

**PARS YAL HEPATEKTOM YAPILMI SIÇANLARDA
PUNICALAGIN' N KARAC ER ÜZER NDEK
APOPTOT K ETK LER N N DE ERLEND R LMES**

Öge ARTAGAN

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Mart-2014

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

JÜR VE ENSTİTÜ ONAYI

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

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. F L Z ALANYALI
Üye :	Prof. Dr. AHMET ÖZATA
Üye :	Doç. Dr. SEV L ENTÜRK
Üye :	Doç. Dr. MUSTAFA UYANO LU
Üye :	Doç. Dr. HAKAN ENTÜRK

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

Enstitü Müdürü



ÖZET

Doktora Tezi

PARSİYAL HEPATEKTOM YAPILMI SIÇANLARDA
PUNICALAGİN'İN KARACİER ÜZERİNDEKİ
APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Öge ARTAGAN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Filiz ALANYALI

2014, 80 sayfa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TE EKKÜR

Doktora tez çalı mamın ekillendirilmesi, olu ması, sonuçlandırılması, de erlendirilmesinde deste ini esirgemeyen danı man hocam sayın Doç. Dr. Filiz ALANYALI' ya,

Tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçların de erlendirilmesinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandı ım danı man hocam sayın Doç. Dr. Mediha CANBEK'e,

E itimime de erli katkıları sa layan hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya,

Deney hayvanları laboratuvar ve cihaz olanaklarından yararlanmamı sa layan hocam sayın Doç.Dr. Hakan ENTÜRK'e

Çalı malarım sırasında uyguladı ım cerrahi yöntemi, bana kazandıran hocam sayın Doç. Dr. Mustafa UYANO LU'na

statistiksel analizlerimi aydınlattı ı için hocam sayın Doç.Dr. Sevil ENTÜRK'e,

Çalı malarım sırasında yardımları ve i birli i için hocam sayın Dr. Emre CEYHAN'a ve Dr. Ahmet ÖZEN'e,

Laboratuvarda birarada çalı tı ım tüm ekip arkadaş larıma,

Sonsuz Te ekkürler...

Tezimi; Babam Ömer BA O LAN'a, Annem Neyil BA O LAN'a ve e im Salih ARTAGAN'a ithaf ediyorum.

Varlı ıyla, ruhumu besleyen yavruma minnettarım...

Ç NDEK LER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TE EK KÜR	iii
Ç NDEK LER	iv
EK LLER D Z N	vii
TABLolar D Z N	viii
S MGELER ve KISALTMALAR	ix
1. G R	1
1.1. Karaci er Hitolojisi.....	1
1.2. Karaci er Anatomisi	2
1.3. Karaci er Hücre Tipleri	3
1.4. Punicalagin.....	7
1.5. Apoptoz.....	10
1.5.1. Apoptozun ndüksiyonu	11
1.5.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	12
1.6. Kaspazların Aktivasyonu	17
1.7. NF- B.....	19
1.8. Kantitatif RT-PCR Yöntemi	22
1.9. Hepatik Hasar.....	23
1.10. Parsiyal Hepatektomi	23
1.11. Karaci er Rejenerasyonu	25



2. MATERYAL VE YÖNTEM	27
2.1. Deney Hayvanları.....	27
2.2. Deney Grupları.....	27
2.3. Puncialagin Uygulaması	28
2.4. Anestezi ve Cerrahi İşlemler	28
2.4.1. Parsiyal hepatektomi işlemi	28
2.5. Doku örneklerinin değerlendirilmesi	32
2.5.1. Real Time-PCR	32
2.5.1.1. Trizol ile RNA izolasyonu için gerekli malzemeler	33
2.5.1.2. RNA izolasyon basamakları.....	33
2.5.1.3. RT reaksiyonu için gerekli malzemeler	34
2.5.1.4. RNA'nın RT reaksiyonu ile c-DNA dönüştürme basamakları.....	34
2.5.1.5. cDNA saklama koşulları	36
2.5.1.6. Real Time PCR reaksiyon bileşenleri	36
2.5.2. Q RT-PCR reaksiyonu	37
2.5.2.1. Probların Sulandırılması	37
2.5.2.2. Balaşma reaksiyonu	38
2.5.2.3. Ligasyon reaksiyonu	38
2.5.2.4. Proteoliz reaksiyonu.....	39
2.5.2.5. Q-PCR reaksiyon basamakları	39
2.5.3. TUNEL metodu.....	41
2.6. Statistiki sel analiz	44
3. BULGULAR	45
3.1. Histolojik de ğerlendirmeler	45
3.2. Apoptotik indeks bulguları.....	50
3.3. RT-PCR bulgular	52
3.4. Q-PCR bulguları	55

4. TARTI MA ve SONUÇ	58
5. KAYNAKLAR	66

EK LLER D Z N

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

TABLOLAR D Z N

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

S İMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma

mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit Messenger Ribonucleic Acid
cDNA	Komplementer DNA Complementary DNA
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Real Time Polymerase Chain Reaction
NF- B	Nükleer Faktör Kappa B Nuclear Factor Kappa B
PH	Parsiyal Hepatektomi Partial Hepatectomy
AP-1	Aktivatör Protein -1 Activator Protein 1
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzim li kili mmünsorbent Analizi Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
TNF-	Tümör Nekroz Faktör-Alfa Tumor Necrosis Factor-Alpha
IkB	NF- κ B nhibitörü Inhibitor of NF- κ B
IKK	IkB Kinaz IkB Kinase
IL	Interlökin Interleukin
IL1	Interlökin 1 Alfa Interleukin 1 Alpha

S İMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma

IL1	Interlökin 1 Beta Interleukin 1 Beta
NIK	NF-κB- ndükleyici Kinaz NF-κB Inducing Kinase
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu Phosphate-bufferd saline
TNF-	Tümör Nekroz Faktör-Alfa Tumor Necrosis Factor-Alpha
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Real Time Polimerase Chain Reaction
Q-PCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Quantitative Polimerase Chain Reaction
TUNEL	TdT-Aracılı dUTP Son aretleme Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP Nick End Labeling
IP	nteraperitoneal Intraperitoneal
SV	Sentral Ven Vena Sentralis
PA	Portal Alan Portal Area
ALT	Alanin-transaminaz Alanine transaminase
AST	Aspartat- transaminaz Aspartate transaminase
EGF	Epidermal Growth Faktör Epidermal Growth Factor

S İMGELER ve KISALTMALAR D Z N**Kısaltma**

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

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**Kısaltma**

μ	Mikron
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromol
mL	Mililitre
mg	Miligram
U/L	Ünite/Litre
%	Yüzde
L	Litre
CT	Etik Döngüsü
M	Molar
Ppm	Milyonda Bir
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece

1. G R

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

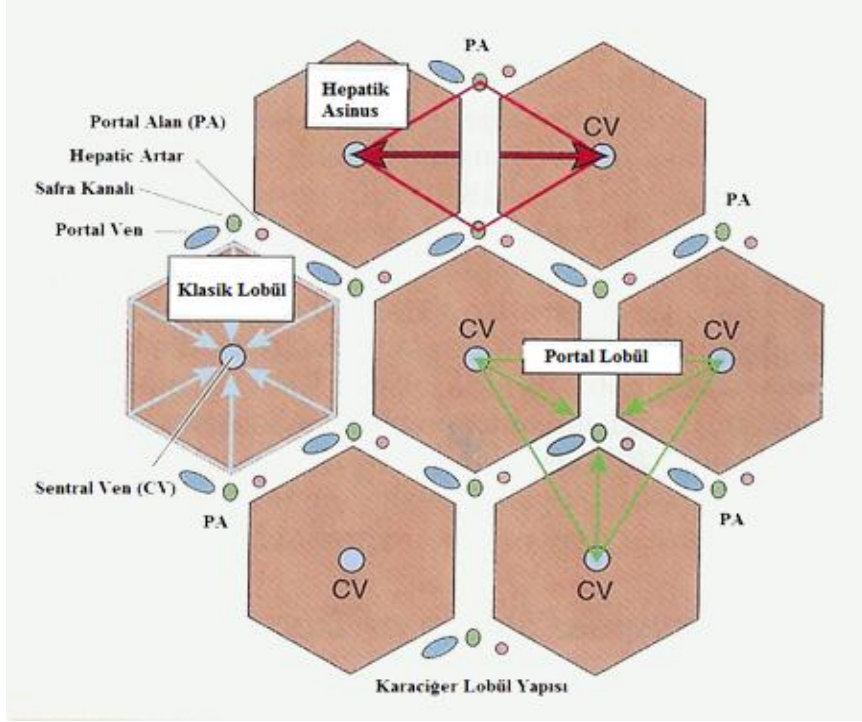
1.1. Karaciğer Histolojisi

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

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

1.2. Karaciğer Anatomisi

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



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

1.3. Karaciğer Hücre Tipleri

a) Hepatositler

Karaciğer lobül yapısını oluşturan, temel metabolik reaksiyonların gerçekleştirildiği ana hücrelerdir. Lobül içinde 1 msal formda dizilmiş 6 ya da daha fazla yüzü yaklaşık 20-30 μm çapındadırlar (ekil 1.2.). Tüm karaciğer dokusunun %80'ini, toplam hücre sayısının yaklaşık %60'ını oluştururlar. Endotel hücreleri ile hepatositler arasında Disse aralıkları bulunur ve kan ile hepatositler arasındaki madde alışverişini bu boşluklarda gerçekleştirir. Hepatositlerin Disse aralığına bakan yüzleri safra kanalcıklarının oluşumuna katılır. Hepatositler, normal koşullarda oldukça düşük mitotik aktiviteye sahip olmasına rağmen, dokuda meydana gelebilecek herhangi bir cerrahi müdahale veya hepatik hasar sonrasında mitotik aktiviteleri artar (Ganong, 1995; Dilek, 2003; Junqueira ve ark., 1993).

b) Endotel Hücreleri

Sinüzoidleri kaplayan hücrelerdir. Endotel Hücreleri, disse aralı 1 ile hepatositlerden ayrılmı lardır. Sinüzoid yüzeyini kapladıkları için sinüzoidal endotel hücreleri olarak da adlandırılırlar. Sinüzoidler içerisindeki konumları itibarıyla, hepatositler ile aralarında madde alı veri ine olanak sa larlar (Smith ve ark., 2007; Junqueira ve ark., 1993).

c) Kupffer Hücreleri

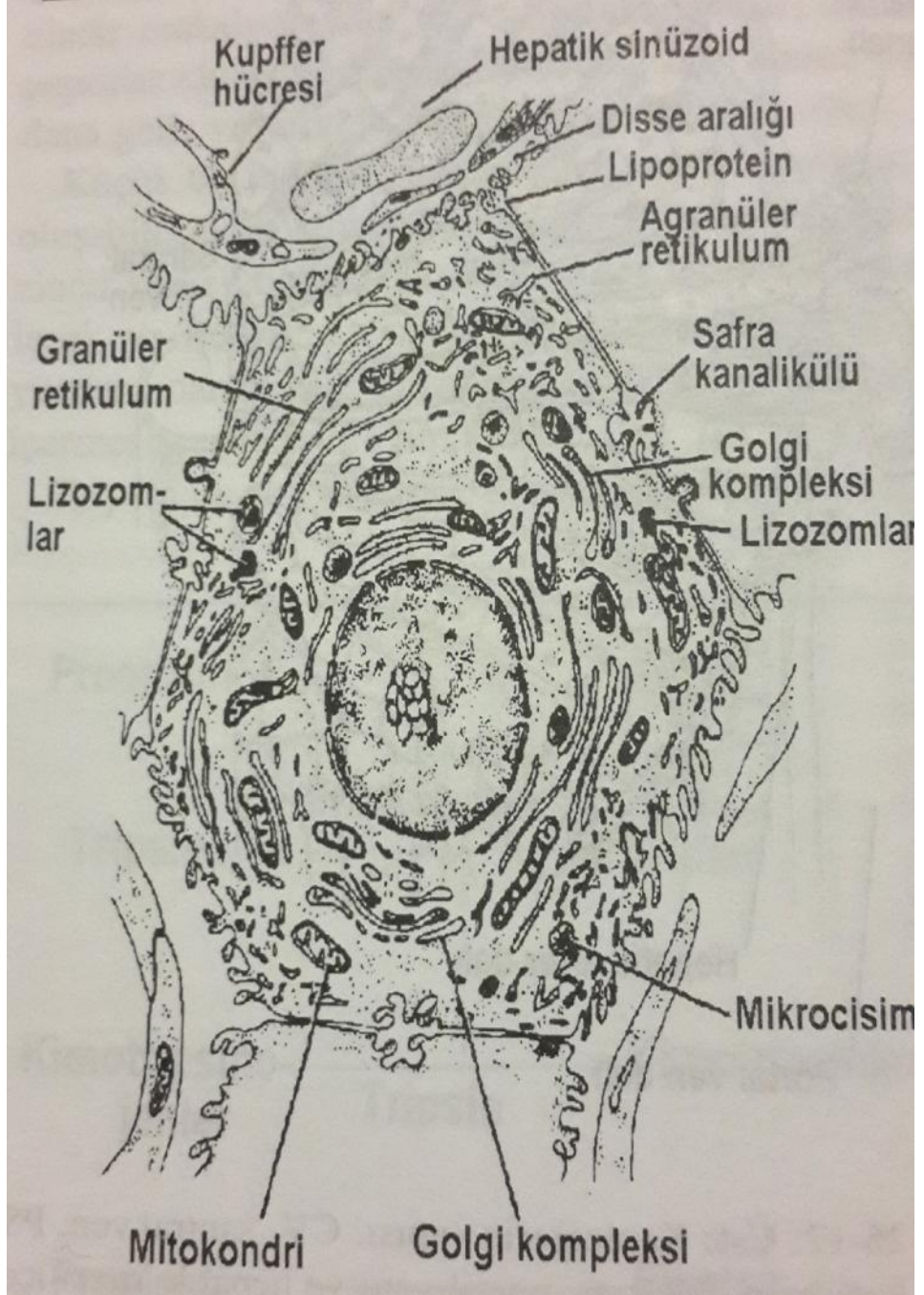
Sinüzoidal alanda endotel hücrelerinin yanında yerle mi makrofajlardır. Kupffer hücreleri denen bu makrofajlar, endotel hücrelerin lümene bakan kısımlarında bulunur. Temel fonksiyonları; ya lı eritrositleri ve hemoglobini metabolize etmek, immünolojik proteinleri sentezlemektir. Lizozomların yakla ık %25'ine sahiptirler, fagositoz ve endositoz fonksiyonlarını gerçekle tirirler. mmünomodülatörlerle uyarıldıklarında sitokin salınımını te vik ederler (Smith ve ark., 2007; Junqueira ve ark., 1993).

d) to Hücreleri (Perisinüzoidal Hücre)

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

e) Pit Hücreleri

Endotel hücrelere ve Kupffer hücrelerine yapı ık formda lokalize olmu di er bir hepatik sinuzoidal hücre tipidir (Nakatani ve ark., 2004). Potansiyel toksinlere kar ı karaci er savunma mekanizmasını olu turan do al öldürücü hücrelerdir (Smith ve ark., 2007; Kaneda ve ark., 1983). Yapılan çalı malarda hepatik do al öldürücülerin deneysel karaci er metastazının baskılanmasında oldukça etkili oldu u ortaya koyulmu tur (Wiltrout ve ark., 1984; Wiltrout ve ark., 1985).



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

1.4. Punicalagin

Do anın mucizevi meyvesi olarak bilinen nar (*Punica granatum*) pek çok ülkede geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır (Moneim ve ark., 2012; Ajaikumar ve ark., 2005). Nar; meyve, tohum ve suya kırmızı rengini veren antosiyaninler, ellagik asit ve punicalagin (ekil 1.3.) gibi hidrolize tanenlerden kaynaklı zengin bir polifenol kayna ıdır (Bell ve Hawthorne, 2007; Adams ve ark., 2006). Aynı zamanda güçlü bir antioksidan (Lin ve ark., 2001), antienflamatuar (Adams ve ark., 2006), antiarteriosklerotik (Aviram ve Dornfeld, 2001; Kaplan ve Aviram, 2001; Nigris ve ark., 2005), antiproliferatif, proapoptotik (Seeram ve ark., 2005) etkili oldu u birçok çalı mada rapor edilmi tir. Hipertansiyon (Aviram ve Dornfeld, 2001), diyabet (Das, 2001; Huang ve ark., 2005), kardiyak fibrozis (Huang ve ark., 2005b), prostat kanseri (Heber, 2008; Malik ve ark., 2005), cilt kanseri (Afaq ve ark., 2005), akci er kanseri (Khan ve ark., 2007), kolon kanseri (Khan, 2009; Kasımsetty ve ark., 2010), gö üs kanseri (Syed ve ark., 2007; Heber, 2008), üzerinde inhibe edici etkileri oldu u deneysel olarak gösterilmi tir.

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

Narın preslenmesi ile elde edilen nar suyunun antioksidan aktivitesinin %92 sini nar kabu unda bulunan ve hidrolize olabilen tanenlerden kaynaklandı ı (Tzulker ve ark., 2007), nar suyunun antioksidan aktivitesinin %50 den fazla kısmının sadece punicalaginden kaynaklandı ı rapor edilmi tir (Adams ve ark., 2006).

Punicalagin, nar kabu una sarı rengini veren ve i leme esnasında meyve suyuna geçen ellagik asite hidroliz olabilen (Heber, 2008) fenolik bile iktir.

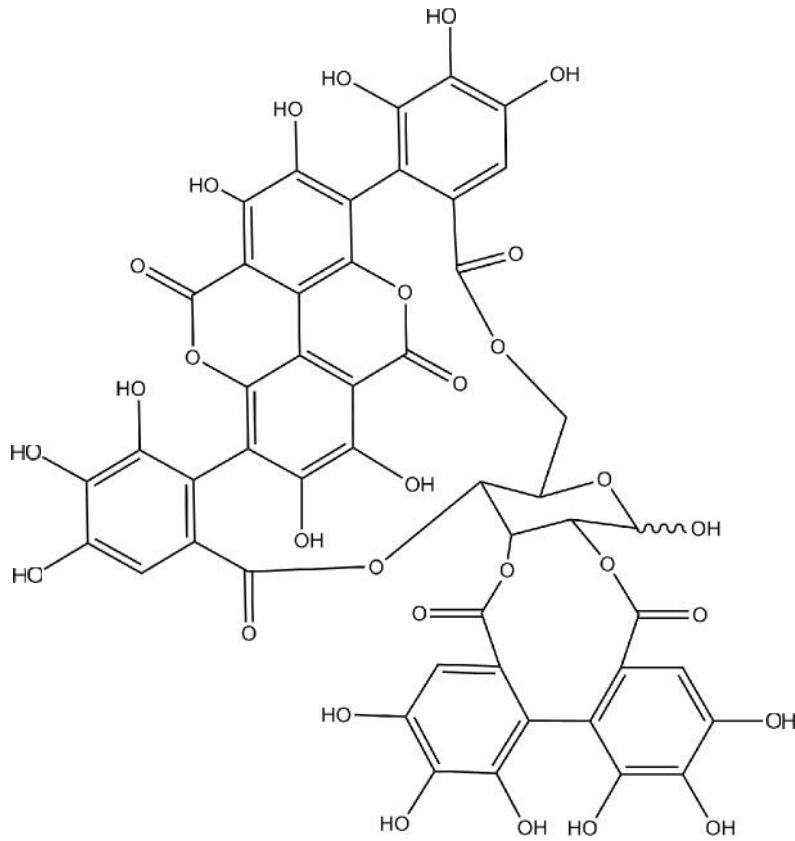
Punicalagin yüksek molekül a ırlı ında, nara özğü bir ellagitanındır (Kulkarni ve ark., 2007; Patel ve ark., 2008). Sahip oldu u antioksidan kapasite, yapısındaki hidroksil (OH) gruplarından kaynaklanmaktadır (Kulkarni ve ark., 2007).

Punicalagin, nar içeri inde yüksek oranda bulunan bir ellagitanındır, serumda ellagik aside hidrolize olarak ba ırsak florasın da urolitine (ellagik asit analo u) dönü ür. Urolitin prostat kanseri üzerinde oldukça etkili bir inhibisyona sahiptir. Heber ve arkadaş larının (2008) yaptı ı bir çalı mada prostat kanseri hücrelerinin punicalagin maruziyeti sonrasında NF- B aktivasyonunun inhibe edildi ini ortaya koymu lardır.

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

Sprague-Dawley sıçanlarda, nar suyunda oldukça fazla bulunan bir ellagitanin olan punicalagin (2 g/L), olası toksik etkileri incelenmi tir. Diyetlerinde ortalama %6 punicalagin bulunacak ekilde 37 gün boyunca beslenmi lerdir. Glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzim düzeylerinde herhangi bir artı gözlenmemi tir. Histopatolojik bulgularda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemi tir (Cerdá B ve ark., 2003).

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



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

1.5. Apoptoz

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

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

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

1.5.1. Apoptozun İndüksiyonu

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

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

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

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

1.5.2. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

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

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

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

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

Hematoksilen-eozin boyama

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

Giemsa Boyama

Giemsa boyama tekni inde hücre çekirde i boyandı için, apoptotik hücreler belirgin morfolojik farklılıklarla ayırt edilebilmektedir (Yılmaz, 2005; Güle ve Eren 2008).

Elektronmikroskopi

Hücre subsellüler yapı de i ikliklerinin ayrıntılı bir biçimde incelenmesine olanak sa layan ileri mikroskopi tekni idir. Hücre hacminin küçülmesi, kromatin fragmentasyonu-kondensasyonu, hücre organellerinin i me-büzülme durumları, hücre zarı bütünlü ü gibi ayrıntıların incelenmesine olanak sa lar (Yılmaz, 2005; Güle ve Eren 2008).

Anneksin V yöntemi

Normal fizyolojiye sahip hücrelerde membranın iç yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin bulunmaktadır. Hücre apoptotik evreye girdi inde, iç yüzde yerle mi olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dı yüzüne transloke olurlar. Bu yer de i tirme hücre membran bütünlü ünün bozulmadı ı apoptotik sürecin ba langıç evrelerinde meydana gelir. Hücrenin dı yüzeyine transloke olan fosfatidilserine ba lanabilme özelli ine sahip olan Anneksin-V, floresan bir madde olan FITC ile i aretilenerek apoptotik hücre

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

Agaroz jel elektroforezi

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

Flow sitometri

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

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

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

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

Faz kontrast mikroskopi

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

M30 yöntemi

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

Kaspaz-3 yöntemi

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

Western blotting

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

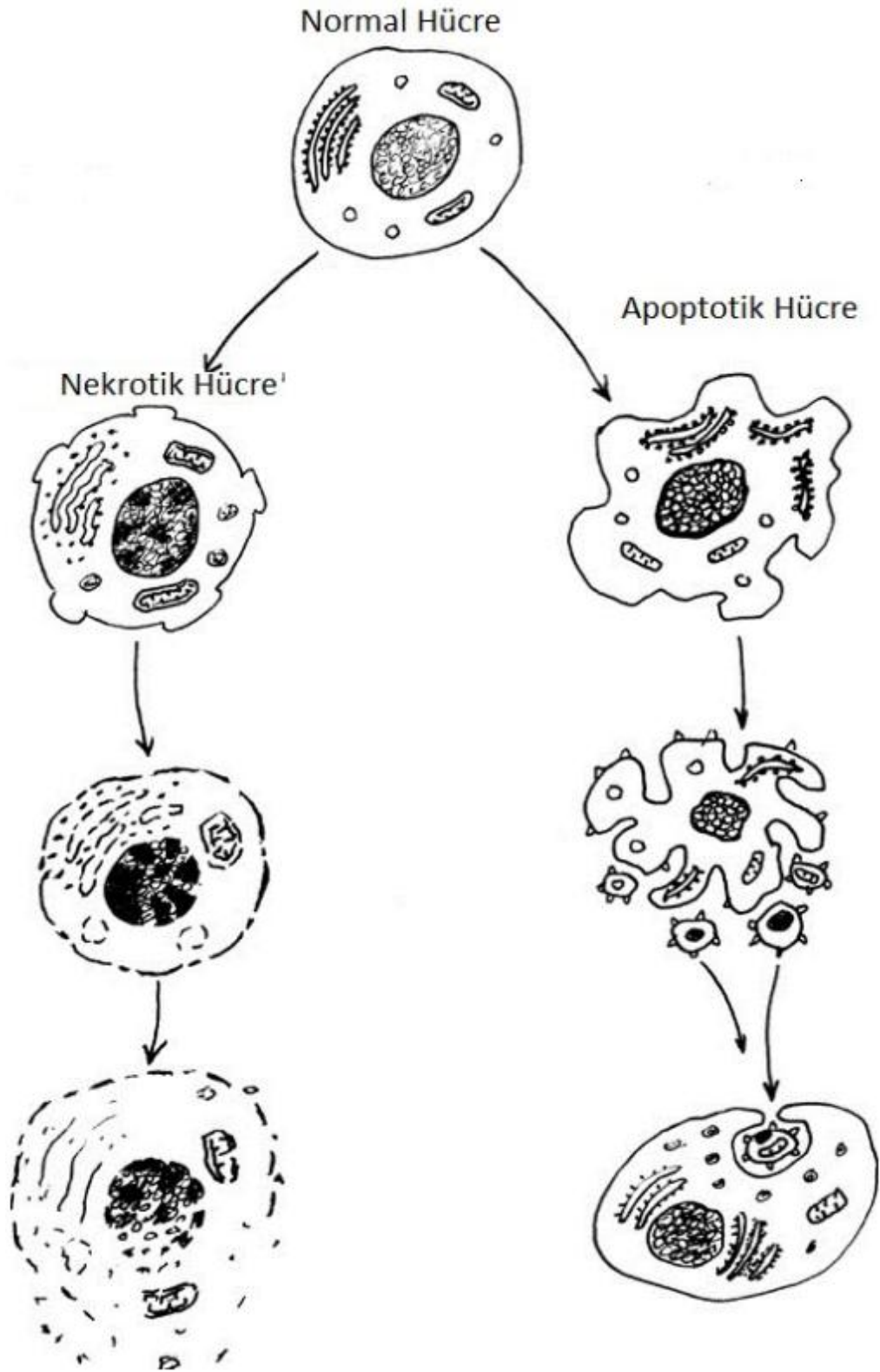
Floresan Mikroskopi

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

1.6. Kaspazların Aktivasyonu

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

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



ekil 1.4. Nekrotik ve Apoptotik ölüm farklılı 1 (Meer ve ark., 2010)

1.7. NF- B (NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B)

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

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

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

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

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

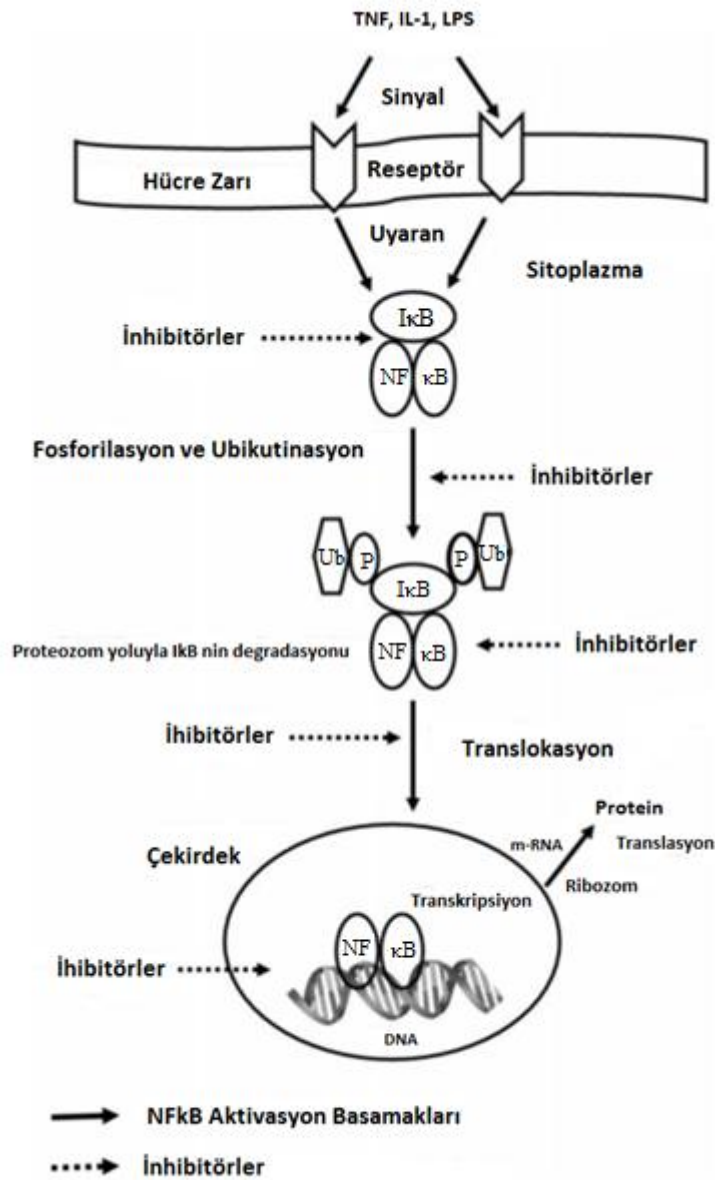
NF- B aktivasyonu bloke edildiğinde, apoptoz kaspaz inhibitörleri tarafından bloke edilir. TNF- aktivasyonu ise kaspaz-2 ve kaspaz-3 aktivasyonunu artırır, kaspaz-8 ise sadece NF- B aktivasyonu engellendiğinde aktive olur (Xu ve ark., 1998).

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

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

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

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



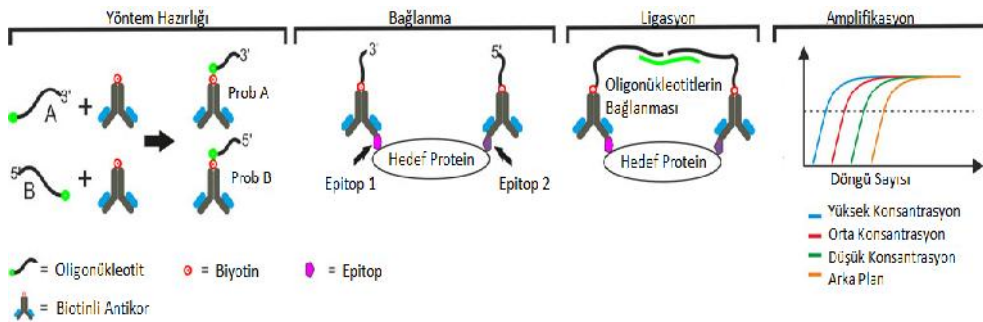
ekil 1.5. NF- κ B aktivasyonu (Luqman ve Pezzuto, 2010)

1.8. Kantitatif RT-PCR Yöntemi

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

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

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



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

1.9. Hepatik Hasar

Akut karaci er hasarı, alkole ba lı karaci er hasarı, ilaçlara ba lı karaci er hasarı, kronik karaci er hasarı olmak üzere hepatik hasar tipleri gruplandırılabilir. AST, ALT, -glutamil-transpeptidaz ve glutamat-dehidrogenaz gibi enzim de erlerinin kan da yükselmeleri karaci erde hepatik hasara i aret etmektedir (Karlson, 1980). Transaminaz düzeylerinin, AST için 200U/L, ALT için 300U/L de erlerine ula mı olması hepatik hasarın göstergesidir. Akut hepatik hasarda AST, ALT düzeyleri hızlı pik yapar, pikden sonra hızlı bir dü ü gösterir. AST düzeyi ALT düzeyine göre daima daha yüksektir yarılanma ömrü de ALT ye göre daha kısadır (Dilek, 2003).

1.10. Parsiyal Hepatektomi

Karaci erde parsiyel hepatektomi genellikle kitlesel lezyonların (metastaz, primer karaci er tümörleri, hemanjiom, vb.) tedavisinde, canlıya karaci er transplantasyonlarında uygulanmaktadır (Bedirli ve ark., 2005).

Karaci er loblarının bir kısmının (yakla ık %70) cerrahi olarak çıkartılması (parsiyal hepatektomi) sonrası, karaci er eski yapısına dönmek için hepatositler hızla bölünme evresine geçerler (Rabes, 1978; Fausto; 1990). %70 PH sonrası hepatositler G₀ fazından G₁ fazına geçi leri 4-6 saat içinde tamamlanır. Hepatositlerin G₁ fazından S fazına geçi leri 18 saat içinde ba lar ve 24 saat içinde maksimum seviyeye ula ır (Chagas ve ark., 2009). Karaci er tekrar normal büyüklü üne eri ene kadar rejenerasyon devam eder (Michalopoulos ve DeFrances, 1997). Karaci er yapısında çok farklı hücre tipleri mevcuttur ve hepatik rejenerasyon esnasında aktif rol alırlar. Kısmi hepatektomi sonrasında rejeneratif yanıtın ba laması birçok faktöre ba lıdır (Ayan. ve ark., 2011; Bedirli, ve ark., 2005; Michalopoulos ve DeFrances, 1997). Büyüme hormonlarının endokrin ve parokrin etkileri, spesifik protoonkogenlerin aktivasyonları, transkripsiyon faktörleri

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

NF- B, STAT3 ve AP-1 (Adaptör-ili kili protein kompleksi) karaci er rejenerasyonunu ba latan temel transkripsiyon faktörleridir. PH den sonraki ilk 4 saat içerisinde NF- B, AP-1, STAT3 transkripsiyon faktörlerinin ba lanmaları artar. NF- B aktivasyonu PH den sonra 30 dakika içinde gözlenmeye ba lar ve 4-5 saat kadar devam eder (Tewari ve ark., 1992; FitzGerald ve ark., 1995; Fausto, 2000). AP-1 ve STAT3 ün ba lanması PH den sonra oldukça yava bir ekilde gerçekleşir ve STAT3 ün ba lanması için 6 saatten fazla bir süreye ihtiyaç duyulabilir.

Apoptoz ve inflamasyon süreçlerinde rol oynayan bir sitokin olan TNF bir çok hücrede NF- B yi aktive eder, ip TNF enjeksiyonunun 30 dakika sonra sıçan karaci erinde yüksek oranda NF- B ba lanmasına neden oldu u rapor edilmiştir (Yamada ve ark., 1997).

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

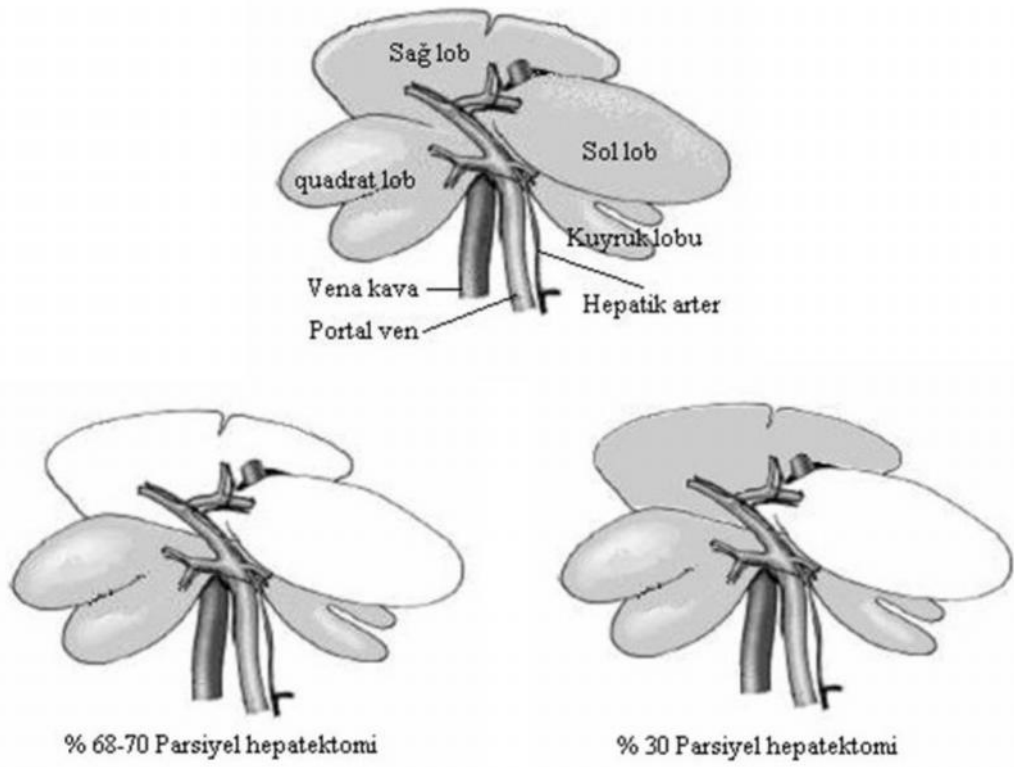
Memeli karaci er hücrelerinin %65'ini oluşturan, düşük proliferatif aktivite ve geni bir yaşam sürecine sahip hepatositler; karaci er dokusunun bir kısmının çıkartılmasından sonra, dikkat çekici bir rejenerasyon kapasitesi gösterirler. Memeli karaci er hücrelerinin %65'ini oluşturan hepatositler düşük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

Bu çalı mada % 70'lik PH i lemi ile rejenerasyonun indüklendi i ve bu indüksiyona kar ılık punicalaginın sıçan karaci eri üzerinde olu turdu u apoptotik etki, gen düzeyinde ve histolojik olarak ara tırılmı tır.

1.11. Karaci er Rejenerasyonu

Normal fizyolojiye sahip karaci er dokusunda rejenerasyon oldukça nadir seyreden bir durumdur. Hepatositlerde mitotik aktiviteye çok nadir rastlanır, öte yandan karaci er dokusunun cerrahi olarak ya da hepatik hasar sonucu kaybı ile dokuda mitotik aktivite hızlanır (Fausto, 2000). Hepatositlerde mitotik aktivite, kanda dola an alon(chalon) olarak isimlendirilen haberci maddeler tarafından kontrol edilir. PH i lemiyle dokuda miktarı azalan alonların DNA replikasyonunu baskılayamamakta ve mitotik aktivite hızlanmaktadır. Doku organizmanın ihtiyacını kar ılayabilecek büyüklü e ula tı ında, hücrede alonların da miktarı artmı ve DNA replikasyonu baskılanmaya ba lamı tır. alonlar dokuda mitotik aktivitenin sonlanmasına neden olur (Fausto, 2000; Dilek, 2003). EGF (epidermal growth faktör), HGF (Hepatosit growth faktör), TGF- (transforming growth faktör alfa), TGF- (transforming growth faktör beta), IL-6 hepatositlerde rejenerasyonu kontrol eden faktörlerdendir (Fausto, 2000; Fausto ve ark., 1995).

PH sonrası rejenerasyon ilk 12 saat içinde ba layıp, 24 saatte maksimum düzeye ula maktadır. Yakla ık olarak 10 gün içerisinde organ kendisini tamamen organizmanın ihtiyaç duydu u büyüklü e tamamlamaktadır (Tewari ve ark., 1992; FitzGerald ve ark., 1995). Büyüme, karaci er kütlesi ile vücut kütle oranı dengelenene kadar devam etmektedir. Organ transplantasyonlarında transplante edilen parça küçük ise, vücut oranı do rultusunda büyür; ya da transplante edilen miktar büyük ise vücut oranı ile orantılı olarak küçülmektedir (Fausto, 2000).



ekil 1.7. Sıçan karaci erinde PH (Palmes ve Spiegel, 2004).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Deney hayvanları

Deneyisel çalı mamızda sa lıklı, 200 ± 20 g a ırlıkta, 3-4 aylık, *Wistar albino* cinsi erkek sıçanlar kullanılmı tır. Tüm deney hayvanları T.C. Sa lık Bakanlı ı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Ba kanlı ı, Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilmi tir. Çalı ma süresince 12:12 saat aydınlık/karanlık ı ıklandırması olan, sıcaklı ı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve nemi %45-50 olarak optimize edilmi laboratuvar ortamında ya atılmı tır. Deneyisel çalı malar öncesinde hayvanların bir hafta ortam ko ullarına adaptasyonları sa lanmı tır. Bu süre zarfında deney hayvanları polikarbonat effaf kafeslerde standart sıçan yemi ve çe me suyu verilerek bakılmı tır.

2.2. Deney grupları

Her bir deney grubu için 7 hayvan kullanılmak ko ulu ile 6 grup olu turuldu.

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

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

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

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

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

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

2.3. Punicalagin Uygulaması

Punicalagin (P0023) 98%(HPLC) saflıkta Sigmadan temin edilmi tir. Punicalagin, hepatektomi i leminden hemen ardından, steril 1 mL %0.9 SF içinde 15mg/kg (Lin, 2001) çözülerek intra peritoneal olarak uygulanmı tır.

2.4. Anestezi ve cerrahi i lemler

Cerrahi uygulamaların tamamı steril ko ullar altında gerçekte tirildi. Deney hayvanlarına intramusküler 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezisi uygulanarak, midline laparotomi gerçekte tirildi. Cerrahi uygulamalar sonrasında karaci er doku örnekleri alınmı tır.

2.4.1. Parsiyal hepatektomi i lemi

Parsiyal hepatektomi uygulanacak deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sabit sıcaklık ko ullarında diseksiyon tablasına tespit edildi. Rektal ısı kontrolü yapıldı. Cerrahi uygulama bölgesi tra landı ve batikon ile temizlendi (ekil 2.1.). Higgins ve Anderson'un (1931) tekni iyle parsiyal hepatektomi gerçekte tirildi.

Deney hayvanının karın bölgesine, vücuda paralel 2-3 cm' lik bir orta hat kesisi ile laparotomi yapıldı (ekil 2.2.). Karaci er loplarını birbirine ba layan zarlar ayrılarak karaci erin yakla ık %68- 70 oranında kütesini olu turan öndeki sa , orta ve sol yan loplar ayrıldı (ekil 2.3.). Bu loplara ait hepatik arter, ven ve safra kanalları etrafından, ipek sütün geçirilerek ba landı. Ba ın hemen üstünden kesim gerçeikle tirildi (ekil 2.4.).

Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın bo lu una steril SF verildi (Kaya ve ark., 2002). Sonra, kas (ekil 2.5.) ve deri (ekil 2.6.) kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 4/0 ipek sütünle dikilerek kapatıldı. Poviiodoks antiseptik solüsyon ile laparotomi bölgesi temizlendi. Cerrahi i lem görmü her bir deney hayvanı, kimyasal sterilizasyonu yapılmı , polikarbonat kafeslere ayrı ayrı yerle tirildi. Diyet de i ikli i yapılmaksızın, deney gruplarına ba lı olarak 3 ve 6 saatlik periyotlarda ya atıldı.



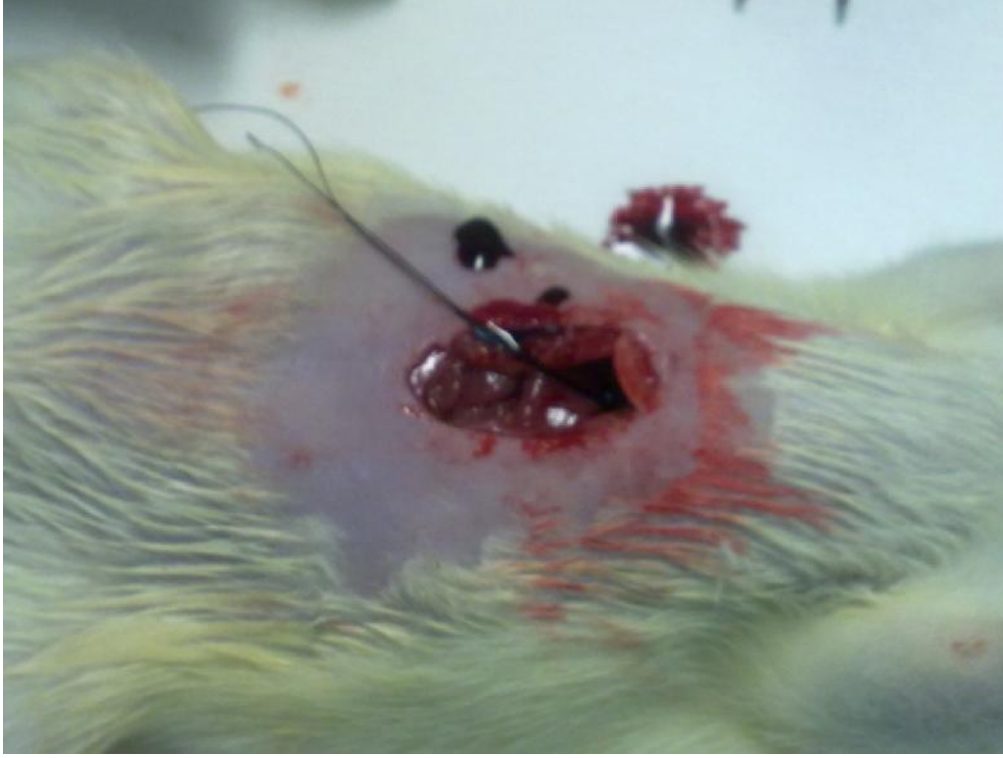
ekil 2.1. Sıçan batın kısmı tra landıktan sonra, batikon ile temizlendi.



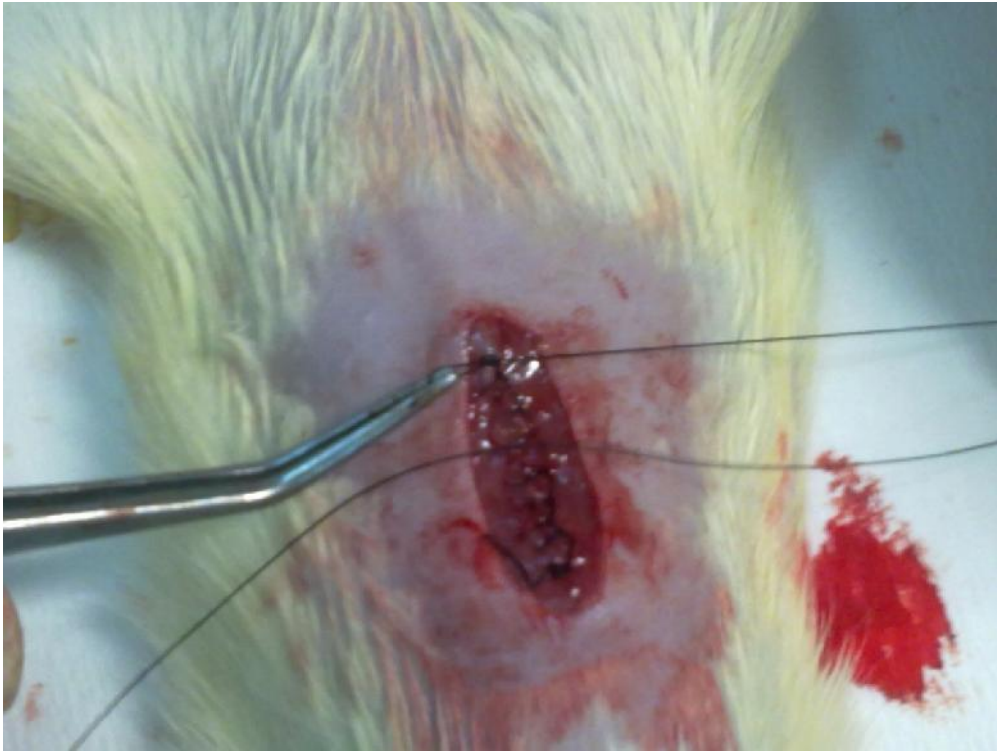
ekil 2.2. Median laparotomi uygulaması.



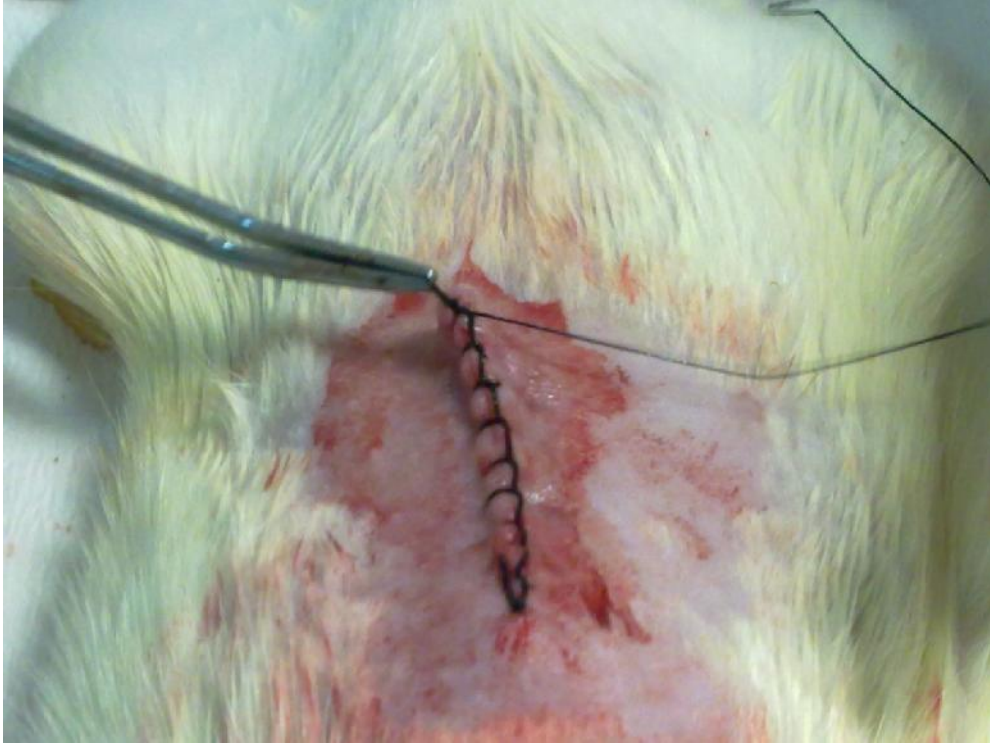
ekil 2.3. % 70 PH görünümü (PH uygulanan loblar).



ekil 2.4. %70 PH sonrası.



ekil 2.5. Kas, 4/0 ipek sütürle dikilerek kapatıldı.



ekil 2.6 Deri, 4/0 ipek sütürle dikilerek kapatıldı.

2.5. Doku  rneklerinin de erlendirilmesi

Eski ehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında etik kurallar çerçevesinde hayvanlardan intrakardiyak kan alındıktan sonra diseksiyonları gerçekle tirilmi tir. Doku  rnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80 C de muhafaza edilmi tir.

2.5.1. Real Time-PCR

Yakla ık olarak 50-100 mg karaci er doku örneklerinden, trizol ile RNA izolasyonu yapılımtır, izole edilen RNA'nın PCR ile o altılabilmesi için revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya d n   m  gerçekle tirilmi tir.

2.5.1.1. Trizol ile RNA zolasyonu için Gerekli Malzemeler

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

2.5.1.2. RNA zolasyon Basamakları

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

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

2.5.1.3. RT Reaksiyonu için Gerekli Malzemeler

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

2.5.1.4. RNA nın RT Reaksiyonu ile c-DNA Dönü üm Basamakları

Örnek sayısından be fazla sayıda reaksiyon karı ımı (RNA hariç) hazırlandı. Her PCR tüpüne, karı ımdan 10 μ L eklendi.

1. 10 μ L (Tablo 2.1. deki ekilde hazırlandı) 2 \times RT-PCR reaksiyon karı ımı 96 kuyucuklu plate e pipetlendi.
2. 10 μ L RNA örne i her bir kuyucu a pipetlendi.
3. Plate yüzeyleri sıkıca yapı tırılarak kapatıldı.
4. 96 kuyucuklu plate kısa süre santrifüj edildi. (Örneklerin kuyucuklarda dibe çökmesi için.)
5. PCR reaksiyonu ba layana kadar plateler buz üzerinde bekletildi.
6. Revers transkriptaz reaksiyonu Tablo 2.2. deki ekilde gerçekleştirildi.

Tablo 2.1. RT c-DNA Sentez Master Mix Karı ımı *10 uL RNA eklendi her bir kuyucu a.

çerik	Reaksiyon Hacmi(uL)	
	RNaz nhibitörü ile	RNaz nhibitörsüz
10 \times RT Tamponu	2 μ L	2 μ L
25 \times dNTP Karı ımı (100 mM)	0.8 μ L	0.8 μ L
10 \times RT Primerler	2 μ L	2 μ L
MultiScribe™ Revers Transkriptaz	1 μ L	1 μ L
RNaz nhibitörü	1 μ L	–
Nukleazsız su	3.2 μ L	4.2 μ L
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 μ L	10 μ L

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

Tablo 2.2. Revers Transkriptaz Reaksiyon Termal Profil

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

2.5.1.5. cDNA Saklama Koşulları

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

Tablo 2.3. cDNA Saklama Koşulları

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

2.5.1.6. RT-PCR Reaksiyon Bileşenleri

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

Tablo 2.4. RT-PCR Reaksiyon Karı ımı

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

*c-DNA miktarı 1 μL de 25 ng olacak ekilde optimize edildi

Tablo 2.5. RT-PCR Reaksiyonu Termal Profili

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

2.5.2. Q RT-PCR Reaksiyonu

2.5.2.1. Probların Sulandırılması

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

Tablo 2.6. Probların Sulandırılması

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

2.5.2.2. Ba lanma Reaksiyonu

Test prob solüsyonu kuyucuklara $2\mu\text{L}$ ilave edildi, üzerlerine $2\mu\text{L}$ örnek ilave edildi. Ba lanma reaksiyonu Tablo 2.7. deki ko ullarda gerçekte tirildi.

Tablo 2.7. Ba lanma Reaksiyonu Termal Profili

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

2.5.2.3. Ligasyon Reaksiyonu

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

Tablo 2.8. Ligasyon Reaksiyonu Termal Profili

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

2.5.2.4. Proteoliz Reaksiyonu

Proteoliz reaksiyon karı ımı Tablo 2.9 daki ekilde hazırlandı ve Tablo 2.10. daki reaksiyon ko ullarında gerçekle tirildi.

Tablo 2.9. Proteoliz Reaksiyon Karı ımı

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

Tablo 2.10. Proteoliz Reaksiyonu Termal Profili

	Proteolizin Sonlandırılması	Proteinazın naktivasyonu	
Derece ($^{\circ}\text{C}$)	37	95	+4
Süre (Dak.)	10	5	

2.5.2.5. Kantitatif PCR (Q-PCR) Reaksiyon Basamakları

- 12 μL test prob A, 12 μL test prob B ve 216 μL test prob dilüsyon tamponu kullanılarak test solüsyonu hazırlandı.
- Her bir kuyucu a 2 μL test prob solüsyonu ve 2 μL hücre lizatu eklendi.
- 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dak. inkübe edildi.
- 2 μL DNA ligaz ve 998 μL ligaz dilüsyon tamponu kullanarak DNA ligaz dilüe edildi.

5. 600 µL ligasyon reaksiyon tamponu, 10 908 µL su ve 12 µL dilüe DNA Ligaz kullanarak ligasyon solüsyonunu hazırlandı.
6. Her bir kuyucu a 96 µL ligasyon solüsyonu eklendi ve 37°C'de 10 dk. inkübe edildi.
7. Ligasyonu durdurmak için 4 µL proteaz ve 396 µL PBS karı tırıldı. Her bir kuyucu a 2 µL dilüe proteaz solüsyonu eklendi.
8. 37°C'de 10 dk. veya 95°C'de 5 dk. inkübe edildi.
9. 1200 µL TaqMan Protein Test Fast Master Mix ve 120 µL Universal PCR Test karı tırılarak Q-PCR karı ımı olu turuldu, ardından 11 µL/kuyucuk PCR karı ımı ve 9 µL/kuyucuk proteazla muamele edilmi ligasyon ürünleri ilave edildi.
10. Q-PCR i lemi gerçekte tirildi.
11. Sonuçlardan C_T de erleri elde edip analizleri yapıldı

Kantitatif PCR reaksiyon karı ımı Tablo 2.11. deki oranlar kullanılarak hazırlandı.

Tablo 2.11. Q-PCR Reaksiyon Karı ımı

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

2.5.3. TUNEL Metodu

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

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

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

1. Doku kesitlerine ale içerisinde deparafinizasyon işlemi uygulaması

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

2. Dokuya ön işlem uygulanması

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

3. Endojen peroksidazın sulandırılması

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

4. Dengeleme tamponu uygulaması

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

5. TdT (Terminal deoksinükleotidil transferaz) enzimi uygulanması

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

6. Durdurma/Yıkama tamponunun uygulanması

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

7. Anti-Digoxigenin konjugatının uygulanması

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

8. PBS de yıkama

- Kesitler ale içerisinde oda sıcaklığında 2 dakika 4 tekrar ekinde PBS ile yıkandı.
- Lamlar yıkanırken peroksidaz substrat solüsyonu hazırlandı.

9. Peroksidaz substratın renk geli imi

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

10. Kesit yıkanması

- Kesitler ale içerisinde distile su ile 1'er dakika 3 tekrar ekinde yıkandı.
- Daha sonra kesitler oda sıcaklığında ale içerisinde distile suda 5 dakika inkübe edildi.

11. Kesitlere ikincil boyamanın uygulanması

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

12. Kesitler kapatıldı ve mikroskop altında incelendi.

Daha sonra oda sıcaklığı altında muhafaza edildi (ApoTaq® Plus Peroxidase *In Situ* Apptosis Detection Kit).

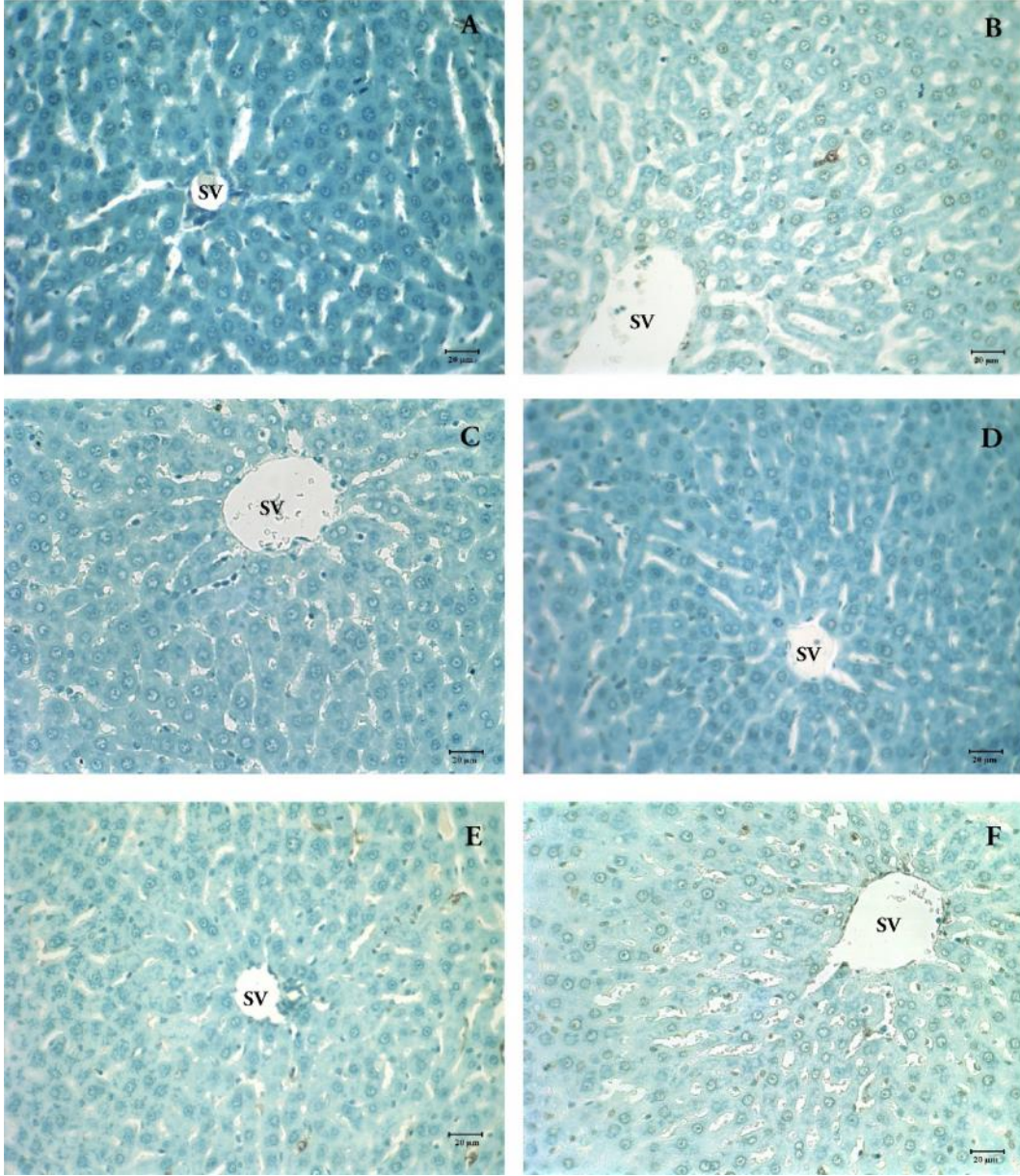
2.6. istatistiksel Analiz

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

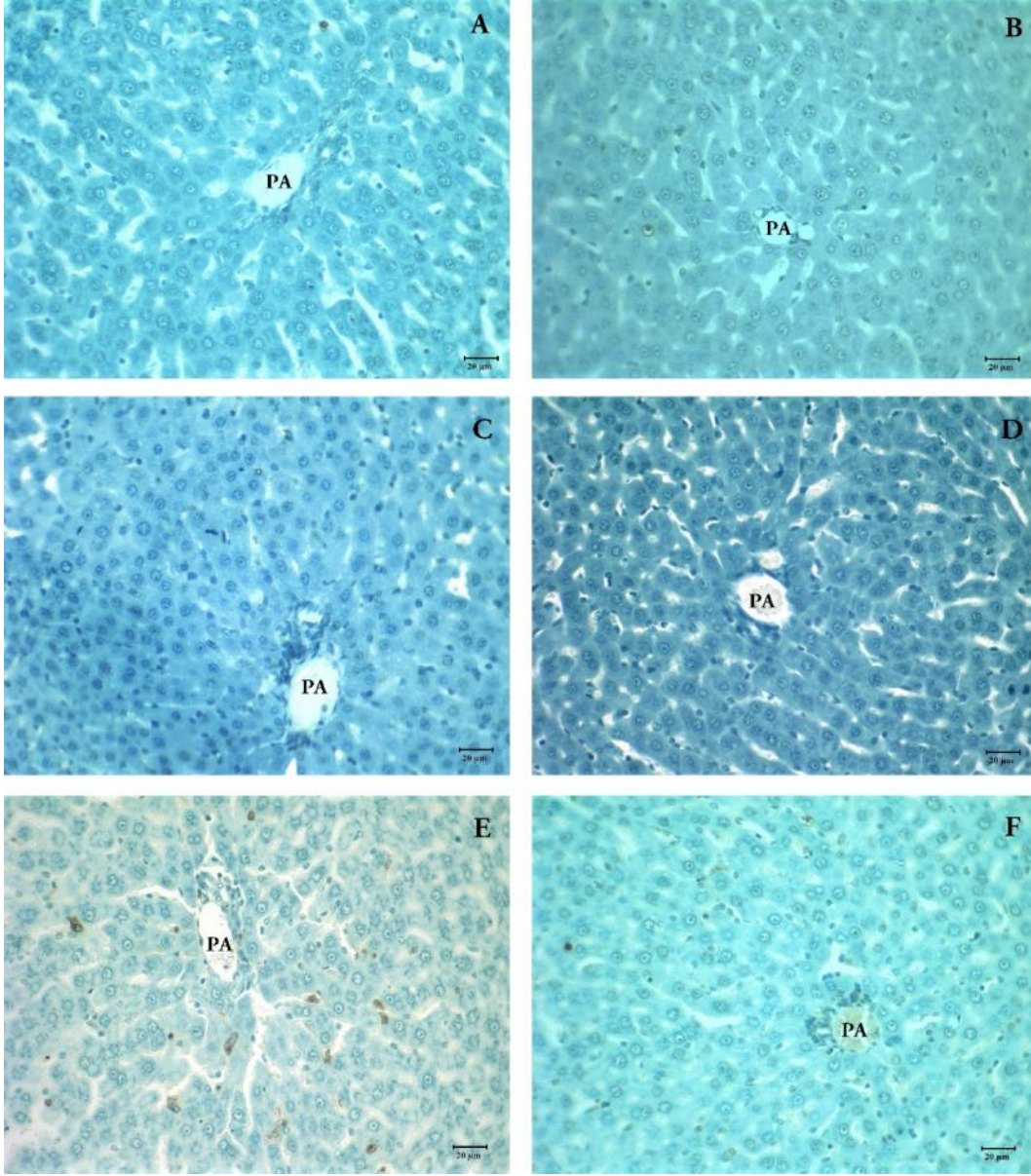
3. BULGULAR

3.1. Histolojik De erlendirmeler

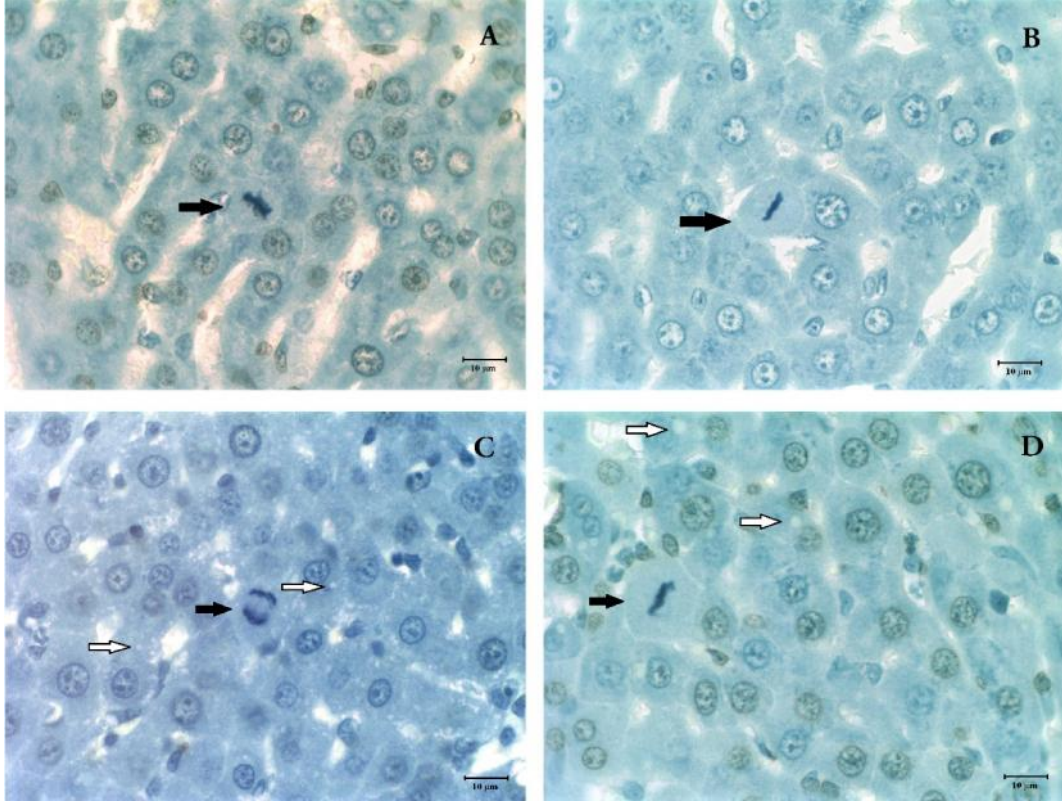
Deney gruplarına ait TUNEL kesitlerinde; I. gruba ait kesitlerde sentral ven (sv) çevresinde hepatositlerin ı nsal formda lokalizasyonu ile olu turdu u lobüllerin birle ti i bölümlerde, üçgen formda portal alanlar (pa) gözlenmektedir. Doku normal histolojiye sahiptir (ekil 3.1A, ekil 3.2A). Mitotik (ekil 3.1A) ve apoptotik (ekil 3.2A) hücreler gözlenmektedir. II. Gruba ait kesitlerde histolojik yapı normal görünümüne sahiptir, ancak apoptotik hücrelerin sayısı I. Gruba oranla artmı tır (ekil 3.1B, ekil 3.2B). PH nin hemen ardından SF verilen Grup III ve Grup IV karaci er kesitlerinde de doku bütünlü ü aynen korunurken mitozun yaygın oldu u gözlenmekte ve hepatositlerde PH den kaynaklı vakuolizasyonlar ortaya çıkmaktadır (ekil 3.1C, ekil 3.1D, ekil 3.2C, ekil 3.2D, ekil 3.3C, ekil 3.3D,). IV. Grupta ait kesitlerde, mitotik aktivite III. Gruba göre oldukça artmı tır. PH uygulamasının ardından 15mg/kg ip punicalagin uygulanan ve 3. saatin sonunda diseksiyonu yapılan V. Grupta apoptotik hücreler artmı tır (ekil 3.1E, ekil 3.2E, ekil 3.4C). PH uygulamasının ardından 15mg/kg ip punicalagin uygulanan ve 6 saat sonra disekte edilen Grup VI da histolojik yapı bütünlü ü aynen korunurken TUNEL pozitif hücrelerin ve vakuolizasyonların sayısının oldukça fazla arttı ı gözlenmektedir (ekil 3.1F, ekil 3.2F, ekil 3.4D).



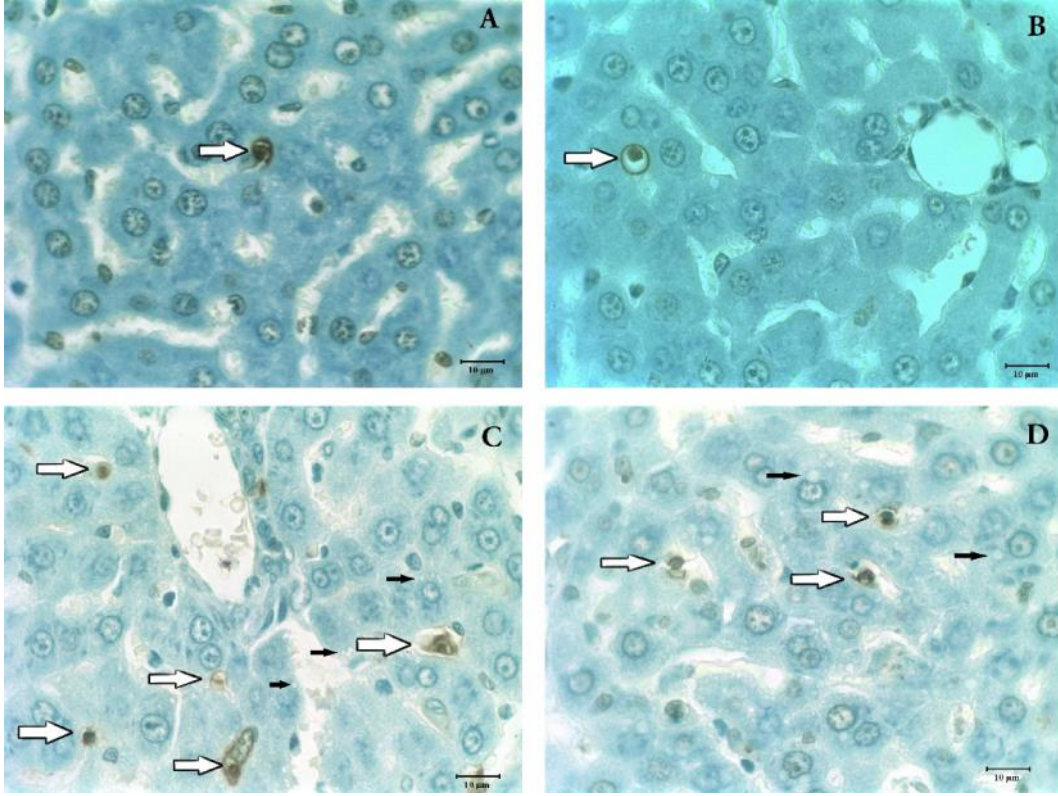
ekil 3.1. Gruplara ait karaciğer kesitlerinde Sentral Ven (SV) çevresindeki hepatositler: A) Grup I, B) Grup II, C) Grup III, D) Grup IV, E) Grup V, F) Grup VI.



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



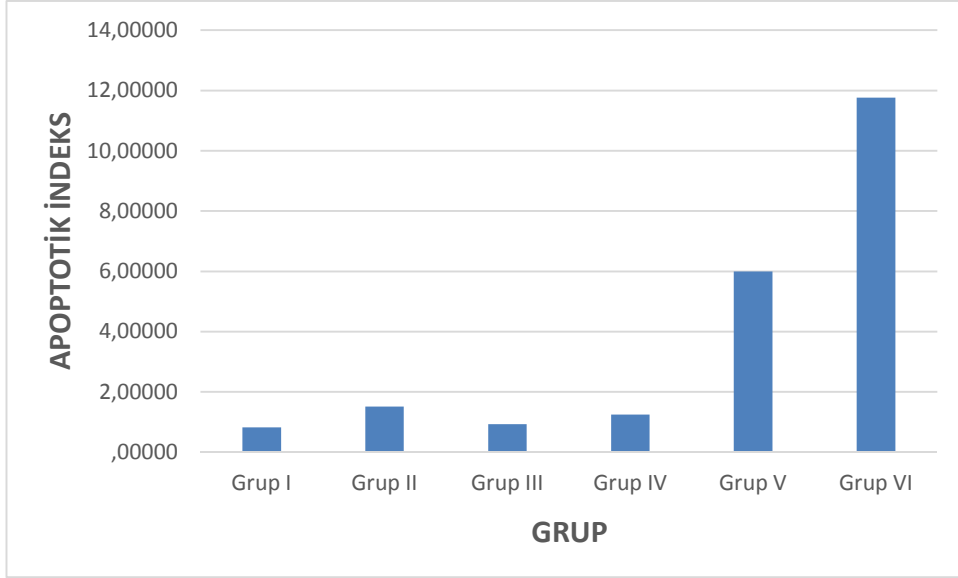
ekil 3.3. Karaci er kesitlerinde mitotik hepatositler: A) Grup I, B) Grup II, C) Grup III, D) Grup IV. Mitotik aktivite siyah renk ok ile, vakuolizasyon beyaz renk ok ile gösterilmi tir.



ekil 3.4. Karaci er kesitlerinde apoptotik hepatositler: A) Grup I, B) Grup II, C) Grup V, D) Grup VI. Apoptotik aktivite beyaz renk ok ile, vakuolizasyon siyah renk ok ile gösterilmi tir.

3.2. Apoptotik İndeks Bulguları

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

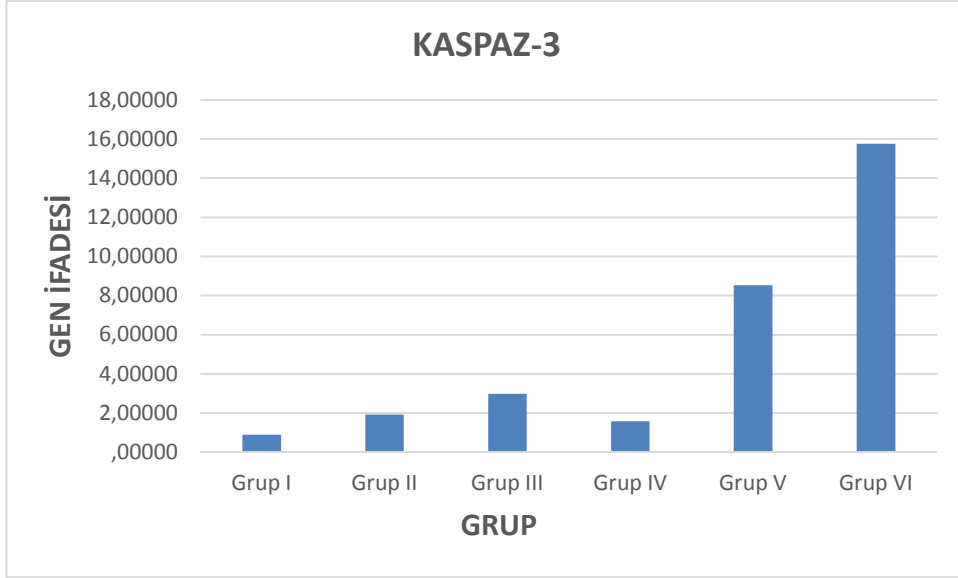


ekil 3.5 Gruplara ait apoptotik indeks sonuçları: Kruskal-Wallis Asymp. Sig.= .001; P< .05

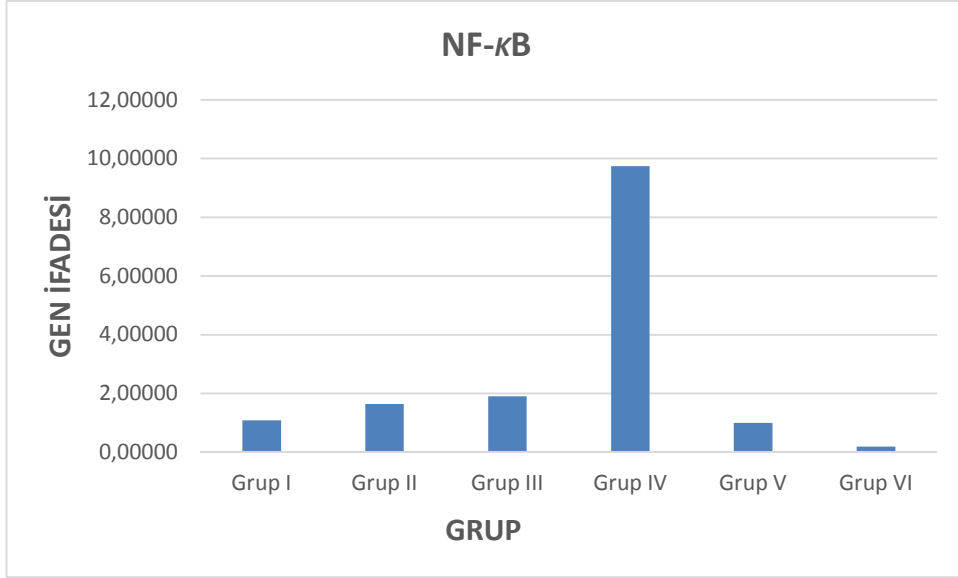
3.3. RT-PCR Bulguları

Kazpaz-3 gen ifadesi için, gruplar arası farklılıklar, istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) bulunmu tur. Grup VI'da kas paz-3 gen ifadesi Grup V ve Grup IV'den anlamlı farklılık göstermi tir. Parsiyal hepatektominin ardından punicalagin uygulanan Grup V ve Grup VI'da kas paz-3 aktivitesi zamana ba lı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir artı göstermi tir. Grup V, Grup III'den anlamlı farklılık ortaya koymu tur ($P < 0.05$) (ekil 3.6).

NF- B gen ifadesi gruplar arası kar ıla tırılmanın sonucunda, Grup III'de artı göstermi ancak Grup IV'de oldukça yüksek seviyelere ula mı tır. Grup III ve IV arasında NF- B gen ifadesi zamana ba lı bir artı göstermi tir. PH'nin ardından punicalagin enjeksiyonuna maruz kalan gruplarda NF- B gen ifadesinde zamana ba lı bir azalma ortaya çıkmı tır. Grup V ve VI'da PH sonrası punicalagin uygulaması NF- B gen ifade düzeyini zamana ba lı olarak baskılamı tır (ekil 3.7). NF- B gen ifadesinde Grup IV'de istatistiksel olarak anlamlı bir yükseli gözlenmi tir ($P < 0.05$).



ekil 3.6. Gruplara ait kaspaz-3 gen ifadesi grafi i (n=7). Kruskal-Wallis Asymp. Sig.= .000; P<.05

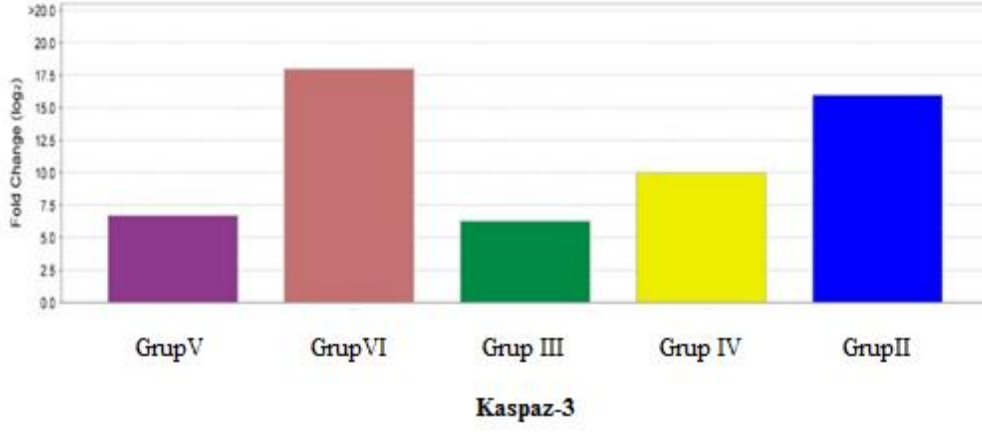


ekil 3.7. Gruplara ait NF- B gen ifadesi grafi i (n=7). Kruskal-Wallis Asymp. Sig.= .000; P<.05

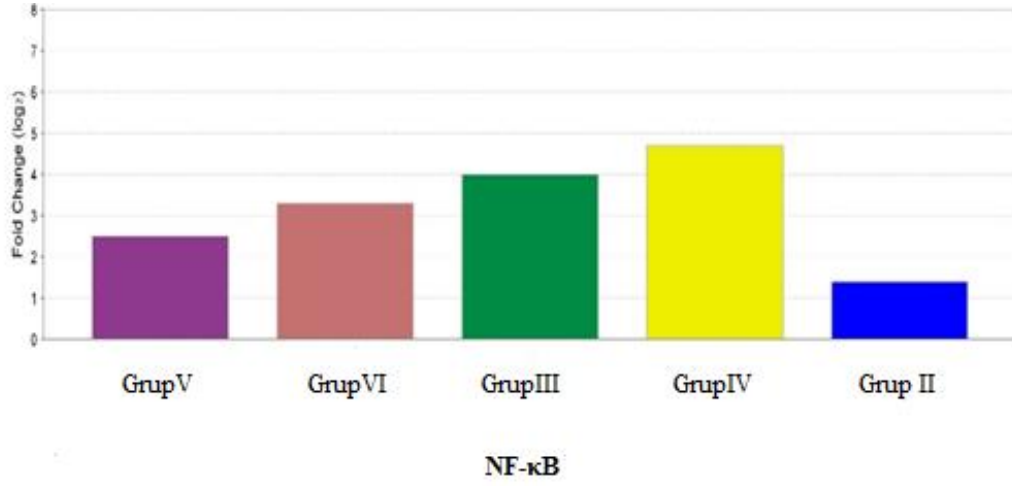
3.4. Q-PCR Bulguları

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

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



ekil 3.8. Gruplara ait kaspaz-3 Q-PCR protein ifade grafi i (De erlendirmede Grup I referans alınmı tır).



ekil 3.9. Gruplara ait NF- B Q-PCR protein ifade grafi i. (De erlendirmede Grup I referans alınmı tır).

4. TARTI MA VE SONUÇ

Karaci er ile ilgili ilk bilimsel çalı malar Higgins ve Anderson adlı bilim adamları tarafından yapılmı tır (1931). Karaci er dokusunun cerrahi olarak ya da çe itli kimyasalların etkisiyle zarar görmesi, hepatositlerin hızla hücre döngüsüne girmesini sa lar. Dokunun önceki kütlesi tekrar olu uncaya kadar devam eden bir mekanizma ortaya çıkar (Junqueira ve ark., 1993). Rejenerasyon herhangi bir travma kar ısında dokunun geli tirdi i mekanizmadır. Normal eri kin karaci er dokusunda mitotik indeks %0.01 ya da daha azdır, ancak rejeneratif karaci er dokusunda bu oran %3'lere kadar çıkmaktadır (Anderson ve ark., 1990; Bucher, 1995; Gökçimen ve ark., 1990).

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

Sıçan karaci erinde %70'lik PH, rejeneratif indüksiyon anlamında optimum bir oran oldu u ve bu oranın alt ya da üst de erlerinde gerçekte tirilecek bir PH rejenerasyonu inhibe edebilece i dü ünülmü tür (Borowiak, ve ark., 2004; Chagas ve ark., 2009; Fausto, 2000, Palmes ve Spiegel, 2004).

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

PH deney modeli karaci er rejenerasyon süresince hücre proliferasyonunun çalı ılabilmesi açısından uygun bir deney modeli olarak dü ünülmektedir. (Fausto,

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

Karaci er birçok toksik kimyasalın detoksifikasyonunu gerçekle tirdi i için, karaci er hasarı sık kar ıla ılan bir durumdur. Hepatotoksik kimyasalların ço unlu u, karaci er lipidleri ile kovalent ba lar olu turan reaktif türler üreterek zarar vermektedir. Zararlı kimyasallara a ırı maruziyet sonucunda, ortaya çıkan serbest radikaller do al savunma sistemini baskılayarak, hepatik hasara yol açmaktadır (Deshwal ve ark., 2011). Bu hasar, nekroz veya apoptoz ile karakterize olan hepatosit kaybı ile gerçekleşir (Helling, 2006). Karaci erde olu abilecek hepatik hasarın kemirgenler üzerinde ara tırılmasının temel nedeni, kemirgenlerde ortaya çıkan yanıtın insanlardakine benzerlik göstermesidir (Haschek ve Rousseaux, 1998; Fausto, 2001).

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

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

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

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

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

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

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

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

rejeneratif belirteçlerin antagonistik etkilerinin araştırıldı ı bir çalışmada tespit edilmemi tir.

Bu çalışmada %70 PH sonrası, rejeneratif karaci erde punicalaginın apoptotik etkileri incelenmi tir. Deneysel çalışmaları 6 grup göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmi tir. Grup I ve Grup II PH yapılmaksızın cerrahi strese maruz bırakılması amacıyla batin açılıp kapatılmı tır. Grup I, 3 saatin ardından disekte edilmi tir, Grup II 6 saatin sonunda disekte edilmi tir. Grup III, IV, V, VI ya PH uygulanmı tır. Grup III, PH sonrası ip SF uygulamasının ardından 3 saatin sonunda disekte edilmi tir. Grup IV PH nin ardından ip SF uygulaması sonrasında 6 saatin sonunda disekte edilmi tir. Grup V ve VI, PH sonrası 15mg/kg punicalagin uygulanmı ve sırasıyla 3 ve 6 saatin sonunda disekte edilmi lerdir.

%70 PH sonrası ip punicalagin 3 saatin sonunda kaspaz-3 gen ekspresyonunu arttırmı , NF- B gen ekspresyonunu baskılanmı tır. 6 saatin sonunda kaspaz-3 gen ekspresyonu, 3 saate göre oldukça fazla artı göstermi tir. 15mg/kg ip punicalagin uygulanmı , rejeneratif karaci erde kaspaz-3 ekspresyonu zamana ba lı anlamlı artı göstermi tir. Kaspaz-3 gen ekspresyonunun en yüksek seviyeye ula tı ı Grup VI da NF- B ekspresyonu önemli ölçüde baskılanmı tır.

Bulgular ı ında PH nin ardından NF- B gen ve protein ekspresyonu 3 saatin sonunda artmı (Grup III), ancak 6 saatin sonunda (Grup IV) ortaya çıkan artı miktarı çok daha yüksek seviyelere ula mı tır. PH sonrası herhangi bir ajana maruz kalmaksızın NF- B aktivasyonu zamana ba lı anlamlı artı göstermi tir. Rejeneratif karaci ere 15mg/kg punicalagin maruziyeti artmakta olan NF- B yi baskılamı tır. NF- B nin punicalagin maruziyeti sonrası baskılanmasıyla, kaspaz-3 protein ve gen ekspresyonları artı göstermeye ba lamı tır. Kaspaz-3, 6 saatin sonunda zamana ba lı olarak artı göstermi tir.

PH sonrası punicalagin uygulaması ile NF- B'nin baskılanması apoptozun tetiklendi inin bir göstergesi olarak dü ünülmektedir (Takahashi ve ark., 2002). Bulgular; karaci er rejenerasyonunun erken evresinde, punicalagin kaynaklı apoptozun hepatositlerde kaspaz-3 aktivasyonu ile ba lantılı oldu una i aret etmektedir.

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

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

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

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

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

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

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

sonrası rejeneratif karaci erde hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu indükledi ini ifade etmi lerdir. Bulgular farnesolün kanser önleyici nitelikte kullanılabilece ine i aret etmektedir. Aynı ekilde arsenit, manganez ve hekzametilen amiloridin PH sonrası cilt altından uygulandı nda, 4 saat sonra apoptozu indükledi i görülmü tür (Chagas ve ark., 2009).

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

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

Çalı mamızda histolojik incelemeler sonucunda PH uygulanmış sıçan karaci erlerinde (Grup V ve VI) vakuolizasyonların olu umunun arttığı görülmü tür. Vakuolizasyonlar lipid damlalarının birikimi olarak nitelendirilmektedir (Hou, ve ark., 2003).

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

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

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

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

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

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

V. Grupta ilk dört gruptan farklı olarak kaspaz-3 gen ve protein ifade düzeylerinde anlamlı artı ortaya çıkmı tır. VI. Grupta hepatositlerde vakuolizasyon, sinüzoidal dilatasyon, apoptoz aktivitesi en yüksek de erde seyretmi tir. Apoptotik indeks de eri ilk be gruptan anlamı farklılık göstermi tir.

Histopatolojik incelemede parsiyal hepatektomiden sonra ilk olarak hepatositlerde vakuolizasyon meydana geldi i, takip eden zaman diliminde apoptozun arttı ının göstergesi olan apoptotik indeksin arttı ı görülmü tür.

Deneyssel olarak olu turulan hepatic rezeksiyon sonrası punicalagin uygulaması ile geli en karaci er apoptozunu histolojik açıdan incelemek amacı ile planladı ımız çalı mada, rejenerasyonun indüksiyonuna kar ı, punicalagin zamana ba lı olarak apoptozu indüklemi tir. Sonuçlar punicalaginın kemopreventif veya tedavi edici olarak kullanılabilece ine i aret etmektedir.

KAYNAKLAR

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

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

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

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

- Forest, V., Peoch, M., Campos, L., Guyotat D. ve Vergnon, Jm. (2005), "Effects of cryotherapy or chemotherapy on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice," *Cryobiology*, **50**(1), 29–37.
- Fredriksson, S., Dixon, W., Ji, H., Koong, A.C., Mindrinos, M. ve Davis, R.W. (2007), "Multiplexed protein detection by proximity ligation for cancer biomarker validation," *Nat. Methods*, **4**(4), 327–329.
- Ganong, W.F. (1995), "Medical Physiology," (Çev Ed: Do an, A.) Barı Kitabevi, stanbul, 543-544.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. ve Ben-Sasson, S.A. (1992), "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation," *J. Cell Biol.*, **119**, 493-501.
- Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. ve Kader, A.A. (2000), "Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing," *J Agric Food Chem.*, **4**, 4581–9.
- Gillis, A.J., Stoop, H., Biermann, K., Van Gurp, R.J., Swartzman, E., Cribbes S., Ferlinz, A., Shannon, M., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H. (2011), "Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis," *International journal of andrology*, **34**, 160-174.
- Gökçimen, A., Öztürk, Ö. ve Karaöz, E. (1990), "Rejenerasyon," *T. Klin. Tıp Bilimleri*, **19**, 169-183.
- Grisham, J.W. (1962), "A Morphologic Study of Deoxyribonucleic Acid Synthesis and Cell Proliferation in Regenerating Rat Liver; Autoradiography with Thymidine-H3," *Cancer Res.* **22**, 842-849.

- Gullberg, M., Gústafsdóttir, S.M., Schallmeiner, E., Jarvius, J., Bjarnegård, M., Betsholtz, C., Landegren, U. ve Fredriksson, S. (2004), "Cytokine detection by antibody-based proximity ligation," PNAS, **101**(22), 8420-8424.
- Güle , Ö. ve Eren, Ü. (2008), "Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler," Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 73-78.
- Haschek, W.M. ve Rousseaux, G.C.(1998), "Fundamentals of Toxicologic Pathology, " Academic Press, London.
- Heber, D. (2008), "Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins," Cancer Letters, 269(2), 262-268.
- Helling, T.S. (2006), "Liver failure following partial hepatectomy, " HPB (Oxford), 8, 3, 165-174.
- Hızel, N. (1997), "Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü), " Sürekli Tıp E itimi Dergisi, 6, 196-7.
- Higgins, G.M. and Anderson R.M. (1931), "Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal, " Archives of Pathology, 12, 186-202.
- Hockenbery, D. (1995), "Defining apoptosis, " American Journal of Pathology, **146**, 16-19.
- Hou, Z., Yanaga, K., Kamohara, Y., Eguchi S., Tsutsumi, R., Furui, J. ve Kanematsu, T. (2003), "A new suppressive agent against interleukin-1b and tumor necrosis factor-a enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats," Hepatology Research, **26**, 40-46.
- Huang, T.H., Peng, G., Kota, B.P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D. ve Li, Y. (2005a), "Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR-gamma and identification of an active component," Toxicol. Appl. Pharmacol., **207**, 160-169.

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

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

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

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

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

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

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

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

- Yamada, Y., Kurillova, I., Peschon, J.J. ve Fausto, N. (1997), "Initiation of Liver Growth By Tumor Necrosis Factor: Deficient Liver Regeneration in Mice Lacking Type I Tumor Necrosis Factor Receptor," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 1441-1446.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karata , M. ve Tanyolaç, B. (2007), "Moleküler Biyoloji," Nobel Yayın Da ıtım, Ankara, 614.
- Yıldız, O.G., Soyuer, S., Soyuer, I., Uçar, K., Gündo , M., Kaplan, B. ve Özkan, M. (2007), "Gastrektomi sonrası adjuvan kemoradyoterapi uygulanan mide karsinomlu olgularda NF- B'nin prognostik önemi," Türk Onkoloji Dergisi, 22(2), 69-73.
- Yılmaz, . (2005), "Eri kin ratlarda deneysel varikosel olu turulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselme olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile de erlendirilmesi," Uzmanlık Tezi, Taksim E itim ve Ara tırma Hastanesi Üroloji Klini i, stanbul.
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R. ve Yan, G. (1997), "Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V.," Biotechniques, 23, 525–531.