

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KARACİĞER İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARINDA NILCO YOLAĞININ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Dr. Erhan ASLANER

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2020

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KARACİĞER İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARINDA NILCO YOLAĞININ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Dr. Erhan ASLANER

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Prof. Dr. Adnan ŞAHİN

ESKİŞEHİR
2020

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T. C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Erhan ASLANER'e ait, "Karaciğer iskemi / reperfüzyon hasarında NİLCO yolağının rolünün araştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Adnan ŞAHİN	Tarih
	Genel Cerrahi Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. Ersin ATEŞ	İmza
	Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
Üye	Prof. Dr. Mustafa Cem ALGIN	İmza
	(Kütahya Sağ. Bil. Üniv. Tıp Fak.)	
	Genel Cerrahi Anabilim Dalı	

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun /.... /....

Tarih ve...../..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İ. ÖZKAN ALATAŞ

Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren sayın hocalarım Prof.Dr. Adnan Şahin ve Prof.Dr. Ersin Ateş'e, asistanlık eğitim süresince emeği geçen tüm mesai arkadaşlarıma ve her zaman destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ERHAN A. Karaciğer iskemisi / reperfüzyon hasarında NILCO yolağının rolünün araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir,2020.

Hepatik I/R hasarının reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimiyle başladığı bilinmektedir. ROS lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarına neden olarak hücrenin fizyolojisini bozmaktadır. Ayrıca ROS ve oksijenlenmiş moleküller inflamatuvar cevaplara neden olan sinyal molekülleri olarak hareket edebilir. Ancak karaciğer I/R hasarında önemli olan ROS birikiminin, moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Notch sinyal yolu hücre çoğalması ile apoptozu düzenler. Notch reseptörleri ve ligandları, doğrudan hücreler arası sinyal iletimine aracılık eden tip I transmembran proteinleridir. Memelilerde dört Notch reseptörü (Notch1-4) ve beş ligandı (Jagged 1, 2 ve Deltalike [Dll] 1, 3 ve 4) tanımlanmıştır. Son çalışmalar, Notch sinyalinin I / R ve ROS birikiminde rol oynadığını göstermiştir. Leptin, temel olarak gıda alımını inhibe eden, ağırlık dengesini modüle eden ve enerji metabolizmasını teşvik etme rolü olan adipoz dokular tarafından salgılanan bir ob gen ürünü olan proteindir. İnflamatuvar sitokinlerden olan IL-1 β , I/R hasarı oluşturulmuş karaciğerlerden salınır ve onun eksikliği hepatik I/R hasarını azaltır. Leptin çeşitli dokularda inflamatuvar sitokinlerin salınımını düzenler. IL-1 ailesi, proinflamatuvar/angiogenesis sitokinlerine aittir ve IL-1 α , IL-1 β diye adlandırılan 2 ligant, interlökin-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra), IL-1R tI (tip 1 reseptör) ile IL-1R tII (tip II reseptör) diye adlandırılan reseptörler tarafından temsil edilir. IL-1'in leptin indüklü etkileri hücreye özgüdür ve Leptin ile IL-1 arasındaki direkt ilişki meme kanseri, endometrium kanseri ve kolorektal kanserde gösterilmiştir. Daha önce kanser üzerinde yapılan çalışmalar Notch, IL-1 ve Leptinin (NILCO) birbiri ile etkileşim içerisinde olduğunu tümör anjiogenez ve inflamasyonda önemli olduğunu göstermiştir. Biz bu çalışmayla Notch yolağının inhibitörü olan GSI-IX un karaciğer iskemisi reperfüzyon hasarındaki etkisini NILCO yolağı üzerinden göstermeyi amaçlıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer iskemisi/reperfüzyon, NILCO yolağı

ABSTRACT

ERHAN A. Investigation of the role of NILCO pathway in liver ischemia / reperfusion injury. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Medicine Specialization Thesis, Eskişehir, 2020. It is known that hepatic I / R damage begins with the accumulation of reactive oxygen species (ROS). ROS disrupts the physiology of the cell by causing lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage. Also, ROS and oxygenated molecules can act as signaling molecules that cause inflammatory responses. However, the molecular mechanism of ROS accumulation, which is important in liver I / R damage is not fully understood. The Notch signaling path is largely evolutionarily conserved and regulates cell proliferation and apoptosis. Notch receptors and ligands are type I transmembrane proteins that mediate direct intercellular signal transmission. In mammals, four Notch receptors (Notch1-4) and five ligands (Jagged 1, 2 and Deltalike [Dll] 1, 3, and 4) were identified. Recent studies have shown that the Notch signal plays a role in the accumulation of I / R and ROS. Leptin is a protein, an ob gene product, that is mainly secreted by adipose tissues that inhibit food intake, modulate weight balance, and promote energy metabolism. IL-1 β , one of the inflammatory cytokines, is released from the liver that has I / R injury and its deficiency reduces hepatic I / R damage. Leptin regulates the release of inflammatory cytokines in various tissues. The IL-1 family belongs to proinflammatory / angiogenesis cytokines and it is represented by 2 ligands interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) called IL-1 α , IL-1 β and IL-1R tI (type I receptor) and 2 receptors called IL-1R tII (type II receptor). The leptin-induced effects of IL-1 are cell-specific, and the direct relationship between leptin and IL-1 has been demonstrated in breast cancer, endometrium cancer and colorectal cancer. Previous studies on cancer have shown that Notch IL-1 and leptin (NILCO) interact with each other and are important in tumor angiogenesis and inflammation. With this study, we aim to demonstrate the effect of GSI-IX, an inhibitor of the Notch pathway, on liver ischemia reperfusion injury through the NILCO pathway.

Keywords: Liver ischemia / reperfusion, NILCO pathway

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEZ KABUL ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Karaciğer Anatomisi	3
2.2 Karaciğer Fizyolojisi	4
2.3 Karaciğer Embriyolojisi ve Histolojisi	5
2.4 Rejenerasyon	6
2.5 İskemi Reperfüzyon Hasarı	7
2.6 NİLCO Yolağı	10
3.GEREÇ VE YÖNTEM	17
4.İSTATİSTİKSEL ANALİZ	25
5. BULGULAR	26
6. TARTIŞMA	44
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AST	Aspartat Aminotransferaz
ALT	Alanin aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
APH-1	Anterior pharynx defective protein 1
Bp	Baz çifti (Base pair)
CAT	Katalaz (Catalase)
Ca	Kalsiyum
CBF-1	C-promoter binding factor 1 (CBF-1)
Cl	Klor
DAB	Diaminobenzidine
dk	Dakika
DMN	Dorsomedial nükleus
DMSO	Deney de kullanılacak GSI IX Çözücü Madde (Dimetil sülfoksit)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoxynucleotide
DTT	Dithiothreitol
EBNA-2	The Epstein–Barr virus nuclear antigen 2
EGF	Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GAL-4	Galactose-responsive transcription factor

GSI IX	DAPT (γ -sekretaz inhibitörü)
H&E	Hematoksilen-Eozin
HGF	Hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte growth factor)
HSC	Hepatik stellat hücre (Hepatic stellate cell)
ICN	İntracellüler Notch
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
IL1RI	İnterlökin 1 Reseptör 1
IL1RII	İnterlökin 1 Reseptör 2
IL-1RAcP	IL-1 reseptor accessory protein
IM	İntramusküler
IP	İntraperitoneal
I/R	İskemi/Reperfüzyon
IU	İnternational Units
JAG1	Jagged 1
K	Potasyum
kDa	kilo dalton
Lag-1	lin-12 and glp-1
LPS	Lipopolisakarit
LR	Karaciğer rejenerasyonu (Liver regeneration)
MDA	Malondialdehit
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit (Messenger ribonucleic acid)

Na	Sodyum
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NICD	Notch intracellular domain
NILCO	Notch, IL-1 and leptin crosstalk outcome
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
Nmol	Nanomol
Nm	Nanometre
No	Numara
PA	Portal alan
PBS	Fosfat tamponlu tuz (phosphate buffered saline)
PCR	Polimeraz zincirleme tepkimesi (Polymerase Chain Reaction)
PEN-2	Presenilin enhancer protein -2
PEST	Proline, Glutamine, Serine, Threonine-Rich
RAM	RBP-jk ilişkili molekül (RBP-jk associated molecule)
RBP-J	Recombinant recognition sequence binding protein
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species)
qRT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction)
SF	Serum Fizyolojik (Salin)
SOD	Süperoksid Dismutaz
SP-1	Spesifikasyon proteini -1 (specificity protein 1)
Su(H)	Suppressor of hairless
SV	Santral ven

U	Units
TACE	Tümör nekroz faktörü-a-dönüştürücü enzim
TAD	Trans-aktivasyon alanı (Trans activation domain)
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TICAM	Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
TK-promotör	Transkripsiyon-promotör
TNF	Tümör nekroz faktör
TUNEL	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü
VP-16	transkripsiyon aktivatörü
μ l	Mikrolitre

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. İnsan Karaciğer Anatomik Segmentasyonu (C. Couinaud, 1999)	4
2.2. Karaciğerin embriyolojik gelişimi (Zaret, 2000)	6
2.3. I/R hasarı metabolizması (Lian-Yue Guan ve arkadaşları)	9
2.4. Karaciğerin histolojik yapısı (Fausto and Campbell, 2003)	10
2.5. GSI IX moleküler yapısı	16
2.6. NİLCO mekanizması	16
3.1 Deney aşaması ticam esogü şekil 1 ve 2	20
4.1. Kaspaz-9 (A), kaspaz-3 (B) ve kaspaz-8 (C) genlerinin kontrol, DMSO ve GSI-XI verilen tedavi grubundaki mRNA ekspresyonu	26
4.2. Notch1 (A), JAGGED1 (B) ve JAGGED2 (C) genlerinin kontrol, DMSO ve GSI-XI verilen tedavi grubundaki mRNA ekspresyonu	26
4.3. IL-1 α (A), IL-1 β (B) ve IL1R (C) genlerinin kontrol, DMSO ve GSI-XI verilen tedavi grubundaki mRNA ekspresyonu	27
4.4. Leptin reseptörü Obrb'nin kontrol (saline), DMSO ve GSI-XI verilen tedavi grubundaki mRNA ekspresyonu	27
4.5. Plazmada SOD değerlerinin gruplar arasında değerlendirilmesi	28
4.6. Plazmada MDA değerlerinin gruplar arasında değerlendirilmesi	28
4.7. Plazmada katalaz değerlerinin gruplar arasında değerlendirilmesi	29
4.8. Kontrol, DMSO ve GSI-IX gruplarında plazma AST seviyeleri	29
4.9. Kontrol, DMSO ve GSI-IX gruplarında plazma ALT seviyeleri	30
4.10. Deneysel İ/R modelinde SF (G1) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X5	31

Sayfa

4.11. Deneysel İ/R modelinde SF (G1) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X10	32
4.12. Deneysel İ/R modelinde SF (G1) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X20	32
4.13. Deneysel İ/R modelinde SF (G1) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X40	33
4.14. Deneysel İ/R modelinde DMSO (G2) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X5	33
4.15. Deneysel İ/R modelinde DMSO (G2) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X10	34
4.16. Deneysel İ/R modelinde DMSO (G2) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X20	34
4.17. Deneysel İ/R modelinde DMSO (G2) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X40	35
4.18. Deneysel İ/R modelinde DMSO (G2) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X5	35
4.19. Deneysel İ/R modelinde GSI9 (G3) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X10	36
4.20. Deneysel İ/R modelinde GSI9 (G3) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X20	36

4.21. Deneysel İ/R modelinde GSI9 (G3) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması X40	37
4.22. Deneysel İ/R modelinde SF grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması X100	38
4.23. Deneysel İ/R modelinde SF grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması X200	39
4.24. Deneysel İ/R modelinde SF grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması X400	39
4.25. Deneysel İ/R modelinde DMSO grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması X100	40
4.26. Deneysel İ/R modelinde DMSO grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması X200	40
4.27. Deneysel İ/R modelinde DMSO grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması X300	41
4.28. Deneysel İ/R modelinde GSI9 grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması X100	41
4.29. Deneysel İ/R modelinde GSI9 grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması X200	42
4.30. Deneysel İ/R modelinde GSI9 grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması X400	42

TABLÖLAR

	Sayfa
41. Deney gruplarındaki histopatolojik tablonun Semikantitatif değerlendirilmesi	31
42. Grupların karaciğer dokularındaki TUNEL boyamalarındaki reaktivite dağılımı	43

1. GİRİŞ

Karaciğer vücutta batının sağ üst kadranında yer alır ve en büyük solid organ özelliği taşır. Glikoz metabolizması, plazma proteinlerinin üretimi, safra asitlerinin sentezi ve sekestrasyonu, vitamin depolanması (A, D, E, K ve B12), endojen ve eksojen bileşiklerin biyotransformasyonu ve detoksifikasyonu gibi fizyolojik süreçlerde görev alır. Karaciğerde meydana gelebilecek herhangi bir fonksiyon bozukluğu vücuttaki tüm sistemleri etkiler. Karaciğer rejenerasyon yeteneği ile diğer dokulardan ayrılır. Karaciğerin rejenerasyon yeteneği, kaybolan dokunun fonksiyonlarını kalan karaciğer dokusunun üstlenmesi hipertrofik ve/veya hiperplazik hücresel süreçleri içermesi nedeniyle önemlidir.

Organ transplantasyonu ve büyük cerrahi rezeksiyonlarda mevcut karaciğer dokusunun vücut fonksiyonlarını karşılamak için artış gösterdiği bilinmektedir. Birçok durumla birlikte görülen iskemi reperfüzyon hasarının anlaşılması rejenerasyonda olan bir karaciğer dokusunu destekleyebilmemiz için önemlidir. Karaciğerde hasar sonrası skar dokusunda da fonksiyonel ünitelerin (lobüler yapının) görülmesi, karaciğer rejenerasyonunun farkını oluşturmaktadır.

İskemi, bir organın veya dokunun kan akımındaki yetersizliğe bağlı oluşan geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olabilen hücre hasarıdır. İskemi Reperfüzyon (İ/R) hasarı, hipovolemik şok, hepatik travma, büyük tümör rezeksiyonları ve hepatik transplantasyon esnasında veya sonrasında karşılaşılan bir durumdur. İskemik bir alanda kan akımının yeniden sağlanmasına ise reperfüzyon denir. İskemi reperfüzyon durumlarında doku beslenmesinin tekrar sağlanması serbest oksijen radikalleri ve hücre içi atıkların dolaşıma karışmasına neden olur. İskemiye maruz kalan doku ve diğer organlar bu durumdan etkilenir. İskemi nedeniyle dokuda eksilen hücreler Notch yolağının kök hücreler üzerine etkisiyle yerine konabilir (1). Notch yolağı hücreler arası iletişimle kök hücrelerin farklılaşması ve profilerasyonu üzerinden etki göstermektedir (4).

Hepatik iskemi reperfüzyon hasarının reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimiyle başladığı bilinmektedir. ROS lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarına neden olarak hücrenin fizyolojisini bozar ve sonuç olarak hücre ölümünü indükler. Ayrıca ROS ve oksijenlenmiş moleküller inflamatuvar cevaplara neden

olan sinyal molekülleri olarak etki edebilir. Ancak karaciğer I/R hasarında önemli olan ROS birikiminin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılammış ve yapılan çalışmaların sonuçları klinik uygulamalara yansıtılamamıştır.

Nilco yolağı; Leptin, IL 1 ve Notch bileşenlerinden oluşan komplike bir sistemdir. Birçok tümürün metastazı ve nüksü ile ilişkilendirilmesi proanjiogenetik etkilerine bağlanmaktadır (2,3). Notch yolağının hepatositleri iskemi reperfüzyonda koruduğı düşünölmektedir (5,6). Karaciğer dokusunda iskemi reperfüzyonla oluşan hasarın başlattığı inflamatuvar süreci durdurmak ve anjiogenezi desteklemek amaçlanarak ratlara GSI IX verildi. GSI IX ile Noth inhibisyonu yaparak NILCO yolağı üzerinden iskemi reperfüzyona bağılı hasarın azaltılması amaçlandı.

2.

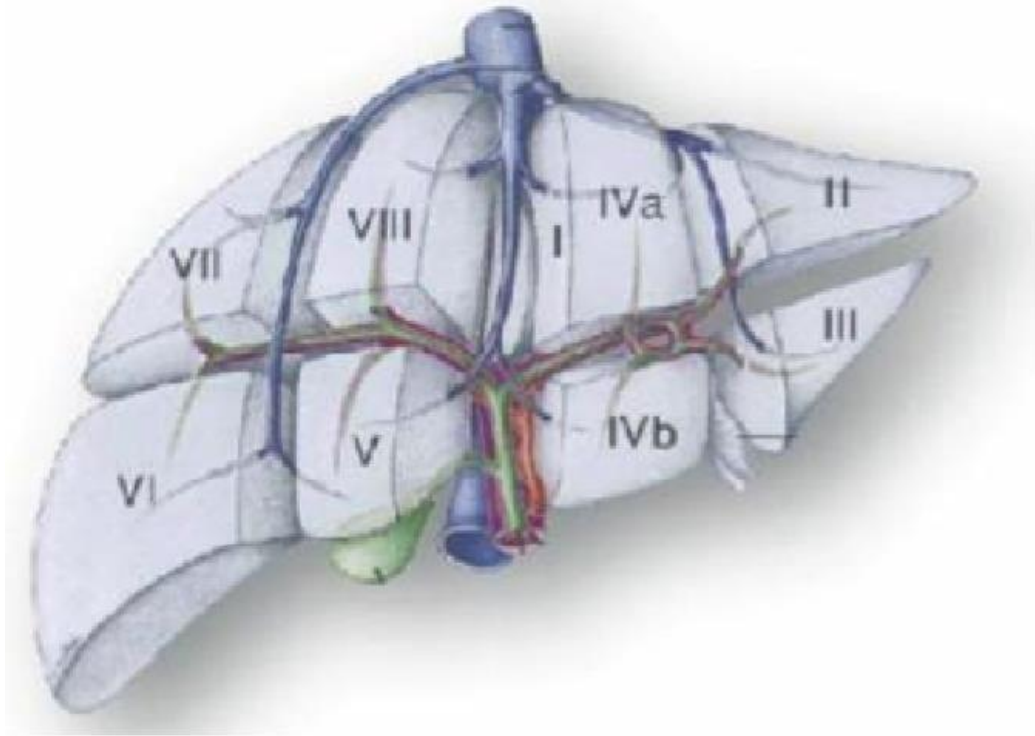
GENEL BİLGİLER**2.1. Karaciğer Anatomisi**

Karaciğer vücudun en büyük iç organıdır ve yaklaşık beden kütlelerinin %2'si kadar bir kütleye sahiptir. Karaciğer batın sağ üst kadranda yer alır. Kubbedeki peritonsuz alanda karaciğer gevşek fibröz doku ile diaframa yapışıktır. Ligamentum coronaria dexter ve sinister karaciğerin kubbesindeki peritonsuz alanın anterior ve posterior'undan her iki yana uzanarak ligamentum triangulare dexter ve sinister'i oluşturur ve karaciğeri retroperitoneal alana tespit eder. Anterior yüzü craniocaudal olarak kat eden ligamentum falciforme hepatis ve inferiorundaki ligamentum teres ile karın ön duvarına tutunur. Karaciğeri duodenuma bağlayan ligamentum hepatoduodenale, içinde arteria hepatica propria, ductus choledochus, vena porta, lenfatik dokular ve küçük sinirler bulundurulur (7).

Falsiform ligaman, transvers fasyadan oluşur ve içerisinde umblikal ven vardır. Karaciğer ve ön barsak arasındaki septum, membranöz hale gelir ve bu membranın arkasındaki boşluk omentum minus olarak adlandırılır. Omentum minusun serbest kenarında safra kanalı, portal ven ve hepatic arter bulunur. Karaciğerin büyük bir kısmı periton ile örtülüdür.

Kanlanması, vena mezenterica superior ile vena lienalis'in birleşmesinden oluşan vena portalis ve truncus coeliacusun dalı olan arteria hepatica communisten ayrılan arteria hepatica propria tarafından sağlanır. Karaciğere gelen kan akımının yaklaşık $\frac{3}{4}$ 'ü vena porta tarafından gelir. Venöz dönüş vena hepatica dexter, sinister ve media ile vena cavaya doğrudur (8).

Rat karaciğerinin safra yolları ve vaskülaritesine göre bölümleri; İki lob, dört sektör ve sekiz segmentten oluşur. Sağ lob anterior (5. ve 8. segmentler) ve posterior (6. ve 7. segmentler) sektörlerle; sol lob lateral (2. ve 3. segmentler) ve medial (4. segment) sektörlerle ayrılır.



2.1. İnsan Karaciğer Anatomik Segmentasyonu (C. Couinaud, 1999)

2.2. Karaciğer Fizyolojisi

Karaciğer metabolik dengenin sağlanmasında önemli fonksiyonlara sahiptir. Glikojen sentezi, bilirubin sekresyonu, ilaçların dönüşümü, lipoproteinlerin sentezi, akut faz proteinlerinin sentezi, elementlerin ve vitaminlerin depolanması ve dağıtımında karaciğer görev alır (8).

Karaciğer parankiminin %80'i hepatositlerdir. Daha az bir kısmı oluşturan parankimal olmayan hücreler olarak gruplandırabileceğimiz ise endotel hücreler, Kupffer hücreleri, lenfositler ve yıldız hücrelerdir. Hepatositler karaciğerin metabolik işlevlerinde esas yükü taşırlar. Endotel hücreleri sinüzoidler ve damarların iç yüzeyini döşer. Kupffer hücreleri sinüzoidlerde fagositoz yapar ve buldukları ortama sitokin salgırlar. Lenfositler immün sistemin bir parçasıdır. Yıldız hücreler ekstraselüler matriks üretir ve A vitamini depolarlar.

Hepatositler albümin, protrombin, fibrinojen gibi proteinlerin sentezlenmesinde görevlidir. Hepatositler kandaki lipid ve karbonhidratları trigliserid ve glikojen şeklinde depolar, yine gerekli durumlarda enerji ihtiyacını hepatositler karşılar. Ayrıca safra salgısı ile yağ emilimini sağlar (10).

Karaciğerde günlük yaklaşık 500-1500 ml safra üretilir. Karaciğer safra asitlerini kolesterolden sentez eder ve kolesterol sentezi safranın vücuttan atıldığı başlıca yoldur. Safra ince barsaklarda en çokta distal ileumdan geri emilir ve günde altı ila on kez olmak üzere enterohepatik dolaşıma girer (11).

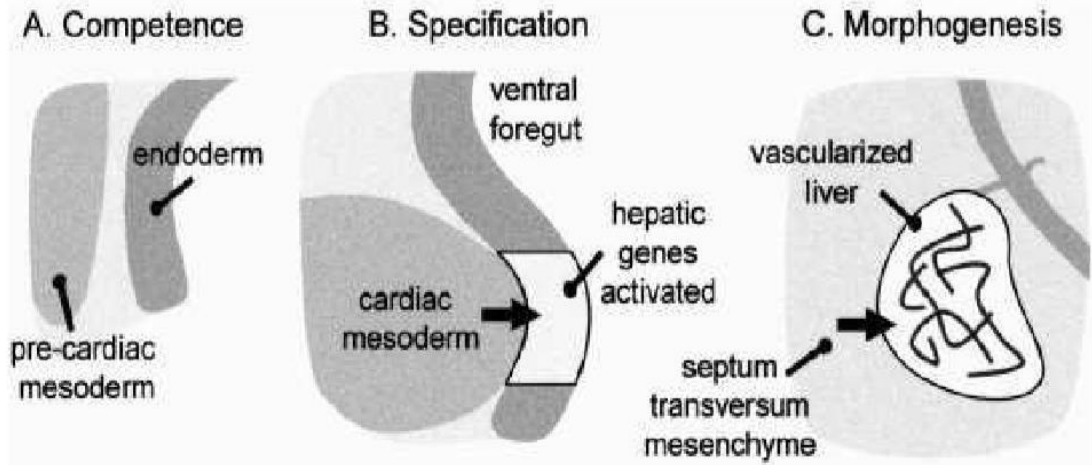
2.3 Karaciğer Embriyolojisi ve Histolojisi

Karaciğer intrauterin hayatın 3. haftasında embriyolojik ön barsağın distal kısmından oluşmaya başlar. Karaciğer, ön barsağın (foregut) endoderminden ve septum transversumun mezoderminden köken alır. Embriyolojik hayatın 4. haftasında duodenumun geliyeceği bölümden divertikülleşme oluşur. Bu divertikül içerisindeki hücreler zamanla hepatobilier sistemi oluşturacaktır. Divertikülün kaudal bölümü duktus sistikus ve safra kesesi, kranial bölümü ise karaciğeri oluşturacaktır (9).

Karaciğer parankimi bilier epitel hücreleri, hepatositler ve Kuppfer hücrelerinden oluşmaktadır. Karaciğer parankiminde bu hücreler lobul olarak isimlendirilen yapıları oluşturmaktadır. Her lobülün orta kısmında santral ven bulunur, Santral venin etrafında hepatositler bulunur ve lobüller portal yollarla ayrılır. Portal yollardan arteriyoller, portal venin dalları, küçük safra kanalları, lenfatikler geçer. Karaciğer lenfi disse aralığında oluşur. Disse aralığı sinüzoidlerin endotel tabakası ile hepatositler arasındaki alandır. Disse aralığında bulunan ito hücreleri yağ depolayarak sirotik süreçte rol almaktadır. Kuppfer hücreleri karaciğerin dokusunun fagositoz ile hücrel savunmasını oluşturmaktadır.

Karaciğer portal ven ve hepatic arterden beslenir. Kan hepatic lobülün periferinde bulunan portal ven ve hepatic arter ile girer. Kan lobülün ortasında bulunan santral vene doğru akar. Üretilen safra ise safra kanallarına boşaltılır.

Karaciğer dolaşımdaki metabolitlerin biriktirilip taşınması ve toksik maddelerin nötralize edildiği yerdir. Bu eliminasyon ekzoksin bir sekresyon olan safra ile gerçekleştirilir. Safra üretimi 12. Haftada hepatik hücreler tarafından başlar (8).



2.2. Karaciğerin embriyolojik gelişimi (Zaret, 2000)

2.4. Karaciğer Rejenerasyonu

Gerçek anlamda karaciğer rejenerasyonu fikrini ilk kez 1833'te Cruveilhier ortaya atmıştır (12). 1900'lü yıllarda sıçanlar üzerinde parsiyel lobektomi ile karaciğer dokusu hakkında daha fazla veri elde edilmeye başlanmıştır. Bu çalışmalarda %75'lik karaciğer doku kaybının yaklaşık 1 ay içerisinde rejenerasyon olduğu gözlenmiştir (13-16).

Cerrahi olarak çıkarılan bir karaciğer lobu yeniden oluşmaz. Ancak organizmanın ihtiyaçlarını karşılayacak fonksiyonel hacmini, kalan lobun hipertrofik ve/veya hiperplazik gelişimiyle yeniden kazanır. Burada rejenerasyon kavramının reperasyon –onarım- kavramından farklılığını belirtmekte fayda vardır. Diğer dokularda gerçekleşen onarımda, kaybolan dokunun yerini orijinal dokudan farklı olarak fibrozis dokusu doldururken rejenerasyonda kaybolan işlevsel hacim, orijinal dokuya ait hücre tipiyle ve mikromimarinin korunması söz konusudur. Karaciğerde fonksiyonel parankimin kaybı birçok şekilde gerçekleşebilir. Cerrahi rezeksiyon,

viral enfeksiyon, metabolik hastalık, toksik etkenler, vasküler patolojiler İ/R hasarın oluşmasına neden olabilir.

Karaciğer geniş proliferasyon özelliği ile dikkat çeken bir organdır. Sağlıklı karaciğer hepatositlerinin %0.0012-%0.01'i hayatın herhangi bir döneminde mitoz bölünme sürecine girmektedir (17-19). Karaciğerdeki bu hücre yenilenmesi, toksik karaciğer hasarı veya cerrahi rezeksiyon gibi kronik süreçlerde bazı çalışmalarda %3 veya daha da yüksek seviyelere ulaşabilmektedir (20,21).

Rejenerasyon doku hasarı ve kısmi eksikliğine karşı gelişen tamamlayıcı hipertrofik ve/veya hiperplazik bir yanıttır. Birçok çalışmada karaciğer dokusunun herhangi bir nedenle hasarı sonrasında karaciğer kütle ve fonksiyonlarının yeniden kazanılması süreci rejenerasyon olarak tanımlanmıştır (22-26).

Zehirlenme gibi metabolik ya da travma gibi cerrahi bir sebepten karaciğer rejenerasyonu (LR) oluşmaktadır. Rejenerasyon sürecini çevre dokular üzerinde iltahabı azalttığı öngörülebilir (27). Rejenerasyon yeteneği, hepatik stellat hücreler (HSC'ler) ve hepatositler gibi çeşitli olgun hücrelerin proliferasyonu ile karakterizedir (28). Rejenerasyon sitokinler, büyüme faktörleri ve metabolik yolların rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Sitokinler hücreler arası etkileşim ve iletişimde rol alan küçük proteinlerdir. Aynı hücre gruplarında aynı sitokinlerin farklı sonuçlar oluşturabildiği karmaşık bir etkileşim sistemi olması çalışmaları zorlaştırmaktadır. Sitokin sinyalizasyonu oldukça değişkendir. Hücrelerin stokin yanıtları inhibisyon ve aktivasyon şeklinde her durum için net olarak tanımlanamamaktadır. Bir stokin farklı bir dokuda farklı bir sitokinin sentezini başlatabilir ya da bitirebilir.

2.5. İskemi Reperfüzyon Hasarı

Karaciğer İR hasarı ilk kez 1975'de deneysel olarak gerçekleştirilen karaciğer naklinde gösterilmiştir (29). Nakil sonrası greft nekrozunun patogenezinde konjesyon ve ilerleyici tromboz olduğu görülmüştür (30).

Karaciğer kan akımının yaklaşık %75 lik kısmı portal venden kalan kısmı ise hepatik arterden sağlanmaktadır (29,31). İki ayrı sistemde kan alması ve anaerobik

glikoliz için gerekli glikoz miktarına sahip olsa da karaciğer dokusunda da hipoksik hasar görülmektedir (32).

Pringle manevrası, karaciğerle ilgili vasküler bir işlem için karaciğere giren kan akımının kapatılması işlemidir. Klemp ya da elle yapılan bu manevranın uzun süre yapılması karaciğer dokusunda iskemik hasara neden olur (29,32). Bazı ameliyatlarda karaciğere giren kan akımı belirli sürelerde açılıp kapatılarak iskemi hasarını azaltmak amaçlanmaktadır.

İskemi/Reperfüzyon sonrasında akciğer, kalp, böbrek fonksiyonlarının etklenmesi İ/R hasarının diğer organlar üzerine etkisini de göstermektedir (33-37). İskemik dokunun boyutlarının artması reperfüzyonda oluşacak metabolik yük nedeniyle daha fazla uzak organ hasarı oluşmasını riskli kılmaktadır. Hücresel fonksiyonlar için geçerli olan pH değeri iskemi reperfüzyon hasarında asidoz yönüne kaymaktadır. Karaciğer İ/R üzerine yapılan çalışmalarda reperfüzyon sürecinin karaciğer cerrahisinde ve özellikle transplantasyonda karaciğerin canlılığına doğrudan ve dolaylı etkileri görülmektedir (37,38). Reperfüzyon sonrası metabolik asidoz özellikle böbrek, kalp ve akciğerlere etki ederek nakil sonrası mortalitede etkili olmaktadır.

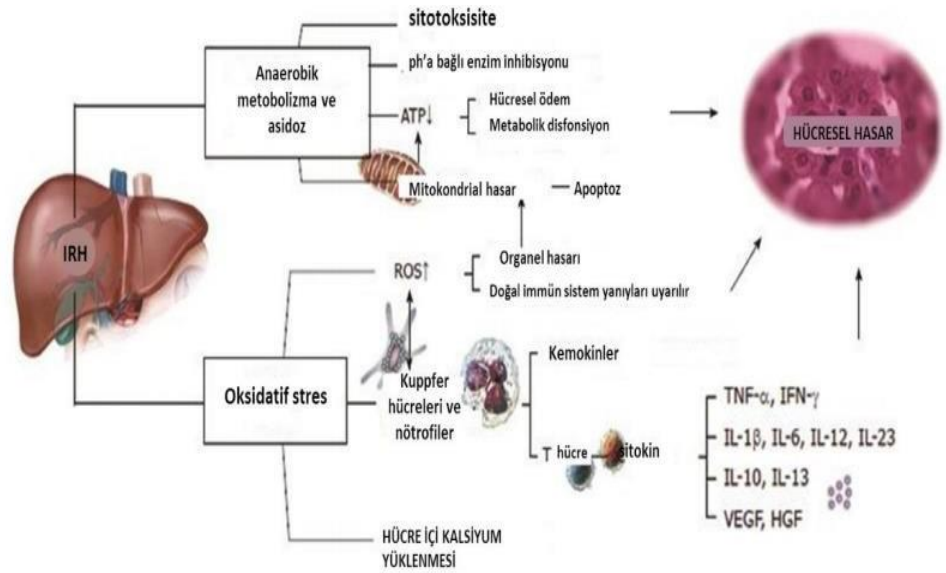
İskemi durumunda hücre membranındaki enerji bağımlı Na^+/K^+ pompasını durdurur. Yeterli ATP sağlanamazsa hücre dışında fazla olan sodyum hücre içine girmesine ve hücre içinde fazla olan potasyonda hücre dışına çıkmasına neden olur. Sonuç olarak hücre boyutları korunamaz. İskemi süresince anaerobik glikolizle adenzin trifosfat (ATP) üretilmeye çalışılır, bu da laktik asit üretimi ile sonuçlanır. Düşük pH nedeniyle diğer hücrelerde fonksiyon göremez.

Adenzin trifosfat bağımlı çalışan diğer bir sistem ise ekstrasellüler ve intrasellüler Ca^{2+} 'u dengelemektedir. Hücre içi kalsiyumun yükselmesiyle fosfolipazlar aktive olurlar. Fosfolipazların aktivasyonu araşidonik asit oluşumu ile sonuçlanır. Araşidonik asit mitokondri fonksiyonlarını bozarak serbest radikal miktarını artırır (39,40). Oluşan tüm bu hücresel atıklar reperfüzyon süreciyle dolaşıma ulaşır.

Reperfüzyon hasarı; belirli bir süre iskemiye maruz kalan dokuların tekrar perfüze olması sonucu mikrosirkülasyonda görülen tıkanmalar ve tekrar perfüze olan

dokunun nekrozu ile karakterize bir hasarlanma olarak tanımlanmıştır (41). Reperfüzyon süreciyle dokunun ihtiyacı olan enerji sağlanmasına rağmen dolaşıma verilen hücresel atıklar hasarı arttırmaya devam etmektedir (42).

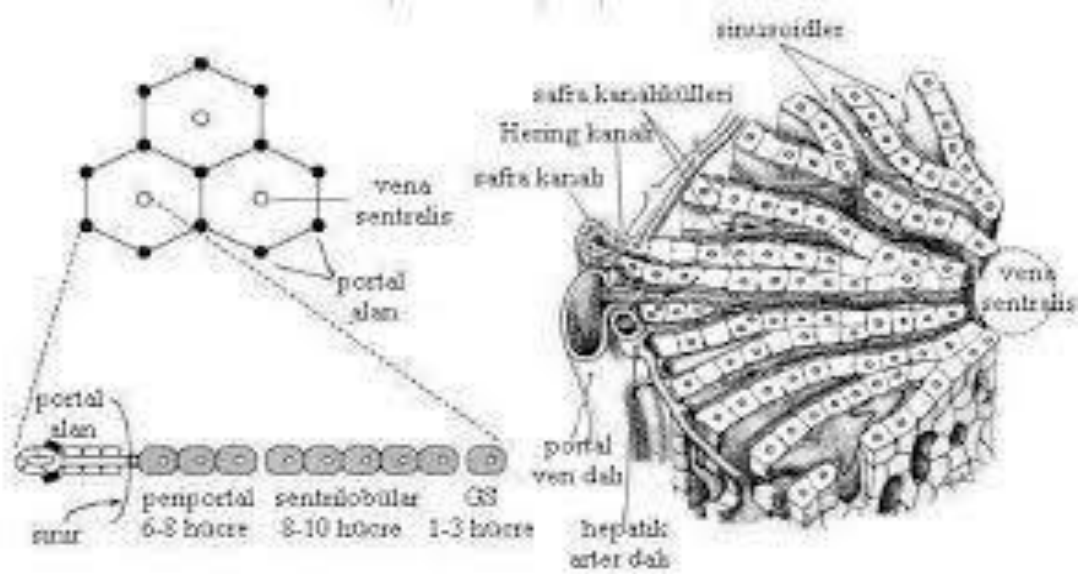
İskemik periyot süresince dokuda toksik serbest oksijen radikalleri üretilir. Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikalleri ve süperoksit radikalleri, endotelyal hasar, artmış vasküler geçirgenlik ve konjesyona neden olmaktadır (43,44). Dolaşımla diğer organlarında fonksiyonları da serbest oksijen radikallerinden etkilenmektedir.



2.3. I/R hasarı metabolizması (Lian-Yue Guan ve arkadaşları)

Karaciğer üzerine yapılan iskemi reperfüzyon çalışmalarında iskeminin erken ve geç aşamaları incelenmiş doku hasarına etkili olan mekanizmalar açıklanmaya çalışılmıştır. İskemi reperfüzyon hasarı oksidatif stres, kupffer hücreleri, sitokinler ve kemokinler gibi farklı yollarla değerlendirilmiştir (45,46,47). Farklı mekanizmalar üzerinden açıklanmaya çalışılan iskemi reperfüzyon hasarı bize NILCO yolağı gibi farklı bişenlerin etkilerini araştırmaya yönlendirmektedir.

Kupffer hücreleri dokuya spesifik makrofaj hücreleridir. I/R sırasında artan TNF- α 'nın en önemli sentez yeri kupffer hücreleridir. I/R hasarında artan Kupffer hücre aktivasyonuna bağlı olarak nitrikoksit inhibisyonunun, akut akciğer hasarının azalttığı görülmüştür (48,49). İL 1'in TNF- α ile benzer etkilere sahip olması NILCO üzerinden karaciğer hasarını azaltabileceğimizi düşündürmektedir.



2.4. Karaciğerin histolojik yapısı (Fausto and Campbell, 2003)

2.6 NILCO (İL 1, NOTCH, LEPTİN)

LEPTİN

Leptin, protein yapıda adipoz dokudan sentezlenen ve dolaşıma salınan bir hormondur (50). Leptin gün içerisinde farklı ritimleri olan pulsatil bir salgılanma gösterir. Serum leptin seviyesi gece yarısı ve sabahın erken saatlerinde en yüksek, öğle saatlerine yakın zamanda ve öğle sonrası ortalarına kadar en düşük düzeyde seyrederek (55). Leptin'in en bilinen rolü enerji dengesi ile ilgilidir. Leptin düzeyleri yağ dokusu ve vücut ağırlığı ile ilişkilidir (61). Leptin, 16 kDa peptid hormonu ve gıda alımını, metabolizmayı, vücut yağın, enerji tüketimini ve nöroendokrin fonksiyonunu düzenlemede rol oynayan inflamatuvar sitokindir (62). Leptin sekresyonu cinsiyete bağlıdır. Kadınlar erkeklerden üç kat daha yüksek leptin

seviyeleri göstermektedir, bu da androjen etkileri ve adrenokortikotropik hormondan kaynaklanmaktadır (63).

Birçok metabolik etkisi bulunmakla beraber esas etkisinin çoğunu merkezi sinir sisteminde hipotalamusta ve periferik dokularda, özellikle akciğer, böbrek, karaciğer, adrenal bez, pankreasta yer alan reseptörlere bağlanarak oluşturur (51,58). Merkezi sinir sisteminde yer alan leptin reseptörleri, özellikle hipotalamusta yer alan arkuat nükleus, paraventriküler nükleus, ventral premamiller nükleus ve dorsomedial nükleusda (DMN) bulunmaktadır (52).

Leptin, hipotalamustaki reseptörlerden aldığı sinyal ile çoğunlukla beyaz adipoz dokudan salınmakla beraber az da olsa kahverengi dokudan da üretilip salınmaktadır (53). β -3 Adrenerjik reseptör uyarısı yağ hücresinde leptin salgısını başlattığı ve β -3 Adrenerjik reseptör agonistinin leptin mRNA yapımını azalttığı gösterilmiştir (54).

Leptinin seviyesi yağ dokusu kitlesi pozitif olarak ilişkilidir. Obez insanlar daha yüksek leptin mRNA'sına ve plazma leptin seviyelerine sahiptirler. Buna karşılık açlık süresince leptin seviyeleri hızla düşer. Üretilen leptin kanla taşınır ve beyin üzerinde direkt etki gösterir. İnsanlarda leptinin yarılanma ömrü yaklaşık 25 dakikadır (54-56).

Leptin iki anjiogenetik faktörü indükler; VEGF ekspresyonunu artırabilecek, IL-1 ve Notch. Ek olarak, leptin, anjiogenez gelişimi için gereken proteazların ve adezyon moleküllerinin salgılanmasını ve sentezini indükler. Adipoz dokudan miktarı yükselen Leptin seviyeleri meme kanserinde artmış Notch seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir (64-66). Leptin tümör anjiogenezini etkileyebilir (64). Leptin sinyali meme kanserinde pro-anjiyojenik, inflamatuvar ve mitojenik olayları etkileyebilir (68-71).

Leptin'in insan ve memelilerde fonksiyonları arasında beslenme davranışlarını düzenleme, otonom sinir sistemi fonksiyonlarını ayarlamak, metabolizma hızını ayarlamak, sempatik aktivitede artış, büyüme, gelişme ve termoregülasyonda rol oynar (58). Ayrıca, lipopolisakarit (LPS) veya tümör nekrosifaktör (TNF-a) veya interlökin (IL) -1 gibi proenflamatuar sitokinlerin uygulanması hem insanlarda hem de kemirgenlerde serum leptin konsantrasyonlarında önemli artışlara neden olmuştur. Bu bulgular leptinin akut ve muhtemelen kronik inflamasyonun patofizyolojisinde rol oynadığını

düşündürmektedir (60). İskemi reperfüzyon süresince oluşan inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde NILCO yolağının bir basamağını oluşturan leptinin de hasar mekanizmasında etkin olduğu aşikardır.

NOTCH

Çok hücreli organizmaların uygun gelişimi, hücrelerin davranışlarını mekansal ve geçici olarak koordine etmelerini gerektirir. Hücre-hücre iletişimi hücre büyümesini, çoğalmasını, hayatta kalmasını, kaderi, farklılaşmasını ve morfolojisini düzenler. Notch familyası reseptörlerinin aracılık ettiği hücre-hücre sinyali, nematode'dan insana değişen organizmalarda çok çeşitli gelişimsel ve fizyolojik bağlamlarda tüm süreçlerde yer almıştır (72). Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, insanlarda çeşitli patolojilerde de rol oynamıştır (73). Notch yolu, gelişimde tekrar tekrar kullanılan temel sinyal yollarından biridir ve hem hücre tipi spesifikasyonu hem de organogenezde rol oynar. Notch yolağı ilk olarak *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*'da tanımlanmıştır (74).

Seksenlerin başlarında, Notch geninin bir 300kDa tek geçişli transmembran reseptörünü kodladığı bulundu. Hücre dışı alanı Notch reseptörü ligand bağlanması için gerekli 36 epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tekrar içerir. Hücre içi alan, hücrenel sinyalleşmede rol oynar ve çoklu korunmuş protein alanları içerir. Daha sonra insanlarda Notch benzeri moleküller tanımlanmıştır. Memelilerde, şimdiye kadar dört Notch reseptörü (Notch 1-4) ve beş transmembran ligandı (Jagged1, Jagged2, Delta benzeri1, Delta benzeri3 ve Deltalike4) tarif edilmiştir. Notch başlangıçta nörojenik bir gen olarak sınıflandırılmasına rağmen, *Drosophila* (böcek) embriyolarının ilk karakterizasyonu bile Notch sinyallerinin yüksek derecede bir gen üzerinden farklı fenotipik özelliklere etki ettiği açıkça gösterilmiştir.

Notch sinyallemesi, Notch reseptörleri ve ligandları (Delta veya Jagged) arasındaki etkileşimlerin bir sonucu olarak hücre-hücre teması üzerine aktive edilir. Moleküler düzeyde, Notch reseptörünün ligand bağlanması ile tetiklenmesi, Notch reseptörünün iki proteolitik yarıma olayını teşvik etmektedir. İlk bölünme, metaloproteazların ADAM ailesi tarafından katalize edilirken, ikinci bölünmeye, presenilin, nicastrin, PEN2 ve APH1 içeren bir enzim kompleksi olan gama sekretaz aracılık eder (75). İkinci bölünme, daha sonra çekirdeğe yerleşen ve transkripsiyonel

bir koaktivatör olarak işlev gören Notch intracellular domain 'i (NICD) serbest bırakır. NICD doğrudan DNA'ya bağlanamaz ancak DNA bağlayıcı protein RBP-J (Rekombinasyon sinyali sekans bağlayıcı protein Jk) ile heterodimerize olur ve RBP-J bağlanması içeren genlerin transkripsiyonunu aktive eder. İlginç bir şekilde, RBP-J başlangıçta Vales ve meslektaşları tarafından transkripsiyon baskılayıcısı olarak tanımlandı (76). Adenovirüs pIX geninin promotör bölgesini incelerken, 10bp'lik bir baskıcı eleman karakterize edildi ve RBP-J'nin bu elemente bağlanan faktör olduğu gösterilmiştir. Daha sonra RBPJ bağlanma bölgesi, diğer transkripsiyon aktivatörleri Gal4-VP16 veya SP1'in yanında raportör tahlillerine yerleştirildi ve RBP-J'nin transkripsiyonel aktivasyonu etkileyebileceği gösterilmiştir. Diğer araştırmacılar ayrıca TK-promotör elemanına birden fazla RBP-J bağlanma yeri yerleştirerek RBP-J baskıcı aktivitesini gösterdiler (77). RBP-J aracılı baskı, viral aktivatör EBNA2 ilavesiyle veya RBP-J'nin VP16 aktivasyon alanına füzyonuyla giderilebilir. RBP-J aktivatörü / baskılayıcı paradoksu, RBP-J yoluyla baskı ve aktivasyonun, hedef genlerin pozitif veya negatif bir şekilde transkripsiyonunu etkileyen farklı protein komplekslerinin içerdiğinin anlaşılmıştır. Ligandın yokluğunda, dolayısıyla nükleer NICD olmadan, RBP-J, çekirdek kompresör komplekslerinin işe alınmasıyla Notch hedef genlerini bastırır. RBP-J'ye NICD bağlanması, bastırılmış durumdan etkin duruma geçiş için çok önemlidir. NICD ilk önce RBP-J'den çekirdek kompresörleri yer değiştirir, bu da RBP-J bağlanma bölgeleri içeren promotörlerin alçalmasıyla sonuçlanır ve daha sonra Notch hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive etmek için bir koaktivatör kompleksi görevi görür.

Notch sinyal yolu, dört Notch reseptörü ve beş ligand içeren memelilerde korunmuş bir ligand-reseptör sinyal yoludur (78). Notch 1, Notch 2, Notch 3 ve Notch 4 olarak adlandırılan dört alıcı benzer bir yapıya sahiptir. Her Notch reseptörü, Notch 1-4, sırasıyla 36, 36, 34 ve 29 epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tekrarlara sahiptir (79). Ligandlar iki ana gruba ayrılabilir: Delta benzeri ligandlar (DLL1, DLL3 ve DLL4) ve Jagged ligandları (Jag1 ve Jag2) (80). Dört Notch reseptörü ve beş ligand transmembran molekülleridir, yani Notch sinyal yolunun aktivasyonu, bitişik hücrelerin yüzeyi üzerindeki reseptörlerin ve ligandların etkileşimi ile hücre kaderini kontrol eder (81). Ayrıca aktivasyonun metaloproteaz, tümör nekroz faktörü-a-dönüştürücü enzim (TACE) ve p-sekretaz ile proteoliz

yoluyla düzenlendiği gösterilmiştir (82). Hücreler arası aktivasyon meydana geldiğinde, Notch reseptörünün (ICN) hücre dışı ve hücre içi alanları, sırasıyla TACE ve P-sekretaz tarafından salınır. Daha sonra hücre dışı alan, bitişik bir hücrenin yüzeyindeki liganda bağlanır ve ICN çekirdeğe taşınır. ICN, ankirin tekrarları, bir RAM alanı, bir trans-aktivasyon alanı (TAD), bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve bir PEST alanı içerir (83). Her etki alanı Notch sinyal yolu aktivite için gereklidir. ICN aktif bir transkripsiyon kompleksi oluşturur ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde doğrudan rol oynar (84). Son çalışma verilerinden, Notch sinyal yolunun hedef genleri, birkaçını belirtmek gerekirse bunlar, Hes ailesi, Hey, NF- κ B, VEGF ve c-myc'dir. Bu Notch hedef genlerinin hepsinin tümör oluşumu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (85).

Notch sinyali, sıklıkla kötü prognoz ve ilerlemiş hastalığın bir göstergesi olarak tanımlanan meme kanserinin ayırt edici özelliğidir. Bu nedenle meme kanseri tedavisi için Notch sinyalleri hedeflenmektedir (90,91). Ayrıca leptin sinyalinin artması meme kanseri büyümesi, anjiyogenez ve kötü sonuçlarla da ilişkilidir (92).

Notch sinyal yolunun hücre farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozda önemli bir rol oynadığı da gösterilmiştir (86). Artan kanıtlar, Notch sinyal yolunun, enflamatuvar sitokinleri, anjiogenezi ve ilaç direncinin ekspresyonunu etkileyebileceğini göstermiştir (87-89). Bu nedenle, Notch sinyal yolundaki kesintilerin birçok çalışmanın bildirdiği gibi tümör oluşumuna üzerinde etkisi olduğu görülmektedir. Hiç şüphe yok ki, Notch sinyal yolunun daha iyi anlaşılması, kanser tedavisine yeni bir bakış getirebilir ve Notch ile ilişkili tümörleri tedavi eden ve bunlardan muzdarip olanlara umut getirebilir.

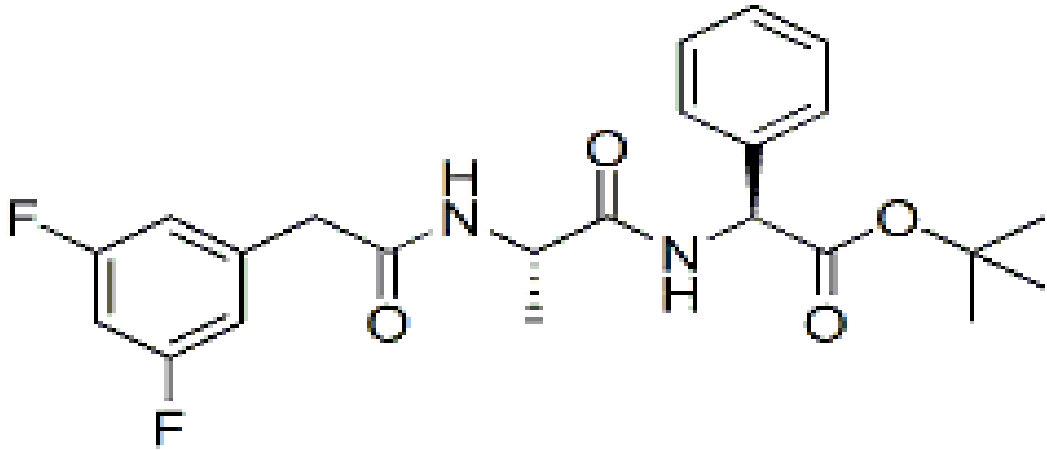
İL 1

Sitokinler vücutta çeşitli hücreler tarafından sentezlenen, multi fonksiyonel polipeptidlerdir. İmmün sistem hücreleri arasındaki ilişkilerin, inflamatuvar cevabın ve hematopoetik kök hücrelerin düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik cevapta önemli rol oynarlar. Sitokinler herhangi bir şekilde depolanmayıp ihtiyaç duyulan zamanda üretilir. Depolanmayan protein yapıların üretilmesi için gen transkripsiyonu gerekmektedir. Transkripsiyon süreleri kısadır. Sitokinler birbirlerinin sentezini ve/veya salınımını etkilemektedir.

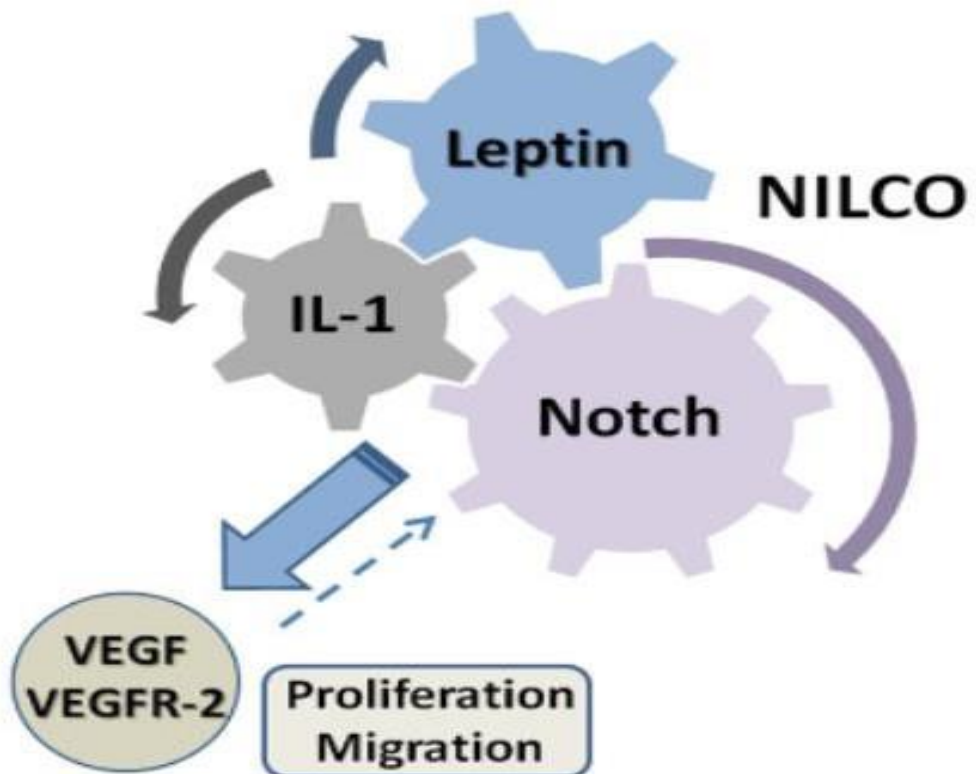
İnterlökin 1 bir proinflamatuvar stokindir. IL-1, esasen lokal bir sitokin ağını indükleyerek ve etkilenen bölgelere inflamatuvar hücre infiltrasyonunu artırarak inflamasyonu başlatır ve çoğaltır. Pro-inflamatuvar araçların son zamanlarda tümör aracılı anjiyogenezde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir ve sitokinler üzerinden durdulabilmesi kanserin progresyonunu etkileyebilir. IL-1 birçok inflamatuvar hastalığa, immün ve inflamatuvar cevapları başlatarak ve güçlendirerek, aracılık eder (93).

IL-1'in tip I (IL-1RI) ve tip II (IL-1RII) olmak üzere iki reseptörü vardır. Ayrıca, sinyalde kritik rol oynayan bağlanma bölgesi, IL-1 β 'nın IL-1RI'e bağlanma affinitesini arttıran ve bir aksesuar protein olan IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) de tanımlanmıştır (94- 96). IL-1, deneysel modellerde anjiogenezi, tümör büyümesini ve metastazı destekleyen, bazı kanserlerde agresif tümör biyolojisi ile ilişkisi bulunan pluripotent bir sitokindir (97). IL-1 ve leptin, kanserde VEGF'yi indükleyerek anjiogenez üzerinden etki göstermektedir (101,102). IL-1 in vitro ve in vivo deneylerde endotel hücresinde anjiogenetik etkilerini indüklediği görülmüştür (98-100). Ancak henüz IL-1 salgılama ve etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır.

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde nilco yolağının neovaskülarizasyonu arttırması hücre hasarını ve inflamasyonu azaltması beklenmektedir. Farklı dokularda nilco yolağının alt basamakları üzerine yapılan çalışmalarda ki anlamlı sonuçlar ümit vericidir. Leptin üzerinden hormonal interlökin üzerinden immün sistemin, Notch üzerinden hücrel sinyal yollarının etkin olduğu kompleks bir sistemi değerlendirmeyi amaçladık.



2.5. GSI IX (DAPT γ -sekretaz inhibitörü)



2.6. NILCO mekanizması

3.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Ortam

Bu deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 15.05.2019 tarihinde etik kurul yönergelerine uygun görülerek 704-1/2019 kayıt no ile onaylanmıştır. Deney hayvanlarının üretilmesi, yetiştirilmesi ve operasyon odasının temini Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi TICAM (Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi) laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışmada 8- 12 haftalık, yaklaşık 200-250 gr ağırlığında Sprague-Dawley cinsi sağlıklı ve dişi toplamda 24 adet denek kullanıldı. Denekler rastgele her grupta 8 hayvan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Sıçanlar, deney öncesi tel kafeslerde, her kafeste 4 hayvan olarak rastgele gruplandı. Ortam sıcaklığı 20-25C olacak şekilde, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık odada tutuldular. Sıçanlar, standart sıçan yemiyle serbest olarak beslendi. Su içmeleri kafes sulukları ile serbest olarak sağlandı.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

- a) Ketamin Hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) 60 mg/kg dozunda intramusküler (im) kullanıldı.
- b) Xylazine Hidroklorit (Rompun, Bayer Şişli, İstanbul) 10 mg/kg dozunda im kullanıldı.

GSI-IX (Selleckchem, USA) 3. gruba sırasıyla 10 mg /kg dozunda operasyondan önce 15 gün boyunca hergün intraperitoneal (ip) olarak kullanıldı.

Deney Gruplarının Oluşturulması

24 adet rat, her biri 8 hayvandan oluşan 3 gruba randomize olarak ayrıldı.

- 1) SF (Salin) grubu: Operasyondan 15 gün önce 10 mg /kg dozunda SF intraperitoneal olarak verilmeye başlandı. Operasyon günü derin sedasyon altında altında ratlar supin pozisyonda operasyon masasına alındı. Antisepsis sonrası orta hat insizyonla batına girilerek karaciğer altında portal triad bulundu. Portal triad çevre

dokulardan ayrıştırıldı. Ardından klemp ile oblutere edildi. 90 dk iskemiden sonra portal triad serbestlenerek 12 saat reperfüzyon sürecine geçildi.

2) DMSO (çözücü madde) grubu: Operasyondan 15 gün önce 10 mg /kg dozunda DMSO intraperitoneal olarak verilmeye başlandı. Operasyon günü derin sedasyon altında altında ratlar supin pozisyonda operasyon masasına alındı. Antiseptik sonrası orta hat insizyonla batına girilerek karaciğer altında portal triad bulundu. Portal triad çevre dokulardan ayrıştırıldı. Ardından klemp ile oblutere edildi. 90 dk iskemiden sonra portal triad serbestlenerek 12 saat reperfüzyon sürecine geçildi.

3) GSI-IX ile tedavi grubu: Operasyondan 15 gün önce 10 mg /kg dozunda GSI-IX intraperitoneal olarak verilmeye başlandı. Operasyon günü derin sedasyon altında altında ratlar supin pozisyonda operasyon masasına alındı. Antiseptik sonrası orta hat insizyonla batına girilerek karaciğer altında portal triad bulundu. Portal triad çevre dokulardan ayrıştırıldı. Ardından klemp ile oblutere edildi. 90 dk iskemiden sonra portal triad serbestlenerek 12 saat reperfüzyon sürecine geçildi.

Reperfüzyon süresi tamamlandıktan sonra tüm hayvanlara tekrar tarif edildiği şekilde laparotomi yapılarak karaciğer doku ve kan örnekleri alınarak ötenazi uygulandı. Doku örneklerinden real time PCR ile Notch 1i Jagged 2 Kaspaz 3-8-9, Leptin, ObR, IL-1 beta ve IL 1 R gen ekspresyonuna bakıldı. Yine doku örneklerinden TUNEL ile apoptoza bakıldı. Kan örneklerinden ise serum SOD, CAT, MDA, AST ve ALT biyokimyasal olarak çalışıldı.

Cihazlar

- Real-time PCR cihazı (Thermo, USA)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Wehingen, Germany)
- Thermal cycler (Corbett Palm Cycler, Mortlake, Australia)
- Vorteks (Heidolph, Germany)
- Doku homojenizatörü (Tissue-Lyser II-Qiagen VX350 Series 2 WPS 3601C12, Hilden, Germany)

- Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA)
- 80° C Dondurucu (Telstar Life Science Solutions, Spain)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Mikro pipet takımı
- Pipet uçları (10'luk, 100'lük ve 1000'lik)

Kimyasal malzemeler

- Lizis Buffer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- β -merkaptoetanol (Biorad, California, USA)
- Proteinaz K (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- TE Buffer (Invitrogen, California, USA)
- Wash Buffer 1 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- Wash Buffer 2 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- %70'lik etanol (Sigma, USA)
- Nükleaz Free Water (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- RNase Free Water (Qiagen, Hilden, Germany)
- RNA Later (Invitrogen, California, USA)
- Buffer 5X (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- dNTP Miks (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- DTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Random Primer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Oligo-dT Primer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Protektor RNAase inhibitör (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Omniscript Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

- Reconstituted primer /probe miks (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- 2X qPCR Mastermiks (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Ameliyat Prosedürü:

Derin sedasyon altında altı ratlar supin pozisyonda operasyon masasına alınır. Antisepsis sonrası orta hat insizyonla batına girilerek karaciğer altında portal triad bulundu. Portal triad çevre dokulardan ayrıştırıldı. Ardından klemp ile oblutere edildi. 90 dk iskemiden sonra portal triad serbestlenerek 12 saat reperfüzyon sürecine geçildi. Reperfüzyon süresi tamamlandıktan sonra tüm hayvanlara tekrar tarif edildiği şekilde laparotomi yapılarak karaciğer doku ve kan örnekleri alınarak ötenazi uygulandı.



3.1 Deney aşaması ticam esogü şekil 1 ve 2

Plazma Katalaz Düzeylerinin Ölçümü

Plazmada Katalaz ölçümü Cayman marka Katalaz ölçüm kiti ile yapıldı (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar nmol/dk/ml olarak verildi.

Plazma SOD Düzeylerinin Ölçümü

Plazmada SOD ölçümü Cayman marka Süperoksid Dismutaz ölçüm kiti ile yapıldı (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar U/ml olarak verildi.

Plazma MDA Düzeylerinin Ölçümü

Plazmada MDA ölçümü Cayman marka TBARS ölçüm kiti ile yapıldı (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ olarak verildi.

Plazma AST Düzeylerinin Ölçümü

Plazmada AST ölçümü Roche marka ölçüm kiti ile yapıldı (Roche, Germany). Absorbans okuması Roche Cobas marka otoanalizör cihazında yapıldı. (Roche, Germany). Sonuçlar IU/L olarak verildi

Plazma ALT Düzeylerinin Ölçümü

Plazmada ALT ölçümü Roche marka ölçüm kiti ile yapıldı (Roche, Germany). Absorbans okuması Roche Cobas marka otoanalizör cihazında yapıldı. (Roche, Germany). Sonuçlar IU/L olarak verildi.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Tekniği ile Hedef Genlerin Tayini

RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu çalışmasında GeneJet RNA Purification Kit kullanıldı.

Çözeltilerin hazırlanması

□ 20 μl β -merkaptoetanol, 1 ml Lizis Buffer içine eklendi ve vortekslendi.

- 590 µl TE Buffer'a 10 µl Proteinaz K eklendi ve vortekslendi.

İşlem basamakları

1. Doku örnekleri, içinde metal boncuk bulunan eppendorflara alındı. Üzerine 300 µl Lizis Buffer eklendi. 30 frekansta 4 dakika homojenize edildi.
2. Homojenizasyondan sonra boncuklar alındı ve örnek başka bir tüpe aktarılarak üzerine 600 µl Proteinaz K eklendi. Vortekslendikten sonra 15-25 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. 12.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
4. Süpernatantın üzerine 450 µl etanol eklenerek pipetle karıştırıldı.
5. Bu sıvının 700 µl'si GeneJet RNA Purification kolonuna aktarıldı ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüjden sonra kolonun altındaki toplama tüpüne biriken sıvı uzaklaştırılarak, kolona 700 µl daha sıvı eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Toplama tüpü atılarak kolon 2 ml'lik tüpe yerleştirildi.
8. Kolona 700 µl Wash Buffer 1 eklenerek 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 600 µl Wash Buffer 2 eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı, 250 µl Wash Buffer 2 eklenerek 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
11. Kolon 1,5 ml'lik eppendorfa aktarılarak üzerine 100 µl nükleaz free water eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Tüpte biriken sıvıdaki RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek için 1,5 µl RNA, 260 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülerek hesaplama yapıldı.

cDNA sentezi

1. Total RNA (500 ng) + ddH₂O = 9.4 µl olacak şekilde karıştırıldı.
2. Üzerine 1 µl random primer, 1 µl oligo-dt primer eklendi. Total hacim: 11.4 µl
3. 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

Komponentin hazırlanması:

Buffer 5x: 4 µl

Reverse transkriptaz: 1,1 µl

Protector RNAase inhibitör: 0,5 µl

Deoxinükleotit mix: 2 µl

DTT: 1 µl

Total hacim: 8.6 µl

4. 11,4'lük total hacim üzerine 8,6 µl komponent dağıtıldı ve vortekslendi.

5. 29 °C'de 10 dk

6. 48 °C'de 60 dk cDNA sentezi için PCR şartları

7. 85 °C'de 5 dk

(Çıkan örnekler (+2) – (+8) °C'de 1-2 saat; -15 ile -25 °C'de daha uzun süre saklanabilmektedir.)

qRT-PCR

Kaspaz-3, kaspaz-9, kaspaz-8, leptin ObRb reseptörü, Notch1 reseptör, JAGGED1 ligand, JAGGED2 ligant, IL-1 α , IL-1 β , IL1R, β -aktin (referans gen) mRNA düzeyleri, Dual Label (Taqman prob) kullanılarak ölçüldü. Çalışmanın sonuçları StepOnePlus Real-Time PCR system, Thermo ile analiz edildi.

Histopatolojik İnceleme

Deney sonunda rompun ve sonrasında ketalar ile anestezi edilen sıçanların karaciğer dokuları alınıp, trimlendikten sonra doku taşıma kasetlerine yerleştirildi ve immunofix içerisinde 24 saat süre ile tespit edildi. Sonrasında sırasıyla doku örnekleri dereceli alkol solüsyonlarından geçirilerek doku içinde bulunan sudan arındırılıp; xylene ile dokular içindeki alkol temizlendi, doku örnekleri etüv içerisinde bulunan parafinde bekletildikten sonra base mod içerisinde bloklandı, bloklanan doku örnekleri mikrotom ile 3-5 mikron kalınlığında kesilip lam üzerine alınarak preparat kutularına yerleştirildi. Her denekten alınan ve 5 mikron kalınlığında kesilen doku örneklerine H.E. boyaması uygulanmıştır.

TUNEL Assay

Hücre ölümünün belirlenmesinde apoptotik hücreleri boyama olanağı sağlayan Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL, S7101, Millipore, USA) yöntemi kullanıldı. Alınan kesitler deparafinizasyon işlemini takiben önce distile suda daha sonra 3x5 dk PBS solüsyonu ile yıkandı. Sonra PBS solüsyonu ile 1/500 oranında seyreltilen 20-µg/ml Proteinaz-K oda sıcaklığında 15 dk uygulandı. PBS ile

yıkamayı takiben 5 dk %3'lük H₂O₂ ile muamele edildikten sonra yeniden 3x5 dk PBS ile yıkandı. Örnekler Equilibration buffer ile oda ısısında 5 dk tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli ortamda 37⁰C de 1 saat bekletildi. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dk ve sonra Antidioksinin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dk muamele edilen örnekler 3x5 dk PBS ile yıkandı. Ardından DAB ile boyaması yapıldı, ardından distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptandı ve ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi. Boyanan tüm doku örnekleri Zeiss AXIO Scope 1 marka araştırma mikroskopunda değerlendirilerek dijital kamera (AxioCam ICc 3) ile fotoğraflanmıştır. Leica LAS V3.8 görüntü analiz sistemi kullanılarak TUNEL pozitif hücreler tespit edilmiştir. Apoptotik hücrelerin boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi; hücrelerin %1'den azında boyanma varsa 0; hücrelerin %1- 10'unda boyanma varsa 1+; hücrelerin %11-50'sinde boyanma varsa 2+; hücrelerin %51-80'inde boyanma varsa 3+; hücrelerin %80'inden fazlasında boyanma varsa 4+ olarak değerlendirildi. Ayrıca boyanma şiddeti 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun olarak kör yöntemle belirlendi. Sonra “(1+boyanma şiddeti/3) x boyanma oranı” formülü ile toplam skor hesaplandı.

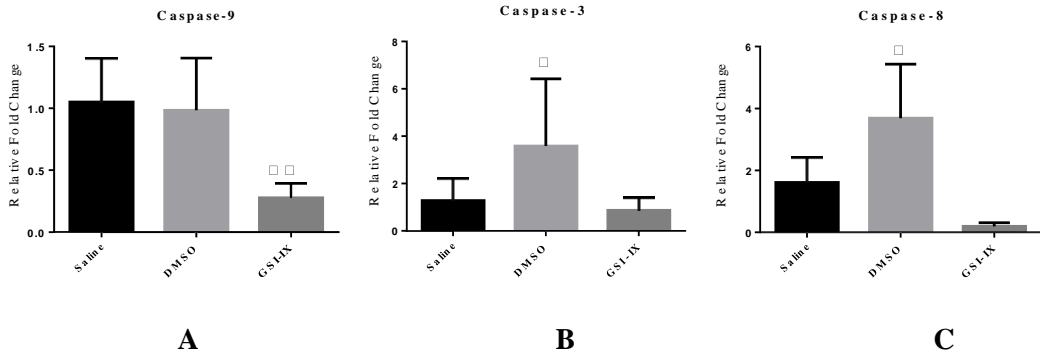
4. İSTATİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme için GraphPad Prism6 programı kullanılmıştır. Öncelikle gruplar Shapiro-Wilk Normality Test kullanılarak normal dağılım gösterip göstermediğine göre analiz edilmiştir. Farklı gruplardan elde edilen ve normal dağılım gösteren veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklar Tukey testi ile analiz edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen veriler ise Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar Dunn testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak p değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

5.

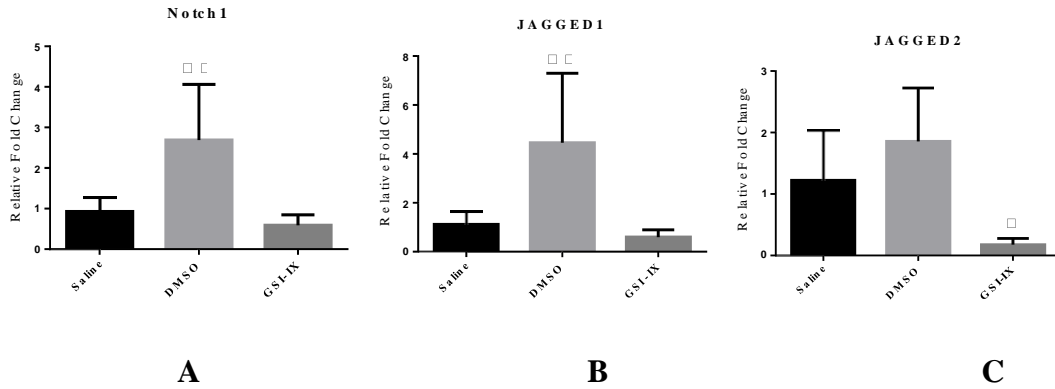
BULGULAR**qRT-PCR Bulguları**

Sonuçlarımıza göre; Notch yolağı inhibitörü olan GSI-IX, kaspaz-3, kaspaz-9 ve kaspaz-8'in mRNA düzeylerini kontrol grubu düzeyine getirerek karaciğer I/R'undan sonra apoptozisi azalttığı saptanmıştır.



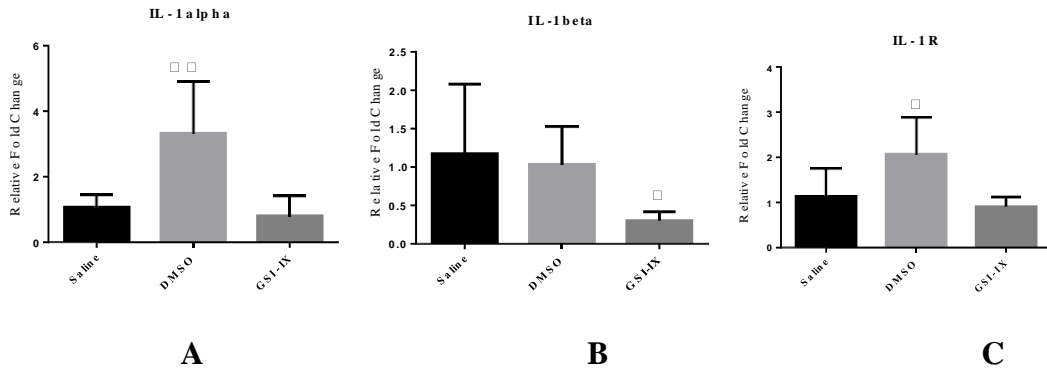
Şekil 4.1. Kaspaz-9 (A), kaspaz-3 (B) ve kaspaz-8 (C) genlerinin kontrol (saline), DMSO ve GSI-XI verilen tedavi grubundaki mRNA ekspresyonu (n:8, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ve *** $P < 0.001$).

Notch yolağı inhibitörü olan GSI-IX grubunda, Notch1, JAGGED1 ve JAGGED2 mRNA düzeylerini diğer gruplardan düşük olduğu saptanmıştır.



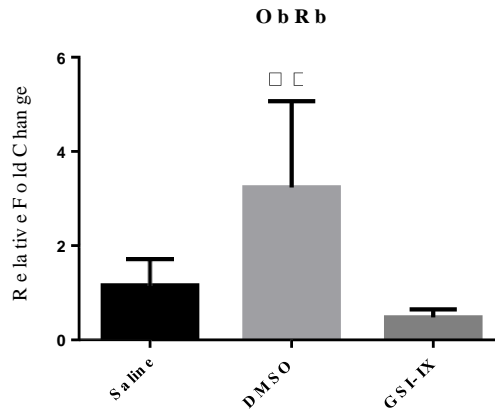
Şekil 4.2. Notch1 (A), JAGGED1 (B) ve JAGGED2 (C) genlerinin kontrol (saline), DMSO ve GSI-XI verilen tedavi grubundaki mRNA ekspresyonu (n:8, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ve *** $P < 0.001$).

Notch yolağı inhibitörü olan GSI-IX grubunda, IL-1 α , IL-1 β ve IL1R mRNA düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.3. IL-1 α (A), IL-1 β (B) ve IL1R (C) genlerinin kontrol (saline), DMSO ve GSI-XI verilen tedavi grubundaki mRNA ekspresyonu (n:8, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ve *** $P < 0.001$).

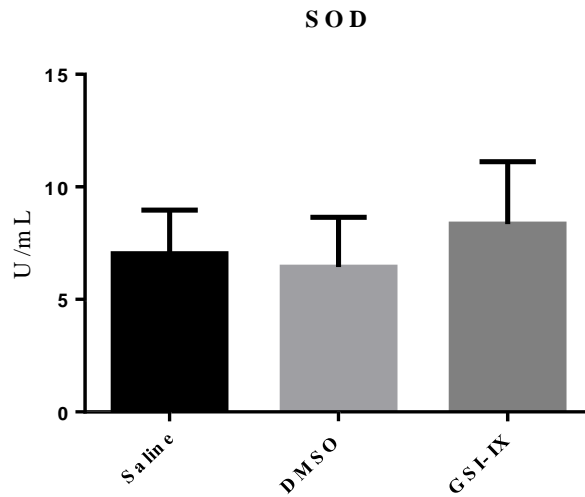
Notch yolağı inhibitörü olan GSI-IX, ObRb mRNA düzeyinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Leptin düzeyinin beklenen etkinin GSI IX grubunda görülmediği saptanmıştır.



Şekil 4.4. Leptin reseptörü ObRb'nin kontrol (saline), DMSO ve GSI-XI verilen tedavi grubundaki mRNA ekspresyonu (n:8, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ve *** $P < 0.001$)

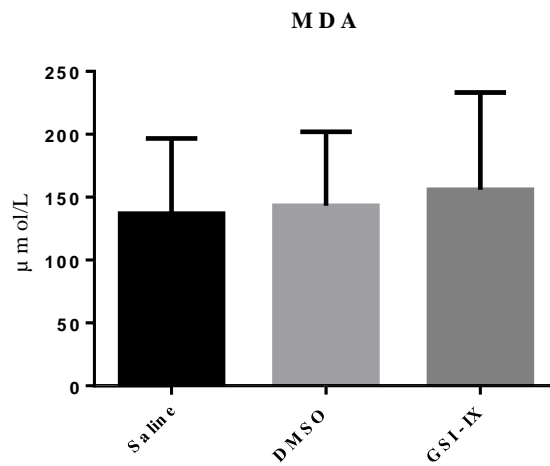
Plazmada SOD, CAT, MDA, AST ve ALT Değerleri

SOD mean değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesinde kontrol, DMSO ve GSI-IX grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).



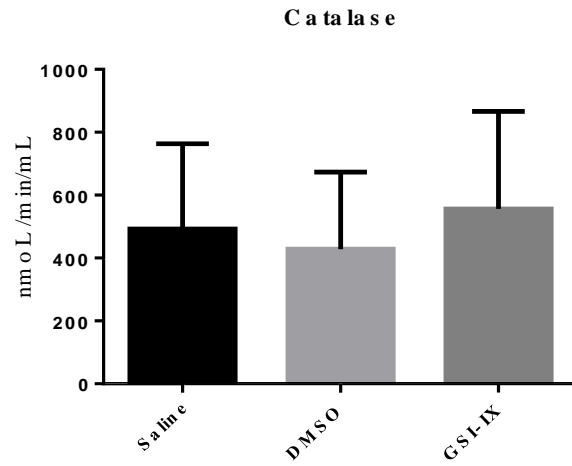
Şekil 4.5. Plazmada SOD değerlerinin gruplar arasında değerlendirilmesi ($p>0.05$).

MDA mean değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesinde kontrol, DMSO ve GSI-IX grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).



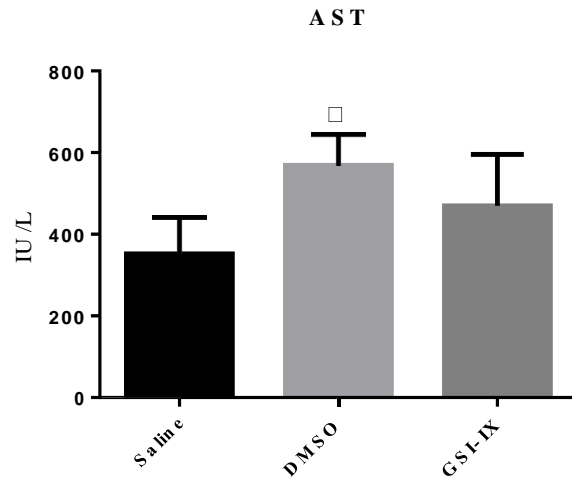
Şekil 4.6. Plazmada MDA değerlerinin gruplar arasında değerlendirilmesi ($p>0.05$).

Katalaz mean değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesinde kontrol, DMSO ve GSI-IX grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

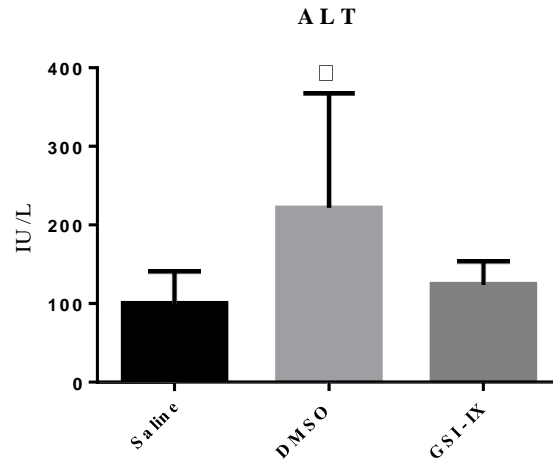


Şekil 4.7. Plazmada katalaz değerlerinin gruplar arasında değerlendirilmesi ($p > 0.05$).

GSI-IX enjeksiyonundan sonra plazma AST ve ALT düzeyleri kontrol grubuyla paralellik göstermiştir.



Şekil 4.8. Kontrol, DMSO ve GSI-IX gruplarında plazma AST seviyeleri ($n:8$, $*P < 0.05$).



Şekil 4.9. Kontrol, DMSO ve GSI-IX gruplarında plazma ALT seviyeleri (n:8, * $P < 0.05$).

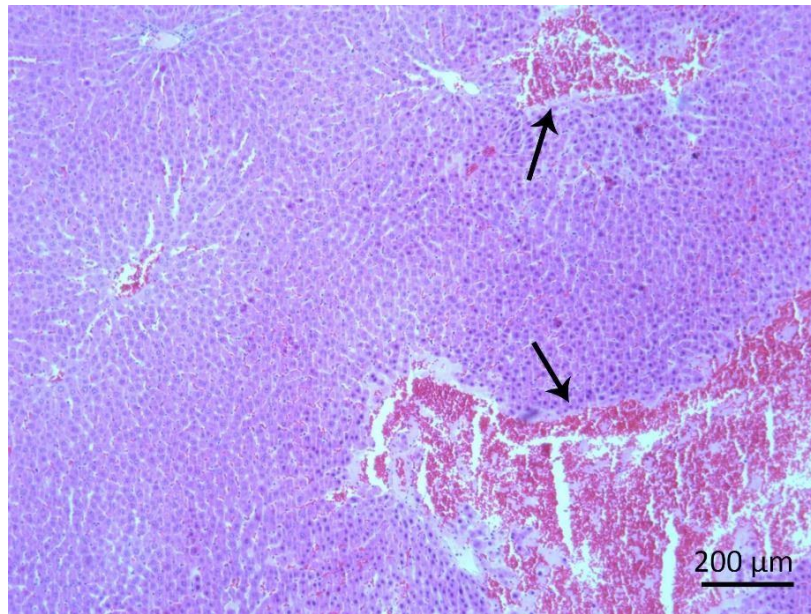
Karaciğer H&E Bulguları

Rutin Hematoksilen-Eozin ile yapılan histolojik boyamada, SF (G1) grubunda yer alan sıçanların karaciğer dokusunda iskemiye bağlı hepatositlerde vakuoler dejenerasyona bağlı sentrilobüler nekrotik alanlar, ödem, parenşimada ve portal alanlar çevresinde mononükleer lökosit infiltrasyonu, dilate olmuş santral ve portal venler ile sinüzoidlerde konjesyonun arttığı gözlenmiştir. Mitotik aktivitenin çok az olduğu tespit edilmiştir. DMSO (G2) grubuna ait karaciğer dokusunda vena sentralis ve portal venlerde dilatasyonlar ve konjesyon dışında parenşimada fokal nekrotik alanların azaldığı, lökosit infiltrasyonunun daha az olduğu görülmüştür. Ayrıca hepatositlerde vakuoler dejenrasyonun çok az olduğu gözlemlendi. Ama mitotik hücre gruplarının yaygın olması dikkati çekti. GSI9 (G3) grubuna ait karaciğer dokusundan alınan örneklerle yapılan H&E boyamasında G1 grubundan daha iyi seyirli parenşimanın olduğu fakat G2 grubundan daha kötü bir histopatoloji tablosu izlenmiştir. G3 Grubunda hem santral ven ve sinüzoidal dilatasyon hemde konjesyon oldukça artmıştır. Vakuoler dejenerasyonun ise biraz daha orta şiddetli seyrettiği görülmüştür. Ayrıca portal alan çevresinde de lökosit infiltrasyonu gözlenmiştir. Mitotik aktiviteninde orta şiddetli olduğu görüldü. Sonuç olarak en şiddetli iskemik tablo G1 de gözlenirken, buna biraz daha yakın bir histopatolojik tablo G3 grubunda izlenmiştir. Burada iskemi/reperfüzyon tablosundan sonra en fazla karaciğer dokusunun korunduğu grubun ise G2 olduğu tespit edilmiştir.

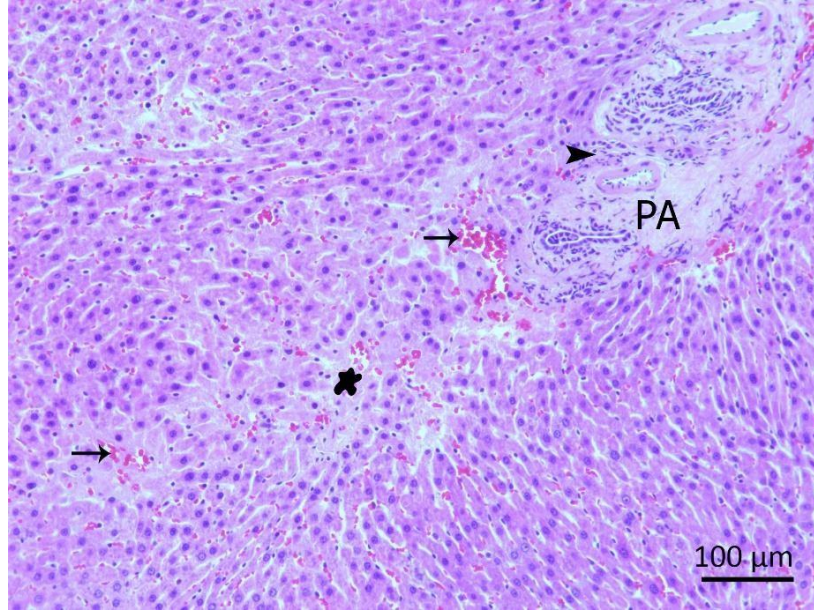
Tüm gruplarda hepatosit vakuolizasyonu, sinüzoidal dilatasyon, fokal nekroz, mononükleer lökosit infiltrasyonu ve konjesyon semikantitatif olarak saptandı. I. Grupta hepatosit vakuolizasyonu, fokal nekroz çok fazla (++++), II. grupta hemen hemen tüm histopatolojik değerlendirmelerin benzer şekilde orta şiddette (++) , III. grupta ise hepatosit vakuolizasyonu ve sentrilobüler nekroz fazla (+++) olarak belirlenmiştir (Tablo 1.)

Tablo 1. Deneysel gruplarındaki histopatolojik tablonun semikantitatif değerlendirilmesi.

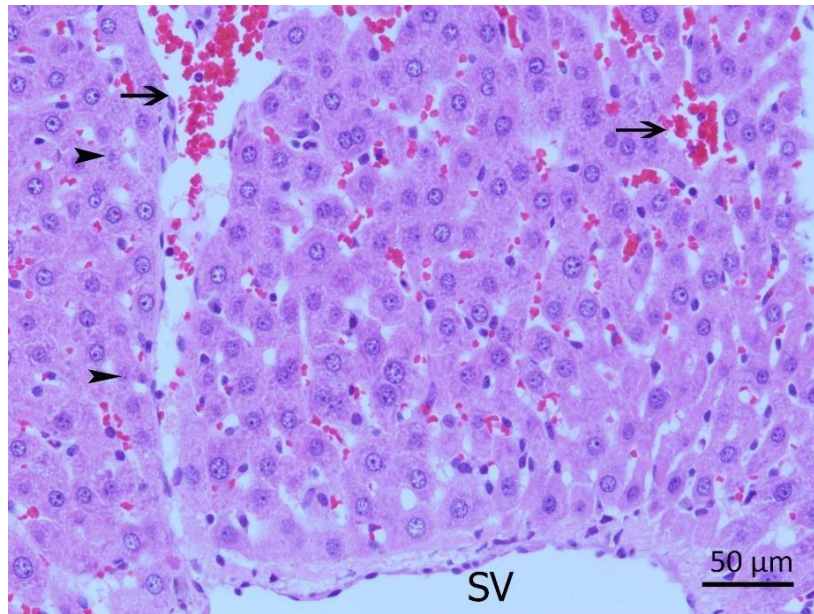
Grup	Hepatosit vakuolizasyonu	Sinüzoidal dilatasyon	Sentrilobüler nekroz	Mononükleer lökosit infiltrasyonu	Konjesyon
G1	++++	+++	++++	+++	+++
G2	++	++	++	++	+
G3	+++	++	+++	++	++



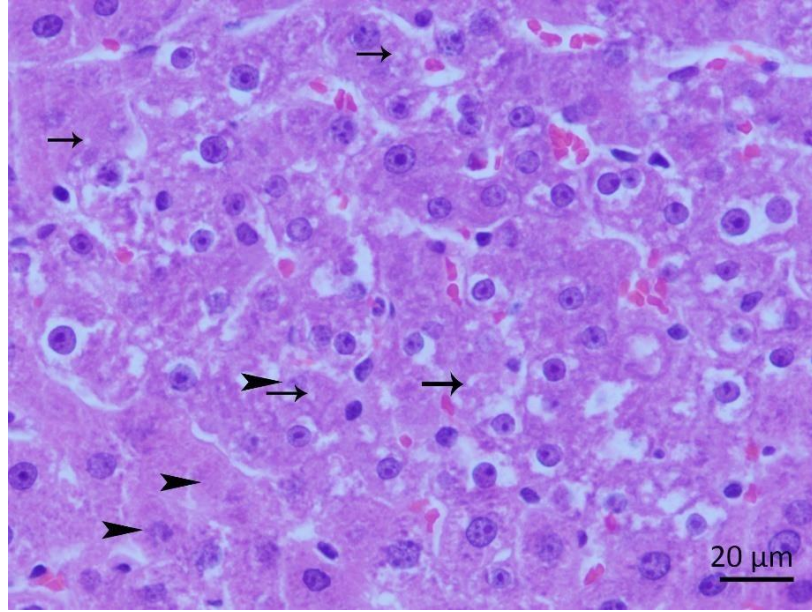
Şekil 4.10. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde SF (G1) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Konjesyon) X5.



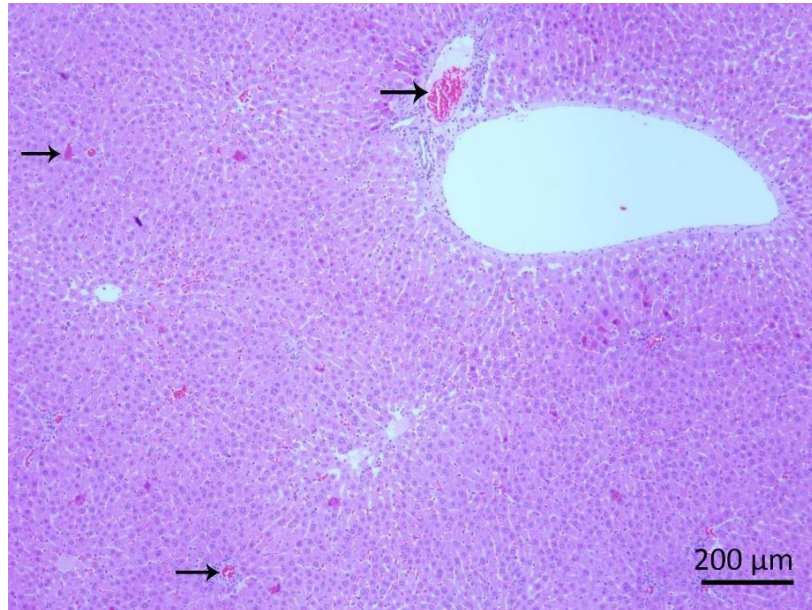
Şekil 4.11. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde SF (G1) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Konjesyon, Ok başı: Portal alan inflamasyonu, Yıldız: Nekrotik alan, PA: Portal alan) X10.



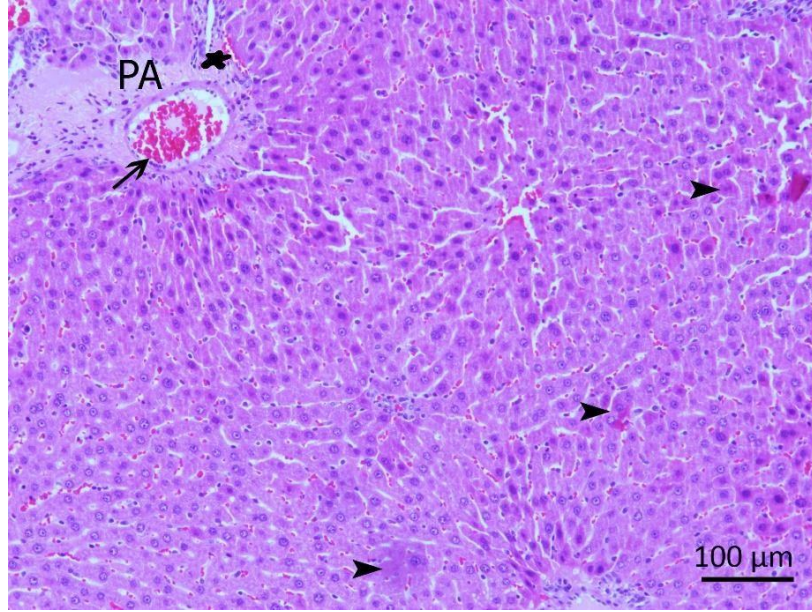
Şekil 4.12. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde SF (G1) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Konjesyon, Ok başı: Dejenere hepatositler (piknotik hücre), SV: Santral ven) X20.



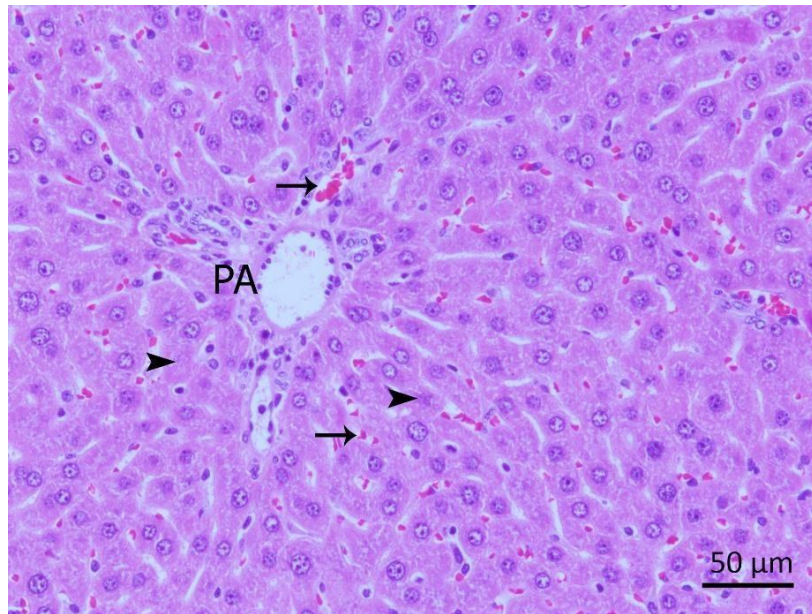
Şekil 4.13. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde SF (G1) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Hepatosit sitoplazmik vakuolizasyonu, Ok başı: Dejenere hepatositler) X40.



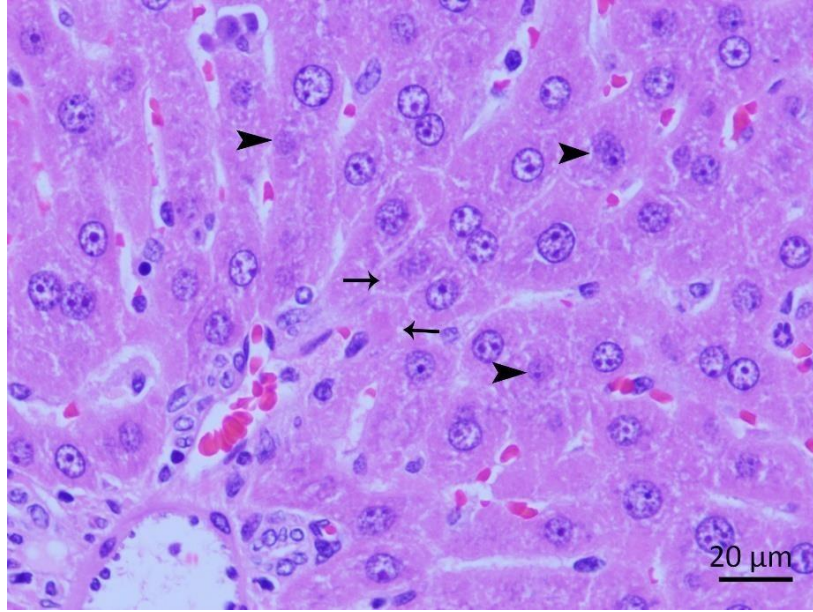
Şekil 4.14. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde DMSO (G2) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Konjesyon) X5.



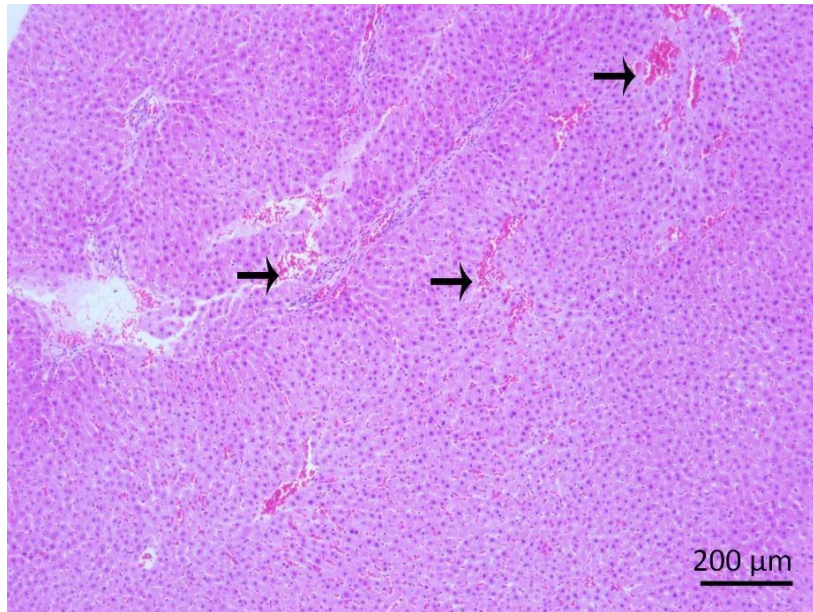
Şekil 4.15. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde DMSO (G2) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Konjesyon, Ok başı: Dejenere hepatosit, Yıldız: İnflamasyon, PA: Portal alan) X10.



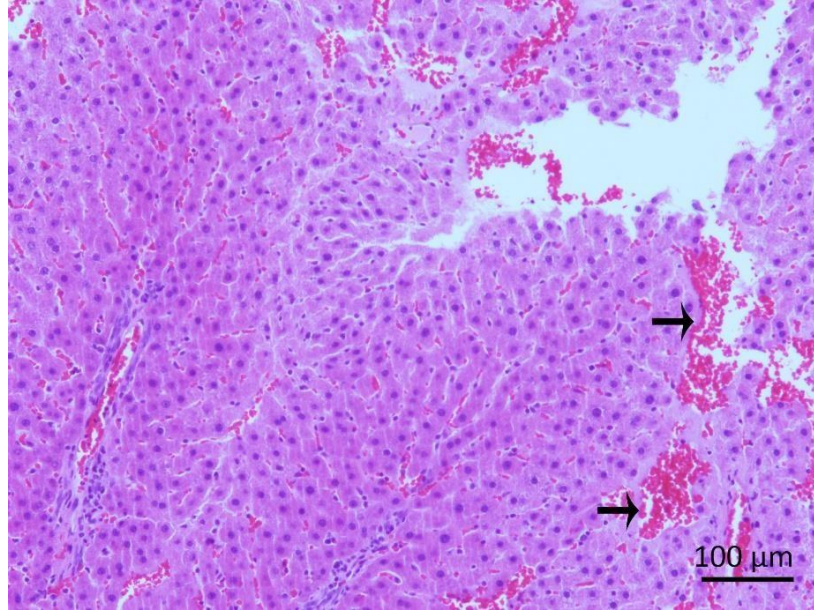
Şekil 4.16. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde DMSO (G2) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Konjesyon, Ok başı: Dejenere hepatosit, PA: Portal alan) X20.



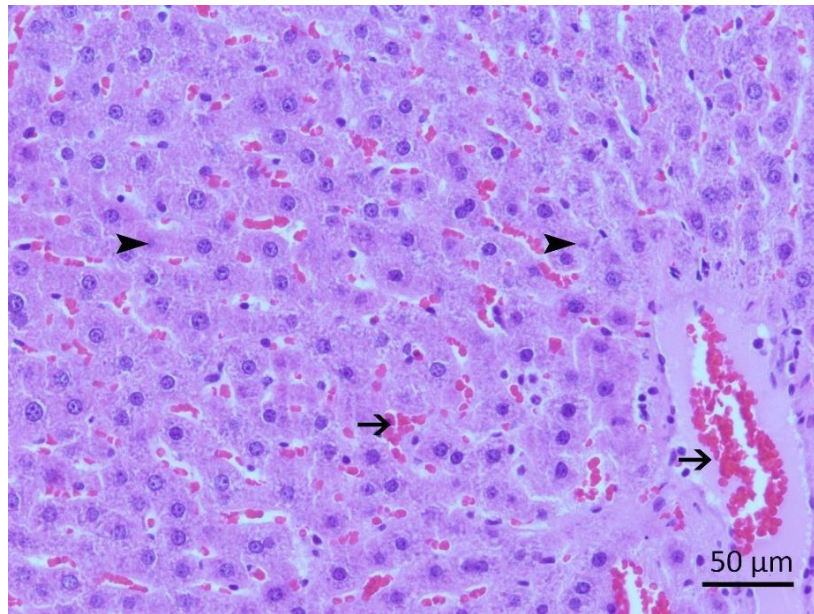
Şekil 4.17. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde DMSO (G2) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Hepatosit sitoplazmik vakuolizasyonu, Ok başı: Dejenere hepatositler) X40.



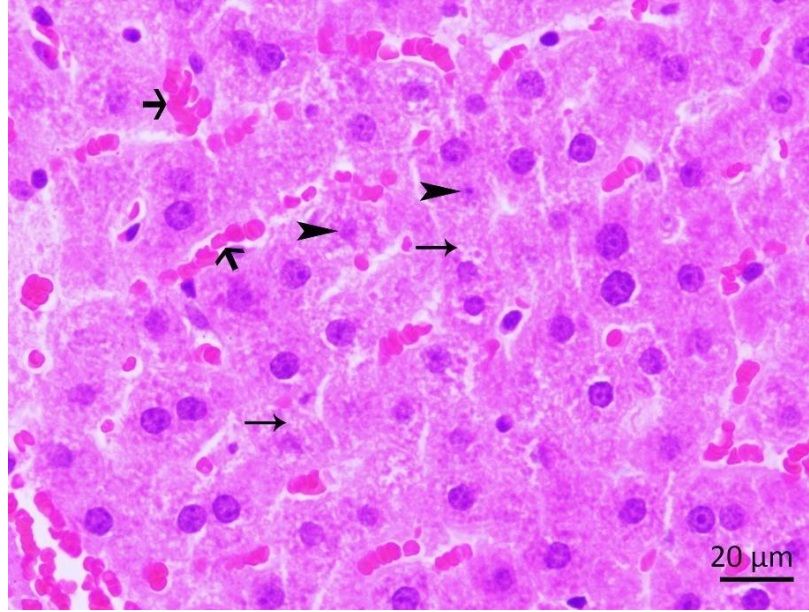
Şekil 4.18. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde GSI9 (G3) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Konjesyon) X5.



Şekil 4.19. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde GSI9 (G3) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Konjesyon) X10.



Şekil 4.20. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde GSI9 (G3) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Ok: Konjesyon, Ok başı: Dejenere hepatosit) X20.

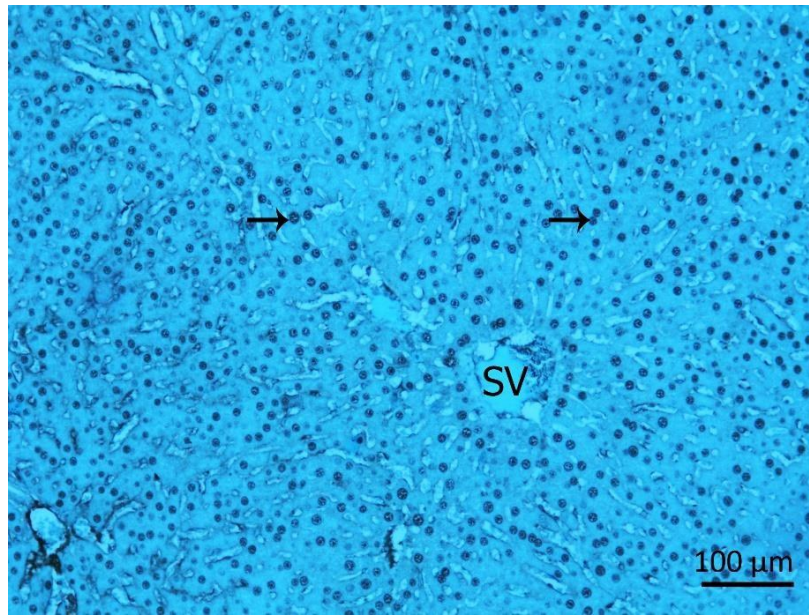


Şekil 4.21. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde GSI9 (G3) grubu karaciğer dokusu H&E boyaması (Uzun ok: Vakuolizasyonu, Kısa ok: Dejenere hepatositler) X40.

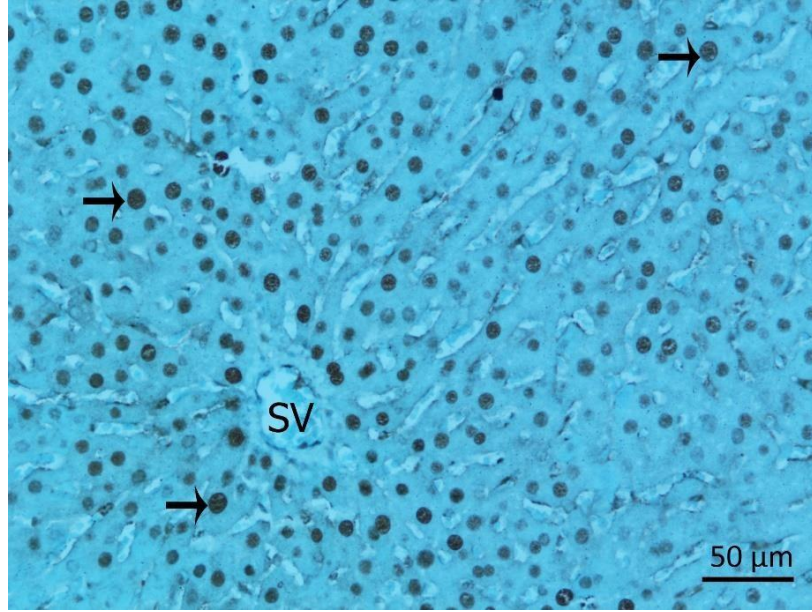
Karaciğer TUNEL Bulguları

Programlı hücre ölümü mekanizması çoğunlukla prenatal dönemde embriyonik dokularda meydana gelirken, erişkin dokuda oksidan antioksidan dengenin bozulması ve dokudaki hasar apoptozisi tetikleyen önemli etkenlerdendir. Hepatoselüler hasarda özellikle oksidatif stres ve inflamasyon hepatositlerin Kupffer hücrelerinden salınan sitokinlerle apoptoza sürüklenmesine neden olur. Dokudaki fonksiyonel işlemlerin aksaklığı apoptozis için önemli tetikleyici durumlardan biridir. TNF- α 'nın kupffer hücrelerinden salınımı ile apoptotik mekanizma aktive olur hepatositler apoptotik sürece girerler. Bu olay sadece hücre ölümüyle sonuçlanmaz. Aynı zamanda yeni onarım için şartlar uygun hale getirilir. Böylece karaciğer bir taraftan apoptozla yıkıma uğrarken diğer taraftan hızla rejenerasyonu oluşturacak olaylar şekillenir. Deneysel iskemi/reperfüzyon çalışmada iskemiye bağlı apoptozisin tetiklendiği ve dokuda apoptozise giden hücrelerin arttığı gözlemlenmiştir. Apoptotik süreç SF (G1) uygulanan grupta en yüksek seviyede seyrederken, DMSO (G2) uygulanan grupların karaciğer dokularında diğer gruplara kıyasla en az apoptotik hücreye rastlanmıştır. GSI9 aktif madde verilen grupların

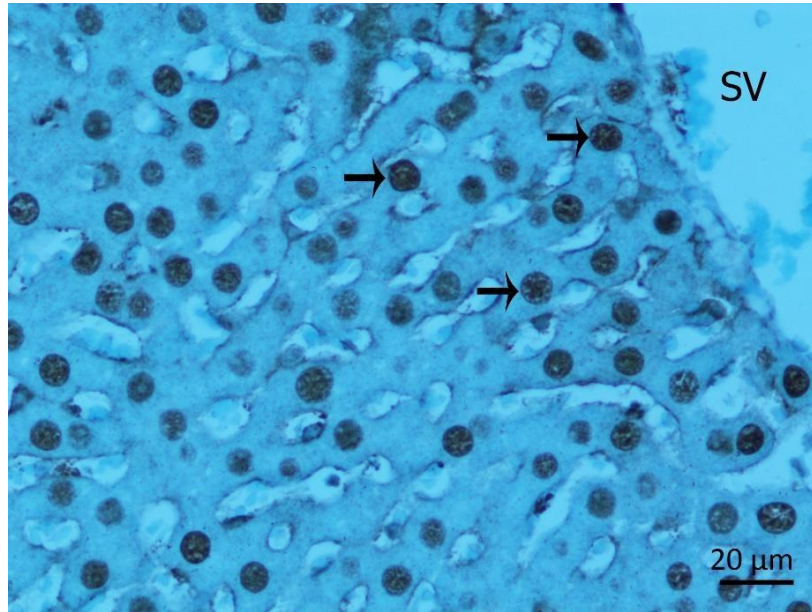
karaciğer dokularında ise G1 grubuna göre daha az G2 grubuna göre ise daha çok apoptotik hücrelerin olduğu gözlemlenmiştir. Deney gruplarına uygulanan maddeler arasında iskeminin neden olduğu apoptozisten hepatositleri koruyucu özelliği en fazla olan maddenin DMSO olduğu görülmüştür. En fazla hasar SF (G1) grubunda tespit edilmiştir, dolayısıyla apoptotik indeks değeri de yüksek bulunmuştur. Aktif madde GSI9'un grupların karaciğer dokularında apoptozisi engelleyici rolünün olduğu görülüyor fakat bu rolün kısıtlı olduğu da bir gerçektir. İstatistiksel karşılaştırmalarda da bu tablo anlamlılıklarla teyit edilmiştir. TUNEL pozitifliğinde gruplar arasındaki en fazla anlamlılık SF ve DMSO grup arasında $***p<0.001$ olarak belirlenmiştir. SF ve GSI9 grupları arasında en az anlamlılık görülürken ($*p<0.05$), DMSO ve GSI9 grubu arasında $**p<0.01$ olarak gözlemlenmiştir.



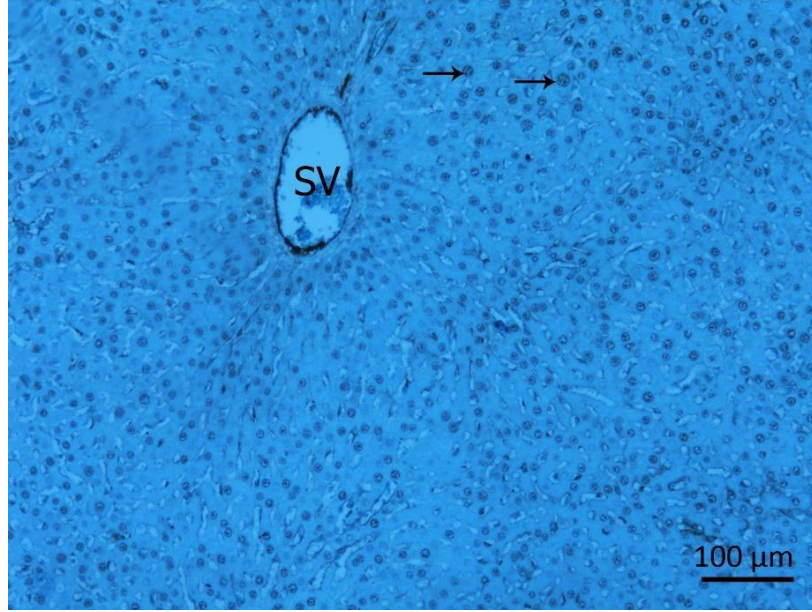
Şekil 4.22. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde SF grubu karaciğer dokusu TUNEL boyaması (Ok: TUNEL pozitif hücre) X100.



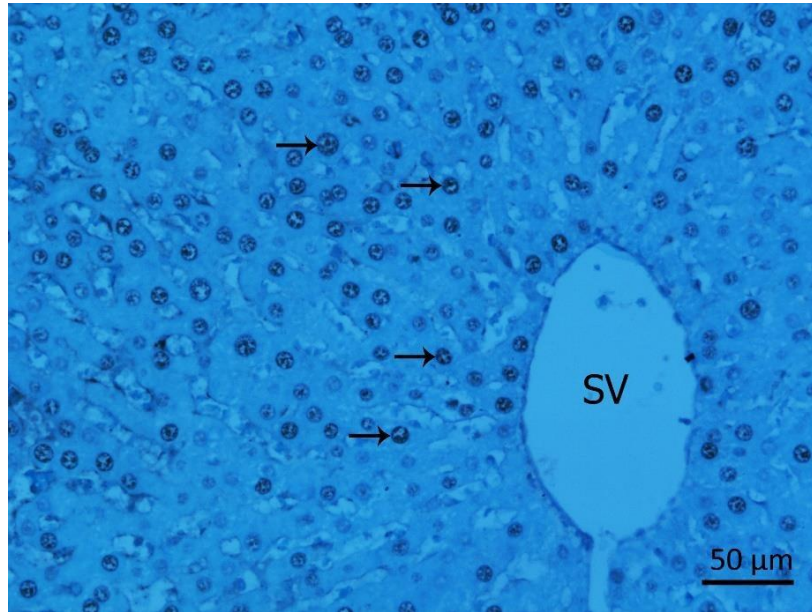
Şekil 4.23. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde SF grubu karaciğer dokusu **TUNEL** boyaması (Ok: TUNEL pozitif hücre) X200.



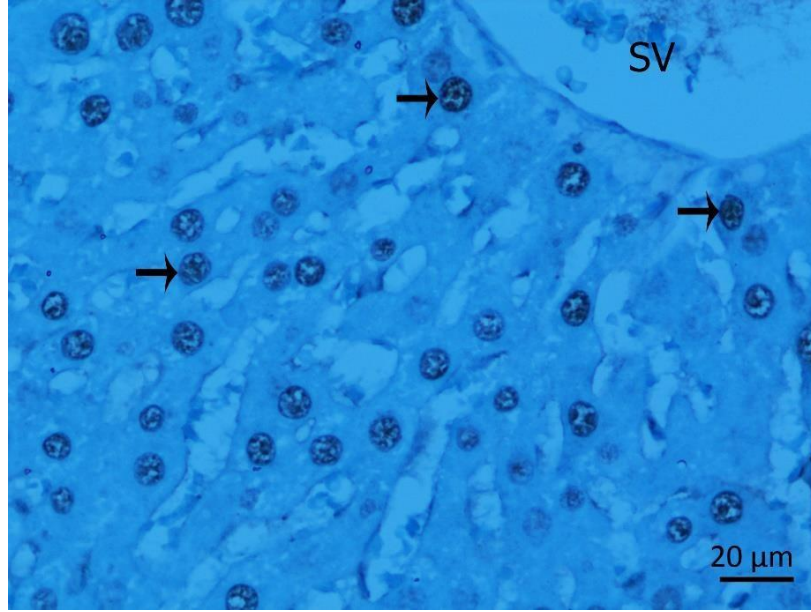
Şekil 4.24. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde SF grubu karaciğer dokusu **TUNEL** boyaması (Ok: TUNEL pozitif hücre) X400.



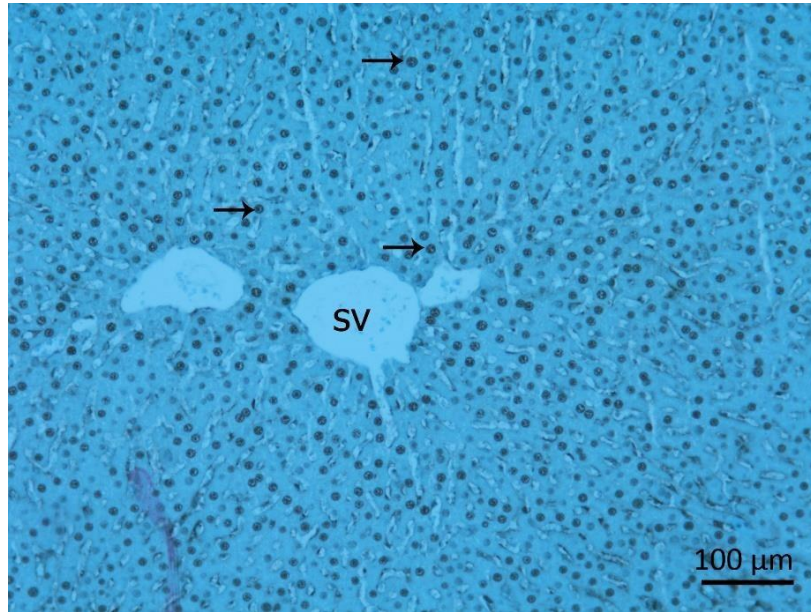
Şekil 4.25. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde DMSO grubu karaciğer dokusu **TUNEL** boyaması (Ok: TUNEL pozitif hücre, SV: Santral ven) X100.



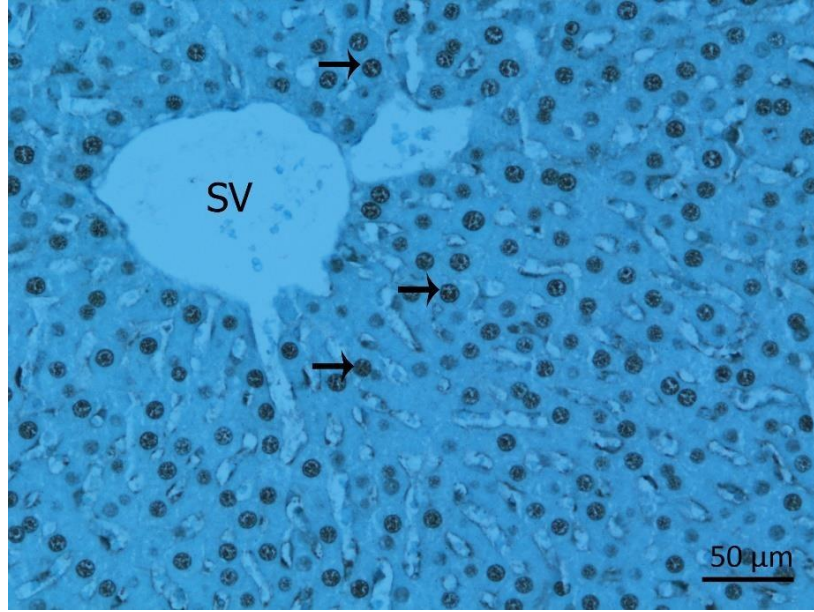
Şekil 4.26. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde DMSO grubu karaciğer dokusu **TUNEL** boyaması (Ok: TUNEL pozitif hücre, SV: Santral ven) X200.



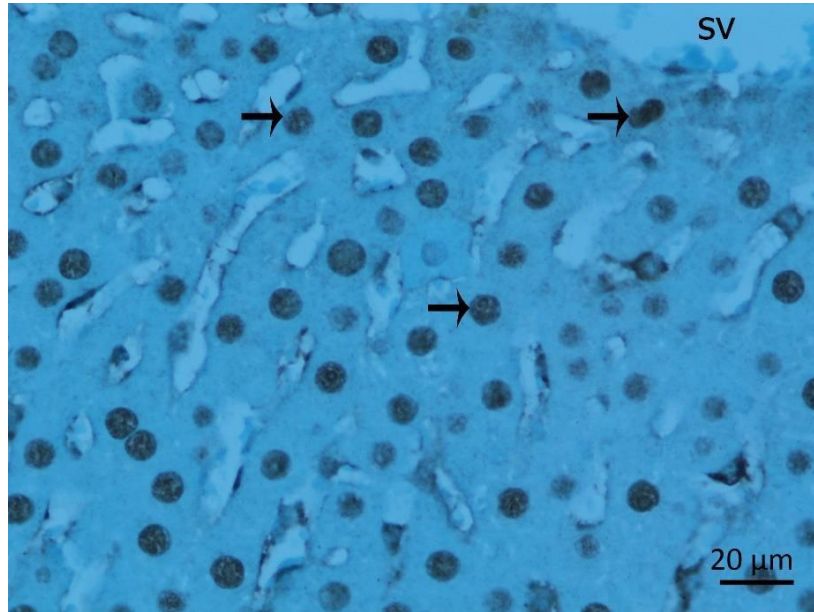
Şekil 4.27. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde DMSO grubu karaciğer dokusu **TUNEL** boyaması (Ok: TUNEL pozitif hücre) X400.



Şekil 4.28. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde GSI9 grubu karaciğer dokusu **TUNEL** boyaması (Ok: TUNEL pozitif hücre, SV: Santral ven) X100.

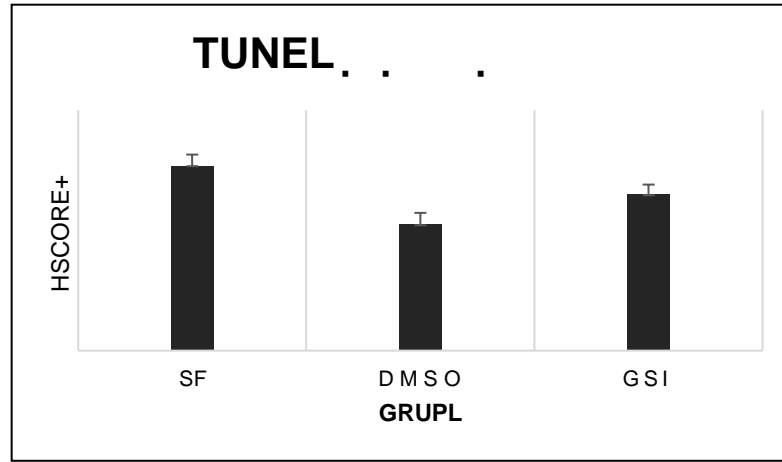


Şekil 4.29. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde GSI9 grubu karaciğer dokusu **TUNEL** boyaması (Ok: TUNEL pozitif hücre, SV: Santral ven) X200.



Şekil 4.30. Deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde GSI9 grubu karaciğer dokusu **TUNEL** boyaması (Ok: TUNEL pozitif hücre, SV: Santral ven) X400.

Tablo 2. Grupların karaciğer dokularındaki TUNEL boyamalarındaki reaktivite dağılımı.



SF vs DMSO ***p<0.001

SF vs GSI9 **p<0.01

DMSO vs GSI9 *p<0.05

6.

TARTIŞMA

Karaciğer rejenerasyon yeteneğiyle diğer dokulardan ayrılmaktadır. Diğer dokulardaki İ/R, oksidatif hasar gibi süreçler rejenerasyonla da ilişkilendirildiğinde karaciğer özellikli tek doku seçeneğimiz olarak görünmektedir. NILCO yolağı üzerinden anjiogenetik etkinlik arttırılarak iyileşme süreci desteklenebilir.

Mevcut çok sayıda çalışmanın iskemi reperfüzyon sürecini daha iyi anlamamızı sağladığı göz ardı edilemez (21). İskemi reperfüzyonun sadece etkilenen organa değil serbest oksijen radikalleriyle sistemik dolaşıma da etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Aynı çalışmalar süreçte ne gibi etkenlerin olduğu ve bu etkenlerin sonuçları gösterilmektedir (11). Klinik gözlemlerde ise iskemi reperfüzyon sonrası hasarın uzak organlarda (ör: akciğer hasarına bağlı ARDS gelişimi) etkisi görülmektedir. Karaciğer rejenerasyon sürecinde hastaların uzak organ hasarından korunması için farklı yolların araştırılmasına devam edilmesi önerilebilir.

Çalışmamızda İL1 üzerinden immün sistemin reperfüzyondaki hasara etkisi NILCO yolağı üzerinden değerlendirilmeye çalışıldı. Notch yolağı inhibitörü olan GSI-IX' un, kaspaz-3, kaspaz-9 ve kaspaz-8'in mRNA düzeylerini DMSO grubuna kıyasla daha düşük düzeylere getirerek I/R'undan sonra görülen apoptozisi azaltmıştır. Bu da bize GSI-IX'un doku karaciğer I/R'undan sonra doku koruyucu etki gösterebileceğini göstermektedir. Yine de multifaktörlü bir çalışma olması sonuçların diğer çalışmalarla desteklemesini gerektirmektedir.

Sitokinlerin birbirleri üzerinde olan etkileri yeni açıklanmaya çalışılırken NILCO yolağının bir basamağı olan İL1 in hücrel ve organ fonksiyonları açısından net sonuçlara varmak henüz mümkün görünmemektedir. Çalışmamızda Notch yolağı inhibitörü olan GSI-IX, IL-1 α , IL-1 β ve IL1R mRNA düzeylerini kontrol grubu düzeyine getirerek karaciğer I/R'undan sonra koruyucu etki göstermiştir. Bu da bize GSI-IX'un doku karaciğer I/R'undan sonra antiinflamatuvar etki gösterebileceğini göstermektedir Transplantasyon üzerine yapılan diğer çalışmalar immün sistemdeki İL1 in fonksiyonlarını daha iyi anlamıza yardımcı olacaktır. Transplantasyon sonrası istenen immün supresyonun iskemik dokularda NILCO yolağı üzerinden sağlanabilmesi için daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır.

Leptin iki anjiyogenik faktörü indükler: VEGF ekspresyonunu artırabilecek IL-1 ve Notch. Ayrıca enerji metabolizması üzerinde etkileri olan Leptin ek olarak anjiyogenez gelişimi için gereken proteazların ve adezyon moleküllerinin salgılanmasını ve sentezini indükler (50). Çalışmamızda Leptin üzerinden NILCO yolağının anjiogenez destekleyen etkisini karaciğer iskemisinde değerlendirmeye çalıştık. Leptin üzerine yapılan kanser çalışmaları sonuçlarından farklı olarak bizim çalışmamızda da anjiogenezin indüklendiği görülmedi. Notch yolağı inhibitörü olan GSI-IX, ObRb mRNA düzeyini beklenen düzeylere getirememiştir. Leptin üzerine yapılan diğer pozitif sonuçlu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda rejenerasyon sürecinde anjiyogenetik etkinin artırılmasının iskemik kalan doku fonksiyonlarının kazanılmasına Leptin üzerinden NILCO yolağının katkısı olacağını düşünmekteyiz.

Çalışma gruplarının patolojik değerlendirmesinde hepatosit vakuolizasyonu, sinüzoidal dilatasyon, sentrilobüler nekroz, mononükleer lökosit infiltrasyonu ve konjesyon gibi parametreler incelendi. Sonuçlarda GSI IX grubundaki parametrelerin SF grubundan düşük seviyelerde bulunması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. GSI-IX grubunda AST ve ALT düzeylerinin DMSO grubunda kıyasla düşük saptanmıştır. GSI IX un iskemi reperfüzyonda karaciğer hasarını azalttığı yönündeki bulgularımız ancak tekrarlanan çalışmalar sayesinde kesinlik kazanacaktır.

15 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyon ve 2 kez laparotomi ise çalışmamızın uygulama zorluğunu oluşturmaktadır. Operasyon günü 2 laparotomi arasında denekler anestezi sedasyonu altında ve standart oda şartlarında batınları kapatılarak veteriner eşliğinde bekletilmiştir. Hem hepatic arterden hemde portal kan akımıyla beslenmesi ve ratlarda vasküler yapıların küçük olması deney aşamasını zorlaştırsada daha önce defalarca denenmiş bir model olması sonuçların karşılaştırılması açısından hala rat deneylerini anlamlı kılmaktadır. İskemi süresi kısaltılarak ya da ön koşullama sağlanarak end organlarda da GSI IX gibi bileşenlerin değerlendirmesi ve çalışma sonuçlarının karşılaştırılması önerilebilir.

İskemi reperfüzyon çalışmalarındaki ön koşullamanın olmaması çalışmamızın eksik yanı olarak değerlendirilebilir. Transplantasyon ve kanser ameliyatları için ön koşullama sözkonusu olabileceği düşünülerek ayrı bir çalışma daha yapılarak sonuçlar karşılaştırılabilir. Ön koşullandırma (aralıklı iskemik koşullandırma) sonrası

GSI IX'un ya da NILCO yolağı üzerinden başka aktif maddelerin de çalışılması İ/R sürecine etkileri değerlendirmemiz için anlamlı olacaktır.

NILCO yolağı üzerinden bulunacak sonuçların, sadece iskemi reperfüzyon sürecine olana katkıları değil, kanser neovaskülarizasyonu gibi başka konularda da farklı sistemlerin (immün, endokrin, hücresele sinyalizasyon) etkilerini ve işleyişini anlamamıza yardımcı olacağını düşünmekteyiz. Notch yolağı inhibitörü olan GSI-IX, Notch1, JAGGED1, JAGGED2, mRNA, IL-1 α , IL-1 β ve IL1R mRNA düzeylerinin DMSO grubuna kıyasla karaciğer I/R'hasarında tedavi edici etki göstermesi ve patolojik süreç tamamlandıktan sonra iyileşmeyede pozitif etkisini destekler sonuçlar bulunmuştur.

Gerek NILCO yolağının gerekse yolağın bileşenlerinin tüm mekanizmalarının tam anlamıyla anlaşılammış olması tek bir çalışmada sonuçların değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Daha geniş kapsamlı bir çalışma ile yolağı oluşturan İL1, Notch ve Leptin farklı gruplar üzerinden denenerek etkinlikleri karşılaştırılabilir. Bu nedenle Leptin üzerinden hormonal, interlökin üzerinden immün sistemin, notch üzerinden hücresele sinyal yolaklarının etkin olduğu kompleks bir sistemin tek bir çalışma ve tek bir model üzerinden açıklanması mümkün değildir. Bu nedenle NILCO yolağı ve bileşenleri üzerine farklı dokularda daha fazla çalışmaya ihtiyacımız vardır.

7.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğer üzerine yapılan çalışmalar rejenerasyon yeteneği nedeniyle daha avantajlı durumdadır (23). Karaciğerin rejenerasyon yeteneği, travma, kanser, transplantasyon gibi büyük operasyonlarda yetersiz kalabilmektedir. Karaciğerin özelleşmiş hücrelerinin iskemi reperfüzyon hasarına yanıtı hala net bir şekilde tanımlanamamıştır.

Özellikle transplantasyon ameliyatlarındaki soğuk ve sıcak iskemi / reperfüzyon durumlarını değerlendirebilmek için farklı moleküller denebilir. Transplantasyon sayısının her geçen gün artması iskemi, reperfüzyon ve rejenerasyon süreçlerinin aydınlatılmasında önem kazanmaktadır (46). Transplantasyon sonrası immün sistemin baskılanması ve anjiogenezin uyarılması NILCO yolağı üzerinden değerlendirilebilir.

Notch sinyali hücre-hücre iletişimi hücre büyümesini, çoğalmasını, hayatta kalmasını, farklılaşmasını ve morfolojisini düzenler. Rejenerasyon sürecinde karaciğer lobül yapısının korunması ve fonksiyonel üniteler kurulması bu anlamda önemlidir. Karaciğer rejenerasyon özelliği ile Nocth sinyali üzerine etkileri hedefleyen çalışmalar için öncelikli doku olmalıdır. Farklı dokularda iskemi reperfüzyon çalışmaları ve NILCO yolağının etkisi daha detaylı olarak araştırılarak da karşılaştırılabilir.

Aktif madde GSI9'un grupların karaciğer dokularında apoptozisi engelleyici rolünün olduğu görülüyor fakat çalışmamızda bu rolün kısıtlı olduğu görülmektedir. Denek sayısı arttırılarak ve/ veya farklı modeller üzerinden NILCO yolağının araştırılması ümit vermektedir.

Yeni bulunan ve henüz tam anlaşılamayan birçok hücresel sistemden biri de NILCO yolağıdır. Birçok kanser türü için yapılan çalışmalarda NILCO yolağının etkisi araştırılmaya devam edecektir. İmmün sistem ve endokrin sistemin, İL ve Leptin üzerinden hücresel düzeyde etkileşimde olması bizi daha çok meraklandırmaktadır. Multifaktöriyel etkileşimler içerisinde olan hücresel yolakların çözülebilmesi için daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1) LiChen, KuanHuang, RongWang, QiongJiang, ZhenghuaWu, WeidongLiang, RuiGuo, andLifengWang Neuroprotective Effects of Cerebral Ischemic Preconditioning in a Rat Middle Cerebral Artery Occlusion Model: The Role of the Notch Signaling Pathway Hindawi BioMed Research International Volume 2018, Article ID 8168720, 12 pages
- 2) Danielle Daley-Brown, Gabriela Oprea-Iles, Kiara T. Vann, Viola Lanier, Regina Lee, Pierre V. Candelaria, Alexander Quarshie, Roland Pattillo, and Ruben Rene Gonzalez-Perez. Type II Endometrial Cancer Overexpresses NILCO: A Preliminary Evaluation Hindawi Disease Markers Volume 2017, Article ID 8248175, 14 pages
- 3) Shanchun Guo, Ruben R. Gonzalez-Perez. Notch, IL-1 and Leptin Crosstalk Outcome (NILCO) Is Critical for Leptin-Induced Proliferation, Migration and VEGF/VEGFR-2 Expression in Breast Cancer June 2011 | Volume 6 | Issue 6 | e21467 NILCO
- 4) Hong-Mei Zhang, Pei Liu, Cheng Jiang, Xiao-Qing Jin, Rui-Ning Liu, Shun-Qing Li, Yan Zhao. Notch signaling inhibitor DAPT provides protection against acute craniocerebral injury (2018) PLoS ONE 13(2): e0193037.
- 5) Yu HC, Bai L, Yue SQ, Wang DS, Wang L, Han H, Dou KF. Notch signal protects non-parenchymal cells from ischemia/reperfusion injury in vitro by repressing ROS Ann Hepatol. 2013 Sep-Oct;12(5):815-21.
- 6) Yu HC, Qin HY, He F, Wang L, Fu W, Liu D, Guo FC, Liang L, Dou KF, Han H. Canonical notch pathway protects hepatocytes from ischemia/reperfusion injury in mice by repressing reactive oxygen species production through JAK2/STAT3 signaling. Hepatology. 2011 Sep 2;54(3):979-88. doi: 10.1002/hep.24469. Epub 2011 Aug 8.
- 7) Kuran O. Sistematik Anatomi. Filiz Kitabevi, İstanbul 1983; ss 429-443.

- 8) Townsend MC, Beauchamp RD, Evers BM. Liver. In: Meyers WC, Chan RS (Eds). Sabiston Textbook of Surgery 16th. WB Saunders Company, Philadelphia 2001; pp 997-1059
- 9) Jarnagin WR, Fong Y, Blumgart LH, Launois B. Hepatic resection. In: Schein M, Wise L(eds). Crucial controversies in surgery. Karger Landes Systems Basel 1997; pp. 201-216.
- 10) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Sindirim Kanalına Bağlı Bezler (çeviri: S. ince).Aytekin Y. (Editör). Temel histoloji“de. istanbul: BarıÇ Kitabevi; 1993.
- 11) Townsend MC, Beauchamp RD, Evers BM. Liver. In: Meyers WC, Chan RS (Eds). Sabiston Textbook of Surgery 16th. WB Saunders Company, Philadelphia 2001; pp 997-1059.
- 12) Ethier C, Kestekian R, Christine B, Dube C et all. Vitamin D depletion retards the normal regeneration process after partial hepatectomy in the rat. Endocrinology 1990;126: 2947-2959
- 13) Higgins G, Anderson R. Experimental Pathology of The Liver. Experimental Surgery and Pathology 1931;186-202
- 14) Bucher RL. Regeneration of Mammalian Liver. Cancer Commission of Harward University 1995; 1081
- 15) Anderson RW, Zieve L, Lindblad S. Ultrastructural Study of Hepatic Regeneration Following One-Lobe, Two-Lobe and Subtotal Hepatectomy in the Rat Ex Pathol 1990; 38:6172
- 16) Bartel H, Orkisz S, Kmiec B. Ultrasuturctural of Hepatocyte Regeneration Rat Liver. Folia Morphol 1972;XXXVI, 367-72
- 17) Fausto N, Webber EM. Liver regeneration. In: Arias I, Boyer J, Fausto N, et al. eds. The liver: biology and pathobiology. New York: Raven Pres; 1994:1059- 1084.
- 18) Diehl AM, Rai R. Review: Regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. J Gastroenterol Hepatol 1996;11: 466-470.

- 19) Holt DR, Thiel DV, Edelstein S, Brems JJ. Hepatic resections. *Arch Surg* 2000;135:1353-1358.
- 20) Bucher RL. Regeneration of Mammalian Liver. Cancer Commission of Harvard University 1995; 1081
- 21) Anderson RW, Zieve L, Lindblad S. Ultrastructural Study of Hepatic Regeneration Following One-Lobe, Two-Lobe and Subtotal Hepatectomy in the Rat *Ex Pathol* 1990; 38:6172
- 22) Fausto N: Liver regeneration. *J Hepatol* 32: 19-31, 2000
- 23) Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 276: 60-6, 1997
- 24) Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br. J. Surg* 89: 1089-1095, 2002
- 25) Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 48:556-62, 2001
- 26) Fausto N: Hepatic regeneration. Zakim D, Boyer TD (eds). *Hepatology* WB Saunders, Philadelphia 32-58, 1996
- 27) Nejak-Bowen K.N, Monga S.P. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol.* 2011; 21:44–58.
- 28) Chen J.A, Shi M, Li J.Q, Qian C.N. Angiogenesis: multiple masks in hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *Hepatol Int.* 2010;4:537–47.
- 29) Baykara B, Tekmen I. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 19: 185-194.
- 30) Yoshikawa T, Murakami M, Yoshida N, et al. Effect of superoxid dismutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats. *Thrombosis and Haemostasis* 1993; 50: 869–872.
- 31) Junqueira, LC, Carneiro, J. 2003, *Basic Histology Text & Atlas*, Tenth Edition, USA: McGraw-Hill Companies, 332.

- 32) Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. *Journal of Hepatology*, 2000; 32: 39–47.
- 33) Hirsch J, Niemann CU, Hansen KC, Choi SJN, Su X, Frank JA, et al. Alterations in the proteome of pulmonary alveolar type II cells in the rat after hepatic ischemia-reperfusion. *Crit Care Med* 2008;36:1846–54.
- 34) Vega VL, Mardones L, Maldonado M, Nicovani S, Manriquez V, Roa J, et al. Xanthine oxidase released from reperfused hindlimbs mediate kupffer cell activation, neutrophil sequestration, and hepatic oxidative stress in rats subjected to tourniquet shock. *Shock* 2000;14:565–71.
- 35) He GZ, Dong LG, Chen XF, Zhou KG, Shu H. Lymphduct ligation during ischemia/reperfusion prevents pulmonary dysfunction in a rat model with omega-3 polyunsaturated fatty acid and glutamine. *Nutrition* 2011;27:604–14.
- 36) Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190:255–66.
- 37) Zhai, Y., et al., Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation-- from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. 10(2): p. 79-89.
- 38) Bejaoui, M., et al., Carbonic Anhydrase Protects Fatty Liver Grafts against Ischemic Reperfusion Damage. *PLoS One*, 2015. 10(7): p. e0134499.
- 39) Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 1994; 81: 637-647.
- 40) Göksel Ş, Berrak ÇY. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim* 5-13 Best B. Ischemia and reperfusion injury in cryonics.
- 41) Uz E, Yılmaz HR, Iraz M, ve ark. Effects Of Vitamin E And Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) On Methabolic Enzymes Of Rats With Experimental Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Ege Tıp Dergisi* 2002; 41: 77–82.
- 42) Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2001; 94: 1133-1138.

- 43) Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte--endothelial cell interactions: role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J* 2006;70(8):1070-5.
- 44) Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A, İşlekel H, Can yilmaz M, et al. Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2006;50(2):150-5.
- 45) Abu-Amara, M., et al., Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl*, 2010. 16(9): p. 1016- 32.
- 46) Zhai, Y., et al., Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation-- from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. 10(2): p. 79-89.
- 47) Guan, L.Y., et al., Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World J Gastrointest Surg*, 2014. 6(7): p. 122-8.
- 48) Brenner, C., et al., Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol*, 2013. 59(3): p. 583-94.
- 49) Ogawa, K., et al., Influence of Kupffer cells and platelets on ischemiareperfusion injury in mild steatotic liver. *World J Gastroenterol*, 2013. 19(9): p. 1396-404.
- 50) Funahashi H, Yada T, Muroya S, Takigawa M, Ryushi T, Horie S, Nakai Y and Shioda S, The Effectsof leptin on feeding-regulating neurons in the rat hypothalamus, *Neurosci Lett*, 1999;264, 117-120
- 51) Teker Z, Özer G, Topaloğlu K, Mungan NÖ and Yüksel B (2002) Leptin yapı ve Fizyolojisi *Arsiv* 2002; 11: 30-40
- 52) Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, Walsh SA and Mark AL Sympathetic and hematopoiesis, *J Leukoc Biol*, 1997;68,437-446.
- 53) Auwex J and Steals B Leptin, *Lancet*, 1998;351, 737-742.
- 54) Prolo P, Wong ML and Licinio J () Molecules in focus leptin, *Int J Biochem Cell Biol*, 1998;30,1285- 1290.
- 55) Fruhbeck G, Jebb SA and Prentice AM (1998) Leptin physiology and pathophysiology, *Clin Physiol*. 1998 Sep;18(5):399-419.

- 56) Funahashi H, Yada T, Muroya S, Takigawa M, Ryushi T, Horie S, Nakai Y and Shioda S, The Effects of leptin on feeding-regulating neurons in the rat hypothalamus, *Neurosci Lett*, 1999;264, 117- 120.
- 57) Meister B (2000) Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm.* 2000;59:265-304.
- 58) Sinha MK. Human leptin: the hormone of adipose tissue. *Eur J Endocrinol.*1997;136:461-4.
- 59) Ergün A. Leptin (ob protein). *T Klin Tıp Bil.* 1999;19:130-6.
- 60) Grunfeld, C., Zhao, C., Fuller, J., Pollock, A., Moser, A., Friedman, J., Feingold, K.R., 1996. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *Journal of Clinical Investigation* 97 (9), 2152–2157
- 61) Gonzalez-Perez RR, Lanier V, Newman G. Leptin's Pro-Angiogenic Signature in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2013;5(3):1140-1162. Published 2013 Sep 6. doi:10.3390/cancers5031140
- 62) Gonzalez R.R., Cherfils S., Escobar M., Yoo J.H., Carino C., Styer A.K., Sullivan B.T., Sakamoto H., Olawaiye A., Serikawa T., et al. Leptin signaling promotes the growth of mammarytumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2) *J. Biol. Chem.* 2006;281:26320–26328. doi: 10.1074/jbc.M601991200.
- 63) Bhaskaran K., Douglass I., Forbes H., dos-Santos-Silva I., Leon D.A., Smeeth L. Body-Mass index and Risk of 22 Specific Cancers: A population-based cohort study of 5.24 UK adults. *Lancet*. 2014;384:755–765. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60892-8.
- 64) Guo S, Gonzalez-Perez RR. Notch, IL-1 and leptin crosstalk outcome (NILCO) is critical for leptin-induced proliferation, migration and VEGF/VEGFR-2 expression in breast cancer. *PloS One*. 2011;6:e21467. doi: 10.1371/journal.pone.0021467
- 65) Gillespie C, Quarshie A, Penichet M, Gonzalez-Perez RR. Potential role of leptin signaling in DMBA-induced mammary tumors by Non-responsive C57BL/6 J mice Fed a high-Fat diet. *J Carcinogene Mutagene*. 2012;3:132.

- 66) Battle M, Gillespie C, Quarshie A, Lanier V, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. Obesity induced leptin-Notch signaling axis in breast cancer. *Int J Cancer*. 2014;134:1606–1616
- 67) Gonzalez-Perez RR, Lanier V, Newman G. Leptin's proangiogenic signature in breast cancer. *Cancers*. 2013;5:1140–1162. doi: 10.3390/cancers5031140.
- 68) Gonzalez RR, Cherfils S, Escobar M, Yoo JH, Carino C, Styer AK, Sullivan BT, Sakamoto H, Olawaiye A, Serikawa T, Lynch MP, Rueda BR. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2) *J Biol Chem*. 2006;281:26320–26328. doi:10.1074/jbc.M601991200.
- 69) Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D. Leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J Biol Chem*. 2007;282:13316–13325. doi: 10.1074/jbc.M609798200
- 70) Ferla R, Bonomi M, Otvos L, Surmacz E. Glioblastoma-derived leptin induces tube formation and growth of endothelial cells: comparison with VEGF effects. *BMC Cancer*. 2011;11:303.
- 71) Guo S, Liu M, Wang G, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 1825;2012:207–222.
- 72) Luca VC et al. Structural biology. Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4. *Science*. 2015;347(6224):847–53.
- 73) Kandachar V, Roegiers F. Endocytosis and control of Notch signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(4):534–40.
- 74) Artavanis-Tsakonas S, Muskavitch MA, Yedvobnick B. Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:1977–81.

- 75) Bray, S.J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678 – 689.
- 76) Dou, S., Zeng, X., Cortes, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Honjo, T. and Vales, L.D. (1994) The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3310 – 3319.
- 77) Waltzer, L., Bourillot, P.Y., Sergeant, A. and Manet, E. (1995) RBP-J kappa repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. *Nucleic Acids Res.* 23, 4939 – 4945.
- 78) Ntziachristos P, Lim JS, Sage J and Aifantis I: From fly wings to targeted cancer therapies: A centennial for notch signaling. *Cancer Cell.* 25:318–334. 2014.
- 79) Okajima T and Irvine KD: Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell.* 111:893–904. 2002.----- Haines N and Irvine KD: Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:786–797. 2003.
- 80) Ntziachristos P, Lim JS, Sage J and Aifantis I: From fly wings to targeted cancer therapies: A centennial for notch signaling. *Cancer Cell.* 25:318–334. 2014.
- 81) Guo S, Liu M and Gonzalez-Perez RR: Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1815:197–213. 2011.
- 82) Lai EC: Notch signaling: Control of cell communication and cell fate. *Development.* 131:965–973. 2004.----- Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Banerjee S, Kong D and Sarkar FH: Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 1806:258–267. 2010.
- 83) Kopan R and Ilagan MX: The canonical Notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism. *Cell.* 137:216–233. 2009.
- 84) Louvi A and Artavanis-Tsakonas S: Notch and disease: A growing field. *Semin Cell Dev Biol.* 23:473–480. 2012.
- 85) Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B and Miele L: Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene.* 27:5124–5131. 2008.----- Wang Z, Zhang Y, Li Y, Banerjee S, Liao J and Sarkar FH: Down-regulation of

Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 5:483–493. 2006.

86) Guo S, Liu M and Gonzalez-Perez RR: Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1815:197–213. 2011.

87) Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N and Böttinger EP: Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J.* 23:1155–1165. 2004.

88) Lawson ND, Vogel AM and Weinstein BM: sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell.* 3:127–136. 2002.

89) Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Banerjee S, Kong D and Sarkar FH: Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 1806:258–267. 2010.

90) Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR. Role of notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1815;2011:197–213.

91) Espinoza I, Miele L. Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacol Ther.* 2013;139:95–110. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.02.003.

92) Guo S, Liu M, Wang G, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 1825;2012:207–222.

93) Pay S. The use of anti-TNF drugs rheumatic disorders. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2006; 26: 430-440.

94) Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite R, Ju G . Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 1995; 270: 13757-13765.

95) Huang J, Gao X, Li S, Cao Z. Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12829-12832.

- 96) Hofmeister R, Wiegmann K, Korherr C, Bernardo K, Kronke M, Falk W. Activation of acid sphingomyelinase by interleukin-1 (IL-1) requires the IL-1 receptor accessory protein. *J Biol Chem* 1997; 272:27730-27736.
- 97) Dina M. Elaraj, David M. Weinreich, Sheelu Varghese, Markus Puhlmann, Stephen M. Hewitt, Nancy M. Carroll, Elizabeth D. Feldman, Ewa M. Turner and H. Richard Alexander. The Role of Interleukin-1 in Growth and Metastasis of Human Cancer Xenografts. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1088-1096
- 98) Elena Voronov, Dror S. Shouval, Yakov Krelin, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *PNAS* 2003; 100: 2645-2650.
- 99) Imaizumi T, Itaya H, Nasu S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells stimulated with interleukin-1 α an autocrine regulation of angiogenesis and inflammatory reactions. *Thromb Haemost* 2000; 83:949-955.
- 100) Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, et al. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1999; 274:11924-11929.
- 101) Newman G., Gonzalez-Perez R. R. Leptin–cytokine crosstalk in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;382(1):570–582. doi: 10.1016/j.mce.2013.03.025.
- 102) Zhou W., Guo S., Gonzalez-Perez R. R. Leptin pro-angiogenic signature in breast cancer is linked to IL-1 signalling. *British Journal of Cancer*. 2011;104(1):128–137. doi: 10.1038/sj.bjc.6606013.

