 2001).

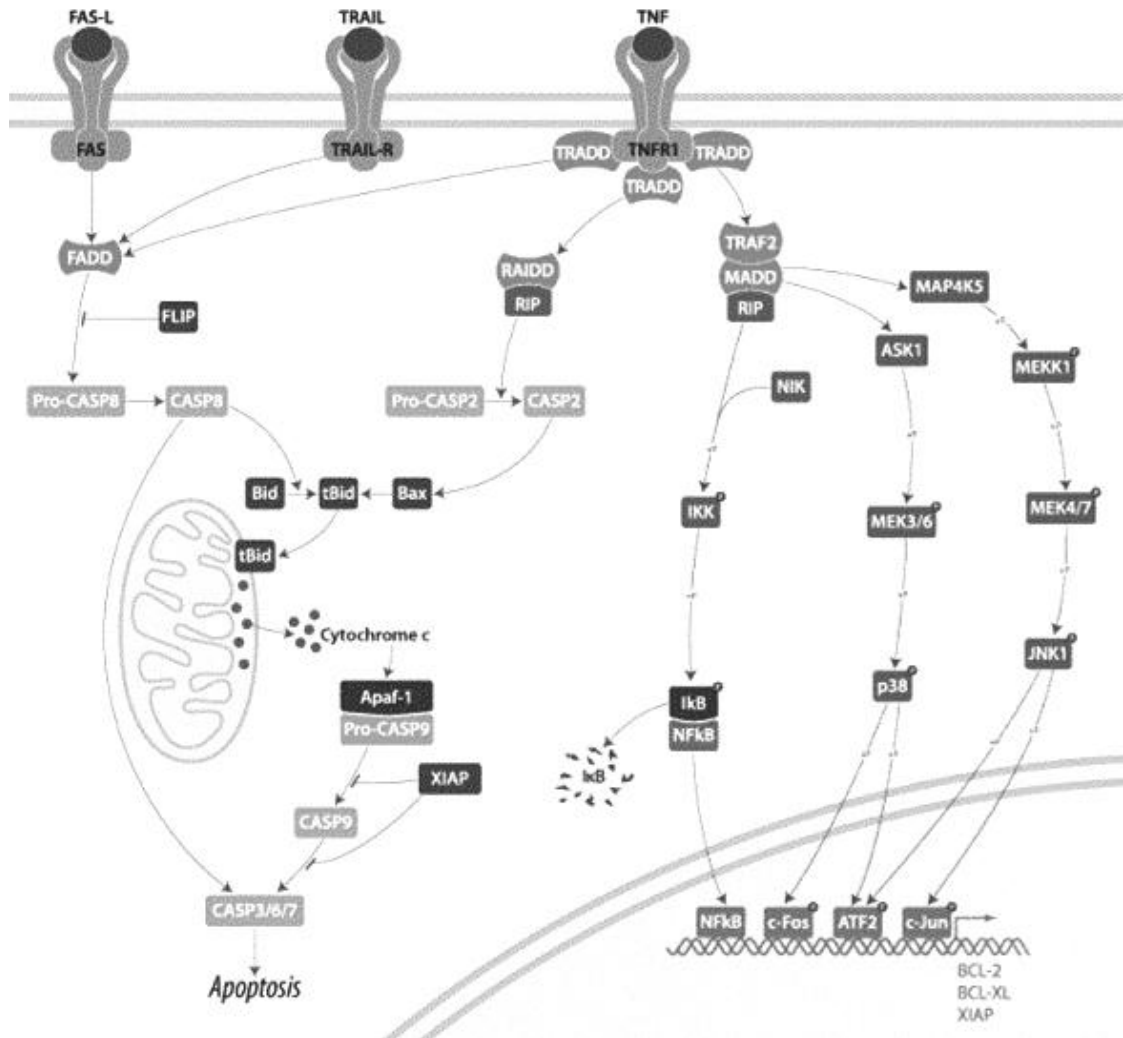
NF- κ B: Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ilk kez 1986 yılında David Baltimore tarafından B hücrelerinde tanımlanmıştır. Rejenerasyon, apoptozis, inflamasyon, hücre adezyonu, proliferasyon gibi olaylarda, genlerin regülasyonunda ve 70 den fazla genin aktivasyonunda görev alan dimerik transkripsiyon faktörüdür (Mars et al., 1995; Baeuerle, 1998; Laurent et al., 2001). Tüm hücre tiplerinde mevcuttur ve sitozolde inaktif formda bulunur. Aktive edildiğinde hızla nükleusa gider ve kaskadları aktifleştirir. Çizelge 2-3’de gösterildiği gibi 5 tipi bulunmaktadır. NF- κ B₁, NF- κ B₂, RelA (p65), RelB ve c-Rel’dir (Muriel, 2009).

Çizelge 2.3 NF- κ B ailesine ait proteinler

Sınıf	Protein	İsimleri	Gen
I	NF- κ B1	P105 $\rightarrow$ p50	NFKB1
	NF- κ B2	p100 $\rightarrow$ P52	NFKB2
II	İlişki	p65	RELA
	RelB		RELB
	c-Rel		REL

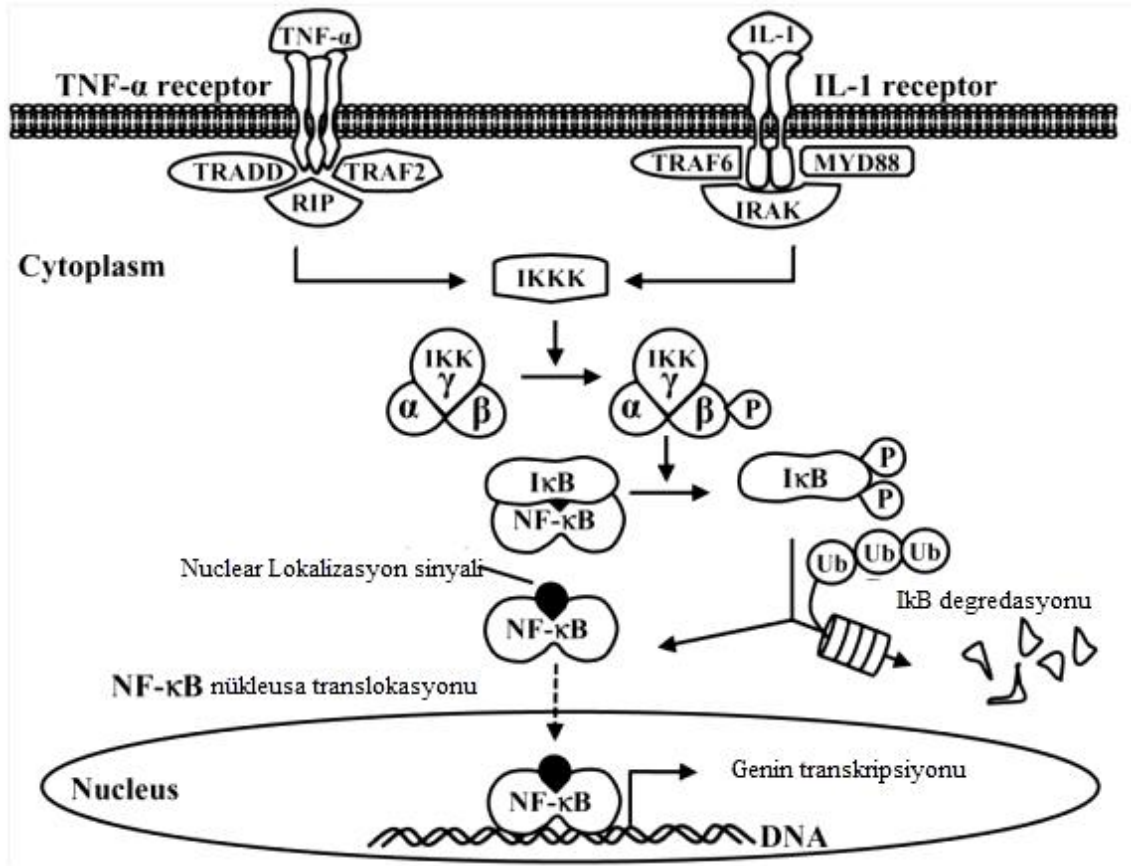
Bu proteinlerin, DNA’nın bağlanması, dimerizasyonu ve spesifik inhibitör faktörlerle (normalde stoplazmada NF- κ B ile dimerize olarak bulunan I κ B ile etkileşimi düzenleyen Rel benzeşim alanı RHD isimli) ortak yapıları vardır. Birçok uyaran I κ B kinaz (IKK) bağımlı fosforilasyon ve takibinde I κ B’nin yıkımı yoluyla NF- κ B’yi aktive eder. Serbest kalan NF- κ B dimerleri, sitokinleri kodlayan genlerin, büyüme faktörlerinin, hücre adhezyon moleküllerinin ve pro ve antiapoptotik proteinlerin

transkripsiyonunu düzenledikleri, nükleusa girerler (Şekil 2.8). Bilinen 3 ayrı IKK kompleksi vardır; birbirine çok benzeşen kinaz subüniteleri içeren IKK ve IKK β ile enzimatik olmayan düzenleyici IKK /NEMO parçasıdır.



Şekil 2.8 TNF Reseptörleri (Schwabe and Brenner, 2006; Muriel, 2009)

Karaciğer rejenerasyon uyarısı gelmeden önce hepatositlerin hemen hemen hepsi G_0 fazındadırlar. Hücre döngüsünün, uyarının gelmesinden sonra ilerleme fazından çok başlama fazının büyüme faktörlerine gereksinimi vardır. Transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, STAT₃, AP-1 (nuclear adaptor protein complex) ve sitokin düzenleyici olabileceği düşünülen enhancer binding protein (C/EBP) karaciğer rejenerasyonunun başlamasında önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.9) (Borowiak ve ark., 2004; Watanabe ve ark., 2001). Birçok hücre tipinde olduğu gibi hepatositlerde de p65-p50 alt ünitelerinden oluşmuş olan NF- κ B molekülü normalde inaktiftir. Bu durum molekülün p65 ünitesine bağlı I/B inhibitöründen kaynaklanmaktadır. SOR aracılığı ile IKK enzim kompleksi tetiklenerek I/B molekülünü katalizlemesi ve NF- κ B'den kopması sağlanır. Böylece hepatosit sitoplazmada fosforilasyondan sonra aktive kazanan NF- κ B hücre çekirdeğine göç eder. Molekülün hücre çekirdeğine geçişi engellendiğinde apoptozis başlar (Fausto, 2000). NF- κ B, sitokrom c'nin salıverilmesini, mitokondrinin permeabilitesini ve depolarizasyonunu inhibe ederek apoptozu önleyen Bcl-XL ve A1/Bfl-1 gibi, Bcl-2 ailesinden çeşitli genlerin ekspresyonunu arttırır. NF- κ B aktivasyonu apoptoz gibi programlanmış nekrozu da önler. NF- κ B'nin nukleusa transloke olup DNA'ya bağlanmasının apoptozu önlemede yeterli olmadığı görülmüştür. Bu aşamada Akt molekülü, DNA'ya bağlı NF- κ B'yi transaktive ederek transkripsiyonel aktivitesini ortaya koymasını sağlar. NF- κ B'nin aktivasyonu Ras onkogeninin indüklediği apoptozu inhibe eder. Ras ise Akt gibi NF- κ B'nin transkripsiyonel aktivite göstermesini sağlar (Richmond, 2002). NF- κ B aktivasyonunda ve kısmi olarak yıkılmasında ubiquitin-proteozom yolu görev alır (Şekil 2.9) (Yerlikaya ve Dokudur, 2009). Parsiyal hepatektomiden sonra NF- κ B, AP-1, C/EBP ve bunların hemen ardından STAT₃'ün DNA'ya bağlanmalarında artış olur. NF- κ B operasyondan 10-15 dakika sonra ölçülebilir ve 1-2 saat içerisinde normal seviyeye düşer (Fausto, 2000; Fausto and Campbell, 2003; Zimmermann, 2004; Muriel, 2009).



Şekil 2.9 NF-κB ile TNF-α'nın aktivasyonu (Muriel, 2009)

2.2.1.2 Isı şok Proteinleri (HSP)

Şaperonlar ya da ısı şok proteinleri (heat-shock proteins; Hsp) ilk kez ısı şokuna maruz kalan hücrelerde tanımlanmıştır. Normal fizyolojik koşullarda, bu proteinlerin görevi; proteinlerin çökmesini önlemek, yeni sentezlenen proteinlerin üçüncül yapılarını kazanmasını sağlamak, yanlış katlanmış ve çökmüş proteinleri birbirinden ayırmak ve doğru katlanmasını sağlamak ve ribozomdan görev alacağı yerlere taşımaktır. 1962 yılında F. Ritossa tarafından *Drosophila melanogaster* larvalarının tükrük hücrelerinde ısı şok cevabının spesifik gen aktiviteleri sonucu olduğu bildirilmiştir. Bu genlerin ilk

ürünlerine “ısı şok protein” ismi 1974 yılında verilmiştir. Sonraki çalışmalar ısı şok proteinlerinin tüm türlerde varlığını göstermiştir (Tissieres et al., 1974).

Molekül ağırlıkları 15 kDa ile 110 kDa arasında değişen ısı şok proteinleri, bütün canlılarda ve hücrelerde bulunan bir grup proteindir. Yüksek sıcaklık, soğuk ve oksijen yetersizliği gibi çeşitli çevresel stres faktörleri altında, hücrede bu proteinlerin sentezi artar. Biyolojik sistem içerisinde strese karşı hücreyi güçlendiren proteinlerdir (Henle et al., 1998; Kontaş-Akar ve ark., 2007).

Yüksek sıcaklık pH değişiklikleri oksijen eksikliği gibi stres faktörleri altında proteinlerin fonksiyonel yapılarının korunması oldukça zordur. Protein katlanmalarında açılmalar meydana gelir. Bu proteinler hücrede karşılaştığı diğer proteinlerle yapışabilir ve kümeler meydana getirir. Konformasyon bozukluğu nedeniyle proteinler fonksiyonlarını kaybeder. Isı şok proteinleri bu denatüre proteinleri tutarak toplanmalarını engeller (Kontaş-Akar ve ark., 2007).

Isı şok proteinleri kuvvetli hidrojen bağları güçlü hidrofobik etkileşimleri ve çift kutuplu heliks stabilitesinden dolayı denatüre olmazlar. Protein stabilitesinde ve denatüre olmuş proteinlerin katlanmalarında gerekir (Kontaş-Akar ve ark., 2007).

i. Isı şok proteinlerinin çeşitleri

Isı şok proteinleri molekül ağırlıkları, yapıları ve fonksiyonlarına göre 5 grupta incelenirler. Bunlar HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 ve küçük ısı şok proteinleridir (Çizelge 2.4) (Henle et al., 1998).

Çizelge 2.4 Bazı HSP'lerin yerleşim yerleri ve işlevleri

Hsp	LOKALİZASYON	İŞLEV
Hsp27	Sitoplazma	protein agregasyonunun engellenmesi, hücre büyümesi, farklılaşması
Hsp40	Sitoplazma	Hsp70'in ko-şaperonu
Hsp60	Sitoplazma, mitokondri	protein agregasyonunun engellenmesi, protein katlanması
grp78	Endoplazmik retikulum	protein taşınımı ve katlanması
Hsp70	Sitoplazma	protein agregasyonunun engellenmesi, protein katlanması
Hsp75	Mitokondri	bilinmiyor
grp94	Endoplazmik retikulum	protein kalite kontrolü
Hsp90	Sitoplazma	protein agregasyonunun engellenmesi, protein stabilizasyonu, transferi
Hsp104	Sitoplazma	proteinlerin agregatlardan serbestleştirilmesi

HSP60: HSP60, 14 alt üniteden meydana gelir. Mitokondri ve sitoplazmada bulunur. HSP70 ile birlikte proteinin doğal katlanmasına aracılık eder. Stresten korunma ve protein katlanması için gereklidir. Hatalı katlanan polipeptidlere bağlanarak doğru katlanmalarına yardım eder (Nollen et al., 1999). Mitokondrial şaperon olarak da adlandırılan bu sıcaklık şok proteininin temel görevi proteinlerin sitoplazmadan mitokondrial matrikse taşınmasını ve amino asit zincirlerinin doğru bir şekilde işlevsel formlarına katlanmasını sağlamaktır (Johnson et al., 2003). Prokaryotlardaki homoloğu olan GroES proteini üzerine yapılan çalışmalar, Hsp60'ın mitokondrial proteinlerin sentezi ve mitokondrial matrikse taşınmasında önemli bir görev üstlendiğini ortaya çıkarmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda Hsp60 proteininin apoptozisi (programlı

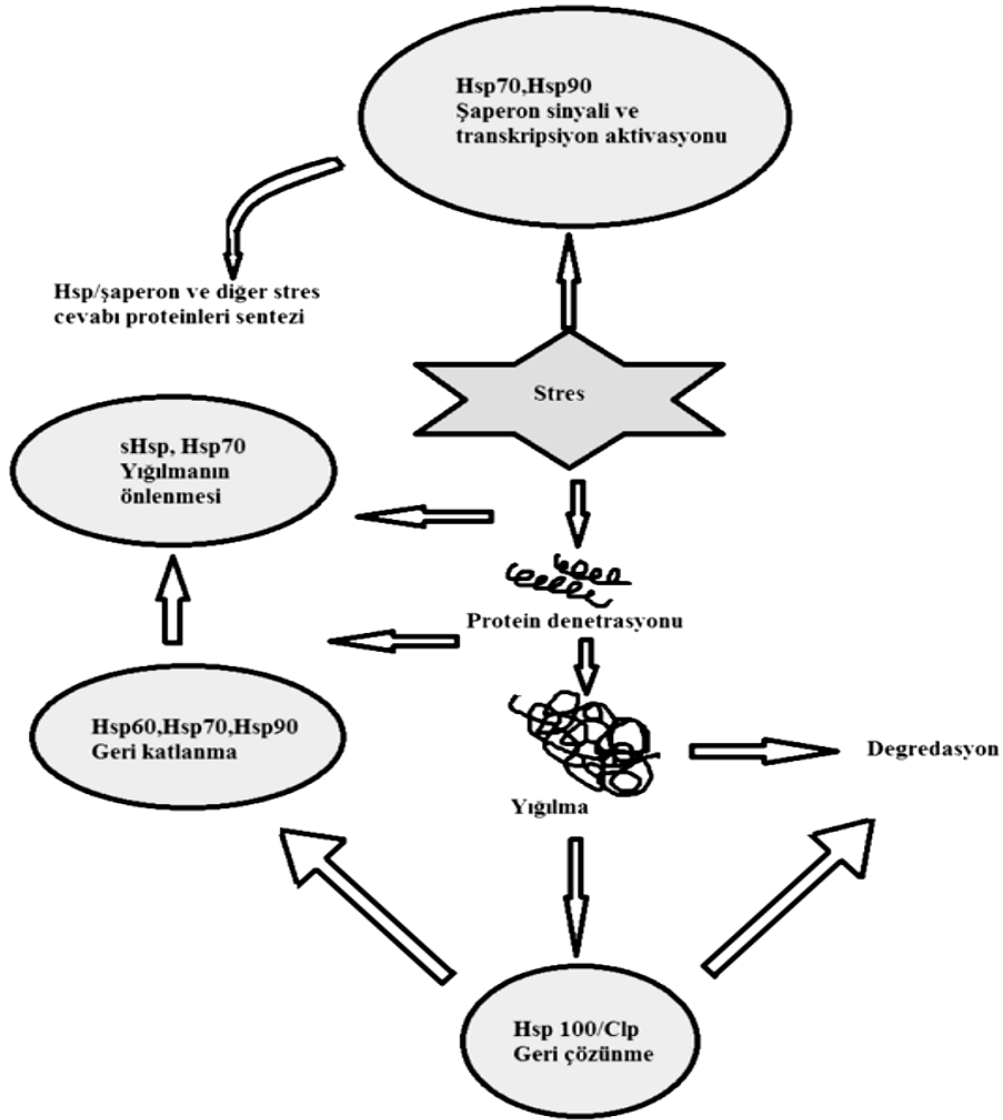
hücre ölümü) önlemede anahtar bir rol oynadığını göstermiştir. Apoptozisten sorumlu proteinler ile bir kompleks yapı oluşturarak bu proteinlerin işlevlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır (Itoh et al, 2002). Hsp60, sadece moleküler şaperon olarak değil aynı zamanda stres tepkisinde de görev almaktadır. Sıcaklık şoku yanıtı esnasında Hsp60 proteinini kodlayan genlerin transkripsiyonunda artma görülmektedir.

HSP27: Hsp27, küçük Hsp ailesindendir ve β sandviç katlanmalı yaygın α kristal bölgesi küçük birimlerin geniş kompleksleridir. Genellikle değişken N ve C uç temasları yapan dimerlerden oluşmuşlardır. Stresle bozulan protein çökeltilerinin açılması ve yeniden katlamada kullanılan ATP bağımlı şaperonlar için stabilizasyonunda çeşitli rolleri vardır (Saibil, 2008). Futbol topu görünümündedirler. sHSP monomer molekülü 15-40 kDa'luk kütleler halinde bulunur. Tüm sHSP'ler yaklaşık 100 kalıntı ve C ucunda hakim olan bir kristalin veya ısı şok hakimiyeti ile belirtilir. Sitoplazma ve çekirdekte bulunur. Isı stresi görülen hücrelerde belirgin olarak artış gösterir (Kontaş-Akar ve ark., 2007). Memeli hücrelerinde, sHSP'ler sadece strese karşı korumada değil, aynı zamanda diğer hücre fonksiyonlarının (apoptozis ve farklılaşma gibi) modülasyonunda görev aldığı bilinmektedir (Wang et al., 2004).

ii. Isı şok proteinlerinin görevleri

Isı şok proteinleri hem hücre içerisinde hem de hücre dışarısında fonksiyon gösterirler. HSP'lerin normal görevleri hücre içerisinde (proteinlerin katlanmasına yardım ederek ve proteinlerin hazırlanmasını düzenleyerek) her proteinin bağlayıcı olmasını sağlamaktadır. HSP'ler hücre içerisindeki peptidleri kuşatarak sınırlandırılmalarını sağlar. Hücre içersine peptitler HSP'ler ile alınır. Bu proteinler hücre fonksiyonları gibi fonksiyon görürler, protein sentezinde ve taşınmasında rol oynarlar. Çünkü bu proteinler benzersiz hücre fonksiyonlarına sahiptir. Stres boyunca çok sayıda enzim ve yapısal proteinde zararlı yapısal ve fonksiyonel değişim meydana gelmektedir. Bu sebeple stres altında bulunan hücrelerin hayatta kalmasında,

proteinlerin kendi fonksiyonel konformasyonlarını sürdürmek, doğal olmayan proteinlerin toplanmasını önlemek, denatüre proteinlerin yeniden yapılanması ile tekrar fonksiyonel yapılarına dönmeleri ve fonksiyonel olmayan ama zararlı olabilecek peptidlerin ortadan kaldırılması önemlidir (Şekil 2.10). Böylece, HSPs/şaperonlar hücrel korumada tamamlayıcı rol oynamak ve bazen bir arada çalışmak suretiyle proteinleri strese korumaktadır (Kontaş-Akar ve ark., 2007).

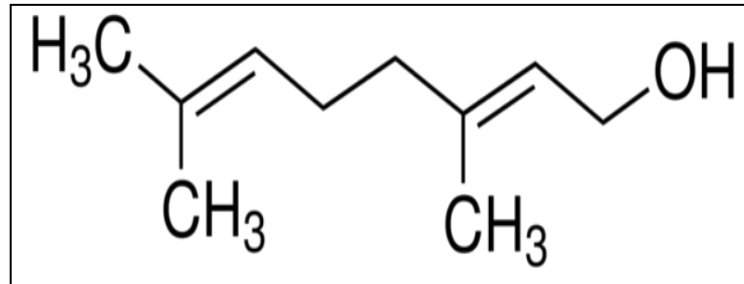


Şekil 2.10 Stres cevabında ısı şok proteinleri (HSP) ve şaperon ağı (Kontaş-Akar ve ark., 2007).

2.3 Geraniol

Geraniol, siklik monoterpenoid bir alkoldür. Kimyasal formülü $C_{10}H_{18}O$ şeklindedir (Şekil 2.11). Molekül ağırlığı 154.25 g/mol, kaynama noktası $229^{\circ}C$, erime noktası $15^{\circ}C$ ve yoğunluğu 0.889 g/cm^3 'dür. Sıçanlardaki akut oral (Gavaj) LD_{50} değeri $3,6 \text{ g/kg}$ 'dır. 27 hafta boyunca sıçanlara diyetleri ile birlikte 100 mg/kg/gün

geraniol 1000 ppm uygulandığında hiçbir kronik efekt gözlenmemiştir (Lapczynski et al., 2008). Geraniol ve nerol olmak üzere iki izomeri vardır. Geraniol gül yağının esansını teşkil eder. Birçok muhtelif esans yağlarda bulunur (Sardunya çiçeğinin yağında, limonda eterik yağında, karanfil yağında, lavantada vb). Yağımsı, uçuk sarı renkte bir sıvıdır. Suda çözünmez, organik çözücülerde çözünür. Geraniol, koku verici olarak, parfümeri, sabun, şampuan ve krem gibi kozmetik ürünlerinde ve dermatolojik kremlerin (egzama yaraları için) hammaddesi olarak ilaç sektöründe kullanılır (Banthorpe, 1972; Lapczynski et al., 2008; Chen ve Viljoen, 2010). Tedavi amaçlı ilaç olarak da değerlendirilen geraniolün ülkemizde ticareti de yapılmaktadır.



Şekil 2.11 Geraniolün açık kimyasal formülü (Lapczynski et al., 2008; Chen ve Viljoen, 2010).

Geraniol yapısında bulundurduğu hidroksil (-OH) gruplarından dolayı iyi bir antioksidandır ve SOR hasarına karşı mitokondri membranını korur. *Citrus volatile* bitkisinde yüksek oranda geraniol bulunur ve uçucu yağın serbest radikal bağlayıcı özelliğini sergilerler (Choi ve ark., 2000). Son yapılan bir araştırmada da geraniolün genotoksik maddelere karşı insan sağlığını koruyabileceğini bildirilmiştir (Wiseman ve

ark., 2007). Ayrıca FDA tarafından güvenli olarak kabul edilmiştir (Lapczynski ve ark., 2008).

Lapczynski ve ark. yaptıkları bir çalışmada, sıçanlara 20 gün süreyle ve gavaj yoluyla 800 mg/kg olacak şekilde geraniol verildiğinde sıçanların idrarlarında geranik asid, 3-hydroxy-citronellic asid, 8-hidroksigeraniol, 8-karboksi-geraniol ve dikarbonik asid metabolizma ürünü olarak tespit etmişlerdir (Lapczynski et al., 2008).

Yapılan çalışmalarda geraniolün farmakolojik özellikleri gösterilmiştir. Geraniol 5-fluorourasil, diklofenak sodyum ve gümüş sulphadiazine cilt penetrasyonu artırmak için doğal artırıcı olarak kullanılmaktadır. Geraniol kemopreventif ilaçların yeni bir sınıfını oluşturmuştur. Çok düşük toksisiteye sahip olan geraniolün aynı zamanda antimikrobiyal, antioksidan ve anti-enflamatuar etkileride söz konusudur (Lapczynski et al., 2008). Geraniol, kültür hücreleri ve PC-3, prostat kanser hücrelerini kullanarak tümör aşılınmış farelere hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi uyardığı bulunmuştur (Kim et al., 2011).

3. MATERYAL ve METOD

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Laboratuvarlarında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi etik kurulunun 269/2012 sayılı onayı ile yapılmıştır.

3.1 Deney Hayvanları

Deneyisel çalışmamızda sağlıklı, erkek, 230 ± 30 gram ağırlıkta, 3 aylık, Wistar albino cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Tüm deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarından temin edilerek deney süresince 12/12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısı (22 ± 2 °C) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmışlardır. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta süre ile ortam koşullarına adaptasyonu sağlanmıştır (Ebrenfried et al., 1997; Fruta et al., 2000; Watanabe ve ark., 2001).

3.2 Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları

Deneyisel çalışmalarımızda, ticari olarak sağlanan ve %99 saflıktaki geraniol kullanıldı. Geraniol, 1 Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Karaciğeri koruyucu ve onarıcı özelliğinden dolayı çalışmamızda pozitif rejenerasyon kontrolü olarak silymarin kullanılmıştır. Silymarin, parsiyal hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonu sırasında DNA ve protein sentezini uyararak rejenerasyon oranını arttırdığı bilinmektedir (Luper, 1998; Lapczynski et al., 2008;).

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

3.3 Deney Grupları

Grup I: Sham 24 saat grubu (n=6): Her hayvanın batin kısmı açılmıştır fakat hepatektomi işlemi yapılmadan kapatılmıştır. RT-PCR yöntemi ile NF- κ B, TNF- α ve IL-6 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. NF- κ B, TNF- α , IL-6, HSP27 ve HSP60 protein miktarlarına Western blot tekniği kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca histolojik incelemeleri yapılmıştır.

Grup II: Sham 48 saat grubu (n=6): Her hayvanın batin kısmı açılmıştır fakat hepatektomi işlemi yapılmadan kapatılmıştır. RT-PCR yöntemi ile NF- κ B, TNF- α ve IL-6 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. NF- κ B, TNF- α , IL-6, HSP27 ve HSP60 protein miktarlarına Western blot tekniği kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca histolojik incelemeleri yapılmıştır.

Grup III: PH + SF 24 saat grubu (n=6): Her hayvana tek doz SF enjeksiyonu intra peritoneal olarak yapılmıştır. 24 saat sonra laparotomi yapıp RT-PCR yöntemi ile NF- κ B, TNF- α ve IL-6 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. NF- κ B, TNF- α , IL-6, HSP27 ve HSP60 protein miktarlarına Western blot tekniği kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca histolojik incelemeleri yapılmıştır.

Grup IV: PH + SF 48 saat grubu (n=6): Her hayvana tek doz SF enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapılmıştır. 48 saat sonra laparotomi yapıp RT-PCR yöntemi ile

NF- κ B, TNF- α ve IL-6 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. NF- κ B, TNF- α IL-6, HSP27 ve HSP60 protein miktarlarına Western blot tekniği kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca histolojik incelemeleri yapılmıştır.

Grup V: Silymarin + PH 24 saat grubu (n=6): Her hayvana tek doz (100 mg.kg⁻¹) Silymarin enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapılmıştır. 24 saat sonra laparotomi yapıp RT-PCR yöntemi ile NF- κ B, TNF- α ve IL-6 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. NF- κ B, TNF- α , IL-6, HSP27 ve HSP60 protein miktarlarına Western blot tekniği kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca histolojik incelemeleri yapılmıştır.

Grup VI: Silymarin + PH 48 saat grubu (n=6): Her hayvana tek doz (100 mg.kg⁻¹) Silymarin enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapılmıştır. 48 saat sonra laparotomi yapıp RT-PCR yöntemi ile NF- κ B, TNF- α ve IL-6 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. NF- κ B, TNF- α , IL-6, HSP27 ve HSP60 protein miktarlarına Western blot tekniği kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca histolojik incelemeleri yapılmıştır.

Grup VII: Geraniol + PH 24 saat grubu (n=6): Her hayvana tek doz geraniol (100 mg.kg⁻¹) enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapılmıştır. 24 saat sonra laparotomi yapıp RT-PCR yöntemi ile NF- κ B, TNF- α ve IL-6 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. NF- κ B, TNF- α , IL-6, HSP27 ve HSP60 protein miktarlarına Western blot tekniği kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca histolojik incelemeleri yapılmıştır.

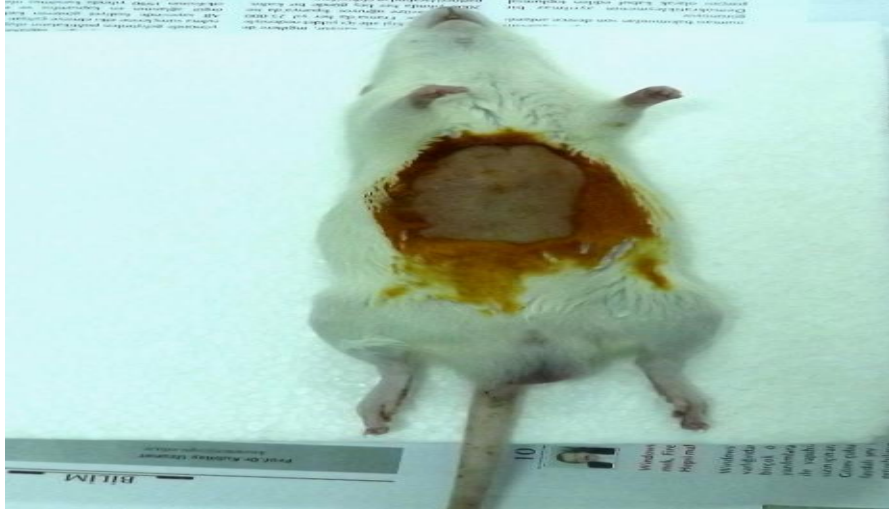
Grup VIII: Geraniol + PH 48 saat grubu (n=6): Her hayvana tek doz geraniol (100 mg.kg⁻¹) enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapılmıştır. 48 saat sonra laparotomi yapıp RT-PCR yöntemi ile NF- κ B, TNF- α ve IL-6 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. NF- κ B, TNF- α , IL-6, HSP27 ve HSP60 protein miktarlarına Western blot tekniği kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca histolojik incelemeleri yapılmıştır.

3.4 Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar

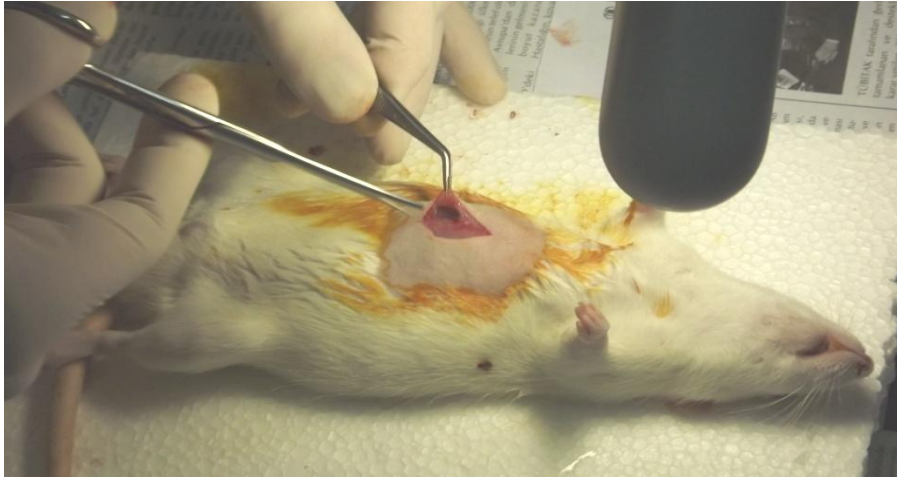
Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diurnal hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkileri dikkate alınarak tüm cerrahi işlemler 09.00 ile 12.00 saatleri arasında yapılmıştır. Deney gruplarına ait hayvanlara intramuskular olarak 10 mg.kg⁻¹ ksilazin ve 70 mg.kg⁻¹ ketamin anestezisi uygulanmıştır (Luper, 1998; Lapczynski et al., 2008; Chen ve Viljoen, 2010).

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

Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verilmiştir (Kaya et al., 2002; Waynforth and Flecknell, 1994). Sonra, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kapatılmış ve poviiodeks antiseptik solusyon ile laparotomi bölgesi temizlenmiştir. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın 24-48 saat boyunca yaşatılmıştır (Watanabe ve ark., 2001)



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



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



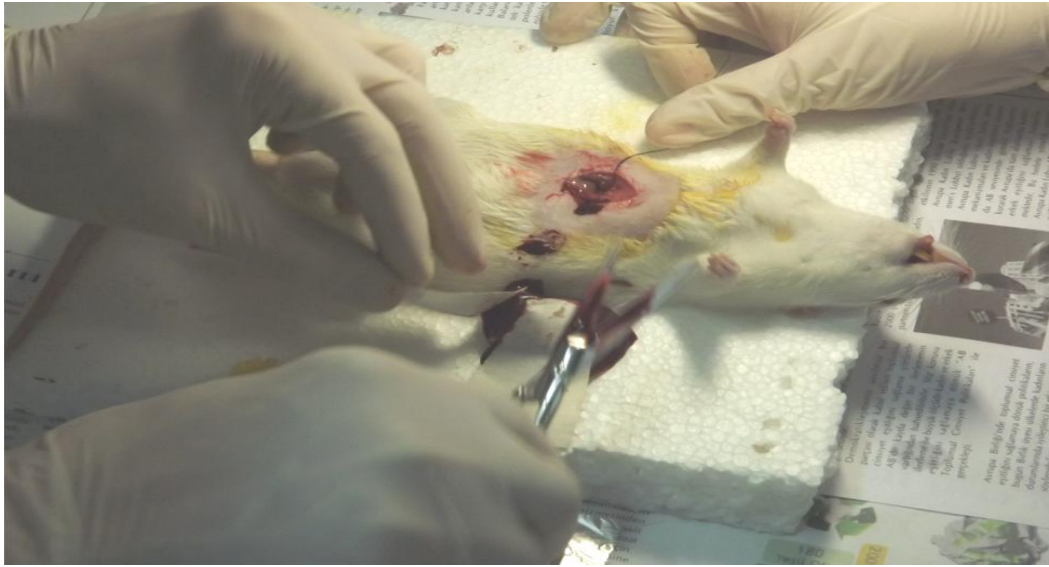
Şekil 3.3 Karaciğer loplarını birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin sağ orta ve sol yan lopların ayrılması-1



Şekil 3.4 Karaciğer loplarını birbirine bağlayan zarlar ayrılarak sağ orta ve sol yan lopların ayrılması-2



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



Şekil 3.6 Bağın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilmesi

3.5 Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Karaciğer rejenerasyon oranlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere tüm hayvanların, ilk laparotominin yapıldığı 0. saatte ve ikinci laparotominin yapılp hayvanların öldürüldükleri 24 ve 48. saatlerde vücut ağırlıkları tespit edilmiştir (Tang et al., 1997). Deney gruplarına ait hayvanlar hafif eter anestezisi altında, intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürülmüşlerdir. Daha sonra da karaciğerler hızlı bir şekilde çıkarılmıştır.

3.5.1 Karaciğer Dokusu

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

3.5.2 Karaciğer Rejenerasyon Oranı

Karaciğerlerin her birinin yaş ağırlıkları ve bunların %68 ve %32 oranındaki miktarları, Child'in (1953) formülüne yerleştirilerek regenerasyon oranı tespitinde kullanılmıştır (Tang et al., 1997).

$$\text{Rejenerasyon Oranı} = \frac{\text{Otopsi sırasındaki k.c ağırlığı} - \text{Hepatektomiden sonra kalan tahmini k.c ağırlığı}}{\text{Hepatektomi sırasında alınan k.c ağırlığı}}$$

3.5.3 Karaciğer Doku Takibi ve Histolojik İncelemeler

Tüm gruplarda intrakardiyak kanın alınmasından hemen sonra her bir hayvana ait karaciğer çıkarılıp serum fizyolojik ile hızlı bir şekilde yıkanmıştır ve karaciğer dokusu histolojik analizler için %10'luk nötral formaldehit fiksasyon sıvısına alınmıştır (Karabelyos et al., 1999). Tüm gruplarda kimyasal fiksasyonu tamamlanan karaciğer dokularına histolojik takip işlemleri uygulanmış, parafin blokları hazırlanmıştır. Etil alkol serisinde sırasıyla 1'er saat %70, %80, %90(1), %90(2), %96(1), %96(2) ve 30 dakika absolüt etil alkolden geçirilerek dehidratasyon sağlanmıştır. 30'ar dakika 2 kez ksilol uygulamasıyla dokuların şeffaflanması sağlanmış, dokular parafinizasyon için 57°C etüvdeki 3 ayrı parafinde (paraplast plus Sigma P3683) sırasıyla 30, 60, 60 dakika sürelerle bekletilerek bloklanmıştır. Bu bloklardan standart H&E boyama uygulaması yapılmak üzere mikrotom (Leica RM 2025) kullanılarak 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak Poly-L-Lysine kaplı lamalar üzerine tespit edilmiştir. Kesitler 57°C etüvde 1 saat bekletilmiş sonra ksilolde deparafinize edilmiştir. Derecesi azalan etil alkol serilerinde hidratasyonu sağlanmış H&E boyamaları yapılmıştır. H&E ile boyanmış karaciğer preparatları ışık mikroskop düzeyde histopatolojik olarak incelenmiştir.

3.5.4 Real-Time PCR analizi

Bu teknikte, NF-κB, TNF-α ve IL-6 kodlayan gen bölgesinin gen ekspresyonları ölçülmüştür.

RT-PCR Yönteminin Prensibi

Bu yöntemin uygulaması RNA izolasyonu ve izole edilen RNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi için cDNA'ya çevrilmesi şeklindedir. RT-PCR yönteminde kalıp olarak kullanılan RNA, revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA'ya çevrilir. Oluşan komplementer cDNA'nın RT-PCR yardımıyla eş zamanlı olarak ölçülmesini kapsar.

Kullanılan Malzemeler

1. Pure link RNA mini kit Ambion Life technologies cat.no. 12183-018A
2. Hight capacity cDNA reverse transcription kits for 200 reaktion cat.no:4368813
3. TaqMan Gene expression master mix cat.no: 4371134
4. DNase-RNase free su

Uygulama Basamakları

Karaciğer Dokusundan RNA İzolasyonu

Life science Pure link RNA mini kit protokolü kullanılarak, dokudan RNA izolasyon işlemi, karaciğerin homejenizasyonu ve RNA eldesi olmak üzere 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar basamaklar halinde aşağıda verilmiştir.

A- Karaciğerin homojenizasyonu

1. Yaklaşık 0,3 gr ağırlığındaki karaciğer dokusu RNA free tüplere konulmuştur.
2. Üzerine koyduğumuz karaciğerin ağırlığının 2 katı kadar trizol ve buffer lizis tamponu eklenmiştir.
3. Homojenizasyon işlemi için her bir örnek başına RNA free 0,6 gr bead (ZROB05) kullanılmıştır.
4. Tüm örnekler Bullet Blender marka homojenizasyon aletinde +4°C'de 5 dk 2000 x g de homojenize edilmiştir.
5. Elde edilen süpernatant RNA free tüplere aktarılmıştır.

B- RNA izolasyonu

1. Elde edilen süpernatantın üzerine eşit hacimde %70'lik alkol eklenmiştir.
2. Karışım vortexlenmiştir.
3. Karışımdan 700 µl alınıp koleksiyon tüplü spin kartuşlarına aktarılmıştır.
4. Oda ısısında 15 dk 12.000 x g de santrifüj edilmiştir.
5. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Bu sayede örneğin koleksiyon tüpüne geçmesi sağlanmıştır.
6. Spin kartuşa 700 µl yıkama solüsyonu I'den eklenmiştir.
7. Oda ısısında 15 dk 12.000 x g de santrifüj edilmiştir. Spin kartuştan koleksiyon tüpü atılarak yeni koleksiyon tüpü takılmıştır.
8. 500 µl etanollü yıkama solüsyonu II'den eklenmiştir.
9. Örnekler oda sıcaklığında 15 dk 12.000 x g de santrifüj edilmiştir. Spin kartuştan koleksiyon tüpü atılarak yeni koleksiyon tüpü takılmıştır.
10. 8-9 basamaklar tekrarlanmıştır.
11. Oda ısısında 1-2 dk 12.000 x g de santrifüj edilmiştir. RNA'nın spin kartuştaki membrana bağlanması gerçekleştirilmiştir. Spin kartuştan koleksiyon tüpü çıkartılarak toplama tüpü takılmıştır.
12. Spin kartuşun merkezine olacak şekilde 30-100 RNase free su eklenmiştir.
13. Örnekler oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakılmıştır.

14. Spin kartuş oda ısısında 2 dk 12.000 x g de santrifüj edilmiştir. Bu şekilde RNA'nın saf bir şekilde toplama tüplerine geçmesi sağlanmıştır.

İzole edilen RNA örnekleri Quibit florometer cihazıyla ölçülmüş RNA konsantrasyonları belirlenmiştir.

İzole edilen RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi

Life science Hight capacity cDNA reverse transcription kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü uygulanmıştır. Üretici firmanın protokolü 3 aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşama 2X RT master mix'in hazırlanması, ikinci aşama RNA ekleyerek revers transkriptaz cDNA'ya çevrilme aşaması, son aşama ise reverse transkripsiyonun PCR ile gerçekleştirilmesi şeklindedir. Protokol Çizelge 3.1'de basamaklar halinde verilmiştir.

Çizelge 3.1 Her bir kuyucuk için 2X RT master mix hazırlanması

Kit Bileşenleri	Hacim (µl)
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primer	2,0
Reverse transcriptase	1,0
RNase inhibitörü	1,0
Nükleaz free su	3,2
Toplam hacim	10,0

2X RT master mix Çizelge 3.1’de görüldüğü gibi hazırlandıktan sonra her bir kuyucukta 10 µl olacak şekilde 96’lık well plate dağıtılmıştır. 8 deney grubumuza ait RNA örneklerinden 10 µl alınarak her biri için ayrı bir kuyucuk olmak üzere eklenmiştir. Toplamda her bir kuyucuğun hacmi 20 µl olmuştur. cDNA’ya çevirme işlemi termal cycle kullanılarak Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 Termal Cycle protokolü

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

Her bir deney grubu için n=6 olacak şekilde elde edilen cDNA’lar gen ekspresyon analizi için mikro litrede 200 ng eşitlenerek kullanılmıştır. Bundan sonraki aşamada RT-PCR geçilmiştir. Gen ekspresyon master mix ve RT-PCR reaksiyonunun protokolü Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 RT-PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

Kit'in Bileşenleri	Plate reaksiyonu için kuyucuk başına konulan miktar (µl)
TaqMan gene expression master mix (2X)	10,0
TaqMan gene expression assay (20X)	1,0
cDNA + H ₂ O	9,0
Toplam hacim	20,0

Çizelge 3.4 PCR reaksiyonu

Basamaklar	Sıcakalık (°C)	Süre	Döngü
İnkübasyon	50	2 dk	1
TaqMan Enzim aktivasyonu	95	10 dk	1
Denaturasyon	95	15 sn	40
Annealing aşaması	60	1 dk	40

Sonuçların analizi ABI Step One Plus marka RT-PCR ve üretici firmanın yazılım programıyla gerçekleştirilmiştir.

3.5.5 Western Blot Analizi

Membrana transfer edilen proteinlerin uygun antikorlarla inkübe edilerek immunolojik yoldan belirlenmesine Western blotting ya da kısaca immunoblotting denir (Temizkan ve ark., 2008; Wilson and Walker, 2000).

Uygulama Basamakları

A. Doku Ekstraktı Hazırlanması ve Protein İzolasyonu:

Alınan dokulara örnek tamponu eklenmiştir (50 mM TrisHCl, pH 7.9, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 µg/mL Aprotinin, 5 µg/mL Leupeptin, 5 µg/mL Pepstatin A) doku ekstraktları hazırlanmış ve homojenizatörde homojenize edilmiştir. Üstteki süpernatant alınıp temiz bir tüpe aktarılmıştır.

B. Protein Ölçümü

Elde edilen homojenattan The Qubit 2.0 Fluorometer quantitates cihazı ile total protein miktarı ölçülmüştür.

C. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

1. Seçilen konsantrasyondaki ayrıştırma ve yığma jeller için monomer karışımı, aşağıdaki Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5 Ayırıcı jel monomer konsantrasyonu

Stok Solüsyon	%12	%15
dH₂O	3.15 ml	2.4 ml
1M Tris-HCl pH 8.8	3.75 ml	3.75 ml
%40 Akrilamid	3.00 ml	3.75 ml
%10 SDS	100 µl	100 µl
%10 Amonyum persülfat	100 µl	100 µl
TEMED	6 µl	6 µl

2. Jel yüzeyi izopropanol ile kaplanmıştır.

3. 45-60 dakika polimerize olması için beklenmiştir.

Çizelge 3.6 Paketleyici jelin hazırlanışı

Kullanılan Solüsyonlar	Miktar
dH₂O	2.329 ml
1M Tris-HCl pH 6.8	375 µl
%40 Akrilamid	281 µl
%10 SDS	30 µl
%10 Amonyum persülfat	30 µl
TEMED	5 µl

5. Paketleyici jel için monomer karışımı Çizelge 3.6 izlenerek hazırlanmıştır.
6. Jel tarakları dikkatli bir biçimde polimerize olmamış karışım içine yerleştirilmiştir.
7. Polimerizasyonun tamamlanması için 45-60 dakika beklenmiştir.

D. Protein Örneklerinin Hazırlanması

1. Protein örnekleri 45 μ L'de yaklaşık 40 μ g olacak biçimde 6X yükleme tamponu ile karıştırılmıştır ve ,
2. 95 °C'de 5 dakika bekletilerek denature olmaları sağlanmıştır.

E. Elektroforetik Yürütme

1. Örnek yüklendikten hemen sonra sistem kapatılmış ve elektrotlar bağlanmıştır.
2. Örnekler ayrıştırma jele girinceye kadar düşük akımda 100 Volt gerilim uygulanmıştır.
3. Örnek ayrıştırma jele geçtikten sonra ise gerilim 150 Volt'a çıkarılmıştır.
4. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna varınca akım kesilmiş ve jel tanktan çıkarılmıştır.

F. Membrana transfer aşaması

Elektroforez bittikten sonra separating jel (ayrıştırma jeli) cam plaklar arasından çıkarılarak Western blot için 15 dk transfer solüsyonuna (25 mM tris base, 192 mM glisin, %7 metanol ve %0.07 SDS) konulmuştur. Western blot için Amersham

firmasının protokolü takip edilmiştir. Jeldeki proteinler metanol ile aktive edilen PVDF membrana 70V'da 2 saat transfer edildikten sonra membran metanol ile yıkanmıştır ve filtre kağıdı üzerinde kuruması için bekletilmiştir (proteinlerin membrana daha güçlü bağlanması için). Kurutma işleminden sonra membran tekrar metanol ile aktive edilmiş ve %5 blocking solüsyonu ile bir gece 4°C'de veya 1 saat oda ısısında bloke edilmiştir. Üç defa TBS-T (8 g/L NaCl, 20 mM tris HCl pH 7.6 ve %0.1 Tween 20) ile yıkandıktan sonra primer antikorla (TBS-T ile firmanın önerdiği oranda seyreltildi) 1 saat oda ısısında shaker'da inkübe edilmiştir. Membran tekrar üç defa yıkandıktan sonra anti-rabbit veya anti-mouse HRP (horse radish peroxidase) konjuge sekonder antikor ile (1:5,000 seyreltildi) 1 saat inkübe edilmiştir. Üç defa TBS-T ile yıkandıktan sonra membran HRP substratı ile 2 dk inkübe edilmiş ve membran plastik streç ile sarıldıktan sonra karanlık odada üzerine Bio-Max X-ray film konulmuştur. Film, iki mukavva kağıdı arasında membran üzerinde 1 veya 2 dk bekletildikten sonra 40 cm x 25 cm x 15 cm ebatlarında ve üç bölmeden oluşan (her biri 5 cm genişliğinde) paslanmaz çelikten yapılan bir tank içinde manüel olarak banyo edilmiştir. Developing solüsyonunda 5 dk, dH₂O'da 1 dk ve son olarak fixer solüsyonunda 5 dk bekletilerek film banyo edilmiştir.

Western Blotlama İşleminde Kullanılan Çözeltiler ve Antikorlar

Jel Elektroforez Tamponu (1000 ml)

14,4 gr glisin, 3 gr Tris baz ve 2 gr SDS distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak çözündürülmüştür. Tampon +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Jelden Membrana Proteinleri Aktarım Tamponu (1000 ml)

6 gr Tris baz, 28,8gr glisin ve 200 ml metanol distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanarak çözündürülmesi ile hazırlanmıştır.

Jel Boyama Çözeltisi (100 ml)

25 ml etanol, 10 ml asetik asit ve 0,115gr Coomasie parlak mavisi distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Çözelti oda ısısında muhafaza edilmiştir.

Jelden Boya Çıkartıcı Çözelti (100 ml)

10 ml etanol ve 10 ml asetik asit distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Her Western blot işleminde yeni çözelti hazırlanmıştır.

TBS (Tris-tuz) Çözeltisi (500 ml)

0,7882 gr Tris-HCl ve 4,383 gr sodyum klorür distile su ile 400 ml'ye tamamlanarak çözündürülmüştür. Çözelti, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH 8'e ayarlanmış ve distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

TBST (Tris-tuz-tween 20) Çözeltisi (300 ml)

TBST, 300 ml TBS çözeltisine 150 µl tween 20 eklenerek hazırlanmıştır. Her Western blot işleminde yeni çözelti hazırlanmıştır.

Blocking Solüsyonu (30 ml)

1,5 gr yagsız süt tozu, 30 ml TBST çözeltisi içinde çözündürülmesi ile hazırlanmıştır.

PBS (Fosfat-tuz tamponu)

1 PBS tableti 100 ml distile su içinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

Kullanılan Antikorlar

NF-κB: Imgenex, catalog no: IMG-150B

IL-6: Life Span Biosciences, catalog no: LS-C104764/35737

TNF-α: Life Span Biosciences, catalog no: LS-C104754/35736

HSP27: Cell Signaling, catalog no: 2401

HSP60: Cell Signaling, catalog no: 12165

Firmalarından temin edilmiştir.

Antikor Çözeltileri

Hazır liyofilize şekilde alınan antikorlar üretici firma tarafından belirtilen miktarda ve oranda steril distile su içinde çözündürülmüş ve -20°C’de muhafaza edilmiştir.

İmmünolojik Saptama için Kullanılan Çözelti

6 mg diaminobenzidin, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH’sı 7.2’ye ayarlanmış olan 10 ml PBS içinde çözündürülmüştür. Daha sonra 10 µl %30’luk hidrojen peroksit eklenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Her western blot işleminde yeni çözelti hazırlanmıştır.

3.6 İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 17.0 for windows” versiyonu bilgisayar paket programı kullanılmıştır. NF-κB, IL-6, TNF-α gen ekspresyon analizleri ve kütle endeksinin gruplar arasındaki farklılık durumları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, gruplar arası karşılaştırmalarda ise Tukey Testi kullanılmıştır. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (P) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, $P < 0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir

4. BULGULAR

4.1 Real-Time PCR analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Tüm deney gruplarına ait $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ değerleri gruplar arasında karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

4.1.1 NF- κ B₁ Gen Ekspresyonu

Çalışmamızda parsiyel hepatektomi sonrasında değişim gösteren, NF- κ B₁ gen ekspresyonu açısından grup I ve grup II'ye göre yapılan karşılaştırma Çizelge 4.1'de ve şekil-4.1'de görüldüğü üzere ilk 24. saatte NF- κ B₁ gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiş olup 48. saatte ise 24 azalma gözlemlendi. İstatistiksel olarak ($P < 0.05$) anlamlı fark bulundu.

24. saat parsiyal hepatektomi grupları olan grup III, grup V ve grup VII, sham kontrol grubu olan grup I'e göre gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında grup V'de NF- κ B₁ gen ekspresyonunun en yüksek olduğu ve sırasıyla grup VII ve grup III'ün geldiği gözlemlendi. Grup III'e göre grup V ve grup VII'de istatistiksel olarak ($P < 0,05$) anlamlı artış gözlemlendi. Grup VII'nin gen ekspresyonunun grup V'e yakın olduğu tesbit edildi.

48. saat parsiyal hepatektomi grupları arasında ki NF- κ B₁ gen ekspresyon seviyeleri grup II'ye göre karşılaştırıldığında, Çizelge 4.1'de ve şekil-4.1'de görüldüğü gibi en fazla grup VI'da gen ekspresyon seviyesinde artış gözlemlendi ve bunu sırasıyla grup VIII ve grup IV'ün izlediği gözlemlendi. Grup IV'e göre grup VI ve grup VIII'de

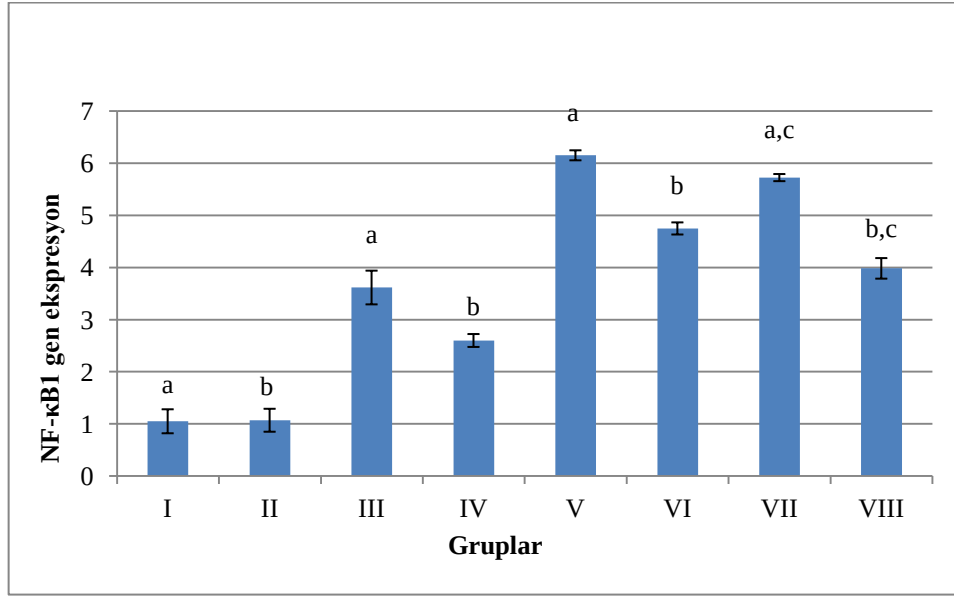
istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. Grup VIII'in gen ekspresyonunun grup VI'ya yakın olduğu tesbit edildi.

Grup VII ile grup VIII arasında zamana göre anlamlı fark görüldü ($P < 0.05$).

Çizelge 4.1 Deney gruplarına ait NF- κ B1 gen ekspresyonu değerleri $\pm$ standart hataları n=6.

GRUP	GEN EKSPRESYONU
1	1,05 $\pm$ 0,23 ^a
2	1,07 $\pm$ 0,22 ^b
3	3,61 $\pm$ 0,32 ^a
4	2,60 $\pm$ 0,12 ^b
5	6,15 $\pm$ 0,09 ^a
6	4,74 $\pm$ 0,11 ^b
7	5,72 $\pm$ 0,06 ^{a,c}
8	3,98 $\pm$ 0,19 ^{b,c}

P < 0.05 (a) ve (b) gruplara, (c) zamana göre anlamlı farklıdır.



Şekil 4.1 NF-κB₁ gen ekspresyon ifadesi (a) ve (b) gruplara, (c) zamana göre anlamlı farklıdır. n=6 (P < 0.05)

4.1.2 IL-6 Gen Ekspresyonu

Parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer dokusunda oluşan yanıt IL-6 gen ekspresyonu düzeyinde incelendi. Grup III, grup IV, grup V, grup VI, grup VII ve grup VIII, grup I ve grup II'ye göre karşılaştırıldığında, Çizelge 4.2'de ve şekil 4.2'de görüldüğü üzere ilk 24. saatte IL-6 gen ekspresyonunda yüksek bir artış gözlenmiş olup 48. saatte ise IL-6 gen ekspresyonunda azalma gözlemlendi. İstatistiksel olarak ($P < 0.05$) anlamlı fark bulundu.

24. saat parsiyal hepatektomi grupları olan grup III, grup V ve grup VII, sham kontrol grubu olan grup I'e göre gen ekspresyon seviyeleri bakımından karşılaştırıldığında grup V'de IL-6 gen ekspresyonunun en yüksek olduğu ve sırasıyla grup VII ve grup III'ün geldiği gözlemlendi. Grup III'e göre grup V ve grup VII'de istatistiksel olarak ($P < 0.05$) anlamlı artış gözlemlendi. Grup VII'nin gen ekspresyonunun grup V'e yakın olduğu tesbit edildi.

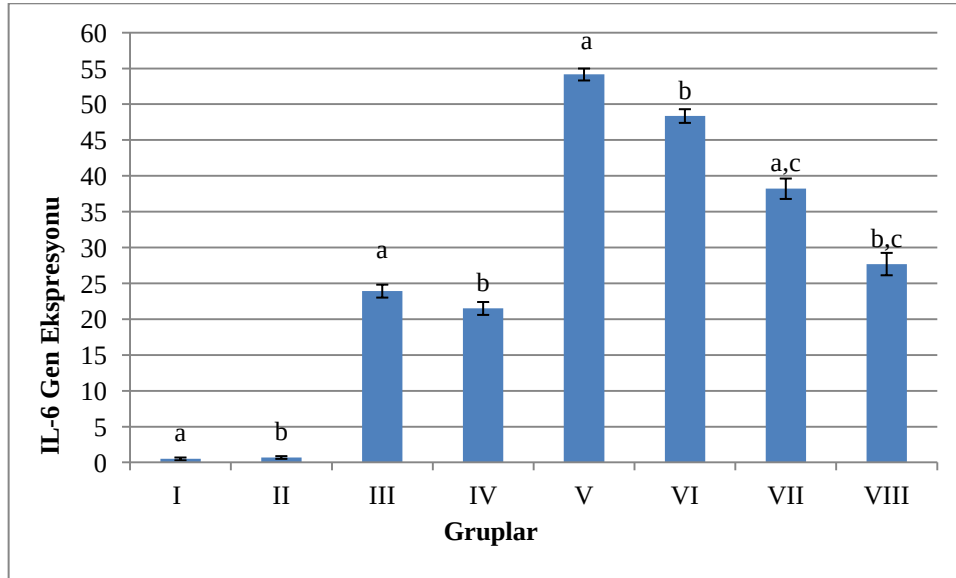
48. saat parsiyal hepatektomi grupları arasında ki IL-6 gen ekspresyon seviyeleri, grup II'ye göre karşılaştırıldığında, Çizelge 4.2'de ve şekil-4.2'de görüldüğü gibi en fazla grup VI'da gen ekspresyonu seviyesinde artış gözlemlendi. Bunu sırasıyla grup VIII ve grup IV'ün izlediği gözlemlendi. Grup IV'e göre grup VI ve grup VIII'de istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. Grup VIII'in gen ekspresyonunun grup VI'ya yakın olduğu tesbit edildi.

Grup VII ile grup VIII arasında zamana göre anlamlı fark görüldü ($P < 0.05$).

Çizelge 4.2 IL-6 gen ekspresyonu Bulgular ortalama $\pm$ standart hataları şeklinde verildi. n=6

GRUP	GEN EKSPRESYONU
1	0,50 $\pm$ 0,2 ^a
2	0,70 $\pm$ 0,19 ^b
3	23,92 $\pm$ 0,90 ^a
4	21,50 $\pm$ 0,90 ^b
5	54,15 $\pm$ 0,83 ^a
6	48,35 $\pm$ 0,95 ^b
7	38,21 $\pm$ 1,42 ^{a,c}
8	27,69 $\pm$ 1,56 ^{b,c}

P<0.05 (a) ve (b) gruplara (c) zamana göre anlamlı farklıdır.



Şekil 4.2 IL-6 gen ekspresyon ifadesi. (a) ve (b) gruplara (c) zamana göre anlamlı farklıdır. n= 6 (P < 0.05)

4.1.3 TNF- α Gen Ekspresyonu

Parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer dokusunda oluşan yanıt, TNF- α gen ekspresyonu düzeyinde incelendiğinde Çizelge 4.3’de ve Şekil-4.3’de görüldüğü gibi grup III, grup IV, grup V, grup VI, grup VII ve grup VIII, grup I ve grup II’ye göre karşılaştırıldığında, grup III ve grup IV hariç tüm gruplarda gen ekspresyonu artmıştır.

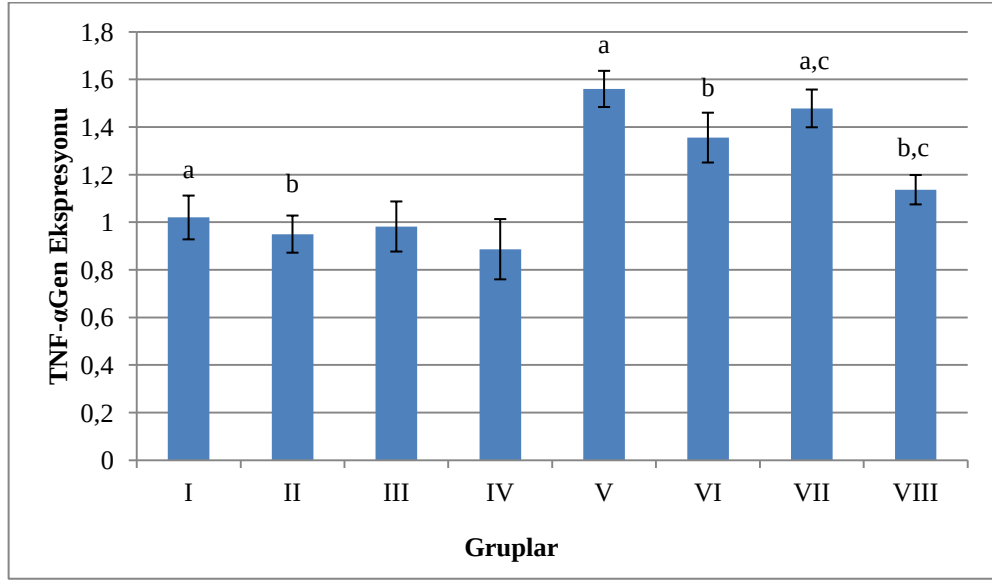
24. saat parsiyal hepatektomi grupları olan grup III’de gen ekspresyonu seviyesinde azalma gözlemlendi. Grup V ve grup VII sham kontrol grubu olan grup I’e göre gen ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir artış gözlemlendi. Grup V’de TNF- α gen ekspresyonunun grup VII’den çok az yüksek olduğu görüldü.. İstatistiksel olarak ($P < 0.05$) anlamlı fark bulundu.

48. saat parsiyal hepatektomi grupları arasında ki TNF- α gen ekspresyon seviyeleri grup II’ye göre karşılaştırıldığında, grup IV’de gen ekspresyonu seviyesinde azalma gözlemlendi. Çizelge 4.3’de ve şekil-4.3’de görüldüğü gibi 48. saat PH grupları arasında en fazla grup VI’da gen ekspresyon seviyesinin artışı ve bunu takiben grup VIII’in geldiği gözlemlendi. Grup IV’e göre grup VI ve grup VIII’de istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. Grup VIII’in gen ekspresyonunun grup VI’ya yakın olduğu tesbit edildi.

Grup VII ile grup VIII arasında zamana göre anlamlı fark görüldü ($P < 0.05$).

Çizelge 4.3 Deney gruplarına ait TNF- α gen ekspresyonu değerleri $\pm$ standart hataları. n=6

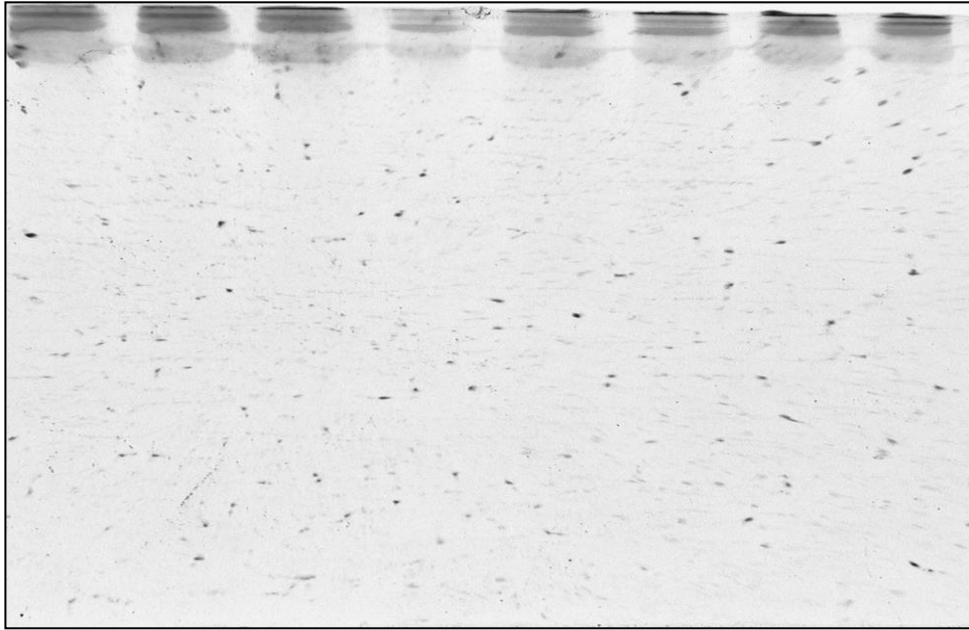
GRUP	GEN EKSPRESYONU
1	1,02 $\pm$ 0,09 ^a
2	0,95 $\pm$ 0,07 ^b
3	0,98 $\pm$ 0,10
4	0,88 $\pm$ 0,12
5	1,56 $\pm$ 0,07 ^a
6	1,35 $\pm$ 0,10 ^b
7	1,47 $\pm$ 0,07 ^{a,c}
8	1,13 $\pm$ 0,06 ^{b,c}
P < 0.05 (a) ve (b) gruplara (c) zamana göre anlamlı farklıdır.	



Şekil 4.3 TNF- α gen ekspresyon ifadesi. (a) ve (b) gruplara (c) zamana göre anlamlı farklıdır.
n = 6 ($P < 0.05$)

4.2 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamız kapsamında, Western blot yöntemi kullanılarak rejenerasyon marker'i olan NF- κ B, TNF- α ve IL-6'nın proteinlerinin düzeyleri de araştırılmıştır. Materyal olarak rat karaciğeri kullanılmıştır. Toplam kırksekiz rattan oluşan 8 grup oluşturulmuştur. Kodag Gel Logic 1500 model görüntüleme cihazında proteinlerin vermiş oldukları sinyallerin yoğunlukları ölçülmüştür. Aşağıda, Şekil 4.4'de Western blot sonrasında SDS-PAGE'in komazi blue ile boyanmış bir görüntüsü bulunmaktadır. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi proteinler membrana transfer edilmiş, ve transfer edilemeyen yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerde gruplar arasında normalizasyon yapmak için eşit yükleme-yapılmadığı göstermektedir.



Şekil 4.4 SDS-PAGE jelindeki proteinlerin membrane transferinden sonra komazi blue ile boyanmış görüntüsü.

4.3 NF- κ B₁ için Western Blot Analiz Sonuçları

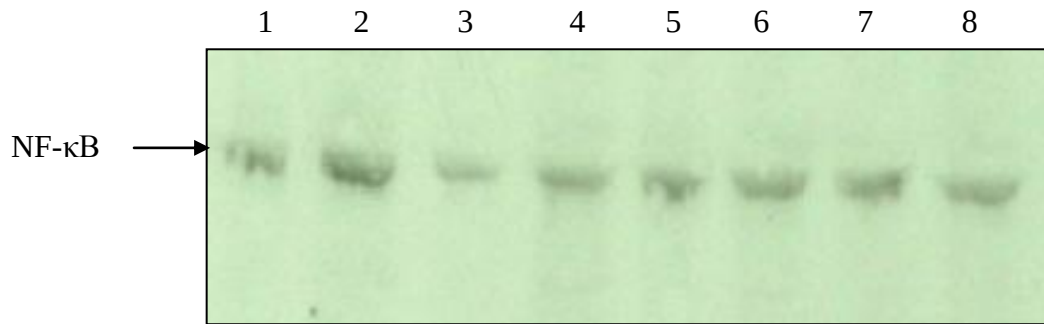
Çalışmamızda parsiyel hepatektomi sonrasında değişim gösteren 105 kDa ağırlığında ve sitozolde serbest olarak bulunan NF- κ B₁'in protein miktarı Grup I ve Grup II' ye göre karşılaştırıldı. NF- κ B₁ protein miktarının Grup I ile kıyaslandığında Grup III hariç, diğer gruplarda (Grup IV, Grup V, Grup VI, Grup VII ve Grup VIII'de) ekspresyonun arttığı tesbit edildi (Çizelge 4.4'de ve Şekil 4.5).

24. saat parsiyal hepatektomi grupları olan Grup III, Grup V ve Grup VII, sham kontrol grubu olan Grup I'e göre protein miktarı bakımında karşılaştırıldıklarında Grup VII'de NF- κ B₁ protein miktarının en yüksek olduğu ve sırasıyla Grup V ve Grup III'ün izlediği gözlemlendi. Grup III'e göre Grup V ve Grup VII'de yaklaşık 2.5 katlık bir artış gözlemlendi. Grup VII'nin protein miktarının Grup V'e yakın olduğu ve önemli bir fark olmadığı tesbit edildi.

48. saat parsiyal hepatektomi grupları (Grup II, Grup IV, Grup VI ve Grup VIII) arasında ki NF- κ B₁ protein miktarları karşılaştırıldığında, Çizelge 4.4'de ve Şekil 4.5'de görüldüğü gibi en fazla Grup II'de protein miktarında artış gözlemlendi ve sırasıyla Grup VIII, Grup VI ve Grup IV'ün geldiği gözlemlendi. Grup IV'e göre Grup VI ve Grup VIII'de protein miktarında artış gözlemlendi. Grup VIII'in protein miktarındaki artış Grup VI'ya yakın olduğu tesbit edildi. Grup II'deki NF- κ B miktarının, Grup IV, Grup VI ve Grup VIII'e göre yüksek olduğu görüldü; bu da muhtemelen protein yüklemesinden veya transferinden kaynaklanan deneysel bir hatadır (artifact).

Çizelge 4.4 Deney gruplarına ait NF- κ B₁ protein band yoğunlukları

NF- κ B ₁	
Gruplar	Göreceli band yoğunluğu
Grup I	1,00
Grup II	2,12
Grup III	0,65
Grup IV	1,26
Grup V	1,42
Grup VI	1,52
Grup VII	1,65
Grup VIII	1,54



Şekil 4.5 Western blot işlemi sonunda elde edilen NF- κ B₁ proteinine ait band görüntüleri. Proteinler, %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıldıktan sonra PVDF membranına aktarılmış ve NF- κ B, Imgenex firmasına ait monoklonal anti-NF- κ B antikor ile görüntülenmiştir.

4.3.1 IL-6 Western Blot Analiz Sonuçları

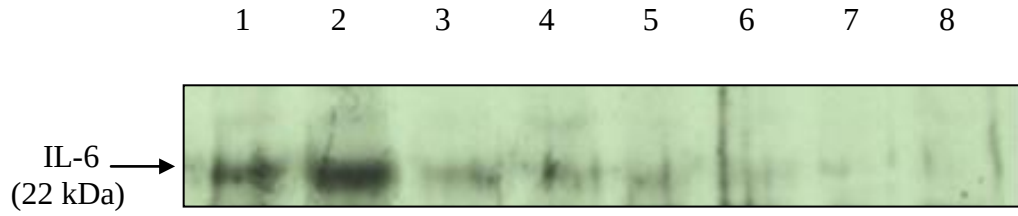
Parsiyel hepatektomi sonrasında değişim gösteren 22 kDa ağırlığındaki IL-6 proteinin, Grup I ve Grup II'ye göre karşılaştırılarak yapılan Western blot analizine göre; IL-6 proteinin miktarının yalnız Grup V'de Grup I'e göre %29 oranında fazla olduğu görüldü (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.6).

24. saat parsiyal hepatektomi grupları olan grup III, grup V ve grup VII, grup I'e göre protein miktarı açısından karşılaştırıldıklarında Grup I'de protein miktarının Grup III ve Ggrup VII'ye göre yüksek olduğu; Grup V'inde Grup I'den %29 oranında daha yüksek olduğu görüldü. Grup V'nin protein miktarının Ggrup VII'den yaklaşık 2,7 kat daha yüksek olduğu tesbit edildi.

48. saat parsiyal hepatektomi grupları olan Grup II, Grup IV, Grup VI ve Grup VIII sham kontrol grubu olan Grup II ile karşılaştırıldığında en fazla artışın Ggrup VI de olduğu ve bunu sırasıyla Grup IV, Grup II ve Grup VIII'in izlediği gözlemlendi (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.6). Grup IV'e göre Grup VI'da protein miktarında artış gözlemlendi. Grup VIII'in protein miktarının Ggrup II'ye yakın olduğu tesbit edildi.

Çizelge 4.5 Deney gruplarına ait IL-6 protein band yoğunlukları

IL-6	
Gruplar	Göreceli band yoğunluğu
Grup I	1,00
Grup II	0,80
Grup III	0,25
Grup IV	0,83
Grup V	1,29
Grup VI	1,71
Grup VII	0,48
Grup VIII	0,78



Şekil 4.6 Western blot işlemi sonunda elde edilen IL-6 proteinine ait bant görüntüleri

4.3.2 TNF- α Western Blot Analiz Sonuçları

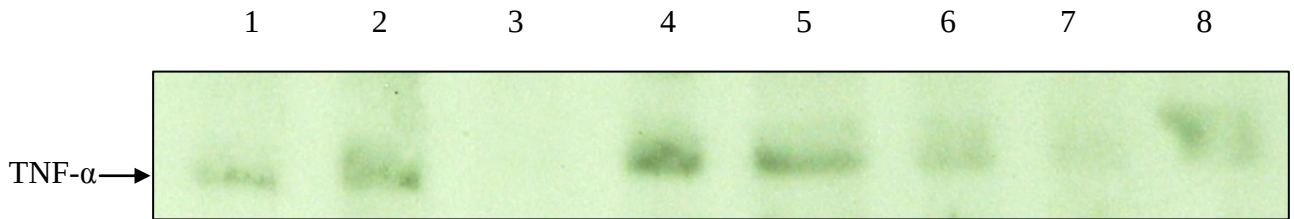
Parsiyel hepatektomi sonrasında değişim gösteren 22 kDa ağırlığındaki TNF- α 'nın Western blot analizi sonucu verdiği protein miktarı Grup I ve Grup II'ye göre karşılaştırıldı. .

24. saat parsiyal hepatektomi grupları olan Grup III'de protein miktarında azalma olduğu gözlemlendi. Grup V'de, sham kontrol grubu olan Grup I'e göre protein miktarı bakımından artış gözlemlendi. Grup V'de TNF- α protein miktarının Grup VII'den de daha yüksek olduğu görüldü. Grup III'e göre Grup V ve Grup VII'de artış gözlemlendi. (Çizelge 4.6 ve Şekil-4.7).

48. saat parsiyal hepatektomi grupları arasında ki TNF- α protein miktarları , Çizelge 4.6'da ve Şekil-4.7'de görüldüğü gibi protein miktarının en fazla Grup IV'de olduğu ve bunu takiben Grup II, Grup VIII ve Grup VI'nın geldiği gözlemlendi.

Çizelge 4.6 Deney gruplarına ait TNF- α protein band yoğunlukları

TNF- α	
Gruplar	Göreceli band yoğunluğu
Grup I	1,00
Grup II	1,68
Grup III	0,13
Grup IV	2,41
Grup V	1,76
Grup VI	0,97
Grup VII	0,56
Grup VIII	1,44

Şekil 4.7 Western blot işlemi sonunda elde edilen TNF- α proteinine ait bant görüntüleri

4.3.3 HSP 27 Western Blot Analiz Sonuçları

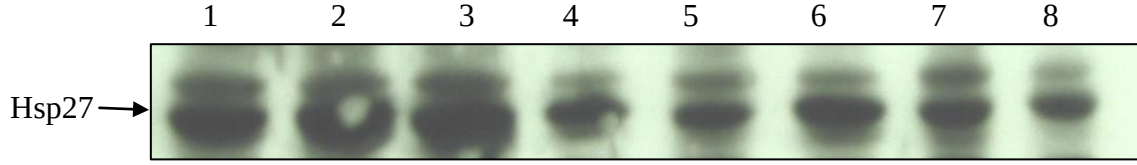
Çalışmamızda parsiyel hepatektomi sonrasında stres proteini olan HSP27'nin Grup I ve Grup II'ye göre yapılan karşılaştırılması sonucunda Grup III'de değişmediği, Grup IV, Grup V, Grup VI, Grup VII ve Grup VIII'de HSP 27 protein miktarının giderek düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.8, Çizelge 4.7).

24. saat parsiyal hepatektomi grupları arasında HSP27 proteini bakımından en fazla düşüş Grup V ve Grup VII'de gözlemlendi.

48. saat parsiyal hepatektomi grupları arasında HSP27 proteini bakımından en fazla düşüş Grup VIII'de gözlemlendi ve bunu sırasıyla Grup IV ve Grup VI'nın izlediği gözlemlendi

Çizelge 4.7 Deney gruplarına ait HSP 27 proteinin western blottaki band yoğunlukları

HSP 27	
Gruplar	Göreceli band yoğunluğu
Grup I	1,00
Grup II	0,98
Grup III	1,04
Grup IV	0,75
Grup V	0,52
Grup VI	0,78
Grup VII	0,53
Grup VIII	0,49



Şekil 4.8 Western blot işlemi sonunda elde edilen HSP27 proteinine ait bant görüntüleri

4.3.4 HSP60 Western Blot Analiz Sonuçları

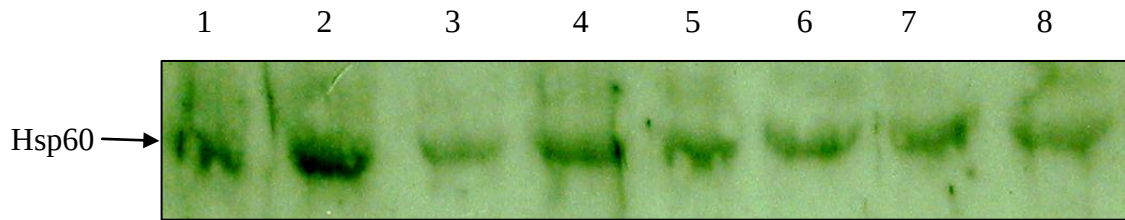
Çalışmamızda Parsiyel hepatektomi sonrasında stres proteini olan HSP60'nın Grup I ve Grup II'ye göre yapılan Western blot analizi sonucunda Grup III, Grup IV, Grup V, Grup VI, Grup VII ve Grup VIII'de protein miktarının giderek azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.9, Şekil, Çizelge 4.8).

24. saat parsiyal hepatektomi grupları arasında HSP60 proteini miktarı bakımından en fazla azalış Grup III'de gözlemlendi ve bunu sırasıyla Grup VII ve Grup V'in izlediği gözlemlendi.

48. saat parsiyal hepatektomi grupları arasında HSP60 protein miktarı bakımından en fazla düşüş Grup VIII'de gözlemlendi ve bunu sırasıyla Grup VI ve Grup IV'ün izlediği gözlemlendi

Çizelge 4.8 Deney gruplarına ait HSP 60 proteinin Western blottaki band yoğunlukları

HSP 60	
Gruplar	Göreceli band yoğunluğu
Grup I	1,00
Grup II	1,35
Grup III	0,61
Grup IV	0,87
Grup V	0,97
Grup VI	0,82
Grup VII	0,87
Grup VIII	0,57



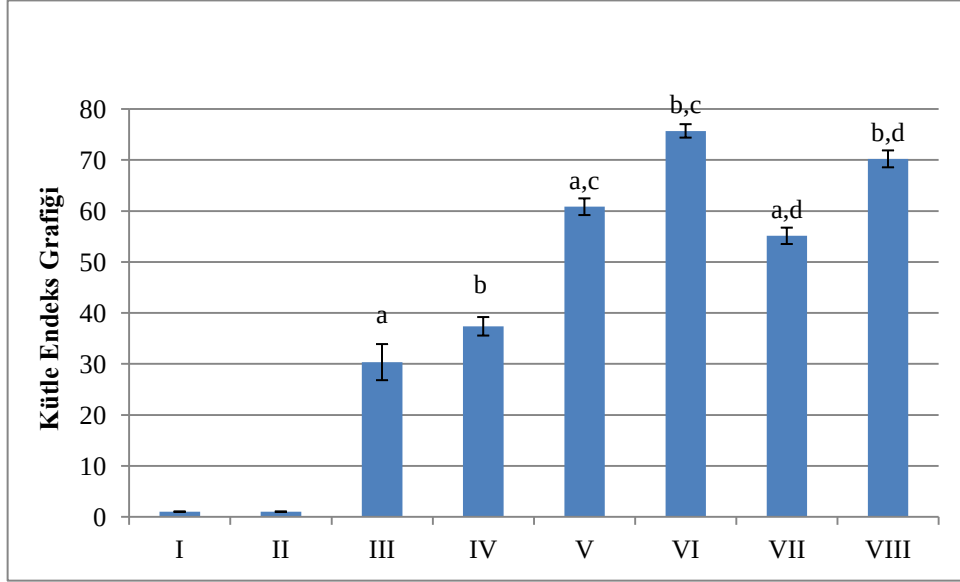
Şekil 4.9 Western blot işlemi sonunda elde edilen HSP60 proteinine ait bant görüntüleri.

4.4 Karaciğer Rejenerasyon Oranı

Parsiyal hepatektomi sonrası Grup III, IV, V, VI, VII ve VIII'de 0., 24. ve 48. saatlerde alınan karaciğerlerin yaş ağırlıkları hesaplanarak gruplar arasında yapılan incelemeler Çizelge 4.9'da ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Tüm deney gruplarındaki hayvanlara ait karaciğer kütle artışı değerlendirmeleri ortalama±standart hataları. n=6

GRUP	ARTIŞ ORANI (%)
1	1,00±0,00
2	1,00±0,00
3	30,34±3,5 ^a
4	37,36±1,81 ^b
5	60,82±1,60 ^{a,c}
6	75,70±1,31 ^{b,c}
7	55,11±1,60 ^{a,d}
8	70,21±1,65 ^d
P<.05 (a) (a,b) gruplara göre (c,d) zamana göre farklı anlamlıdır	



Şekil 4.10 Tüm deney gruplarındaki hayvanlara ait karaciğer kütle artışı değerlendirmeleri grafiği (a,b) gruplara göre (c,d) zamana göre farklı anlamlıdır (n=6).

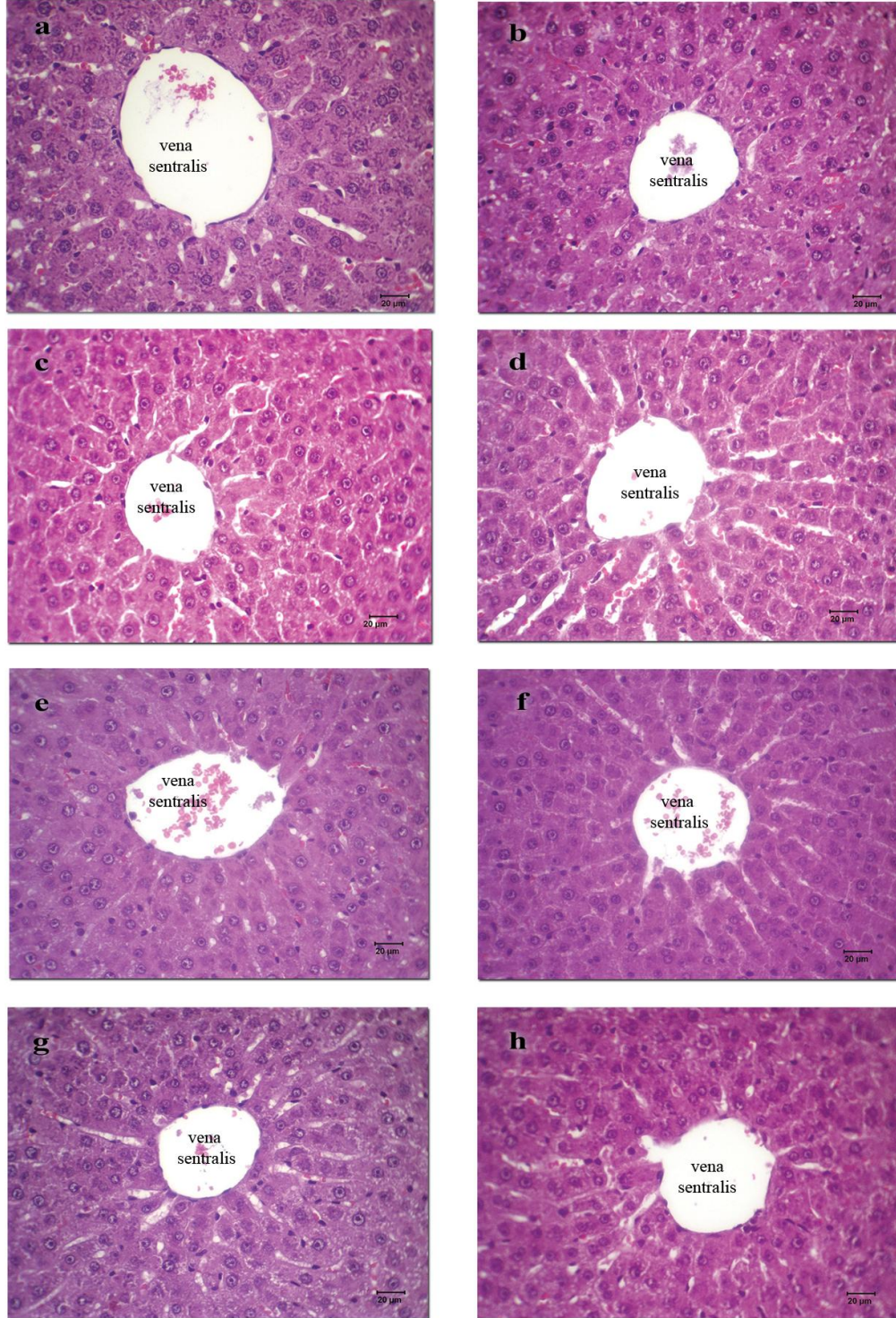
Çizelge-17’de ve Şekil 4.10’da görüldüğü gibi karaciğer rejenerasyon oranı grup III ve IV, Grup V, VI, VII ve VIII’e oranla düşük olduğu görüldü ve istatistiksel olarak ($P < 0,05$) anlamlı fark bulundu.

Parsiyal hepatektomi sonrası Grup IV, VI ve VIII, 48. saat sonunda incelendiğinde mitozun çeşitli safhalarında bulunan hepatositlere rastlandı. Grup VIII’in rejenerasyon oranının grup VI’ya yakın olduğu görüldü.

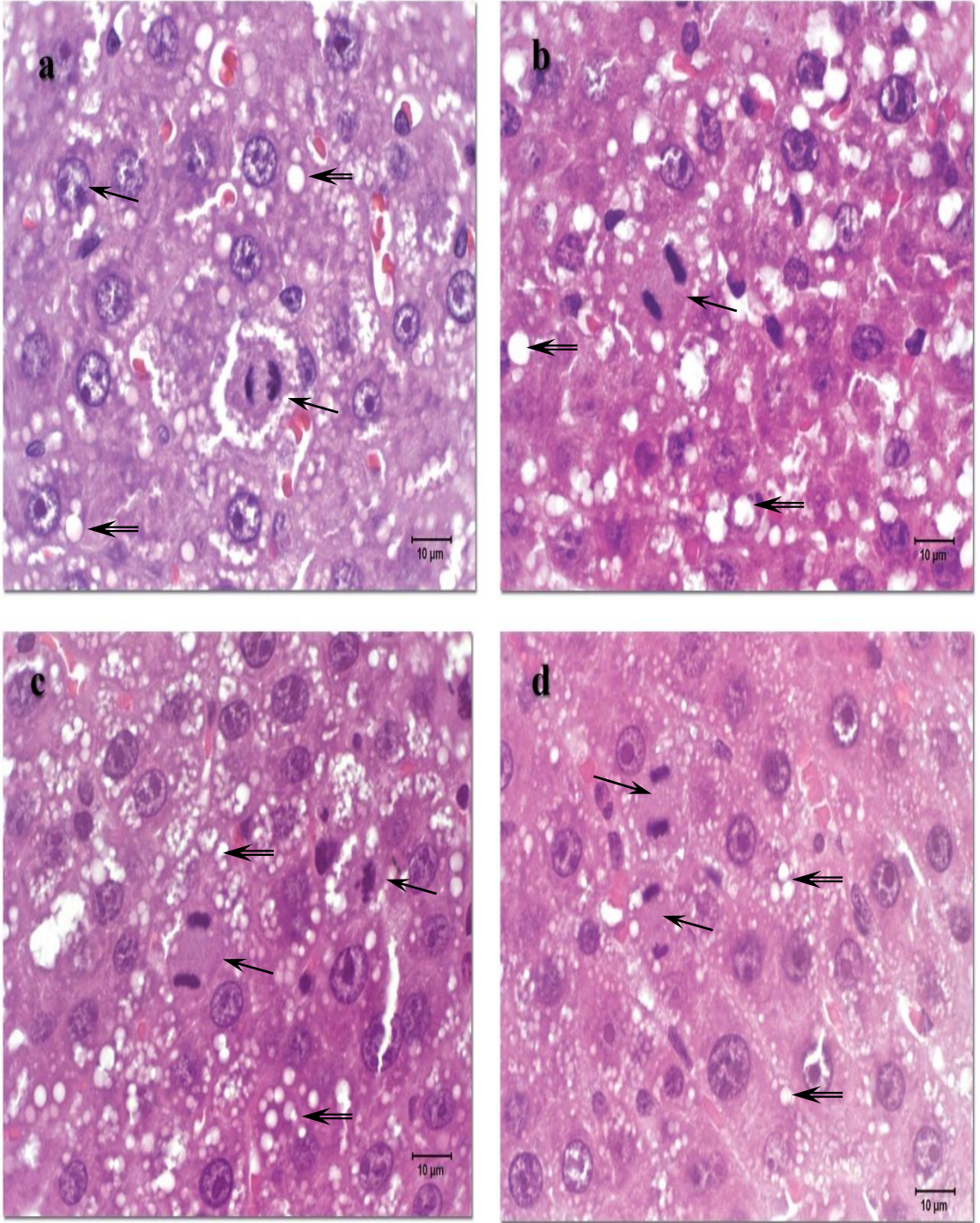
Grup VII ile grup VIII arasında zamana göre anlamlı fark bulundu. ($P < 0.05$).

4.5 Histolojik Analiz Sonuçları

Bütün gruplarda histolojik yapının korunmuş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11). Ancak hepatektominin neden olduğu vakuolizasyon ve mitotik aktivite, SF + parsiyal hepatektomi (Grup III ve Grup IV), Silymarin + parsiyal hepatektomi (Grup V ve Grup VI) ve Geraniol + parsiyal hepatektomi (Grup VII ve Grup VIII) gruplarına ait hayvanların karaciğer kesitlerinde görüldü. Klasik karaciğer lobül yapısının korunduğu gözlenmiş olup, Şekil 4.12’de görüldüğü gibi de mitozun çeşitli safhalarındaki hepatositlere sıkça rastlanmaktadır. Serum fizyolojik + parsiyal hepatektomi grubunun kesitlerindeki hepatositlerde yaygın gözlenen vakuolizasyon oldukça azalmıştır. Sinusoidal konjesyona, silymarin + parsiyal hepatektomi ve geraniol + parsiyal hepatektomi gruplarına ait hayvanların bazılarında rastlanmıştır.



Şekil 4.11 Karaciğer kesitlerinde vena sentralis çevresindeki bir ve iki çekirdekli hepatositler. (a) Grup I, (b) Grup II, (c) Grup III, (d) Grup IV, (e) Grup V, (f) Grup VII, (g) Grup VII, (h) Grup VIII



Şekil 4.12 Karaciğer kesitlerinde hepatositlerde mitotik aktivite (↗) ve yaygın vakuolizasyon (↗↗).
(a) Grup V, (b) Grup VI, (c) Grup VII, (d) Grup VIII

5. TARTIŞMA SONUÇ

Rejenerasyon, bir doku veya organın herhangi bir parçasının eksilmesi veya hasar görmesi sonrasında o dokunun kütleini yeniden tamamlayabilme yeteneği olarak tanımlanır (Fausto, 2000). Karaciğer, kendi kendisini yenileyebilen eşsiz bir organdır ve ciddi kütle kayıplarından sonra bile orijinal boyutuna ulaşana kadar hepatosit rejenerasyonuna devam eder. Karaciğer rejenerasyonu ile yapılan çalışmalar ya parsiyal hepatektomi sonrası ya da belirli kimyasal maddeler varlığında toksik yaralanma sonrası rejenerasyon modeli şeklindedir (Palmes and Spiegel, 2004; Limuro and Fujimoto, 2010). Karaciğer dokusunun kaybı rejenerasyonu başlatmaktadır. Büyümenin durmasını sağlayan hassas nokta ise vücut kütlesi ile karaciğer kütlesi arasındaki ilişkidir. Karaciğer, vücudun fonksiyonel ihtiyaçlarını karşılayacak, metabolizmayı gerçekleştirecek büyüklüğe erişince büyüme durmaktadır. Parsiyal hepatektomi çalışmalarında, sıçanlarda her bir karaciğer lobunun, tüm karaciğer loblarının toplam kütleine oranlarını belirleyerek karaciğerin rejenerasyon oranı belirlenir (Watanabe ve ark., 2001). Toplam karaciğer kütleine göre sağ lob %38, sol lob %30, kuyruk lobu %8 ve iki parçalı olan quadrat (dörtgen) lob ise %10 oranında bir kütlei içermektedir. Sıçanlarda yapılan parsiyel hepatektomi araştırmalarına en uygun model olarak karaciğerin %68–70' lik bir kısmının rezekte edilmesi olduğu belirtilmiştir (Ebrenfried et al., 1997).

Karaciğer rejenerasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda; NF- κ B, IL-6, TNF- α , IL-1, STAT3, HGF, TGF- α , ve TGF- β gibi mediyatör ve sitokinlerin gen ekspresyonlarının belirlenmesi ve buna bağlı olarak da protein miktarlarının ölçülmesi rejenerasyon durumu hakkında bize bilgi vermektedir (Gerald et al., 1995; Kay and Fausto, 1997; Yamada and Fausto, 1998; Krillova et al., 1999; Fausto ve ark., 2006; Limuro and Fujimoto, 2010). Bununla birlikte, hepatositlerin bölünerek çoğalmalarına ilişkin indekslerin çıkarılmasında karaciğerde rejenerasyon çalışmalarında kullanılan en eski yöntemdir (Palmes and Spiegel, 2004). Ayrıca ısı şok proteinlerinin (HSP) karaciğer rejenerasyonu üzerine etkileri olduğu da yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Farelerle yapılan çalışmalarda HSP'lerin karaciğer rejenerasyonunu geciktirdiği bildirilmiştir (Taub, 2004; Shi et al., 2007).

Parsiyal hepatektomi sonrası hepatositler dakikalar içerisinde G_0 fazından çıkarak hücre siklusuna girerler. Başlangıç fazında hepatositler replikasyon için hazırlanırlar. Başlangıç-faktörleri IL-6 ve TNF- α 'dır. IL-6, TNF- α uyarımı ile hepatik stellat ve Kupffer hücrelerinden salınan bir transkripsiyon faktörüdür (Black ve ark., 2004). TNF- α ve IL-6, G_0 'dan G_1 'e geçişi tetikler. IL-6'nın gp 130 reseptörüne bağlanmasından sonra STAT3 ve C/EBPbeta/nukleer faktör-IL6 (NF-IL-6) aktivasyonu gerçekleşir. STAT ailesi proteinleri sitokin sinyalini düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Hepatektomi sonrasında oluşan sinyal yolağı; TNF-TNFR1-NF- κ B-IL-6-STAT3 şeklindedir (Fukuhara ve ark., 2003).

Yapılan pek çok çalışma parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda NF- κ B'nin rolünü ortaya koymuştur (Krillova et al., 1999; Chaisson et al., 2002; Limuro and Fujimoto, 2010; Kurinna and Barton, 2011). NF- κ B hücrenin hayatta kalması, çoğalması ve ölümü başta olmak üzere homeostazında gerekli bir transkripsiyon faktörüdür (Karin and Lin, 2002). Kupffer hücrelerinde sitokin aracılı transkripsiyonda NF- κ B önemli bir aktivatördür (Kurinna and Barton, 2011). Parsiyal hepatektomi sonrası NF- κ B'nin DNA'ya bağlanması çok hızlı olmaktadır (Limuro and Fujimoto, 2010).

Çalışmamızda NF- κ B, TNF- α ve IL-6 gen ekspresyonlarının tüm gruplarda parsiyal hepatektomiden sonraki 24. saatte yükselmiş olduğu ve 48. saat sonunda gen ifade seviyesinin 24. saate göre azalmaya başladığı görülmüştür. Test maddemiz olan geraniol gruplarında, pozitif kontrol olan silymarin gruplarına yakın gen ekspresyon ifadesi gözlenmiştir.

Arai ve ark. yaptıkları bir çalışmada; sıçanlarda parsiyal hepatektomi sonrası NF- κ B'nin ekspresyonunun 48. saatte de etkili olduğunu göstermişlerdir (Arai et al., 2003). Yang ve ark. ise parsiyal hepatektomi sonrası kupffer hücreleri ve nonparanşimal hücrelerde NF- κ B aktivasyonunun 24 saatten fazla devam ettiğini göstermiştir (Yang et al., 2005). Malato ve arkadaşları ise adenovirüs kullanarak harapladıkları karaciğerde 48. saate kadar süren NF- κ B aktivasyonunun IKK α yolu üzerinden olduğunu bildirmişlerdir. Malato ve arkadaşlarının sonuçlarına göre IKK α tarafından siklin D'yi uyarmaktadır. Uyarılan Siklin D ise AP-1 ve NF- κ B aktivasyonunu tetiklemektedir (Malato et al., 2008).

Iwai ve ark., sıçanlarda %67'lik parsiyel hepatektomiden sonra TNF- α ve IL-6 gen ekspresyon seviyelerinin; 24. saatte arttığını, 48. saatte ise maksimum düzeye ulaştığını bildirmişlerdir. Ayrıca 72. saatte TNF- α ve IL-6 gen ekspresyon seviyelerinin azaldığını gözlemlemişleridir (Iwai et al., 2001). TNF- α , IL-6 ve aktif NF- κ B ardışık bir şekilde erken fazda aktif hale gerçekleşmektedirler (Limuro and Fujimoto, 2010). Scotte ve ark. sıçanlarda parsiyal hepatektomiden 24 saat sonra IL-6 sitokin seviyelerinde yükselme olduğu ve 48 saat sonra en yüksek seviyeye ulaştığını, 72. saate ise kontrol grubu hayvanlarına yakın bir seviyeye düştüğü bildirilmiştir (Scotte et al., 1993). Uyanoglu ve ark. yaptığı çalışmada parsiyal hepatektomi sonrası 72. saatte serumda IL-6 seviyesinin kontrole yakın bulunduğu bildirilmiştir (Uyanoglu ve ark., 2008). Fukuhara ve ark. yaptığı çalışmaya göre parsiyel hepatektomiden sonraki 6-48 saat içinde IL-6 ve TNF- α genlerinin de dahil olduğu 27 genin regülasyonunda artış gözlenmiş olup, 48-72 saatler arasında bu genlerin aktivasyonlarında düşüş olduğu bildirilmiştir (Fukuhara et al., 2003). Çalışmamızın sonuçları daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında NF- κ B, IL-6 ve TNF- α gen ekspresyonları açısından benzerlik görülmüştür.

Bu çalışmada, Western blot yöntemi kullanılarak NF- κ B, IL-6 ve TNF- α protein miktarları saptanmaya çalışıldı. Western blot, karaciğer rejenerasyonunda sitokinlerin

ve aktivatör proteinlerin rolünü göstermede en güvenilir yöntemdir. Çalışmamızda NF- κ B aktivatörü ile TNF- α ve IL-6 sitokinlerinin protein miktarı ölçüldü.

Parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 24. saatte NF- κ B proteinlerinin miktarının Grup I'e göre Grup V ve VII'de arttığı gözlemlendi. 48. saatte ise grup VIII, VI ve IV'de protein miktarının yüksek olduğu tesbit edildi. 24. ve 48. Saat gruplarının protein miktarlarının birbirine yakın olduğu görüldü. Protein miktarının en fazla artış gösterdiği gruplar, test grubumuz olan Grup VII ve VIII'dir. Çalışmamızda kullandığımız test grubumuz olan Grup VII ve VIII'de pozitif kontrol grubumuz olan Grup V ve VI'ya yakın protein miktarı gözlenmiştir. NF- κ B için gen ekspresyon verileri ile western blott verileri paralellik göstermiştir. 48 saat boyunca NF- κ B geni ekspresyonunun ve proteine dönüşümünün olduğu gözlenmiştir.

Parsiyal hepatektomiden sonraki ilk 24. saatte TNF- α proteinlerinin miktarının Grup I'e göre Grup V arttığı gözlemlendi. 48. saatte ise grup II'ye göre grup IV'de protein miktarının yüksek olduğu tesbit edildi. Grup VIII'in protein miktarının grup II'ye yakın olduğu tesbit edildi. 24. ve 48. saat gruplarının protein miktarlarının birbirine yakın olduğu görüldü. Protein miktarının en fazla artış gösterdiği gruplar, Grup IV ve VIII'dir. Çalışmamızda kullandığımız test grubumuz olan Grup VII ve VIII'de pozitif kontrol grubumuz olan Grup V ve VI'ya yakın protein miktarı gözlenmiştir. 48 saat boyunca TNF- α sitokini test grubumuz olan grup VII ve VIII'de ifade edilmiştir. Grup I, II, III, IV, V, VI ve VIII için TNF- α proteini miktarı western blott bulgularımız RT-PCR bulgularımızla paralellik göstermiştir. TNF- α proteininin miktarının Grup VII'de düşük olmasını rejenerasyonun devamı için IL-6 ile arasında olması gereken belli bir konsantrasyon oranına bağlamaktayız.

IL-6 proteini western blott analiz sonuçlarına göre, 24. saat gruplarımızda Grup I'e göre , grup III ve grup VII'de protein miktarının azaldığı, grup V ise grup I'den yüksek olduğu görüldü. 48. saat gruplarımızda Grup II'ye göre , grup IV ve grup VI'da

protein miktarının arttığı, grup VIII ise grup II'ye çok yakın olduğu görüldü. Tedavi gurubumuz olan grup VII ve grup VIII'de protein miktarının azaldığı görüldü. RT-PCR sonuçlarımıza göre Grup VII ve VIII'de IL-6 geninin ekspresyonunun 24 ve 48 saat boyunca Grup I ve II'den yüksek olduğu görüldü. Elde edilen bu bulguların ışığı altında 24. saate yakın bir zamanda post transkripsiyonel düzenleme ile IL-6 proteininin miktarının transkripsiyon yada translasyon seviyesinde kontrol edilerek azaldığını düşünmekteyiz. Çünkü rejenerasyonda IL-6 proteininin konsantrasyonu kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında NF- κ B, IL-6 ve TNF- α protein miktarları açısından benzerlik görülmüştür.

Bilindiği gibi IL-6, TNF- α uyarısıyla etkinlik kazanır ve farklı hücre tipleri üzerine çok yönlü biyolojik aktiviteler gösteren pleiotropik bir sitokinidir (Scotte ve ark., 1993). IL-6'nın fizyolojik miktarı rejenerasyon için gereklidir ancak fazla IL-6 büyüme durdurucu onkogenleri uyarak rejenerasyonun bozulmasına neden olabilir (Kaya ve ark., 2002). IL-1 ve IL-6'nın konsantrasyonunun artması TNF- α 'nın ekspresyonunu inhibe eder. Dolayısıyla IL-6'nın konsantrasyonu ile TNF- α 'nın karşılıklı konsantrasyonu bir denge içerisinde. Fazla miktardaki TNF- α yada IL-6 rejenerasyonu durdurucu etki yapmaktadır (Krillova et al., 1999; Sudo ve ark., 2008; Muriel, 2009).

Scotte ve ark. yapmış oldukları çalışmada parsiyel hepatektomi sonrası IL-6 serum seviyesinin 24. saate en yüksek seviyede olduğunu ve 48. saate ise IL-6 seviyesinin düştüğünü bildirmiştir (Scotte ve ark., 1997).

Sudo ve arkadaşları parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonu gösteren farelere IL-6 ve TNF- α enjekte ettiklerinde DNA sentezinin durduğunu ve rejenerasyonun yavaşladığını gözlemlemişlerdir. Bu da araştırmacılara IL-6 ve TNF- α seviyelerinin karaciğer rejenerasyonu için kritik bir öneme sahip olduğunu göstermiştir (Sudo ve ark., 2008).

Isı şok proteinleri (HSP) stresle indüklenen proteinlerdir. Parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda HSP 27, HSP 60, HSP 70 ve HSP 90'nın karaciğeri koruyucu olarak önemli rolleri vardır (Shi et al., 2007).

Çalışmamızda HSP 27 ve HSP 60'ın parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonundaki durumunu western blot tekniği ile araştırıldı. HSP 27 ve HSP 60 protein miktarları karşılaştırıldığında tüm gruplar içerisinde en yüksek HSP protein miktarına Grup I, II, III ve IV'ün sahip olduğu gözlemlendi. Grup V, VI, VII ve VIII'de HSP 27 ve HSP 60 protein miktarlarının düşük olduğu tespit edilmiştir. Tedavi amaçlı kullandığımız geraniol gruplarında HSP 27 ve HSP 60 protein miktarı pozitif kontrol silymarin'e göre daha düşük olduğu görüldü. Bu sonuçlara göre geraniolün karaciğerde parsiyal hepatektomi sonrası oluşan strese karşı koruyucu bir etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızın sonuçları daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında HSP 27 ve HSP 60 western blot analizleri açısından benzerlik görüldü. Shi ve ark., parsiyal hepatektomi sonrası intraperitoneal olarak quercetin verilen farelerde karaciğerdeki HSP 27 ve HSP 60 protein miktarını sham gruplarıyla karşılaştırmışlar ve ilk 24. saate kadar tüm gruplarda HSP 27 ve HSP 60 protein miktarının arttığını, 48. saate ise quercetin grubunda dikkate değer bir şekilde HSP 27 ve HSP 60 protein miktarının düştüğünü bildirmişlerdir (Shi et al., 2007).

Morimoto ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HSP'lerin hepatositler üzerindeki koruyucu etkisi olduğunu ve protein hemostasında önemli görevlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir (Morimoto and Santoro, 1998).

Son yapılan çalışmalara göre HSP'lerin karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerini, Kupffer hücrelerinden sitokin salınımını tetikleyerek gösterdikleri düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar HSP'lerin kupffer hücreleri için böyle bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu uyarıcı etkilerini IL-6 ve TNF- α miktarını ayarlayarak yapmaktadırlar (Cressman et al., 1996; Ledda-Columbano et al., 1998; Yamada and Fausto, 1998; Garrido et al., 2001; Blindenbacher ve ark., 2003).

Karaciğer rejenerasyon oranı, parsiyal hepatektomi sonrası kalan karaciğer kütlesi ile hepatektomiden belirli zaman sonra alınan tüm karaciğerin kütleleri değerlendirilerek elde edilen kütle endeksine verilen isimdir (Tang et al., 1997; Fan et al., 2003). Yapmış olduğumuz çalışmada parsiyal hepatektomiden 48 saat sonra rejenere olan karaciğer ağırlıklarının parsiyal hepatektomi gruplarında ortalama olarak iki katına çıktığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda parsiyel hepatektomi sonrası geraniol uygulanan gruplarda 48. saatte karaciğer kütle artışının Grup VIII'de yüksek olduğu görüldü. Ayrıca pozitif kontrol maddesi olan silymarine göre de yakın sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları diğer yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, kütle endeksi açısından benzerlikler göstermiştir.

Karaciğer yaş ağırlıkları ve bunların %68 ve %32 oranındaki miktarları, Child' in formülüne göre regenerasyon oranı tespitinde kullanılmıştır (Tang, et al., 1997; Fan, et al., 2002). 24 ve 48. saatte %70 karaciğer ağırlığına göre hesapladığımız rejenerasyon oranları Grup III ve IV için daha önce yapılmış olan çalışmalarla paralel bulunmuştur (Furuta, et al., 2000; Kaya, et al., 2002). Tang ve ark. yapmış oldukları çalışmada %68 parsiyal hepatektomiden sonraki 24, 48, 72 saat ve 8. günde rejenerasyon oranlarının zamana göre yükseldiğini bildirmişlerdir (Tang, et al., 1997).). Li ve arkadaşları,

sıçanlarda 2/3 parsiyal hepatektomiden 48 saat sonra kalan karaciğer kütlesinin iki katı artış gösterdiğini ve 7-10 gün içinde ise parsiyel hepatektomi öncesi ağırlığına ulaştığını bildirmişlerdir (Li et al., 1999). Magliulo ve ark. %69 parsiyal hepatektomiden kısa bir süre önce tek doz silymarin enjeksiyonu yaparak oluşturdukları deney modelinde, 72 saat sonra karaciğer ağırlık artışının kontrol grubuna göre yüksek olduğunu göstermişlerdir (Magliulo, et al., 1973). Crocenzi ve ark tarafından doza bağımlı artan silymarinin, sıçanların karaciğer ağırlığında artışa neden olduğu ve optimum dozdan daha fazla silymarin verildiğinde ise ağırlıkta değişikliğin olmadığı gözlenmiştir (Crocenzi, et al., 2000). Srivastava ve ark. parsiyal hepatektomiden önce silymarin uygulanmış sıçanların hepatositlerinde cerrahiyi takip eden 18 ve 72 saatler arasında DNA ve RNA sentezinde artışın olduğunu buna paralel olarak mitozunun tetiklendiğini bildirmişlerdir (Srivastava, et al., 1994). Nagaue ve ark. %68 parsiyal hepatektomi işleminden 48 saat sonra karaciğer rejenerasyonunun maksimuma ulaştığını ve organ büyümesinin olduğunu bildirmişlerdir Uyanoglu ve ark yaptığı çalışmada parsiyel hepatektomiden 72 saat sonra karvakrol ve silymarin verilmiş gruplarda kontrol grubuna göre karaciğer ağırlık artışının yüksek olduğu saptamışlardır (Uyanoglu ve ark., 2008).

Çalışmamızda da parsiyel hepatektomi sonrası Grup III, IV, V, VI, VII ve VIII'de mitotik aktivitenin arttığını gözledik. Özellikle geraniol uygulanan gruplarda 48. saatte karaciğer yaş ağırlığının artması ve histolojik kesitlerin çeşitli evrelerinde mitoz hücrelerine rastlanması geraniolün karaciğer rejenerasyonu indüklediğini desteklemektedir.

Çalışmamızda karaciğer kesitlerinde yapılan histolojik incelemeler sonucunda, Grup III, IV, V, VI, VII ve VIII'e ait hayvanların karaciğer kesitlerindeki histolojik yapının, grup I ve grup II ile benzer şekilde olduğu gözlemlendi. Grup III ve IV'e ait hayvanların karaciğer kesitlerinde klasik karaciğer lobül yapısının korunduğu gözlenmiş olup parsiyel hepatektomiye bağlı olarak vakuolizasyon dikkat çekmektedir. Grup V, VI, VII ve VIII'e ait hayvanların karaciğer kesitlerinde, klasik karaciğer lobül yapısı

korunmuş olup, mitotik aktivitenin arttığı görüldü. Grup III ve IV'deki hepatositlerde yaygın gözlenen vakuolizasyonun Grup V, VI, VII ve VIII'de oldukça azaldığı gözlemlendi. Çalışmamızın sonuçları diğer yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, histopatoloji açısından paralellik bulunmaktadır..

Uyanoğlu ve ark. parsiyel hepatektomiden 72 saat sonra silymarin uyguladıkları gruplarda hepatositlerde mitozun arttığını vurgulamışlardır. Ayrıca silymarin ve karvakrol verilen gruplardaki karaciğer histolojik kesitlerinde vakuolizasyonun azaldığını göstermişlerdir (Uyanoglu ve ark., 2008). Greif ve ark. yaptığı çalışmada %70 parsiyal hepatektomi yapılmış ve sonrasında serum fizyolojik verilmiş ratlarda vokulizasyon, mitotik figürler ve rejenerasyon çekirdeklerine dair kanıtlar gözlemişlerdir (Greif ve ark., 2010).

Daha önce yapılan çalışmalarla geraniolün antimikrobial, antioksidan, antikanser, antienflamtuvar ve protektif etkileri ortaya konulmuştur (Lapczynski ve ark., 2008). Ayrıca geraniol kanser için iyi bir kemopreventif ajandır. Özellikle mesane, böbrek ve pankreatik kanserlerde kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır (Chen ve Viljoen, 2010). Buna karşın geraniol kullanılarak karaciğer rejenerasyonu üzerine yapılmış *in vivo* çalışma bulunmamaktadır.

Araştırmamızda %70 parsiyal hepatektomiden sonraki 24 ve 48. saatlerde NF- κ B, TNF- α ve IL-6 sitokinlerinin gen ekspresyon seviyelerinin ve protein miktarlarının ortaya çıkarılmış olması gelecek araştırmalarda parsiyal hepatektomiden sonraki farklı saatlerde geraniolün test edilmesine olanak sağlayabilir. Ayrıca, parsiyal hepatektomiden sonra Kupffer hücrelerinde TNF- α ve IL-6 varlığının gen ekspresyon analizi ve protein miktar analizi ile belirlenmesi, rejenerasyon için kritik öneme sahip konsantrasyonlarını belirlemede doğru bir yöntemdir. Geraniol uygulanan gruplarda HSP 27 ve HSP 60'ın, karaciğer koruyucu özelliği ortaya konmuş olan silymarin'e göre düşük olması bize geraniolün hepatoprotektif etkisini göstermesinin yanısıra HSP 27

ve HSP 60'ın karaciğer rejenerasyonu üzerine düzenleyici etkilerinin olabileceğinde düşündürmektedir.

Sonuç olarak geraniolün sıçanlarda %70'lik parsiyel hepatektomiden sonra karaciğer kütlesini 48. saatte eski oranına yaklaştırarak mitozu tetikleyen bir ajan olduğu görüldü. RT-PCR ile yaptığımız NF- κ B, IL-6 ve TNF- α gen ekspresyon analizleri ve NF- κ B, IL-6 ve TNF- α protein miktarı bulgularımız da bu durumu desteklemektedir. Ancak tamamlayıcı tıp uygulamaları açısından geraniolün karaciğer rejenerasyonu ve iyileşmesi için kullanılabilirliğinin gelecekte yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, yaptığımız çalışmaya ek olarak aynı deneysel modelde geraniolün farklı doz ve zamanlardaki etkileri ile karaciğer rejenerasyon sürecinde geraniolün etki mekanizmasının moleküler ve fizyolojik düzeyde belirlenmesinin yeni araştırma konuları oluşturması açısından oldukça önemlidir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akça, S. ve Dinçer, D., 2004, Karaciğerin Rejenerasyon Yeteneği: Karaciğerin Diğer Organlardan Farkı, Güncel Gastroenteroloji, 8/4, 261-265.
- Andreeff, M. and Goodrich, D.W., 2000, Cell proliferation, differentiation and apoptosis, BC Decker Inc, 17 p.
- Andreoli, T.E.; Fallon, M.B.; McGuire, B.M.; Abrams, G.A. and Arguedas, M.R., 2001, Liver, WB Saunders Company, 365 p.
- Ankoma-Sey, V., 1999, Hepatic Regeneration , News in Physiological Sciences, 14, 149-155.
- Aoki, T.; Murakami, M.; Niiya, T.; Murai, N.; Shimizu, Y.; Kato, H., and Kusano, M., 2001, Capacity of hepatic regeneration following a second partial hepatectomy in rats, Hepatology Research, 21, 228-241.
- Arai, M.; Yokosuka, O.; Chiba, T.; Imazeki, F.; Kato, M.; Hashida, J.; Ueda, Y.; Sugano, S.; Hashimoto, K.; Saisho, H.; Takiguchi, M., and Seki, N., 2003, Gene Expression Profiling Reveals the Mechanism and Pathophysiology Liver Regeneration, The Journal of Biological Chemistry, 278, 29813-29818.
- Assy, N.; Gong, Y.; Zhang, M.; Pettigrew, N.M.; Pashniak, D., and Minuk, G.Y., 1998, Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats, J Lab Clin Med, 131, 251-256.
- Baeuerle, P.A., 1998, Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle?, Curr Biol, 8, 19-22.
- Banthorpe, D.V., 1972, Biosynthesis of Geraniol and Nerol and their P-D-Glucosides in *Pelargonium graveolens* and *Rosa dilecta* Biochem, Biochem.J., 130, 1045-1054.
- Bartel, H.; Orksız, S., and Kmiec, B., 1972, Ultrastructural of Hepatocyte Regeneration Rat Liver, Folia Morphol, XXXVI, 367-372.
- Bismuth, H.; Houssin, D., and Castaing, D., 1982, Major and Minor Segmentectomies Regles in Liver Surgery, World J Surg, 6, 10-17.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Black, D.; Lyman, S.; Heider, T.R. ve Behrns, K.E., 2004, Molecular and Cellular Features of Hepatic Regeneration, *Journal of Surgical Research*, 117, 306-315.
- Blindenbacher, A.; Wang, X.; Langer, I.; Savino, R.; Terracciano, L. ve Heim, M.H., 2003, Interleukin 6 is Important for Survival After Partial Hepatectomy in Mice *Hepatology*, *Hepatology*, 38, 3, 674-682.
- Borowiak, M.; Garratt, A.N.; Wüstefeld, T.; Strehle, M.; Trautwein, C. ve Birchmeier, C., 2004, Met provides essential signals for liver regeneration, *PNAS*, 101, 29, 10608-10613.
- Boyer, J.; Dufour, J.F.; Jaeschke, H.; Pagliaro, L.; Pakela, J.; Roskams, T., and Trautwein, C., 2003, Die another day, *Journal of Hepatology*, 38, 873-875.
- Bucher, R. L., 1995, Regeneration of Mammalian Liver, 1081-1081
- Burtis, C.A. ve Ashwood, E.R., 2005, Klinik kimyada temel ilkeler, (Palme Yayıncılık, 747-756 s.
- Cardozo, M.T.; de Conti, A.; Ong, T.P.; Scolastici, C.; Purgatto, E.; Horst, M.A.; Bassoli, B.K. ve Moreno, F.S., 2011, Chemopreventive effects of b-ionone and geraniol during rat hepateocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCofA reductase, and RhoA, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 130-135.
- Chaisson, L.M.; Brooling, T.J.; Ladiges, W.; Tsai, S., and Fausto, N., 2002, Hepatocyte-specific inhibition of NF- κ B leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy, *Journal of Clinical Investigation*, 110 (2), 193-202.
- Chen, W. ve Viljoen, A.M., 2010, Geraniol — A review of a commercially important fragrance material, *South African Journal of Botany*, 76, 4, 643-651.
- Choi, H.-S.; Song, H.S.; Ukeda, H. ve Sawamura, M., 2000, Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 9, 4156-4161.
- Court, F.G.; Wemyss-Holden, S.A.; Dennison, A.R., and Maddern, G.J., 2002, The mystery of liver regeneration, *Br.J.Surg*, 89, 1089-1095.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cressman, D.E.; Greenbaum, L.E., and DeAngelis, R.A., 1996, Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice., *Science*, 274, 1379-1383.
- Debonera, F.; Aldeguer, X.; Shen, X.; Gelman, A.E.; Gao, F.; Que, X.; Greenbaum, L.E.; Furth, E.E. ve Olthoff, K.M., 2001, Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation, *Journal of Surgical Research*, 96, 2, 289-295.
- Diehl, A.M. and Rai, R.M., 1996, Regulation of signal transduction during liver regeneration, *FASEB J.*, 10, 215-227.
- Ebrenfried, J.A.; Ko, T.C.; Thompson, E.A., and Evers, B.M., 1997, Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration, *Surgery*, 122, 927-935.
- Eguchi, S.; Kamlot, A., and Ljubimova, J., 1996, Fulminant hepatic failure in rats: Survival and effect on blood chemistry and liver regeneration, *Hepatology*, 24, 1452-1459.
- Fan, C.Y.; Lee, S., and Cyr, D.M., 2003, Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40, *Cell Stress Chaperones.*, 8 (4), 309-316.
- Farghali, H., Kamenikova, L., Hynie, S. and Kmonickova, E., 2000, Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: A study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury, *Pharmacological Research*, 41, 2, 231-237.
- Fausto, N., 2000, Liver Regeneration, *J.Hepatol*, 32, 293-302.
- Fausto, N. and Campbell, J.S., 2003, The Role of Hepatocytes and Oval cells in Liver Regeneration and Repopulation, *Mechanisms of Development*, 120, 117-130.
- Fausto, N.; Campbell, J.S. ve Riehle, K.J., 2006, Liver Regeneration, *Hepatology*, 43, 2, 45-53.
- Fruta, K.; Kakita, A.; Takahashi, T.; Tomiya, T., and Fujiwara, K., 2000, Experimental study on liver regeneration after simultanous partial hepatectomy and pancreatectomy, *Hepatology*, 17, 223-236.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fukuhara, Y.; Hirasawa, A.; Li, X.-K.; Kawasaki, M.; Fujino, M.; Funeshima, N.; Katsuma, S.; Shijima, S.; Yamada, M.; Okuyama, T.; Suzuki, S. ve Tsujimoto, G., 2003, Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy, *Journal of Hepatology*, 38, 784-792.
- Galun, E. ve Axelrod, J.H., 2002, The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1592, 3, 345-358.
- Garrido, C.; Gurbuxani, S.; Ravagnan, L., and Kroemer, G., 2001, Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death., *Biochem Biophys Res Commun.*, 286, 433-442.
- Gerald, M.F.; Weber, E.; Donovan, J., and Fausto, N., 1995, Rapid DNA binding by nuclear factor-kB in hepatocytes at the start of liver regeneration., *Cell Growth Diff*, 6, 417-427.
- Greif, F.; Ben-Ari, Z.; Taya, R.; Pappo, O.; Kurtzward, E.; Cheporko, Y.; Ravid, A. ve Hochhauser, E., 2010, Dual Effect of Erythropoietin on Liver Protection and Regeneration after Subtotal Hepatectomy in Rats, *LIVER TRANSPLANTATION*, 16, 631-638.
- Haber, A.H.; Mohn, K.L., and Diamond, R.H., 1993, Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration, *J Clin Invest*, 91, 1319-1326.
- Hamanoue, M.; Kawaida, K., and Takao, S., 1992, Rapid and Marked Induction of Hepatocyte Growth Factor During Liver Regeneration After Ischemic or Crush Injury, *Hepatology*, 16, 1485-1492.
- Henle, K.J.; Jethmalani, S.M., and Nagie, W.A., 1998, Stress proteins and glycoproteins, *Int J Mol Med*, 1(1), 25-32.
- Higgins, G.M. and Anderson, R.M., 1931, Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver white rat following partial surgical removal, *Arch Pathol.*, 12, 186-202.
- Itoh, H., Kobayashi, R., Wakui, H., Komatsuda, A., Ohtani, H., Miura, A. B., Otaka, M., Masamune, O., Andoh, H., Koyama, K., Sato, Y., and Tashima, Y., 2002, Mammalian 60-kDa Stress Protein. *FEBS J.*, 269 (23): 5931–5938.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Iwai, M.; Cui, T.-X.; Kitamura, H.; Saito, M. ve Shimazu, T., 2001, Increased Secretion Of Tumor Necrosis Factor And Interleukin 6 From Isolated, Perfused Liver Of Rats After Partial Hepatectomy, *Cytokine*, 13, 1, 60-64.
- Jacobs, B.P, Dennehy, C., Pharm, D., Ramirez, G., Sapp, J. and Lawrence V.A., 2002, Milk thistle for the treatment of liver disease: A systematic review and Meta-Analysis, *The American Journal of Medicine*, 113, 506-515.
- Johnson, R.B., Fearon, K., Mason, T., and Jindal, S., 2003, Cloning and characterization of the yeast chaperonin HSP60 gene. *Gene*, 84: 295- 302.
- Karabelyos, C.; Dobozy, O.; Slazai, C.; Klenjanzki, K.; Vargu, K.; Hadhazy, A.; Kiss, A.; Fulop, K.A.; Madarsz, B., and Falus, A., 1999, Elevated hepatic glucocorticoid receptor expression during liver regeneration in rats, *Pathology Oncology Research*, 5 (2), 107-109.
- Karin, M. and Lin, A., 2002, NF- κ B at the crossroads of life and death, *Nature Immunology*, 127 (3), 221-227.
- Kay, M.A. and Fausto, N., 1997, Liver Regeneration: prospects for therapy based on new technologies, *Molecular Medicine Today*, 108-115.
- Kaya, Y.; Coskun, T. ve Aral, E., 2002a, Pringle manevrasının parsiyal karaciğer rejenerasyonundan sonra karaciğer interleukin-6 üretimine etkisi, *Çağdaş Cerrahi Dergisi*, 16,4, 202-207.
- Kaya, Y.; Coşkun, T. ve Aral, E., 2002b, Pringle manevrasının parsiyal karaciğer rezeksiyonundan sonra karaciğerin İnterlökin-6 üretimine etkisi, *Çağdaş Cerrahi Dergisi*, 16, 4, 202-207.
- Kaya, Y.; Coşkun, T.; Erkasap, N., and Var, A., 2002, Increased intraabdominal pressure impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *Journal of Surgical Research*, 108, 250-257.
- Kim, S.H.; Bae, H.C., and Park, E.J., 2011, Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways, *Biochem Biophys Res Commun.*, 407 (1), 129-134.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kontaş-Akar, T.; Ergün, N. ve Turunç, V., 2007, Isı şok proteinler ve fizyolojik rolleri, Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 13(1), 109-114.
- Krillova, I.; Chaisson, M., and Fausto, N., 1999, Tumor Necrosis Factor induces DNA replication in hepatic cell through nuclear factor kappaB activation, Cell Growth Diff, 10(12), 819-828.
- Kufrevioğlu, İ., 2007, Biyokimya ve Moleküler Biyolojide Modern teknikler, Ege Üniversitesi Basımevi, 153 s.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., 2004, Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, Food Chemistry, 85, 633-640.
- Kurinna, S. and Barton, C.M., 2011, Cascades of transcription regulation during liver regeneration, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 43, 189-197.
- LaBrecque, D.R. and Steele, G., 1987, Purification and Physical-Chemical characterization of Hepatic Stimulator Substance, Hepatology, 7, 100-106.
- Lapczynski, A.; Bhatia, S.P.; Foxenberg, C.S., and Letizia, A.M., 2008, Fragrance material review on geraniol, Food and Chemical Toxicology, 46, 160-170.
- Lapczynski, A.; Bhatia, S.P.; Foxenberg, R.J.; Letizia, C.S. ve Api, A.M., 2008, Fragrance material review on geraniol, Food and Chemical Toxicology, 46, 11, 160-170.
- Laurent, S.; Otsuka, M. and De Saeger, C., 2001, Expression of presumed specific early and late factors associated with liver regeneration in different rat surgical models., 1299 p.
- Ledda-Columbano, G.M.; Curto, M., and Riga, R., 1998, In vivo hepatocyte proliferation is inducible through a TNF and IL-6-independent pathway, Oncogene, 17, 1039-1044.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, Y.; Wang, H.Y., and Cho, C.H., 1999, Effects of heparin on hepatic regeneration and function after partial hepatectomy in rats, *World Journal of Gastroenterology*, 5(4), 305-307.
- Limuro, Y. and Fujimoto, J., 2010, TLRs, NF-kB, JNK, and Liver Regeneration, *Gastroenterology Research and Practice*, 1-7.
- Magliulo, E., Carosi, P.G., Minoli, L. and Gorini, S., 1973, Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin, *Arzneimittel-Forschung*, 23, 161-167.
- Malato, Y.; Sander, L.E., and Liedtke, C., 2008, Hepatocyte specific inhibitor-of-kappaB-kinase deletion triggers the innate immune response and promotes earlier cell proliferation during liver regeneration, *Hepatology*, 47, 2036-2050.
- Mars, W.M.; Kim, T.H., and Stolz, D.B., 1995, Immediate early dedection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implication of liver regeneration, *Hepatology*, 21, 1695-1701.
- Michalopoulos, G.K. and DeFrances, M.C., 1997, Liver Regeneration, *Science*, 276, 60-66.
- Morimoto, R.I. and Santoro, M.G., 1998, Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection., *Nat Biotechnol*, 16, 833-838.
- Muriel, P., 2009, NF-kB in liver diseases: a target for drug therapy , *Journal of Applied Toxicology*, 29, 91-100.
- Nagasue, N.; Kobayashi, M.; Iwaki, A.; Yukaya, H.; Kanashima, R. ve Inoguchi, K., 1977, Effect Of 5-Fluorouracil On Liver Regeneration And Metabolism After Partial Hepatectomy In The Rat, *Cancer*, 41, 435-443.
- Nagasue, N.; Yukaya, H., and Ogawa, Y., 1987, Human Liver Regeneration After Major Hepatic Resection, *Ann Surg*, 206, 30-39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Neuman, M.G., 2003, Cytokines-Central Factors in Alcoholic Liver Disease, Alcohol Research & Health, 27(4), 307-316.
- Nollen, E.A.; Brunsting, J.F.; Weber, L.A., and Kampinga, H.H., 1999, In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance, Molecular Cell Biology, 19 (3), 2069-2079.
- Nuzzo, G.; Giuliente, F.; Giovannini, I.; Tebala, G.D., and Cosmo, G., 1996, Hepatic resections in normothermic ischemia., Surgery, 120(5), 852-858.
- Oliveira, C.P.M.S., Lopasso, F.P., Laurindo, F.R.M., Leitao, R.M.C. and Laudanna, A.A., 2001, Protection against liver ischemia-reperfusion injury in rats by silymarin or verapamil, Transplantation Proceedings, 33, 3010-3014.
- Palmes, D. and Spiegel, H.U., 2004, Animal models of liver regeneration, Biomaterials, 25, 1601-1611.
- Perek, S. ve Kapan, S., 2000, Cerrahi Gastroenteroloji, Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul, 194 s.
- Ramadan, L.A., Roushdy, H.M., Senna, G.M.A., Amin, N.E. and El-Deshw, O.A., 2002, Radioprotective effect of silymarin against radiation induced hepatotoxicity, Pharmacological Research, 45, 6, 447-454.
- Rolo, A.P., Oliveira, P.J., Moreno, A.J.M. and Palmeira C.M., 2003, Protection against post-ischemic mitochondrial injury in rat liver by silymarin or TUDC, Hepatology Research, 26, 217-224.
- Richmond, A., 2002, NFkB, chemokine gene transcription and tumour growth., Nat Rev Immunol, 2 (9), 664-674.
- Saibil, H.R., 2008, Chaperone machines in action, Curr Opin Struct Biol., 18 (1), 35-42.
- Sakamoto, T.; Liu, Z.; Murase, N.; Ezure, T.; Yokomuro, S.; Poli, V., and Demetris, A.J., 1999, Mitosis and apoptosis in the liver of IL-6 Deficient Mice after Partial Hepatectomy, Hepatology, 29, 403-411.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Salazar-Montes, A.; Rincon, A.R.; Panduro, A., and Armendariz-Borunda, J., 1999, Chemically induced liver regeneration is characterized by specific IL-6 gene expression, *Hepatology Research*, 15, 10-21.
- Scotte, M.; Daveau, M.; Hiron, M.; Tcnikre, P. ve Lebreton, J.P., 1993, Absence of expression of interleukin-6 (IL-6) mRNA in regenerating rat liver, *FEBS Letters*, 315, 2, 159-162.
- Scotte, M.; Masson, S.; Lyoumi, S.; Hiron, M.; Teniere, P.P.; Lebreton, J.P. ve Daveau, M., 1997, Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat, *Cytokine*, 9, 11, 859-867.
- Shi, Q.; Dong, Z., and Wei, H., 2007, The Involment of Heat Shock Proteins in Murine Liver Regeneration, *Cellular & Molecular Imminology*, 4, 53-57.
- Soto, C., Recoba, R., Barron, H., Alvarez, C. and Favari, L., 2003, Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 136, 205–212.
- Sökmen, A., Güllüce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sökmen, M. and Şahin, F., 2004, The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*, *Food Control*, 15, 627-634.
- Sudo, K.; Yamada, Y.; Saito, K.; Shimizu, S.; Ohashi, H.; Kato, T.; Moriwaki, H.; Ito, H. ve Seishima, M., 2008, TNF- α and IL-6 signals from the bone marrow derived cells are necessary for normal murine liver regeneration, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782, 11, 671-679.
- Tanaka, Y.; Mak, K.M., and Lieber, C.S., 1990, Immunochemical dedection of proliferating lipocytes in regenerating rat liver., *J Pathol*, 160, 129-134.
- Tang, T.X.; Hashimoto, T.; Chao, L.Y.; Itoh, K., and Manabe, T., 1997, Effects of Partial Pancreatectomy on Liver Regeneration in Rats, *Journal of Surgical Research*, 72, 8-14.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Taub, R., 2004, Liver Regeneration: from myth to mechanism, *Molecular Cell Biology*, 5, 836-847.
- Temizkan, G.; Arda, N.; Yılmaz, S.; Öztürk, M.; Arı, Ş.; Ertan, H. ve Sarıkaya-Topal, A., 2008, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Kitapevleri, 200 s.
- Theocharis, S.E.; Skepelitou, A.S., and Margeli, A.P., 1994, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in regenerating rat liver after partial hepatectomy., *Dig Dis Sci*, 39, 245-252.
- Tissieres, A.; Mitchell, H.K., and Tracy, U.M., 1974, Protein synthesis in salivary glands of drosophila melanogaster: Relation to chromosome puffs, *J Molecular Biology*, 84 (3), 389-398.
- Tsuchiya, T.; Miyazawa, M.; Abe, T.; Saito, T.; Kanno, H.; Ishii, S.; Suzuki, M.; Kenjo, A.; Yamada, F.; Gunji, T., and Gotoh, M., 2000, Hepatic regeneration and ischemia/reperfusion injury in fatty-liver rats., *Transplantation Proceedings*, 32, 2324-2332.
- Tuczek, H.V. and Rabes, H., 1971, Loss of proliferation capacity of hepatocytes following subtotal hepatectomy, *Experientia*, 27, 26-530.
- Uyanoglu, M.; Canbek, M.; Aral, E. ve Baser, K., 2008, Effects of Carvacrol Upon The Liver of Rats Undergoing Partial Hepatectomy, *Phytomedicine*, 15, 3, 226-229.
- Wang, W.; Basia Sho seyov, V.O., and Altman, A., 2004, Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response, *TRENDS in Plant Science*, 9 (5), 244-252.
- Watanabe, M.; Yamaguchi, K.; Chijiwa, K. ve Tanaka, M., 2001, FR167653 Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats, *Journal of Surgical Research*, 101, 2, 146-151.
- Waynforth, H.B. and Flecknell, P.A., 1994, *Hepatectomy*, A Harcourt Science and Technology Company, 241 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Widmann, J.J. and Fahimi, H.D., 1975, Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver., *Am J Pathol*, 80, 349-366.
- Wilson, K. and Walker, J., 2000, Principles and techniques of practical Biochemistry, Cambridge University Press,
- Wiseman, D.A.; Werner, S.R. ve Crowell, P.L., 2007, Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320, 3, 1163-1170.
- Yamada, Y. and Fausto, N., 1998, Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor., *Am J Pathol*, 152, 1577-1589.
- Yang, L.; Magness, T.S.; Bateller, R.; Rippe, A., and Brenner, A.D., 2005, NF- κ B activation in Kupffer cells after partial hepatectomy, *American Journal of Physiology*, 289 (3), 530-538.
- Yerlikaya, A. ve Dokudur, H., 2009, Protein yıkımının önemi, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 35(2), 93-99.
- Zimmermann, A., 2004, Regulation of liver regeneration, *Nephrol Dial Transplant*, 19, 4, 6-10.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emre CEYHAN

Doğum Yeri-Tarihi : 05/05/1975

Uyruğu : T.C

Görevi : Araştırma Görevlisi

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

Yabancı Dil : İngilizce (intermediate)

Mail:eceyhan@ogu.edu.tr

Eğitimi

1994 – 1998 : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen–Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden mezun oldu.

1998-2001 : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalından “2,3-Difenil substitue kinoksalin'in 11 farklı türevinin mutajenik aktivitesinin UMU Test sistemi ile araştırılması” isimli yüksek lisans tezi ile mezun oldu.

2002 : Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başladı.

İş

1999 : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen–Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı.

7. EKLER

7.1 Ek 1: Etik Kurul Raporu



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

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 05. 04. 2012
TOPLANTI SAYISI	: 46
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 269
KARAR NUMARASI	: 269
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Mediha CANBEK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Arş. Gör. Emre CEYHAN Doktora Öğrencisi Ahmet ÖZEN
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Wistar albino (erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü/Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Mediha CANBEK** 'in araştırma yürütücüsü olduğu 269/2012 kayıt numaralı ve “**Sıçanlarda parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonuna geraniolün etkisinin NF- κ B yolağı üzerinden olarak belirlenmesi.**” konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Ömür ELÇİOĞLU (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sümmani DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

Adres: Meşelik Kampüsü 26480 Eskişehir
Telefon: 0 222 239 29 79 / 4563 – 4579



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

GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü/Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Mediha CANBEK** 'in araştırma yürütücüsü olduğu 269/2012 kayıt numaralı ve “**Sıçanlarda parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonuna geraniolün etkisinin NF- κ B yolu üzerinden olarak belirlenmesi.**” konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

1. Deney hayvanları: Çalışmada 42 adet 200-250 gr ağırlığında erkek *Wistar albino* ırkı sıçanlar kullanılacaktır.

2. Deney Grupları:

Grup 1: Kontrol grubu (n=7): Bu grup hayvanlara cerrahi ya da enjeksiyon uygulamalarından hiçbiri yapılmayacak.

Grup 2: Sham PH 24 saat grubu (n=7): Her hayvanın batin kısmı açılıp hepatektomi işlemi yapılmadan kapatılacaktır. 24 saat sonra laparotomi yapıp serum ALT düzeylerini saptamak için intrakardiyak kan alınacaktır. Karaciğer dokuları histolojik ve TNF- α , IL-6 ve NF- κ B gen ekspresyon düzeylerine ve protein quantifikasyonuna bakmak için ayrılacaktır.

Grup 3: Sham PH 48 saat grubu (n=7): Her hayvanın batin kısmı açılıp hepatektomi işlemi yapılmadan kapatılacak. 48 saat sonra laparotomi yapıp serum ALT düzeylerini saptamak için intrakardiyak kan alınacaktır. Karaciğer dokuları histolojik ve TNF- α , IL-6 ve NF- κ B gen ekspresyon düzeylerine ve protein quantifikasyonuna bakmak için ayrılacaktır.

Grup 4: PH 24 saat grubu (n=7): Her hayvanın batin kısmı açılarak hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Her hayvana tek doz SF enjeksiyonu intra peritoneal yapılacaktır. 24 saat sonra laparotomi yapıp serum ALT düzeylerini saptamak için intrakardiyak kan alınacaktır. Karaciğer dokuları histolojik ve TNF- α , IL-6 ve NF- κ B gen ekspresyon düzeylerine ve protein quantifikasyonuna bakmak için ayrılacaktır.

Grup 5: PH 48 saat grubu (n=7): Her hayvanın batin kısmı açılarak hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Her hayvana tek doz SF enjeksiyonu intra peritoneal yapılacaktır. 48 saat sonra laparotomi yapıp serum ALT düzeylerini saptamak için intrakardiyak kan alınacaktır. Karaciğer dokuları histolojik ve TNF- α , IL-6 ve NF- κ B gen ekspresyon düzeylerine ve protein quantifikasyonuna bakmak için ayrılacaktır.

Grup 6: Silymarin + PH 24 saat grubu (n=7): Her hayvanın batin kısmı açılarak hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Her hayvana tek doz Silymarin (100 mg/kg) enjeksiyonu intra peritoneal yapıp 24 saat sonra laparotomi uygulanacaktır. Serum ALT düzeylerini saptamak için intrakardiyak kan alınacaktır. Karaciğer dokuları histolojik ve TNF- α , IL-6 ve NF- κ B gen ekspresyon düzeylerine ve protein quantifikasyonuna bakmak için ayrılacaktır.

Grup 7: Silymarin + PH 48 saat grubu (n=7): Her hayvanın batin kısmı açılarak hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Her hayvana tek doz Silymarin (100 mg/kg) enjeksiyonu intra peritoneal yapıp 48 saat sonra laparotomi uygulanacaktır. Serum ALT düzeylerini saptamak için intrakardiyak kan alınacaktır. Karaciğer dokuları histolojik ve TNF- α , IL-6 ve NF- κ B gen ekspresyon düzeylerine ve protein quantifikasyonuna bakmak için ayrılacaktır.

Grup 8: Geraniol + PH 24 saat grubu (n=7): Her hayvanın batin kısmı açılarak hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Her hayvana tek doz Geraniol (100 mg/kg) enjeksiyonu intra peritoneal yapılacaktır ve 24 saat sonra laparotomi uygulanacaktır. Serum ALT



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

düzeylerini saptamak için intrakardiyak kan alınacaktır. Karaciğer dokuları histolojik ve TNF- α , IL-6 ve NF- κ B gen ekspresyon düzeylerine ve protein quantifikasyonuna bakmak için ayrılacaktır.

Grup 9: Geraniol + PH 48 saat grubu (n=7): Her hayvanın batin kısmı açılarak hepatektomi işlemi gerçekleştirilecektir. Her hayvana tek doz Geraniol (100 mg/kg) enjeksiyonu intra peritoneal yapılacak ve 48 saat sonra laparotomi uygulanacaktır. Serum ALT düzeylerini saptamak için intrakardiyak kan alınacaktır. Karaciğer dokuları histolojik ve TNF- α , IL-6 ve NF- κ B gen ekspresyon düzeylerine ve protein quantifikasyonuna bakmak için ayrılacaktır.

3. Hepatektomi İşlemi: Parsiyal hepatektomi yapılacak deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasında tespit edilip rektal ısı kontrolü yapılarak işlem başlatılacaktır. Cerrahi uygulama bölgesi %70' lik etil alkol ile temizliği yapıp Higgins ve Anderson'un (1931) tekniğiyle parsiyal hepatektomi gerçekleştirilecektir. Buna göre, deney hayvanının karın bölgesinde vücutta paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi ile laparotomi yapılacak ve karaciğer loplarnı birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin yaklaşık %68-70 oranında kütesini teşkil eden öndeki sağ, orta ve sol yan loplarnı ayrılacaktır. Bu loplara ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanıp, bağın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilecektir. Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verilecektir. Sonra, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 4/0 ipek sütürle dikilerek laparotomi bölgesi kapatılacaktır ve povioideks antiseptik solüsyon ile laparotomi bölgesi temizlenecektir. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın 1 hafta boyunca yaşatılacaktır.

4. Anestezi: Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilecektir. Deney gruplarına ait hayvanlar hafif eter anestezisi altında, intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürülecektir. Deney gruplarına ait hayvanlara intramuskular olarak 10 mg.kg⁻¹ ksilazin ve 70 mg.kg⁻¹ ketamin anestezisi uygulanacaktır ve midline laparotomi gerçekleştirilerek karaciğer doku örnekleri alınacaktır.

Parsiyel hepatektominin de ketamin + ksilazin anestezisi altında yapılacağı belirtilmelidir. Hayvanların hayatına son verilme işlemi de aynı anestezi altında elisamguinasyon şeklinde yapılmalıdır.

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.