



**KARACİĞER FİBROZU ESNASINDA LİPOKSİN A4'ÜN
KARACİĞER HÜCRE REJENERASYONU VE İMMÜN
YANIT ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elçin Latife KURTOĞLU

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Başak KAYHAN
Doktora Tezi – 2017**

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARACİĞER FİBROZU ESNASINDA LİPOKSİN A4'ÜN
KARACİĞER HÜCRE REJENERASYONU VE İMMÜN YANIT ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elçin Latife KURTOĞLU

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Başak KAYHAN**

Bu araştırma, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
114S161 proje numarası ile desteklenmiştir.

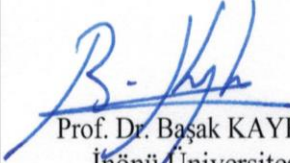
**MALATYA
2017**


KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Elçin Latife KURTOĞLU'nun "Karaciğer Fibrozu Esnasında Lipoksin A4'ün Karaciğer Hücre Rejenerasyonu ve İmmün Yanıt Üzerine Etkisinin Araştırılması"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

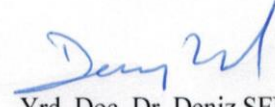
Tez Savunma Tarihi 29/12/2016


Prof. Dr. Elif YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Başak KAYHAN
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye


Prof. Dr. Mehmet GÜL
İnönü Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Ebru ETEM ÖNALAN
Fırat Üniversitesi
Üye


Yrd. Doç. Dr. Deniz ŞEN
Fırat Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/..../..... tarih ve/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer.....	3
2.1.1. Hepatositler	4
2.1.2. Hepatik Stellat Hücreler.....	4
2.1.3. Kupffer Hücreleri.....	6
2.1.4. Sinüzoidal Endotel Hücreler	6
2.1.5. Karaciğerde Ekstrasellüler Matriks	7
2.2. Karaciğer Fibrozisi	8
2.2.1. Karaciğer Fibrozisinin Patogenezi.....	8
2.3. Karaciğer Fibrozisi ve İmmün Yanıt	11
2.4. Fibrozisin Geriye Dönebilmesi ve Antifibrotik Stratejiler	14
2.5. İnflamasyon, Çözülme ve Lipoksinler	15
2.5.1. Lipoksinler	16
2.5.2. Lipoksinlerin Biyosentezi	17
2.5.3. Lipoksin A4	18
2.5.3.1. LXA4'ün Hastalıklardaki Etkisi	19
2.6. Karaciğer Rejenerasyonunda <i>MKK4</i> , <i>MKK7</i> , <i>ATF2</i> ve <i>TGF-β1</i> Gen İfadelerinin Önemi	22
2.6.1. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4 (<i>MKK4</i>) Geni	22
2.6.2. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7 (<i>MKK7</i>) Geni	24
2.6.3. Transforming Growth Factor Beta-1 (<i>TGF-β1</i>) Geni	24
2.6.4. Activating Transcription Factor 2 (<i>ATF2</i>) Geni	25
2.7. Fibrozis Araştırmalarında Kullanılan Deney Hayvan Modelleri.....	25
2.7.1. TAA ile İndüklenmiş Karaciğer Fibrozis Modeli.....	26
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal	27

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları	27
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları	27
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	28
3.2. Metot.....	30
3.2.1 Deney Gruplarının Oluşturulması.....	30
3.2.2. Ağırlık Ölçümü	30
3.2.3. Doku ve Kan Örneklerinin Çıkarılması	30
3.2.4. Biyokimyasal Analizler	31
3.2.5. Histopatolojik Analiz Yöntemleri.....	31
3.2.6.Moleküler Analiz Yöntemleri	32
3.2.6.1. Fare Karaciğer Dokusundan RNA izolasyonu.....	32
3.2.6.2. RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri.....	32
3.2.6.3. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi	33
3.2.6.4. Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi	33
3.2.6.5. Gerçek Zamalı PZR ile <i>ATF2</i> , <i>MKK4</i> , <i>MKK7</i> , <i>TGF-β</i> , <i>GAPDH</i>	33
Gen İfadelerinin Tayini.....	33
3.2.6.6. Gerçek Zamanlı PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektforezi	34
3.2.7. İmmünolojik Analizler.....	34
3.2.7.1. Akım sitometri Analizleri	34
3.2.7.2. ELISA Yöntemi ile TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IL-23,	35
IFN- γ Sitokinlerinin Ölçümü	35
3.3. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Karaciğerin Makroskopik Bulguları	37
4.2. Fare Canlı Ağırlık ve Karaciğer Ağırlık Bulguları	37
4.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları	38
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	38
4.5. Moleküler Analiz Bulguları	41
4.5.1. RNA'nın Agaroz Jel Elektforezi Bulguları	41
4.5.2. Gerçek zamanlı PZR ile Gen İfadesi Analizi Bulguları	42
4.5.3. Gerçek zamanlı PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektforezi Bulguları.....	58
4.6. İmmünolojik Analiz Bulguları.....	59
4.6.1. Dalak Hücre Populasyonu ve Aktive T-lenfosit Dağılımı.....	59

4.6.2. ELISA Yöntemi ile TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IL-23, IFN- γ Sitokinlerinin Ölçüm Bulguları	64
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
KAYNAKLAR	78
EKLER.....	88
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	88
EK-2. DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL ONAYI.....	95



TEŐEKKÜR

Yapılan tez çalıőmasının yürütölmesi için, 114S161/1002 numaralı projeye sağladığı maddi destekten dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu'na (TÜBİTAK) teőekkür ederim.



ÖZET

Karaciğer Fibrozu Esnasında Lipoksin A4'ün Karaciğer Hücre Rejenerasyonu ve İmmün Yanıt Üzerine Etkisinin Araştırılması

Amaç: Anti-inflamatuar lipid ara ürünlerinden, lipoksin A4 (LXA4) bir G-protein reseptörüne bağlanarak lökositlerin hücresel aktivitelerini düzenler ve gen transkripsiyonunu aktive ederek doğrudan hücre içi enzim aktivitesine etki eder. Araştırmamızda thioacetamide (TAA) ile karaciğer fibrozu oluşturulması sonrası LXA4'ün sistemik olarak verilmesinin karaciğer fibrozu ve immün sistem üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: TAA ile karaciğer fibrozu oluşturulmuş BALB/c deney farelerinde LXA4 intraperitoneal (i.p.) yoldan verilerek tüm gruplardaki deneklerin serum örneklerinde karaciğer enzim düzeyleri, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17, IL-23, IL-4 ve IL-10 sitokin düzeyleri, dalak hücre izolasyonu sonrası immünofenotipleme, karaciğerde fibroz oluşumundan ve hücre yenilenmesinden sorumlu gen ifadeleri ile karaciğer dokusunda Knodell skorlaması sonrası histopatolojik incelemeler ve analizler gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Araştırmamız sonucunda, karaciğer fibrozu ile artan ALT, AST enzim düzeyleri ile inflamatuvar immün yanıtın sorumlu sitokinlerden TNF- α , IFN- γ ve IL-2 düzeylerinde LXA4 enjeksiyonu sonrası belirgin azalma saptanmıştır. Hücresel anlamda ise, TAA ile karaciğer fibrozunun oluşturulması aktive sitotoksik T-lenfosit popülasyon yüzdesinde artışa neden olmaktadır. LXA4 enjeksiyonu bu artışı belirgin düzeyde düşürmektedir. Karaciğer fibrozu esnasında LXA4 enjeksiyonu ile *TGF- β 1* gen ifadesinde belirgin düzeyde azalma tespit edilmiştir. *MKK4* geni fibrozlu deneklerde yüksek düzeyde ifade edilirken, LXA4 enjeksiyonu yapılmış fibrozlu deneklerde ifade edilme düzeyi belirgin düzeyde düşmektedir. *ATF2*, *MKK7*'nin ifade edilme düzeylerinde istatistiksel bir fark tespit edilememiştir. Histopatolojik incelemeler sonrası TAA grubunda belirgin düzeyde köprüleşmiş fibroz oluşumları ve lökosit infiltrasyonu tespit edilmiştir. Karaciğer fibrozu esnasında LXA4 enjeksiyonu lökosit infiltrasyonunu belirgin düzeyde düşürmekte, köprüleşmiş fibroz görüntüsü kaybolmakta, bağ dokusu oluşumu belirgin düzeyde azalmaktadır.

Sonuç: LXA4 karaciğer fibrozunun tedavisinde kullanılabilecek ve karaciğer yenilenmesini sağlayabilecek potansiyele sahip bir molekül olabilir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer fibrozu, Lipoksin A4, immün yanıt, karaciğer yenilenmesi

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Lipoxin A4 on Liver Cell Regeneration and Immune Response during Liver Fibrosis

Aim: An anti-inflammatory lipid mediator lipoxin A4 (LXA4) regulates leukocyte cellular activity and activates gene transcription to activate intracellular enzyme activity by binding to a G-protein receptor. In our investigation we aimed to observe the effect of LXA4 on liver fibrosis and immune system after systemic administration of LXA4 to TAA induced liver fibrosis mice.

Materials and Methods: LXA4 administered via intraperitoneally to BALB/c mice with TAA induced liver fibrosis and serum liver enzymes, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17, IL-23, IL-4 and IL-10 levels measured, immunophenotyping on spleen cells performed, expression levels of genes responsible from degeneration and regeneration of liver analyzed and histo-pathological investigations performed by Knodell scoring.

Results: According to our results, an elevation on liver enzymes ALT, AST during liver fibrosis together with a significant reduction on TNF- α , IFN- γ and IL-2 levels observed after LXA4 injection. In cellular sense; TAA induced liver fibrosis increases the percentage of activated cytotoxic T-lymphocyte population. LXA4 administration significantly reduced that elevation. Despite that; LXA4 administration during liver fibrosis significantly reduced *TGF- β 1* expression. *MKK4* gene expression which is expected to be reduced during liver cell regeneration, highly expressed during fibrosis, however it is significantly reduced in LXA4 administered liver fibrosis group subjects. We did not observe a statistical difference on other genes *ATF2*, *MKK7* expression. Accordingly; bridging fibrosis and leukocyte infiltration have been observed in TAA group. According to Trichrom staining connective tissue formation has been observed in TAA group. LXA4 administration during liver fibrosis significantly reduced infiltration of leukocytes, bridged fibrosis formation disappeared and connective tissue formation significantly reduced. According to PAS staining; LXA4 administration significantly reduced physiologic activation on liver cells.

Conclusion: LXA4 can be used in the treatment of liver fibrosis and may be a molecule that may potentially cause liver regeneration.

Key Words: Liver fibrosis, Lipoxin A4, immune response, liver regeneration.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Araşidonik asit
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATF2	: Activating transcription factor 2
ATL	: Aspirin Tetikleyici Lipoksinler
CCl4	: Karbon tetraklorür
CT	: Threshold Cycle
CTGF	: Connective tissue growth factor
DMN	: Dimethylnitrosamine
ESM	: Ekstrasellüler matriks
ET-1	: Endotelin-1
GAPDH	: Gliseraldehid-3-Fosfat Dehidrogenaz
H&E	: Hematoksilen-Eosin
HSH	: Hepatik Stellate Hücre
IFN-γ	: İnterferon- γ
IGF-1	: İnsülin büyüme faktörü
IL	: İnterlökin
i.p.	: İntraperitoneal
LX	: Lipoksin
LXA4	: Lipoksin A4
LXB4	: Lipoksin B4
MKK4	: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4
MKK7	: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7
MMP	: Matriks MetalloProteinaz
NASH	: Nonalcoholic steatohepatitis
NO	: Nitrit Oksit
PAS	: Periyodik asit schiff
PBS	: Phosphate-buffered saline
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	: Reactive oxygen species
SD	: Standart sapma

TAA : Thioacetamide
TGF : Transforme edici büyüme faktörü
TIMP : Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases
TNF : Tümör nekroz faktör



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. A. Normal karaciğer dokusu ve hepatik hücrelerin yerleşimi B. Kronik karaciğer hasarını takiben meydana gelen yapısal değişiklikler.....	11
Şekil 2.2. Lipoksin Biyosentezi.....	18
Şekil 2.3. <i>MKK4</i> sessizleştirilmesi yapılan sinyal iletimindeki değişiklikleri gösteren şematik yolak.....	22
Şekil 4.1. LXA4'ün karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonuna ve inflamasyon gelişimine etkisinin H&E boyama ile analizi.....	39
Şekil 4.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Trikrom boyama analizleri	40
Şekil 4.3. Karaciğerden elde edilen RNA'ların jel elektroforezinde görüntülenmesi.....	41
Şekil 4.4. Gruplara göre <i>TGF-β1</i> gen ifadelerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.5. Gruplara göre <i>ATF2</i> gen ifadelerinin karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.6. Gruplara göre <i>MKK7</i> gen ifadelerinin karşılaştırılması.	55
Şekil 4.7. Gruplara göre <i>MKK4</i> gen ifadelerinin karşılaştırılması.	56
Şekil 4.8. <i>ATF2</i> geninin erime noktası grafiği.....	56
Şekil 4.9. <i>MKK4</i> geninin erime noktası grafiği.....	57
Şekil 4.10. <i>MKK7</i> geninin erime noktası grafiği.....	57
Şekil 4.11. <i>TGF-β1</i> geninin erime noktası grafiği.....	57
Şekil 4.12. <i>GAPDH</i> geninin erime noktası grafiği	58
Şekil 4.13. Gerçek zamanlı PZR sonunda PZR ürünlerinin jel elektroforezinde görüntülenmesi	58
Şekil 4.14. T lenfosit ve B lenfosit popülasyonlarının yüzdesel dağılımı.....	60
Şekil 4.15. Lenfosit kapısı alındıktan sonra CD3 ve CD19 popülasyonlarının dağılımının temsili histogram görüntüsü.	60
Şekil 4.16. Yardımcı T-lenfosit ve sitotoksik T-lenfosit hücre popülasyonlarının yüzdesel dağılımı	61
Şekil 4.17. Lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4 ve CD8 popülasyonlarının dağılımının temsili histogram görüntüleri	61

Şekil 4.18. CD4 ⁺ CD69 ⁺ ve CD8 ⁺ CD69 ⁺ hücre popülasyonlarının yüzdesel dağılımı	62
Şekil 4.19. Lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4/CD8/CD69 popülasyon dağılımının temsili histogram görüntüleri.	62
Şekil 4.20. CD4 ⁺ CD127 ⁺ ve CD8 ⁺ CD127 ⁺ hücre popülasyonlarının yüzdesel dağılımı	63
Şekil 4.21. Lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4CD127/CD8CD127 popülasyon dağılımının temsili histogram görüntüleri.	63
Şekil 4.22. Gruplara göre serum TNF- α düzeyleri	64
Şekil 4.23. Gruplara göre serum IFN- γ düzeyleri	65
Şekil 4.24. Gruplara göre serum IL-2 düzeyleri	65
Şekil 4.25. Gruplara göre serum IL-17 düzeyleri	66
Şekil 4.26. Gruplara göre serum IL-23 düzeyleri	66
Şekil 4.27. Gruplara göre serum IL-4 düzeyleri	67
Şekil 4.28. Gruplara göre serum IL-10 düzeyleri	67

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Karaciğer fibrozisinde immün hücre tipleri ve rolleri	13
Tablo 3.1. Deneyde Kullanılan Aletler	28
Tablo 4.1. Farelerin vücut/karaciğer ağırlık bulguları.	37
Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarının biyokimyasal bulguları.	38
Tablo 4.3. Karaciğer dokularında histolojik değerlendirme.	41
Tablo 4.4. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>ATF2</i> ve <i>GAPDH</i> genleri için Ct değerleri.....	43
Tablo 4.5. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>ATF2</i> geni için ortalama Δ Ct değerleri.	44
Tablo 4.6. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>ATF2</i> geni için ortalama $\Delta\Delta$ Ct değerleri.....	44
Tablo 4.7. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>ATF2</i> geni için $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.....	45
Tablo 4.8. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>MKK4</i> ve <i>GAPDH</i> genleri için Ct değerleri.	46
Tablo 4.9. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>MKK4</i> geni için ortalama Δ Ct değerleri.....	47
Tablo 4.10. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>MKK4</i> geni için ortalama $\Delta\Delta$ Ct değerleri.	47
Tablo 4.11. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>MKK4</i> geni için $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.	48
Tablo 4.12. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>MKK7</i> ve <i>GAPDH</i> genleri için Ct değerleri.	49
Tablo 4.13. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>MKK7</i> geni için ortalama Δ Ct değerleri.....	50
Tablo 4.14. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>MKK7</i> geni için ortalama $\Delta\Delta$ Ct değerleri.	50
Tablo 4.15. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait <i>MKK7</i> geni için $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.	51

Tablo 4.16. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklerle ait <i>TGF-β</i> ve <i>GAPDH</i> genleri için Ct değerleri.....	52
Tablo 4.17. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklerle ait <i>TGF-β</i> geni için ortalama Δ Ct değerleri.....	53
Tablo 4.18. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklerle ait <i>TGF-β</i> geni için ortalama $\Delta\Delta$ Ct değerleri.	53
Tablo 4.19. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklerle ait <i>TGF-β</i> geni için $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.....	54



1. GİRİŞ

Karaciğer fibrozisi dünya genelinde yaygın olarak görülen, önemli morbitide ve mortalite oranlarına sahip bir sağlık sorunudur (1, 2). Ana nedenleri arasında; kronik hepatit C enfeksiyonu, alkol ve alkolik olmayan steatohepatit (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) yer almaktadır (2, 3). Parazit enfeksiyonları, aşırı demir ve bakır yüklenmesi, safra tıkanıklığı ve aşırı dozda ilaç kullanımı karaciğer fibrozisine yol açan diğer nedenler arasında sayılabilir (2). Fibrozis, özellikle tip I kollajen gibi çeşitli hücre dışı proteinlerin aşırı birikmesi ile ortaya çıkan kronik karaciğer hasarının bir sonucudur (2, 3). İlerlemiş dönemde, karaciğer, normalden yaklaşık altı kat daha fazla kollajen (I, III ve IV), fibronektin, undulin, elastin, laminin, hyaluronan ve proteoglikanı kapsayan hücre dışı proteinler içermektedir. Bu hücre dışı proteinlerin aşırı birikmesi karaciğerin normal yapısını bozan patofizyolojik hasar ile sonuçlanmaktadır (2). Fibrotik yanıt; portal hipertansiyon, asit birikimi, ensefalopati, sentetik disfonksiyon ve bozulmuş metabolik kapasiteyi içeren son dönem karaciğer hastalığının hemen hemen tüm komplikasyonlarını temelinde bulundurmaktadır. Karaciğerin olağanüstü kendini yenileyebilme kapasitesi sayesinde, hastaların büyük çoğunluğunda fibrozis yavaş ilerlemektedir (4). Fibrozis tedavi edilmezse organ küçülmesi ve nodül oluşumuyla ilişkili olan siroz ortaya çıkabilmekte ve sonuçta organ yetmezliği ve ölüme neden olabilmektedir (2, 4). Bir fibrotik uyarıyı takiben hücre dışı proteinlerin birikiminden sorumlu primer hücre tipi; aktive olmuş hepatik stellate hücre (HSH) ve Kupffer hücreleridir (2). Aktive Kupffer hücrelerinin salgıladığı transforme edici büyüme faktörü- β (Transforming Growth Factor- β ; TGF- β), HSH'leri aktive ederek kollajen üreten miyofibroblastik hücrelere transforme eder. Fibrozisin başlamasında ve gelişiminde lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen ürünlerinin (Reactive oxygen species; ROS) anahtar rol oynadığını gösteren kuvvetli kanıtlar vardır. Hasar görmüş hepatositler tarafından salgılanan ROS ve fibrojenik ara ürünler inflamatuvar yanıtta rol alan akyuvarların hasar görmüş bölgeye hareketine neden olur. Bölgeye göç eden lenfositler ve polimorfonükleer hücreler gibi immün sistem hücreleri, kollajen salgılaması için HSH'leri aktive ederler. Aktive HSH'ler inflamatuvar kemokinleri salgılar, hücre adhezyon moleküllerini ifade eder ve lenfositlerin aktivasyonunu düzenler. Dolayısıyla, inflamatuvar ve fibrojenik hücreler arasında birbirini uyaran bir kısır döngü ortaya çıkmaktadır (3).

Günümüzde karaciğer fibrozisinin standart bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Her ne kadar fibrozis oluşumunu önlemeye yönelik kemirgenler üzerinde yapılan deneysel çalışmalar umut verici olsa da, bu etkenlerin insanlar üzerinde başarısı gösterilebilmiş değildir. Antifibrotik etkenin tedavi edici olabilmesi için ajanın karaciğere özgül olması, uzun dönem uygulamada kolaylıkla tolere edilebilmesi, normal ekstrasellüler matriks (ESM) protein sentezini etkilemeden fazladan kollajen birikimini etkin bir şekilde azaltabilmesi önemlidir. Günümüzde, HSH hücre aktivasyonunu inhibe eden Pentoksifilin, interferon (IFN)- α , TGF- β 1 inhibitörleri, inflamatuvar yanıtı inhibe eden kortikosteroidler, interlökin (IL)-10, antioksidan özellik gösteren Tokoferol, anjiyotensin inhibitörleri kullanılmaktadır. Ancak söz konusu antifibrotik ilaçların aktive HSH'ler üzerinde yeterli düzeyde etkin olamaması ve istenmeyen yan etkilere sahip olması nedeniyle kullanımları sınırlıdır (3, 5).

Anti-inflamatuvar lipid ara ürünlerinden olan lipoksin A4 (LXA4) yalnızca spesifik bir G-protein reseptörün bağlanması yoluyla lökositlerin hücrel aktivitelerini düzenlemekle kalmaz, ayrıca bazı genlerin transkripsiyonunu ve doğrudan hücre içi enzim aktivitesini de düzenleyebilir (6, 7). Bunlara ek olarak; LXA4'ün inflamasyonda endojen bir "fren sinyali" olarak çalıştığı da düşünülmektedir. LXA4 nötrofillerin aktivasyon durumunu azalttığı gibi aynı zamanda proinflamatuvar sitokin salınımını da azaltabilir. LXA4 inflamasyonlu dokuya monosit göçünü aktive eder ve nötrofil apoptozunu desteklemek için sağ kalım sinyalini bloke ederek inflamatuvar yanıt sürecini düzenler (6, 8). LXA4'ün anti-inflamatuvar etkileri böbrekte, karaciğerde, beyinde ve gastrointestinal sistemde gösterilmiştir (6). Ancak, bu çalışmalarda LXA4'ün karaciğer hücre rejenerasyonu ve immün sistem üzerine etkisi gösterilmemiştir.

Bu çalışma ile karaciğer fibrozisi esnasında anti-inflamatuvar özelliği olan LXA4'ün fibrozis oluşumu üzerine etkisinin immünolojik ve moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Karaciğer, vücudun en büyük karın içi organı ve bezidir (9). Vücut ağırlığının %2-2,5'ini oluşturur. Yetişkinlerde ağırlığı yaklaşık olarak 1,2 ila 1,5 kg arasındadır (10). Koyu kırmızı-kahverengi görünümünde, karnın sağ üst çeyreğinde, sağ alt kaburga hizasında, diyaframın altındadır (11). Karaciğer alt yüzü sağda duodenum, kolon, sağ böbrek ve surrenal ile; solda özofagus ve mide ile komşudur. Karaciğer sağ ve sol loblara ayrılır (12). Karaciğer, dıştan Glisson kapsülü olarak isimlendirilen fibröz bağ dokusundan bir kapsül ile çevrelenmiştir (13). Karaciğer kanını iki yerden sağlar. Portal ven, barsaklardan ve dalaktan venöz kanı getirirken; hepatik arter ise karaciğere arteriyel kan sağlar (14). Karaciğerde fonksiyonel ve yapısal birim karaciğer lobülüdür (13). Karaciğer lobülü birbiriyle birleşen sinüzoid boşlukları ile çevrili hepatosit plaklarından oluşmaktadır. Lobülde bir sentral vena bulunur. Sentral venaya çok sayıda venöz sinüzoidler açılır. Bu sinüzoidler portal venüllerden kan alırlar. İki venöz sinüzoid arasında hepatik hücreler yer alır. Bu hücreler genellikle iki tabaka halinde dizilmişlerdir ve iki komşu hücre arasında ince bir safra kanalı uzanır. Karaciğer hücreleri tarafından sürekli olarak sentezlenen safra bu kanala verilir. Bir yüzeyleri ince safra kanalına bakan karaciğer hücrelerinin diğer yüzeyleri venöz sinüzoidlere bakar. Sinüzoidlerin endotelyal yüzeyi ve hepatositler arasında "Disse aralığı" bulunur (11, 15). Disse aralığında; A vitamini metabolizması ve depolanmasında görev alan hepatik stellat hücre (HSH)'ler, hepatosit villusları, endotelden filtre edilen plazma, fibronektin, proteoglikanlar ve kollajen bulunur. Disse aralığındaki kollajen fibriller hepatositlere destek için çatı özelliği taşır. Bu çatı yapısı hasarlanır ise, iyileşme süreci fibrozise yol açar. Fibrozisin ilerlemesi ise siroz ile sonuçlanır. Erken dönemde fibrozis geri dönüşümlü iken siroz geliştiğinde kalıcı hale gelir (15). Fibrozis sürecinde birçok hücre tipi ve değişik faktörler rol oynamaktadırlar. HSH'ler ve Kupffer hücreleri fibroziste rol oynayan esas hücrelerdir (16).

2.1.1. Hepatositler

Karaciğerin parankimal hücreleri olan hepatositler, santral venden periferine doğru ilerleyen ışmsal hücre kordonları şeklinde dizilmiş poligonal şekilli ökromatik nükleuslu hücrelerdir (13). Karaciğerde bulunan hücrelerin yaklaşık %80'ini hepatositler oluşturur (17). Hepatositlerin birincil rolü metabolizmada protein üretimi ve toksin nötralizasyonu olmasına rağmen, karaciğerin bu parankimal hücreleri patojenleri belirleyebilir ve konak immün yanıtına yardımcı olabilirler. Hepatositler çoğu akut faz proteinleri ve kompleman bileşenlerinin üretiminden de sorumludur (14). Hepatositler üzerinde doğal immün reseptörlerin ifadesinin tanımlandığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Buna ek olarak hepatositler ayrıca adaptif immün yanıtın başlamasında da işe karışmaktadırlar (18). Hepatositler çeşitli patolojik durumlardan, toksik ajanlardan ve iskemiden kolay etkilenirler (13). Kronik karaciğer yaralanmasında apoptoza maruz kalabilirler. Apoptotik hepatositlerin, Kupffer hücreleri tarafından alınarak karaciğerden çıkarılması sağlanır. Aktive olmuş Kupffer hücrelerinin salgıladığı tümör nekroz faktör (TNF)- α , transforme edici büyüme faktörü- β (Transforming Growth Factor- β ; TGF- β) gibi çeşitli inflamatuvar yanıtı ilerleten sitokinler, hepatik stellat hücre (HSH)'leri aktive ederek bir fibrotik yanıt oluşmasına neden olurlar (19). Serbest kalan hepatosit kaynaklı apoptotik cisimler HSH'leri doğrudan da aktive edebilirler (17, 19). Aktive HSH'ler de karaciğer fibrozisine neden olan tip I kollajen salgırlar. Karaciğer fibrozisini tersine çevirmek için hepatositlerin apoptozdan korunması yararlı terapötik stratejilerden biri olabilir (17). Hepatosit hücre ölümüne ek olarak, bozulmuş karaciğer rejenerasyonu ve tamiri de akut karaciğer bozukluğunun genel bir özelliğidir (20).

2.1.2. Hepatik Stellat Hücreler

Hepatik stellat hücre (HSH)'ler, hepatositler ve sinüzoidal endotel hücreler arasında Disse boşluğunda yer alan yıldız benzeri uzantıları olan perisinüzoidal hücrelerdir (18, 21-23). HSH'ler A vitamini ve lipid depolamada merkezi bir role sahiptirler. Yağ depolayan hücreler ya da İto hücreleri olarak da bilinen HSH'ler sağlıklı karaciğer hücrelerinin %5-8 kadarını oluştururlar (18, 21). HSH'ler ve bunlardan türeyen myofibroblast benzeri hücreler; retinoidleri çözüp içlerine alırlar ve depolarlar, ekstrasellüler matriks (ESM) proteinlerini (kollajen 1, 3-6, fibronektin,

laminin, tenaskin, undulin, hyaluron, proteoglikanlar vb.) sentezler ve salgırlar (24). HSH'ler ayrıca anjiyogeneze ve oksidant strese katkıda bulunurlar (22). HSH'ler normal karaciğerde sakin, hastalıklı karaciğerde ise aktive olmuş iki ayrı fenotipte gözlenebilirler. HSH'ler herhangi bir uyarın ile aktive olmadan önce; retinoid, trigliserid, kolesterol ve serbest yağ asidleri içeren, çok sayıda yağ damlacıkları ile kuşatılmış sitoplazmaya ve yıldız benzeri bir şekle sahiptirler. HSH'lerin en önemli ve belirgin yapısal özelliği, aktin mikroflaman demetlerini ve desmin, vimentin, synemin gibi ara filamentleri bulundurmasıdır. HSH'ler ayrıca sakin formlarını devam ettirmekten sorumlu olan LIM-homeodomain protein (Lhx2) transkripsiyon faktörünü de ifade ederler. Sessiz HSH'ler, transkripsiyonel seviyede tip I kollajen ifadesini inhibe ederek antifibrojenik etkiler de sergileyen adipogenez için ana transkripsiyonel düzenleyici olarak düşünölen bir nükleer reseptör olan peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) ifade ederler. Sessiz HSH'ler ayrıca hepatosit büyüme faktörü, TGF- β , insulin-like growth factor-I (IGF-I) ve diğer sitokinlerin ifadelerini otokrin ve parakrin tarzda düzenlerler (21). Kronik karaciğer yaralanmasını takiben ise HSH'ler aktive olur ve durgun bir hücreden fibrojenik bir hale farklılaşırlar (18, 23). HSH'ler, aktive olmuş Kupffer hücreleri, hasar görmüş hepatositler, kan pulcukları, endotelial ve inflamatuvar hücreler arasındaki etkileşim HSH aktivasyonunda rol oynar (24). HSH'ler yağ damlacıklarının kaybolması, artmış proliferasyon ve migrasyon, aşırı ESM proteinlerinin salgılanması, güçlenmiş kasılabilirlik ve TGF- β 1'i içeren proinflamatuvar ve profibrojenik faktörlerin serbest bırakılması özellikleri ile karakterize edilen myofibroblast benzeri hücrelere dönüşürler. Aktive HSH'ler mezenkimal hücre belirteçlerini (α SMA ve tip I kollajen) arttırırlar ve nöral belirteçlerini kaybederler (23). Lipid depolama ve fibrojenezdeki iyi tanımlanmış rollerine ek olarak, karaciğerde immün koruyucu olarak rol oynadıklarına dair kanıtlar da mevcuttur (18). Ek olarak, HSH'ler sitokinler ve kemokinlerin salgılanması ve immün hücrelerle etkileşmesi yoluyla immün yanıtı aktive etmede çok önemli bir rol oynarlar. HSH'lerin, normal ve fibrotik karaciğerdeki ESM'nin birikmesini düzenleyen primer efektör hücre olduğu fibrozisi anlamada anahtar bir keşiftir (22).

2.1.3. Kupffer Hücreleri

Kupffer hücreleri karaciğere yerleşmiş sabit makrofajlardır. Kupffer hücreleri vücuttaki tüm doku makrofajlarının %80-90 kadarını temsil ederler. Karaciğer hücre popülasyonunun ise %15'ini oluştururlar (21). Karaciğer endotel hücrelerine bağlı olarak bulunan, sitoplazmik uzantıları olan fagositoz yeteneğine sahip ve kan içeriğine doğrudan maruz kalan hücrelerdir. Kupffer hücrelerinin önemli görevleri; yaşlı eritrositleri metabolize etmek, patojenleri yakalamak ve immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamaktır (18). Kupffer hücreleri endotelial hücreler ve hepatositler ile etkileşen yardımcı bir sitemin parçasını oluşturmaktadır (25). Kupffer hücreleri reseptör aracılı endositoz ile farklı molekülleri dolaşımdan kaldırabilirler. Doğal immün sistemin bir parçası olan bu hücreler, kemotaksis ve fagositoz gibi olayları ilerleterek, TNF- α , IL-1, IL-6 gibi sitokinleri ve reaktif oksijen türlerini salgılayarak karaciğerdeki inflamatuvar sürecin regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (21). Fibrozisteki asıl etkileri ise fibrozis sürecindeki matriks üretiminde en etkili uyaran olan TGF- β 1'in üretimidir. Aktive Kupffer hücrelerinin ürettiği TGF- β 1, HSH'leri aktive ederek kollajen üreten myofibroblastik hücrelere değişimini sağlar. Proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra, anti-inflamatuvar sitokinler de üretirler (15). Antifibrotik etkisi, özellikle fibrozun erken dönemlerinde ve akut karaciğer hasarı esnasında anti-inflamatuvar ve antifibrotik etkiye sahip olan önemli sitokin IL-10'un varlığı ile belirgindir. IL-10 kollajenaz salgısını arttırdığı için kollajen birikmesinin bir azalmasına yol açmaktadır. Aktive olmuş Kupffer hücreleri HSH'leri etkili bir şekilde öldürebilirler. Bu öldürme işlemini ise kaspaz-9 bağımlı mekanizma ile yaparlar (21).

2.1.4. Sinüzoidal Endotel Hücreler

Karaciğer sinüzoidal endotel hücreler; patojen belirlemede, yakalamada ve muhtemelen antijen sunumunda önemlidir. Sinüzoidal endotel hücreler karaciğerdeki nonparankimal hücrelerin yaklaşık %50'sini oluştururlar. Sinüzoidal endotel hücreler sinüzoidal lümeninde hepatositleri kandan ayıran temel yapıdır (18). Sinüzoidal endotel hücreler aralıklı olarak yerleşmişlerdir (26). Aralıklı yapılar moleküllerin sinüzoidal lümeninden Disse aralığına geçişini kolaylaştırır (18). Sitoplazma ve organelleri azdır. Farklılaşmış sinüzoidal endotel hücrelerin fonksiyonu, HSH'lerin aktivasyonunu önlemede bir bekçi görevi görür. Ancak, toksinle indüklenmiş fibrozis modellerinde,

fibrojenezin erken aşamalarında kapillerize sinüzoidal endotel hücrelerin HSH aktivasyonunu önleyemedikleri ve EIIIA-fibronektin üreterek HSH aktivasyonunun ilerlemesine izin verdikleri görülmüştür (26).

2.1.5. Karaciğerde Ekstrasellüler Matriks

Karaciğer ekstrasellüler matriks (ESM), sinüzoidleri döşeyen endotel ile hepatosit hücrelerinin arasını dolduran, portal trakt ve santral ven çevresinde bulunan jelatinimsi ağ benzeri bir destek dokusudur. ESM hücrelere destek olmanın yanında çeşitli araçların depolanması ve salınımı, solütlerin transportu, hücreler arası iletişimin sağlanması gibi çeşitli fonksiyonlar görür. Hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, farklılaşmasını, özelleşmiş hepatosellüler fonksiyonları ve sinüzoidlerde dar küçük deliklerin oluşmasını ESM sinyalleri düzenler. Karaciğerde en fazla matriks sentezleyen hücreler hepatik stellat hücrelerdir (27). ESM; normal ve fibrotik karaciğer iskeletini oluşturan makromoleküllerin bir dizisini içermektedir. Bu makromoleküller üç ana aileden oluşur: kollajenler, glikoproteinler ve proteoglikanlar. Glikoproteinler fibronektin, laminin, merosin, tenaskin, nidojen ve hyaluronik asit içermektedir. Proteoglikanlar heparan, dermatan, kondroitin sülfatlar, perlekan, sindekan, biglikan ve dekorin içermektedir. İnterstisyel kollajenler tip I ve III, fibrotik karaciğerde olduğu gibi normal karaciğerde de kollajenlerin büyük miktarını oluşturur, fibroziste tip III kollajen miktarının nispeten arttığı görülmektedir (28). Normal karaciğerde, Disse boşluğunun bazal membran benzeri matriksi, birincil olarak tip IV ve VI kollajenlerden oluşmaktadır (22). Farklı izoformları, farklı doku bölgelerindeki değişken kombinasyonları ve yaşla ilişkili değişikliklerle ilişkili olarak bu matriks makromoleküllerinin dikkate değer heterojenitesi mevcuttur. Karaciğer fibrotik olurken, kantitatif ve kalitatif olarak belli değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Kollajen ve kollajen olmayan bileşenlerin toplam miktarı 3 ila 8 kat arasında artmaktadır (29). ESM yapımı ve yıkımı sürekli devam eden dinamik bir süreçtir. Matriks Metalloproteinaz (MMP) enzimleri sürekli olarak matriks komponentlerini yıkar ve yerine yenileri oluşur. Dokuda bulunan matriks metalloproteinaz inhibitörleri (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases; TIMP) ise oluşan matriksin yıkımının engellenmesini sağlarlar. Kronik bir zedelenmede TIMP artarak MMP inhibe edilir ve fibröz matriks yıkımı engellenmiş olur (27).

2.2. Karaciğer Fibrozisi

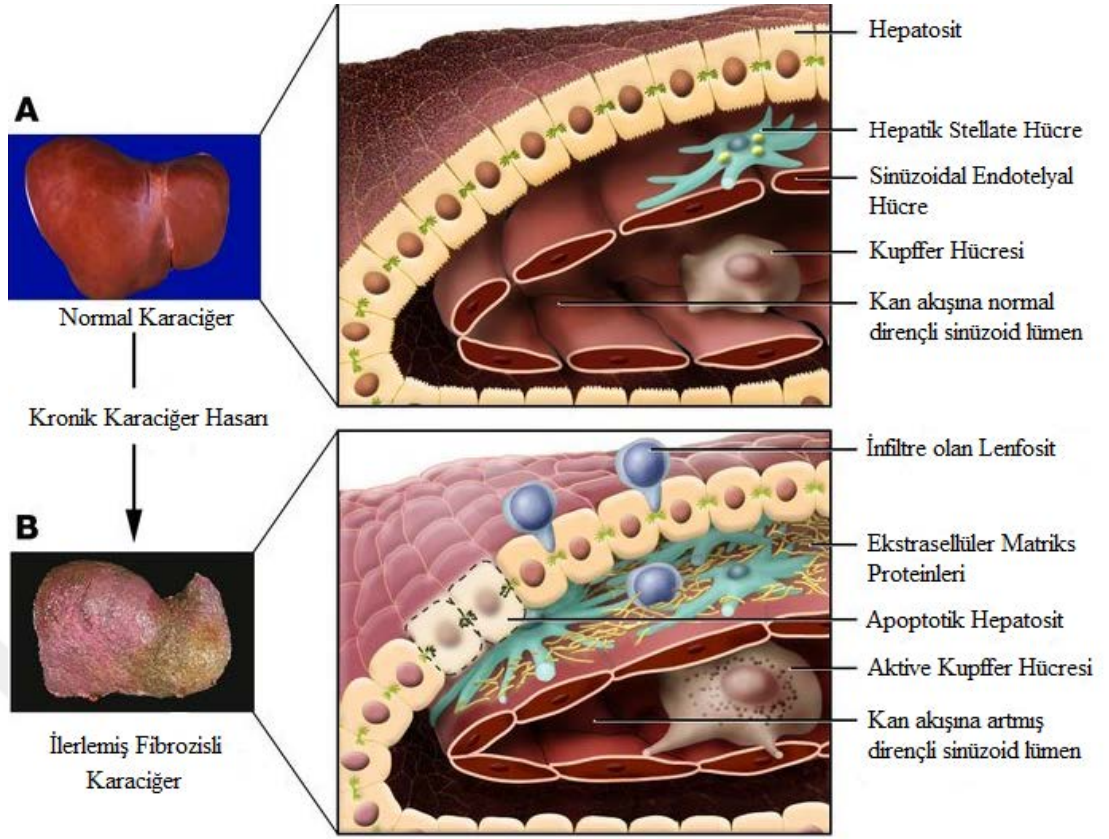
Karaciğer fibrozisi, ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenlerinin aşırı üretimi ve birikmesi ile karakterize olan, kronik hasarlı karaciğerdeki bir yara-iyileşme sürecidir (30). Bu süreç; HSH'lerin aktivasyonunu ve ESM proteinlerinin aşırı ifadesini içermektedir (21, 31). Viral hepatitler (B,C,D) ve şistozomiazis tarafından oluşturulan kronik enfeksiyonlar, toksin ve ilaçlar (alkol, amiodaron, metotreksat vs.), alkolik olmayan steatohepatit, hemakromatozis, alfa-1 antitripsin eksikliği, wilson hastalığı, galaktozemi, tirozinemi, tip IV glikojen depo hastalığı gibi metabolik nedenler, primer biliyer siroz, otoimmün hepatit gibi otoimmün hastalıklar karaciğer fibrozisine yol açan etkenler arasında bulunmaktadır (21). İnsandaki hepatik fibrozisin ortaya çıkmasında farklı uyarıcılar (konjenital, metabolik, inflamatuvar, parazitik, vasküler, toksinler ya da ilaçlar) rol alsada, fibrozisin altında yatan moleküler mekanizmalar temelde aynıdır (31). Karaciğer fibrozisi tedavi edilemediği zaman siroza doğru ilerleyebilen kronik bir süreçtir (32). Ancak, travma geçici ise karaciğerdeki değişiklikler de geçici olabilir ve karaciğer fibrozisi çözülebilir (31). Yaş, cinsiyet, kilo, günlük alkol tüketim miktarı, enfeksiyona maruz kalma süresi, Diabetes Mellitus, karaciğer demir seviyesi fibrozisin derecesini ve siroza ilerleme hızını etkileyen faktörler arasındadır (33).

2.2.1. Karaciğer Fibrozisinin Patogenezi

Fibrozisin gelişmesi; inflamasyon ve fibrojenez olmak üzere iki ana fazda gerçekleşmektedir (21). İnflamasyon karaciğer fibrozunun önemli ve kompleks bir özelliğidir. Karaciğer yaralanmasını takiben, inflamatuvar hücrelerin yaralı bölgede bir birikimi meydana gelir (32). Başlangıçta, çeşitli hepatotoksik faktörler ile, hepatik hücrelerden (hepatosit, endotel, Kupffer hücreleri, trombosit vb.) gelen parakrin uyarılar sonucunda hepatik stellat hücre (HSH)'lerin gen ifadesinde değişiklikler meydana gelir. Endotel hücreleri; fibronektin, TGF- β , endotelin-1 (ET-1) sentezi ile HSH aktivasyonunda rol alırlar (27). 21 amino asitlik peptid olan ET-1, erken faz esnasında tip-I kollajen gen ifadesini yükselterek HSH aktivasyonunu, invazyonunu ve fibrojenezini indükler (21). Kupffer hücreleri ise çeşitli inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımını gerçekleştirirler. Kupffer hücrelerinden salınan TGF- β 1, HSH'lerdeki kollajen I ifadesini arttıran, HSH'lerin myofibroblast benzeri fenotipe dönüşmesini ilerleten ve TIMP'lerin ifadesini uyarması yoluyla ESM degradasyonunu

da etkileyen en profibrotik sitokinlerden biri olarak tanımlanmaktadır (34). HSH'lerdeki TGF- β ayrıca, hücre içi sinyal kaskadına ve Ras, Raf-1, MEK ve MAPK genlerinin transkripsiyonel düzenlenmesine de katılmaktadır (21). Paralelinde trombositlerden salınan PDGF ise HSH için en güçlü pro-proliferatif sitokin olarak görülmektedir. Bağ dokusu büyüme faktörü (Connective tissue growth factor; CTGF) de son zamanlarda fibrogenezin potansiyel bir aracısı olarak ortaya çıkmaktadır (33). Proliferasyonu uyaran diğer faktörler ise; vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin büyüme faktörü (IGF-1) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF)'dür. Trombin, arginin, vazopressin, AT-II gibi vazokonstriktörler HSH'ler üzerine mitojenik etki gösterirken, vazodilatörlerden prostaglandin E2 ve Nitrit Oksit (NO) antimitojenik etki oluşturur. HSH'lerin kontraktıl özellikler kazanması, içerisinde aktin ve miyoflamanların artması ile olur. ET-1 kasılmayı uyaran en önemli faktördür. NO, ET-1'in fizyolojik antagonisti olup, fibrozis sürecinde ET-1 artarak, NO azalarak kasılma uyarılır (27). Sonuç olarak, Ca²⁺ alınımına aracılık ettiği ve hücrel kasılmayı düzenledikleri bilinen L-tipi voltajla çalışan Ca²⁺ kanalları ifadesinde değişikliklere ve bir-düz kas aktininin (α -smooth muscle actin; α -SMA) artmış ifadesine sebep olan ESM bileşenlerinin aşırı sentezi gerçekleşir. Aktive olmuş HSH'ler yağ damlacıklarını kaybetmiş, glial fibriller-asidik protein eksikliği olan ve artmış hücre proliferasyonu özelliklerini gösteren myofibroblast benzeri hücre tiplerine dönüşürler. Aynı zamanda bu hücreler, karaciğer fibrozisinin gelişmesini ilerleten, otokrin bir şekilde onların kontraktıl, proliferatif ve transformatıl özelliklerini ilerleten sitokin ve aktive peptidler üretirler. Aktive olmuş HSH'lerin IL-10, FAS (CD95), PDGF, FGF, VEGF ve TGF- β 1 için reseptörlerin otokrin etkilerini arttırdıkları bilinmektedir. Aynı zamanda, bu HSH'ler IGF-1 reseptörünün, üç TGF- β tip reseptörünün ve genel olarak Smad proteinleri olarak isimlendirilen sinyal aracılarının ifadesini de baskırlar. Aktive olmuş HSH'ler kemotaktıl yanıt gösterir ve hasarlı bölgeye doğru göç eder ve hasarlı doku etrafında birikmeye başlarlar (21). Pro-fibrojenik myofibroblastların birikmesi doku fibrozisinde merkezi bir özelliktir (23). Myofibroblast benzeri hücreler otokrin ve parakrin olarak uyarılırlar. Bu hücrelerin oluşturduğu ürünler fibrogenezin sürekliliğini sağlar (24). Fibrozis esnasında, sağlıklı karaciğer için normal olan düşük yoğunluklu matriks bozulur ve fonksiyonel olmayan kollajenöz yapı ile yer değiştirir. Başlangıçta, Kupffer hücrelerinden salgılanan TGF- β 'nın uyarımı ile aktive olan HSH'ler, özellikle tip-I-III-IV kollajen, fibronektin, elastin, laminin ve proteoglikanlar gibi ESM

proteinlerini sentezlemeye başlar (21, 32). Fibrozis artarak siroza doğru ilerlerken normal karaciğer dokusunda 1:1 olan kollajen tip I/tip III oranı 4:1 oranına değişmektedir (35). HSH'ler, tip IV kollajen ve laminin gibi ESM'nin ana bileşenlerini bozan matriks metalloproteinaz (MMP)-2'nin önemli bir kaynağıdır (21, 36). MMP'ler, matriksinler olarak da bilinir, kollajen ve nonkollajen ESM substratlarını yıkıma uğratan kalsiyum bağımlı enzimlerin ana ailesidir. MMP'ler çeşitli inaktif proenzim olarak salgılanırlar ve endojen proteinaz inhibitörlerinin bir ailesi olan TIMP'ler tarafından düzenlenirler. Bu nedenle, TIMP'ler karaciğer yaralanması esnasında metalloproteinazların aktivitesini antagonize ederek matriks birikiminin degradasyonunu önlemede önemli bir rol oynar. TIMP-1 de HSH'ler üzerinde bir antiapoptotik etkiye sahiptir; yaralanma esnasında B cell lymphoma (Bcl)-2 indüksiyonu yoluyla aktive olmuş HSH'lerin sağkalımını iletir ve onların temizlenmesini önler. Hepatik makrofajlar ayrıca karaciğer fibrozisinin çözülmesi esnasında MMP-13 üretimini artırarak matriks degradasyonunda belirleyici bir rol oynar ve matriks değişikliğini düzenlerler (36). Fibrotik karaciğerde TIMP'lerin seviyesinin belirgin şekilde artmış olduğu kaydedilmiştir. TIMP'ler, MMP-1'in etkisini inhibe edebilme yeteneğine sahip olması nedeniyle kollajen fiberlerinin birikmesine neden olmaktadır (21). Büyüme faktörleri ve sitokinlerin yanı sıra ESM komponentleri de direkt HSH aktivasyonunu etkilerler. Plazmin antifibrotik bir sitokin olup, HSH'ler plazminojen aktivatör inhibitör (PAI)-1 yoluyla fibrozis gelişimine katkıda bulunurlar. Karaciğerde etken ne olursa olsun oluşan inflamasyon ve nekroz sonucu ortak bir yara iyileşme cevabı ve sonucunda fibrozis gelişir. Etken ortadan kaldırılamaz ve kronik bir zedelenme sürecine girilirse bu yara iyileşme yanıtı, kalın fibröz bantlar ve rejenerasyon nodülleriyle seyreden siroza kadar ilerler (27) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. A. Normal karaciğer dokusu ve hepatik hücrelerin yerleşimi
B. Kronik karaciğer hasarını takiben meydana gelen yapısal değişiklikler (3).

2.3. Karaciğer Fibrozisi ve İmmün Yanıt

İnflamatuvar yanıt fibrojenezde önemli bir rol oynar (22). Fibrojenez süreci kompleman ve interferon (IFN)'lar gibi humoral faktörlerle beraber doğal immün yanıt hücreleri NK (Naturel Killer Cell; Doğal Öldürücü Hücreler), NKT (Doğal Öldürücü T Hücreleri), nötrofiller ve doğal immün yanıt reseptörleri, kazanılmış immün yanıt hücreleri, T ve B lenfositleri tarafından kontrol edilmektedir (32, 37). Sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve oksidatif stres ürünleri fibroz süreci sırasında immün sistem hücrelerinden kaynaklanan inflamatuvar yanıtta aracılık ederler. Hepatik stellat hücre (HSH)'ler immün sistem hücrelerinin farklı tipleriyle etkileşerek inflamasyon sürecinde aktif olarak yer alırlar (32). Aktive HSH'ler inflamatuvar kemokinleri salgılar, adhezyon moleküllerinin sentezlenmesi yoluyla immün hücrelerle doğrudan etkileşir ve antijen sunumuyla immün sistemi modüle ederler (22). HSH'ler "sitokinle uyarılan nötrofil kemoatraktan protein (CINC)", MCP-1 ve M-CSF gibi kemoatraktanlar salgılayarak monosit, makrofaj ve lenfositleri inflamasyon bölgesine çekerler. İnterlökinler (IL-4, IL-6, IL-8, IL-6 ilişkili sitokin), prostaglandinler (PG D2, PG E2),

TNF- α , TGF- β , IFN- α , IFN- δ , PDGF, M-CSF, MCP-1, PAF ve FGF inflamasyon ve fibrosis sürecinde rol oynayan sitokinlerdir (27). Kupffer hücre aktivasyonu NF- κ B aktivitesine ve HSH'lerin aktivasyonuna neden olan, TNF- α 'yı içeren pro-inflamatuar sitokinlerin ve monosit kemoatraktant proteinlerin (MCP)-1 sonradan salgısına yol açmaktadır (22). HSH'lerin aktive olarak myofibroblast benzeri fenotipe dönüşmesinde, myofibroblast benzeri hücrelerin çoğalmasında ve aşırı ekstrasellüler matriks birikiminde TGF- β ve TNF- α gibi inflamatuvar araçlar rol oynar (32). TNF- α ayrıca nötrofil infiltrasyonunu indükler ve apoptoza duyarlı hale gelen hepatositlerdeki mitokondriyal oksidant üretimini stimüle eder (22). TGF- β ana fibrojenik sitokindir ve aktive HSH'ler yoluyla α -SMA ve tip I kollajen sentezini artırır. PDGF, extracellular signal-regulated kinase (ERK)-bağımlı ve ERK-bağımsız mekanizmalar yoluyla ve intrasellüler pH'daki değişiklikler yoluyla myofibroblastların proliferasyonunu indükler. Lökositler hasarlanmış bölgeye toplanırlar, apoptotik hücreleri fagosite ederler ve TNF, IL-6 ve IL-1 β gibi pro-inflamatuar sitokinleri üreterek ve T hücrelerini toplayarak inflamatuvar yanıtı çoğaltırlar. Hüresel hasar ve stimüle olmuş immün hücreler tarafından üretilen PDGF, bağ dokusu büyüme faktörü (connective tissue growth factor; CTGF), TGF- β ve IL-13'ü içeren sitokinler gibi proinflamatuvar araçlar dokulardaki mezenkimal öncül hücreleri aktive ederler ve onların myofibroblastlara farklılaşmasını indüklerler. Apoptotik hepatositler ve lenfositlerin HSH'ler tarafından fagositozu da onların doğrudan fibrojenik aktivasyonunu tetikler (23). HSH'ler T (MHC I, MHC II, CD80 ve CD86) hücrelerine antijen sunumu için gerekli molekülleri düşük miktarda da olsa ifade ederler ve ekzojenik antijenleri endositoz yapabilirler. Floresan mikroskopi çalışmaları HSH'ler ve lenfositler arasındaki doğrudan iletişimi ortaya çıkarmıştır ve HSH'lerin naif lenfositleri doğrudan aktive edebildiği fikrini desteklemektedir. Ayrıca bazı çalışmalar da, HSH'lerin T lenfositler, NK hücreleri ve NKT hücreleri tarafından sitokin üretimini ve bu hücrelerin aktivasyonunu doğrudan indükleyebildiği sonucuna varılmıştır. HSH'ler bazal koşullarda antijen sunucu hücreler gibi fonksiyonel olamayabilirler, fakat bu durum iltihaplanmış karaciğerde değişebilir. HSH'lerin kronik karaciğer hasarına ya da IFN- γ gibi inflamatuvar sitokinlere maruz kalması HSH'lerin fenotiplerinin değişmesine neden olur. Bu durum HSH'lerin lenfositlere antijen sunum yeteneklerini arttırabilmektedir. Sonuç olarak, bu hücreler hastalığın ilerlemesinde ve karaciğerdeki hasarın çözülmesinde önemli oyuncular olabilir (18). Oksidan stres ve apoptotik parenkimal hücreler immün sistemin güçlü indükleyicileridir. Karaciğer

hasarı sonucu oluşan apoptotik hücreler HSH'ler tarafından fagosite edilebilir ve bu da NADPH oksidazdaki (NOX) bir artışı ve hücre sağkalımını stimüle eder. NOX indüksiyonu, HSH aktivasyonuna katkı sağlayan oksidan strese de neden olabilir. Doğal öldürücü hücreler aktive HSH'leri inhibe etme ya da öldürme yoluyla antifibrotik bir aktiviteye sahiptirler. Hasarlı karaciğerde, NK hücreleri, IFN- γ üretimi yoluyla HSH'lerin apoptozisini indüklerler. Dinlenme durumundaki HSH'ler göreceli olarak apoptotik sinyale karşı dirençlidir fakat aktivasyondan ve onların sınıf I ifadesinin azalmasından sonra daha hassas olabilirler. Ayrıca, karaciğerdeki NK hücrelerinin azalmış seviyelerine sahip immün-baskılanmış bireylerde muhtemelen daha az NK hücre aracılı HSH apoptozisi nedeniyle fibrozis artmıştır. Son olarak, HSH'ler çeşitli immün hücrelerle, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 ve vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 moleküllerinin ifadesi yoluyla doğrudan etkileşir. Her iki adhezyon moleküllerinin ifadesi TNF- α 'nın aracılık ettiği hasar sırasında HSH'lerde artmıştır. Bu yüzden, HSH üzerindeki adhezyon molekül indüksiyonu karaciğerdeki hasarlı bölgeye inflamatuvar hücrelerin toplanmasını kolaylaştırmaktadır (22).

Tablo 2.1. Karaciğer fibrozisinde immün hücre tipleri ve rolleri (34).

Hücre Tipi	Sitokin Üretimi	Karaciğer Fibrozisindeki Rolü
Kuffer Hücreleri	IL-1, IL-6, TNF- α	Pro-inflamatuvar ve fibrojenik araçların büyük oranda salgılanması. Kupffer hücre tükenmesi histolojik fibrozisi azaltır.
Doğal Öldürücü Hücreler	IFN- γ , TNF- α , GM-CSF	Bir TRAIL-bağımlı tarzda HSH apoptozisini indükler. Doğal öldürücü hücrelerin tükenmesi karaciğer fibrozisini güçlendirir.
Doğal Öldürücü T Hücreleri	IFN- γ , IL-4, IL-13	Tip 2 profibrotik sitokinlerin salgılanması yoluyla fibrozis sürecini sürdürür. Doğal öldürücü T hücrelerinin tükenmesi karaciğer hasarı ve fibrozisi azaltır.
Dendritik Hücreler	IL-12, IL-10 IL-6, IFN- α	Karaciğer fibrozisi esnasında dendritik hücre kalite ve miktarında değişim gerçekleşir. Doğal öldürücü T hücreleri ve HSH'leri uyarmak için yetenek kazanır. Dendritik hücre tükenmesi fibrotik karaciğerdeki inflamatuvar araçları tamamen kaldırır.
T hücreleri	IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10	T hücreler antifibrotik ve profibrotik sitokinler üretir.
B hücreleri	IL-12, IL-8, IL-1, TNF- α	B hücresi tükenmesi kollajen birikmesini azaltır.

2.4. Fibrozisin Geriye Dönebilmesi ve Antifibrotik Stratejiler

Karaciğer fibrozisi dünya genelinde mortalite ve morbidite ile ilişkili önemli bir sağlık problemidir. Milyonlarca insan dünya genelinde sirozdan muzdariptir. Ancak karaciğer fibrozisi için standart bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (32). Günümüzde ilerlemiş fibrozis için mevcut olan tek etkili yöntem karaciğer transplantasyonudur. Ancak en iyi koşullara rağmen transplantasyon, birçok zorluğu ve komplikasyonları olan pahalı bir seçenektir. Bu yüzden hepatik fibrozisin önlenmesi veya tedavi edilebilmesi için medikal tedavi arayışları gittikçe önem kazanmaktadır (3, 38). Tedavide amaç; hasar yapan etkenin ortadan kaldırılması, karaciğerdeki inflamasyonun baskılanması, HSH aktivasyonunun azaltılması ve matriks yıkımını arttırmaktır. Günümüzde çeşitli ilaçlar, insan ve hayvanlarda denenmektedir (3, 39). Fibrozisin deneysel hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda, fibrozise neden olan etkenin ortadan kaldırılması fibrozisin gerilemesi ile sonuçlanmaktadır. Karaciğer fibrozisinin gerilemesi, aşırı demir ve bakır ile yüklenmiş, alkolle indüklenmiş hasarlı hastalarda, kronik hepatit B, C ve D'li hastalarda, hemakromatozisli, sekonder biliyer sirozlu, alkolik olmayan steatohepatitli hastalarda ve otoimmün hepatitli hastalarda gözlenmiştir. İnsanda ise, hastalığın altında yatan temel nedenin başarılı tedavisi karaciğer fibrozisini tersine çevirebilir. Günümüzde hepatik fibrozisin sanılandan daha geri çevrilebilir olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (36). Moleküler biyolojideki son araştırmalar, karaciğer fibrozisinde rol oynayan çeşitli elementleri keşfetmeye ve daha iyi karakterize etmeye yardımcı olmaktadır. Karaciğer fibrozisinin patolojisinin daha derin seviyede moleküler olarak anlaşılması yeni ve tamamlayıcı terapötik yaklaşımlara fırsat vermektedir. Bazı çalışmalarla dikkate değer bir başarı olarak, belirli antifibrotik ajanların uygulanmasından sonra ilerlemiş fibrozun ve hatta sirozun geriye dönebildiği gösterilmiştir. Antifibrotik bileşenler etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. İnflamasyonu azaltabilen (1), ESM degradasyonunu ilerleten (2), HSH aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eden (3), HSH'ler tarafından ESM üretimini azaltan (4), HSH kontraktıl yanıtını nötralize eden (5) ve HSH'lerin apoptozunu stimüle eden (6) özellikte ve antioksidanlar (7) gibi bileşikler örnek olarak verilebilir. ESM proteinlerine benzer moleküller, hücre-ESM aracılı etkileşimlerdeki bazı reseptörler, sitokinler, integrinler, büyüme faktörleri (özellikle TGF- β ve PDGF) ve post-reseptör sinyal düzenleyiciler (Smadlar gibi) ve transkripsiyon faktörleri (özellikle PPAR- γ 'nın azalmış ifadesi) antifibrojenik terapötik yaklaşımın odak noktası olabilir.

Antifibrotik etkileri için geliştirilmiş çok sayıda ilaç olmasına rağmen onların da bazı sınırlamaları ve yan etkileri bulunmaktadır (21).

2.5. İnflamasyon, Çözülme ve Lipoksinler

Etkili konak savunmasında anahtar bir süreç olan inflamasyon modern batı uygarlığında yaygın olarak görülen birçok hastalığın merkezi bileşenidir (7, 40). İnflamasyon yabancı patojenler, travma ya da yaralanma ile tetiklenmiş süreci sıkı bir şekilde düzenlemekte ve polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu ve bölgeye spesifik toplanması ile karakterize edilmektedir (7, 41). Bu süreci makrofajlara farklılaşan monositlerin infiltrasyonu, enfeksiyon mikrobunun ve hasarlı dokunun başarılı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılması takip etmektedir (6).

İnflamasyonun çözülmesi ise, kronik inflamasyonu ve hastalığı önlemeyi, homeostazisi devam ettirmeyi amaçlayan, ön çözücü lipid araçlarının bir grubu tarafından başlatılan, hayati öneme sahip aktif endojen bir süreçtir (40-42). Çözülme sırasında aktive edilen hücresel olaylar; lökositlerin transepitelyal göçü, fagositoz ile apoptotik hücrelerin çıkarılmasının uyarılması ve hasarlanmış doku yapısının restorasyonu ile inflamatuvar hücre toplanmasının aktif şekilde azalmasını içermektedir (6). Konak için hasarı sınırlamak ve çözülmeyi ilerletmek için lökosit toplanması sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (43). Ön çözülme süreci esnasında, nötrofil kemotaksisinin inhibe edilmesinin yanında, iltihaplanmış doku içindeki spesifik fonksiyonları tamamlanmış olan nötrofiller apoptoz yoluyla ölürlere ve dokuya toplanan makrofajlar tarafından fagosite edilirler (6, 42). Bu anahtar mekanizma sayesinde iltihabi doku proinflamatuvar bir durumdan çözülmeye başlayan duruma geçer, makrofaj proinflamatuvar aracı oluşumunun azalmasına ve antiinflamatuvar ve çözülmeyi ilerletici lipid araçlar ve sitokinlerin serbest bırakılmasına neden olur (6). Devam eden inflamasyonun çözülme sürecinin herhangi bir aşamasındaki başarısızlık fibrozis ve sonunda organ yetmezliği ile kronik inflamasyona yol açabilmektedir (7, 42). İnflamatuvar hastalıkların yarattığı etkiler göz önüne alındığında tıbbi çalışmalar inflamatuvar yanıtın çözülmesine yönelik farmakolojik araştırmalara odaklanmıştır (6). Endojen kimyasal araçların çeşitli dizilerinin bu olayları kontrol ettiği ve konak yanıtını düzenlediği açıktır (44). İnflamasyonun başlangıç fazı esnasında prostaglandinler ve lökotrienleri içeren eikosanoidler, inflamasyon alanındaki proinflamatuvarların (Th1 kaynaklı sitokinler) üretimine bağlı aktive olmuş lökositlerin güçlü kemotaktik yanıtına

yol açan, bir inflamatuvar durumun gelişmesinde lokal aracı olarak önemli rol oynarlar (7, 44). Araşidonik asidin (AA) oksijenasyonu ve serbest bırakılması; konak savunması, inflamasyon ve hemodinamiklerdeki kilit süreçlerin düzenlenmesine yardım eder. Araşidonik asidin oksijenasyonu eikosanoidler olarak bilinen prostaglandinler, tromboksanlar, prostasiklinler, lökotrienler ve lipoksinler (LX) gibi güçlü biyoaktif bileşiklerin biyosentezini başlatmaktadır (45).

2.5.1. Lipoksinler

Lipoksinler 1980 yılında, ekzojen substratlarla inkübe edilen karışık insan lökositlerinden izole edilerek keşfedilmişlerdir (46). LX'ler, *in vivo* ve de *in vitro* olarak, anti-inflamatuvar ve ön-çözücü özellik sergileyen, lipoksijenaz bağımlı araşidonik asit metabolizması esnasında hücre-hücre etkileşimi yoluyla birçok hücre tipinde üretilen endojen eikosanoidlerdir (47-49). LX'ler inflamasyon için, pro-inflamatuvar araçların oluşumunu ve etkisini yok edebilen ya da aşağı çekebilene ve çözülmeyi ilerleten endojen "stop sinyali" olarak düşünülmektedir (50).

LX'ler inflamasyon bölgelerine ve reperfüzyon hasarının olduğu organlara nötrofil girişini kontrol ederek (yeni nötrofillerin girişini geciktirme yoluyla), makrofaj toplanmasını ve makrofajlar tarafından apoptotik nötrofillerin fagositozunu ilerleterek inflamasyonun çözümlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadırlar ve aktif olarak çözülmeyi ilerletme yeteneğine sahip oldukları için önemli görülmektedirler (40, 42, 51, 52). Anti-inflamasyon, ön çözülme ve immunomodülasyon etkileri yanında LX'lerin hücre proliferasyonunu da azalttığı gösterilmiştir (48). LX'ler uyarılmaya yanıtta hızlıca üretilirler, lokal olarak etki ederler ve metabolik enzimlerce hızlıca inaktive edilirler. LX'lerin inaktivasyonu için majör yol monositlerden 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaz (15-PGDH) yoluyla LX'lerin 15-oxo-LX'lere dönüşmesidir (51). LXA4 ve analogları merkezi tetraen grubu nedeniyle asit ve ışıktaki kimyasal olarak kararsızdırlar (53). Ayrıca vasküler permeabiliteyi de azaltan LX'ler kanda, kemik iliğinde ve tonsilde belirlenmiştir (40, 41, 52). İnflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ve göçünü düzenleyebilen LX'lerin güçlü anti-inflamatuvar, ön çözülme ve potansiyel antifibrotik özelliklerinin değeri son zamanlarda anlaşılmıştır (7).

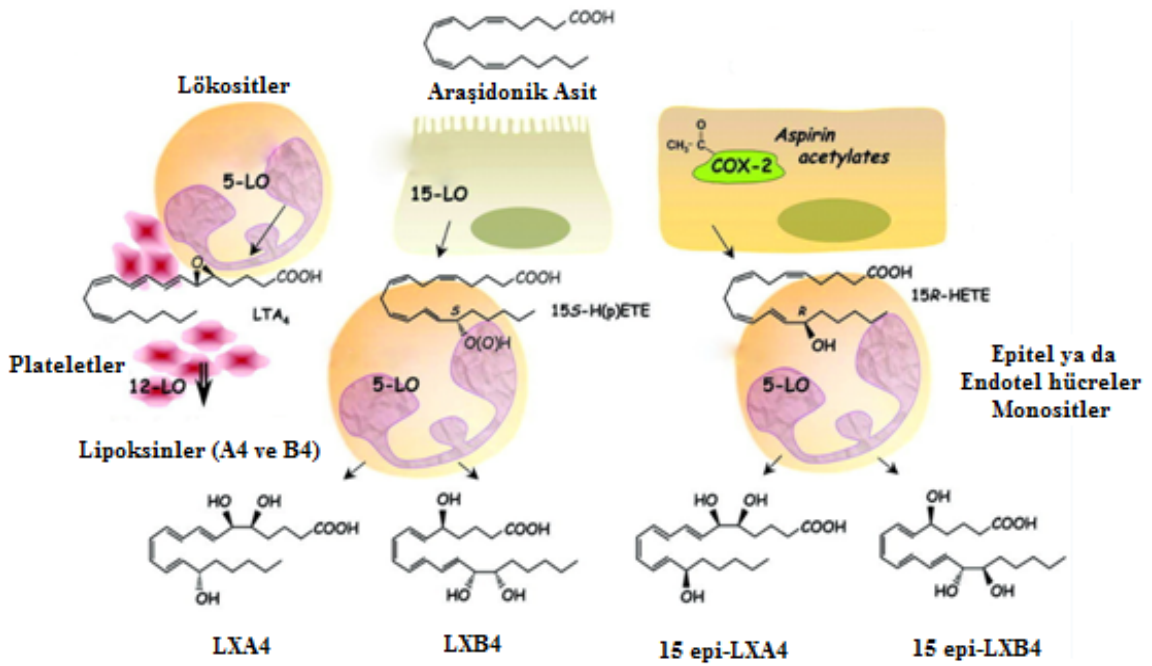
LX'ler pro ve anti-inflamatuvar sitokinlerin dengesini düzenleyebilir, sitokinler aracılı yaralanmayı inhibe edebilir (48, 49). Proinflamatuvar sitokinler (örneğin, GM-CSF, IL-3) ve TGF- β , LX'lerin oluşumu için merkez olan 5-lipoksijenaz transkriptlerini

düzenler. Kararlı LX analoglarının nanomolar konsantrasyonlarda nötrofiller, monositler ve lenfositlerdeki L-selektin ifadesini baskılayarak göçü inhibe ettiği gösterilmektedir. Alternatif olarak, LX'ler ve kararlı LX analogları monosit kemotaksisini uyarmaktadır. LX'ler ayrıca, fare dalak dendritik hücrelerinde IL-12 üretimini ve göçünü inhibe ederler (51). LX'ler peroksinitrit üretimini inhibe eder, NF- κ B birikmesini azaltırlar, endotelial nitrik oksid üretimini uyarırlar, VEGF-indüklü endotelial hücre göçünü ve anjiyogenezisi inhibe ederler, lökotrien salgısını ve etkisini inhibe ederler (54).

2.5.2. Lipoksinlerin Biyosentezi

İnsan dokularında, lipoksin (LX) oluşumu, inflamasyon esnasında araşidonik asitten transsellüler biyosentez yoluyla meydana gelmektedir (8, 53, 55). Doğal olarak ortaya çıkan Lipoksin A4 (LXA4) ve lipoksin B4 (LXB4) ve aspirin tetikleyici lipoksin (ATL) olan 15-epimeric lipoxin A4 ve 15-epimeric lipoksin B4, lipoksijenaz enzimlerinin etkisiyle araşidonik asitten iki ardışık oksijenasyonla biyosentezlenmektedir (41, 42, 53, 56). LXA4 ve onun pozisyonel izomeri LXB4 memelilerde oluşan ana lipoksin türleridir. İnsan hücre ve dokularında iki ana lipoksijenaz aracılı lipoksin biyosentez yolağı vardır. Bunlardan birincisi; 15-LO içeren epitel hücreleri ve monositler ile 5-LO içeren lökositler arasındaki etkileşimlerle araşidonik asitin arda arda lipoksijenasyonunu içermektedir (7). Bunun için ilk olarak, 15-LO etkisi ile araşidonik asitin C-15 pozisyonuna moleküler oksijenin katılması ile lökositlerde 5-LO için substrat olan 15-HPETE (15-Hydroperoxyicosatetraenoic acid) meydana gelir. Bu molekül hidrolaz ile hızlıca ya LXA4 ya da LXB4'e dönüşür (51, 57). Ayrıca LX biyosentezinin diğer bir kaynağında ise insan nötrofillerinin membranlarından 15-HETE (15-hydroxyeicosatetraenoic acid)'nin inositol-içeren fosfolipitlere esterifikasyonu gerçekleşmektedir, daha sonra ise lipoksine transforme olacak şekilde 15-HETE'ler serbestleşmektedir (7, 57). Bu yolağın keşfi, LX biyosentezi öncüllerinin inflamatuvar hücre zarlarında depolanabildiğini ve hastalık veya konak savunması esnasında serbest bırakıldığı görüşünü desteklemektedir (7). İkinci yolak ise, kan damarlarında 5-LO içeren nötrofiller ile 12-LO içeren trombositlerin birbirleriyle etkileşimini kapsamaktadır (45). Trombositler tek başlarına lipoksin üretmezler. Fakat nötrofillere bağlandıktan sonra aktive olarak, damar içinde lipoksinlerin majör bir kaynağı haline gelirler. Plateletlerin nötrofillere bağlanmasıyla

nötrofillerdeki 5-LO epoksid ürünü LTA₄ (leukotriene A₄), 12-LO'nun LX-sentetaz aktivitesi ile ya LXA₄'e ya da LXB₄'e dönüşür (7). LX üretimi için üçüncü majör yolak ATL yolağıdır (51). COX-2 ifade eden hücreler (vasküler endotel hücreler, epitel hücreler, makrofajlar, nötrofiller gibi) carbon-15 epimeric LX'lerin endojen oluşumunu tetikleyen aspirinin etkisiyle ATL'leri üretebilirler (7). Aspirin tarafından asetil radikali katıldığında, COX-2 enzimatik olarak inaktive olur ve PG ara ürünün yerine araşidonik asitten 15R-HETE üretecek şekilde katalitik aktivitesini değiştirir. 15R-HETE, 5-LO aracılığıyla 5,6-epoksitetraen'e dönüştürülür (Şekil 2.2). Bu da, 15-epi-LXA₄ ve 15-epi-LXB₄'ün her ikisinin oluşumuna neden olur (51).



Şekil 2.2. Lipoksin Biyosentezi (58).

2.5.3. Lipoksin A4

1984'te Serhan ve arkadaşları, insan lökositleri ile 15L-hydroperoxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid (15-HPETE)'i inkübe ederek LXA₄ ve LXB₄'ü keşfetmişlerdir (45, 59). LXA₄ memeli hücreleri tarafından üretilen ana LX'lerden biridir (60). LXA₄ ve metabolik olarak kararlı analogları nötrofillerin toplanmasını inhibe eder, vasküler endotel hücrelere ve epitel hücrelerine karşı kemotaksisi, adhezyonu ve transmigasyonu azaltır, apoptotik polimorfonükleer nötrofillerin makrofajlarca temizlenmesini ve alınmasını uyararak ve monosit aktivasyonunu kapsayan çeşitli

süreçlere aracılık ederek inflamatuvar yanıtı önlemektedir (43, 56, 61). Lökotrien fonksiyonunu, doğal öldürücü hücre fonksiyonunu, lökosit göçünü, TNF indüklü kemokinlerin üretimini, NF-κB translokasyonunu, kemokin reseptörleri ve adhezyon molekülerinin ifadesini ve patojen tetikli IL-12 üretimini inhibe ederler (62). LXA4 inflamasyonun çözülmesinde önemli bir rol oynar ve inflamasyon bölgesinden lökositlerin ve yıkıntıların çıkarılmasını düzenlemektedir (63). LXA4 dendritik hücre ve T hücreler tarafından üretilen proinflamatuvar araçların serbest bırakılmasını aşağı çeker (41). IL-1β sitokini; IL-6, IL-8 ve MMP-1, 3'ün sentezini indükler. LXA4 ise IL-6 ve IL-8 sentezini azaltarak IL-1β yanıtını inhibe eder (60). Ek olarak, LXA4, mezengial hücrelerdeki PDGF indüklü fibrozis ilişkili gen ifadesini yok edebilir (7). LXA4, ödem, nötrofil infiltrasyonu ve vasküler permabilite, NF-κB'nin DNA bağlama aktivitesi üzerinde inhibitör etkiler sergiler. NF-κB'nin DNA bağlama aktivitesini aşağı çekmesinden dolayı güçlü anti-inflamatuvar ve anti-proliferatif etki göstermekte ve LXA4 oluşumu bloke edildiği zaman NF-κB artmaktadır (63). Lipoksinlerin anti-inflamatuvar etkileri NF-κB'nin inhibisyonu dışında muhtemelen MAPK, AP-1'in inhibisyonu yoluyla da olmaktadır (42). Lipoksinler nötrofillere yönelik kemotaksisin, adhezyonun, migrasyonun, süperoksit üretiminin, MAC1 ifadesi ve IP3 oluşumunun inhibisyonunu içeren sayısız anti-inflamatuvar biyoaktivitelere sahiptir. Ayrıca monositler, eozinofiller, doğal öldürücü hücreler, dendritik hücreler ve myeloid progenitörleri içeren ek lökosit popülasyonlarının yanıtlarını baskırlar (46). LXA4 kaspaz-3'ün aktivitesini arttırarak apoptozisi güçlendirir. Lipoksinlerin, yara iyileşmesini güçlendirdiğini destekleyen kanıtlar mevcuttur (63). Deneysel sistemlerde, LXA4'ün granülosit-makrofaj koloni-stimüle edici faktör (GM-CSF)'ün ifadesini inhibe ettiği gösterilmiştir (42).

2.5.3.1. LXA4'ün Hastalıklardaki Etkisi

LXA4 ve analogları; vasküler hasar, böbrek hastalığı, periodontal hastalık, astım, kolit, artrit, kistik fibrozis, tüberküloz ve toksoplazmozisi kapsayan pek çok inflamatuvar bozuklukta anti-inflamatuvar özelliğe sahip olduğu gösterilmiş eikosanoid araçlardır (41, 62). LXA4 kültüre edilmiş hücrelerde ve primer insan mezengial hücrelerdeki reseptör tirozin kinaz aktivitesini düzenler. Böbrek ve diğer dokulardaki renal epitelyal bütünlüğü devam ettirdiğine dair de kanıtlar vardır. LX'lerin, iskemi-reperfüzyon hasarı ve akut glomerulonefrit kaynaklı renal hasara karşı koruyucu etkisi vardır. Renal

iskemik reperfüzyonda, bir sentetik LX analogunun polimorfonükleer hücre akışını inhibe ettiği, kemokin ve sitokin yanıtını azalttığı, renal fonksiyon ve morfolojiyi koruduğu belirtilmiştir (47). Glomerulonefritte, LX'ler proteinüriyi, glomerular inflamasyonu ve mezengial hücre proliferasyonunu azaltmaktadır (47, 48). LXA4'ün ifadesi, post akut streptokokkal glomerilomefritisli çocuklarda yüksektir. LX'lerin mikrobiyal enfeksiyon sırasındaki proinflamatuvar yanıtı da düzenleyerek immün sistemi doğrudan modüle ettiğini gösteren kanıtlar vardır. *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunda LXA4, IL-12 üretimini inhibe ederek *T. gondii*'ye karşı immün yanıtı düzenlemektedir. LXA4, ALX-FPR2 bağımlı bir tarzda IgM ve IgG üretimini azaltarak kazanılmış immüniteyi etkilemektedir ve bellek B hücrelerin antikor üretimini ve proliferasyonunu inhibe etmektedir (48, 51). Çeşitli çalışmalarda, LXA4 tedavisini takiben NF-κB ile sürdürülen sürecin ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir. *Salmonella typhimurium* indüklü kolit modelinde, LXA4 analogu NF-κB yolağının inhibisyonu yoluyla proinflamatuvar gen ifadesinin aşağı çekilmesine aracılık etmektedir (51).

Kistik fibrozis ve periodontiti içeren inflamasyonun çeşitli hayvan modellerinde lipoksinler, lökosit yuvarlanmasını ve infiltrasyonunu, nötrofil aracılı doku hasarını inhibe eder ve konak savunmasını artırır (46). Shimizu ve arkadaşları, LXA4'ün, havayolu epitel hücrelerinde, TNF-α indüklü IL-8 salınımını inhibe ettiğini göstermiştir, bu sonuçlar üst solunum yolundaki inflamasyonun çözülmesinde LXA4'ün rolünün olabileceğini göstermektedir (64). Walker ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, sıçanlarda oluşturulan sepsisin çekum ligasyonu modelinde, LXA4 uygulaması plazmadaki IL-6, MCP (monocyte chemotactic protein)-1 ve IL-10 seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca, LXA4 uygulaması, makrofajların toplanmasını fagositik yeteneklerini etkilemeden güçlendirerek kandaki bakteriyel yükü azaltmaktadır. Bu sonuçlar, LXA4'ün sistemik inflamasyonu ve NF-κB aktivasyonunu azalttığı görüşünü de desteklemektedir (48, 65).

Xu ve arkadaşlarının çalışmaları, endometriyoz oluşturulan farelerde LXA4 tedavisinin VEGF ve MMP-9 ile indüklenmiş anjiyogenezi inhibe ederek endometriyoz gelişimini bloke ettiğini göstermektedir (8). Motohashi ve arkadaşlarının çalışmalarında ise, deneysel sıçan endometriyoz dokularında ve ektopik endometriyozlu hastaların dokularında lipoksin reseptörlerinin normal dokulara kıyasla yüksek seviyede ifade edildiği belirtilmektedir (66). Medeiros ve arkadaşları, sıçanlarda endotoksin-indüklü üveit modelinde LXA4'ün anti-inflamatuvar etkilerini değerlendirmiştir. Topikal olarak

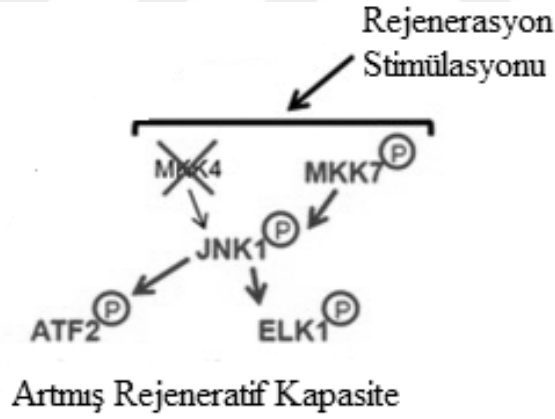
uygulanan LXA4'ün gözün anterior kısmında inflamatuvar hücrelerin sayısını azalttığı ve buna ek olarak, LPS-indüklü IL-1, TNF- α , PGE2 üretimini ve VEGF ifadesini azalttığı gösterilmiştir. LXA4 ile tedavi edilen gözlerde ayrıca NF- κ B ve c-Jun'un aktivasyonunun azalmış olduğu da bulunmuştur (67). Bannenber ve arkadaşları, zymosan A ile indüklenmiş peritonitis oluşturulan farelere lipoksin ve analoglarını uygulamıştır. Bunun sonucunda akut inflamatuvar hücre toplanmasını inhibe etmede intravenöz, oral ve topikal uygulamaların benzer derecede etkili olabildiği belirlenmiştir (53).

Serhan ve arkadaşlarının çalışmalarına göre, LXA4 stabil analoglarının, *in vivo* ve *in vitro* olarak LXA4'ün etkilerini ve terapötik potansiyelini değerlendirmede kullanışlı araçlar olabileceği vurgulanmaktadır (68, 69). Guilfor'un derlemesinde ise, lipoksin analoglarının intravenöz, intraperitoneal, topikal ve oral olarak nanogram dozunda uygulandığında dahi etkili olduğu vurgulanmıştır (70).

Lipoksin seviyelerindeki değişimler çeşitli insan hastalıklarının patofizyolojisi ile nedensel olarak ilişkili olabilmektedir (71). Pouliot ve arkadaşlarının çalışmasında, LXA4 ve analoglarının, periodontal hastalık (örneğin; *P. gingivalis* ile uyarılmış) gibi inflamatuvar koşullarda lökosit toplanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (72). Yapılan deneylerde LX ve analoglarının, inflamasyon esnasında pikogramdan nanogram oranlarına kadar üretildiği ve bununla birlikte pek çok hastalıkta (solunum yolu inflamasyonu, astım, artrit, kardiyovasküler hastalıklar, gastrointestinal hastalık, periodontal hastalık, böbrek hastalıkları, graft-vs.-host hastalığı ve kontrol edilemeyen inflamasyonun olduğu diğer hastalıklar) üretimlerinin değişebileceği gözlenmiştir (46, 73). Son zamanlarda yapılan çalışma sonuçlarına göre ise; diğer inflamatuvar akciğer durumlarına sahip hastalarla karşılaştırıldığında kistik fibrozisli hastalarda hava yolundaki LXA4 konsantrasyonlarının anlamlı ölçüde baskılandığı rapor edilmiştir (74). Diğer taraftan ise, LXA4 üretimi juvenil periodontitis ve hafif astımda artmaktadır (72, 75). LX'ler, akut böbrek iskemisini, akciğer hasarını, hepatik hasarı, myokardial enfarksiyonu da içeren pek çok akut inflamatuvar bozuklukta güçlü anti-inflamatuvar özelliklere sahiptir. LX'lerin yetersizliği bu kronik hastalıklarda önemli bir aracı olduğunu desteklemektedir (48).

2.6. Karaciğer Rejenerasyonunda *MKK4*, *MKK7*, *ATF2* ve *TGF-β1* Gen İfadelerinin Önemi

Karaciğer rejenerasyonu, doku yaralanmasından sonra karaciğer kütlesinin eski haline dönmesine izin veren kompleks ve ardarda oluşan bir süreçtir. Bu süreç proliferatif ve hepatoprotektif sinyal kaskadlarını düzenleyen çoklu regülatör yollar tarafından kontrol edilmektedir (76). 1990’larda karaciğer rejenerasyonunun kontrolünde test edilen genlerle ilgili bilgilerin birikmesi ile birlikte pek çok hipotez ve teoriler üretilmiştir. Transgenik ve knock-out teknolojilerin gelişmesi ile birlikte karaciğer rejenerasyonu esnasında ilgili genlerin ifadelerindeki değişiklikler ve bu genlerin önemi test edilmiştir (77). 2013 yılında ise Wuestefeld ve arkadaşları çalışmalarının sonuçlarına göre *MKK4*, *MKK7* ve *ATF2* genlerini karaciğer hücre yenilenmesinde kilit öneme sahip genler olarak tanımlamışlardır. Çalışmalarında, *MKK7*, *ATF2* ve *ELK1* transkripsiyon faktörlerinin uyarımının *MKK4* inhibisyonuna bağlı olarak hepatosit rejenerasyonunda etkin olduğunu saptamışlardır. Karaciğer fibrozisi esnasında *TGF-β1* geninin karaciğer hücrelerince ifade edilme düzeyi arttığından dolayı, bu çalışmada pozitif bir kontrol verisi olarak kullanılmıştır (78).



Şekil 2.3. *MKK4* sessizleştirilmesi yapılan sinyal iletimindeki değişiklikleri gösteren şematik yolak (78).

2.6.1. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4 (*MKK4*) Geni

MAP kinazlar, “Mitogen-activated protein kinases” süper ailesinde yer alırlar. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında önemli rol oynar. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenez, çoğalma, farklılaşma ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır

(79). Extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 kinazlar ve c-Jun NH2- terminal kinaz (JNK) olmak üzere en az üç farklı MAPK (mitogen-activated protein kinase) grubu tanımlanmıştır. JNK ve p38 yolları; inflamatuvar sitokinler, radyasyon, ısı şoku, osmotik dengesizlik, DNA hasarı, bakterial ürün lipopolisakkarid gibi hücresel strese yanıtta aktive olur ve stresle aktive olan protein kinaz (Stress Activated Protein Kinase; SAPK) sinyal yolağı olarak da bilinirler (80). Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre göçü, apoptoz ve hücre iskeletinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (81). Tüm MAPK ailesi üyeleri, MAPK kinaz (MKK) tarafından katalizlenen, threonin ve tirozin rezidülerinden fosforillenerek aktive olur (80). *MKK4* (mitogen-activated protein kinase kinase 4; Map2k4) geni 17 nolu kromozomun p11.2 bölgesinde yer almaktadır (82). İlk kez 1994'te farede klonlanmıştır. Fare *MKK4* gen ifadesi daha çok merkezi sinir sisteminin çoğunda, karaciğerde ve gelişimin erken aşamalarında timusta belirlenmiştir (80). *MKK4*, bir çift spesifik protein kinazı temsil eder (78, 80). p38 ve JNK yolları ile ilişkilidir. Bu yollardan JNK sinyalinin proliferatif, p38 sinyalinin ise antiproliferatif olarak etki ettiğine inanılmaktadır (78). *MKK4*, strese ve proinflamatuvar sitokinlere karşı hücresel yanıtta fosforile olur ve daha sonra JNK'yı fosforiller ve aktive eder (80). JNK Thr-Pro-Tyr şeklinde ikili fosforilasyon motifi içerir ve JNK aktivasyonu için tirozin ve treoninin her ikisinin de fosforilasyonu gerekmektedir. *In vitro* ortamda yapılan son çalışmalar tirozinin *MKK4* tarafından, treoninin ise *MKK7* tarafından fosforile edildiğini göstermektedir (81). JNK'nın fosforile edilerek aktive edilmesi ise ATF2 (activating transcription factor 2) ve c-Jun gibi transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna neden olur. Böylelikle strese bağlı hücresel yanıt oluşturulmuş olur (80) (Şekil 2.3). *MKK4* karaciğer organogenezinde ve rejenerasyonunda bir master düzenleyicidir. *MKK4* baskılanması fare modellerinde hepatositlerin rejeneratif kapasitesini artırmaktadır. Hepatositlerdeki *MKK4* baskılanmasının, karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulmuş kronik karaciğer hasarından sonra fibrozis gelişimini azalttığı görülmüştür. Kararlı RNA interferans aracılı *MKK4* sessizleştirilmiş hepatositlerde karaciğer rejenerasyonu esnasında hepatositlerin hücre döngüsüne girişinin ve progresyonunun daha hızlı olduğu, bunun da AP1 transcription factor ATF2 ve Ets factor ELK1'in JNK-1 aracılı aktivasyonuna ve *MKK7*'nin artmasına bağlı olduğu gösterilmiştir (78).

2.6.2. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7 (MKK7) Geni

MKK7 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7; Map2k7) ilk kez 1997'de tanımlanmıştır (80). *MKK7*, stres ve inflamatuvar yanıtı primer olarak düzenleyen JNK yolağının spesifik bir aktivatörü olarak fonksiyon görür (80, 83). Karaciğerdeki *MKK7* mRNA seviyesi *MKK4*'ten özellikle daha düşüktür. *MKK4* ve *MKK7* katalitik aktiviteleri arasındaki ana fark; *MKK7*, JNK'ların spesifik bir aktivatörü iken, *MKK4* JNK ve p38'in her ikisini de aktive etme yeteneğine sahiptir. Bu bilgi *MKK4*'ün en iyi JNK aktivasyonu için gerekli olduğunu gösterirken, *MKK7*'nin proinflamatuvar sitokinler tarafından JNK aktivasyonunun stimülasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (84). Fonksiyonel genetik verilere göre; *MKK7*'nin uyarılması ve AP1 transcription factor ATF2'nin ve Ets factor ELK-1'in bir JNK1-bağımlı aktivasyonu hepatositlerin artmış rejeneratif kapasitesi için çok önemlidir (78).

2.6.3. Transforming Growth Factor Beta-1 (TGF-β1) Geni

TGF-β (Transforming Growth Factor Beta) ilk kez 1978'de izole edilmiştir. 112 amino asitten oluşan bir polipeptiddir ve 19. kromozomun uzun kolunda yerleşmiş olan bir gen tarafından kodlanmaktadır (85). TGF-β sağlıklı karaciğerde ve pek çok karaciğer hastalığında hücre gelişimi ve proliferasyonun regülasyonunda önemli bir role sahiptir (86). Memelilerde TGF-β üç majör izoforma sahiptir (TGF-β1, TGF-β2, and TGF-β3). TGF-β1 karaciğer fibrozisinde anahtar rol oynayan multifonksiyonel bir sitokindir ve fibrozisin gelişmesi için HSH ve myofibroblast aktivasyonunda büyük rol oynar. Genellikle monositler, makrofajlar ve HSH'ler tarafından üretilir (87). Normal karaciğer genellikle TGF-β1'in ifadesini çok az miktarda içerirken, yaralanmayı takiben, TGF-β1, HSH ve Kupffer hücreleri gibi nonparankimal hücreler tarafından yükseltilmektedir (86). Ekstrasellüler matriks üretimini stimüle eder, hepatositlerin proliferasyonunu potansiyel olarak baskılar ve apoptozise aracılık eder (87). TGF-β1 hasarlanmış doku ve organların rejenerasyonunda ve fibrozise benzer histopatolojik lezyonların gelişmesinde bir rol oynar. *In vitro* ve *in vivo* da gösterildiği gibi, TGF-β1 genellikle HSH, fibroblastlar ve osteoblastlar gibi mezenşimal kökenli hücre tiplerinin proliferasyonunu stimüle eder. Tamir sürecinde TGF-β1 yaralanmış bölgeye fibroblast göçünü stimüle eder ve fibronektin, kollajen ve proteoglikanlar gibi ESM proteinlerinin sentezini stimüle eder (85). TGF-β1, ESM'de bir inaktif formda depolanır ve

MMP'lerin ve inflamatuvar reaksiyonların etkisi ile ESM'den serbest bırakılır. TGF- β 1 ayrıca fibronektin EDA'nın üretimini arttırmak için sinüzoidal endotelial hücreler üzerinde de etkilidir. Fibroziste çeşitli genlerin transkripsiyonu TGF- β 1 tarafından arttırılır. Kollajen (COL1A1, COL3A1, COL5A2, COL6A1, COL6A3), CTGF, plasminogen activator inhibitor-type 1 (SERPINE1) ve TIMP1 genlerinin ifadesinin artması doğrudan TGF- β sinyal aktivasyonu ile ilişkilidir (87).

2.6.4. Activating Transcription Factor 2 (ATF2) Geni

Activating transcription factor 2 (ATF2) DNA bağlayan proteinlerin lösün fermuar ailesinin bir transkripsiyon faktörüdür. 1991 yılında Ozawa ve arkadaşları tarafından insan kromozomunun 2q32 bölgesinde yerleştiği keşfedilmiştir. ATF2 proteini 505 amino asid içermektedir. ATF2 proteini hücre proliferasyonunda, apoptozis, inflamasyon ve kanserde önemli role sahiptir. UV ışığı, ısı şoku, osmotik stres ve oksidatif stresi de içeren pek çok çevresel baskılayıcı ATF2'yi aktive eder. İnfiltre olmuş makrofajlarda yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir. ATF2 proteini sitoplazmada bir homodimer olarak bulunur fakat nükleusta Jun ile bir heterodimer olarak tutulur. Proinflamatuvar sinyaller hormonal ve hücrel mekanizmalarla spesifik olarak aktive edilebilir (88). Stimülasyondan sonra ATF2, stresle aktive olan protein kinazlar JNK ya da p38 tarafından threonin rezidüleri 69/71'in fosforilasyonu yoluyla aktive olur. ATF2 ayrıca büyüme faktörleri tarafından Ras-MEK-ERK yolağı aracılığıyla da aktive olur (89).

2.7. Fibrozis Araştırmalarında Kullanılan Deney Hayvan Modelleri

Hepatik fibrozisin hayvan modelleri; reperfüzyon hasarının klinik kullanımlara uygulanması, fibrozisin ilerlemesi, geri dönüşümünün çalışılması ve yeni antifibrotik terapilerin geliştirilmesi amacıyla yapılan deneysel araştırmalarda öneme sahiptir (36, 90). Uygun bir hayvan modeli için gerekli faktörler; kolay uygulanabilirlik, yeterli derecede fibrozis oluşumu, sınırlı indüklenme süresi, tekrarlanabilirlik ve çalışan için minimum tehlike olarak sıralanabilir (90). Fare modelleri terapötik ajanların genellikle daha düşük miktarlarını gerektirmesi bakımından daha uygundur (36). Diyet, ilaçlar (thioacetamide (TAA), CCl₄ ve dimethylnitrosamine (DMN) gibi), alkol gibi hepatotoksik ajanlar, safra kanalı bağlanması ve immünolojik aktivasyon tarafından indüklenen karaciğer fibrozis için çeşitli modeller sunulmuştur (90). Safra kanalı

ligasyonu ve toksik ajanlar fibrozisin ilerlemesinin ve çözümünün gösterilmesinde kullanılan onaylanmış modellerdir (33, 36).

2.7.1. TAA ile İndüklenmiş Karaciğer Fibrozis Modeli

TAA; hepatotoksitesisi 1948'den beri bilinen ve thiono-sülfür içeren bir bileşiktir (91, 92). Bir fungusit, organik çözücü, lastik sertleşmesini hızlandırıcı, motor yağı stabilize edici gibi farklı kullanım alanları bulunmaktadır (92). TAA, reaktif metabolitleri ile deney hayvanlarında akut sentrilobüler nekroza neden olabilen, hepatotoksitesisi iyi bilinen bir maddedir (93). TAA'nın toksisitesinin ortaya çıkması için metabolik aktivasyonu gerekmektedir. TAA'nın aktivasyonu iki oksidasyon yoluyla ortaya çıkar (91). TAA, özellikle FAD monooksijenazlar ve majör bir ilaç metabolize edici enzim olduğu bilinen CYP2E1 tarafından karaciğerde önce TAA-sülfoksida (TASO) metabolize olur. TASO da daha ileri metabolizmalarla TAA-disülfoksida (TASO2) dönüşür (91-93). Metabolik aktivasyon sonucu oluşan reaktif metabolitler üretilir üretilmez karaciğerdeki hücrel makromoleküllere kovalent olarak bağlanırlar (92, 93). Bunun sonucunda hücrel oksidatif stres artar (93). ROS üretimini lipid peroksidasyonu, glutatyon tükenmesi ve SH-tiyol gruplarında azalma takip eder. Hücre içi depolardan kalsiyum mobilizasyonu indüklenir. ROS ve kalsiyumun her ikisinin hücre hasarı ya da proliferasyonla ilişkili çoklu mekanizmaları aktive ettiği belirlenmiştir. Artmış ROS oluşumu ve kalsiyum homeostazının bozulması, mitokondriyal iç membranının permeabilitesinde bir artışı indükleyebilen faktörlerdir ve mitokondriyal solunumu inhibe ederler (92). Hepatotoksin TAA, karaciğer fibrojenezin altında yatan mekanizmayı incelemek amacıyla yapılan birçok çalışmada uygulanmış, iyi tanımlanmış modellerden biridir. Diğer deneysel yaklaşımlarla kıyaslandığında, TAA-indüklü karaciğer fibrozis, etkilenmiş insanın karaciğerlerindeki aynı metabolik ve histolojik değişikliklerin çoğunu göstermesi nedeniyle alkolik karaciğer fibrojenez en yakın model olarak görülmektedir. TAA oral olarak, intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon yoluyla ya da kombine bir yaklaşımla uygulanabilmektedir (5).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ve Histoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, deney hayvanları etik kurulunun 2014/A-15 sayılı onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Ek-1).

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 5-6 haftalık, ortalama 18-20 gr ağırlıklarında 40 adet erkek BALB/c fare kullanıldı. Deneyde kullanılan fareler, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edildi. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23 °C) bulunduruldu ve standart fare yemi ile beslendi.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

Deneyde kullanılan aletler alfabetik sıraya göre, marka, model ve üretildikleri ülkelere göre Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

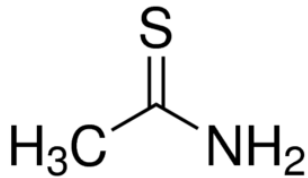
Tablo 3.1. Deneyde Kullanılan Aletler

Cihaz	Marka / Model / Ülke
Buzdolabı	Arçelik / 4252 A+ / Türkiye
Derin dondurucu (-80)	Panasonic /MDF-U5386S / Japan
Elektroforez cihazı	Bio-Rad / Power Pac Basic / Singapore
ELISA Okuyucu	Bio-Rad
Etüv	Nüve / EN500 / Türkiye
Flow Sitometri	BD/ FACSCanto / USA
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı	QIAGEN / Rotor-Gene Q / Germany
Hassas terazi	Sartorius / BP 110 S / Germany
Isı bloğu	Biosan /Bio TDB-100 /Latvia
Işık Mikroskobu	Olympus / CH2 / Japan
Mikrodalga Fırın	Beko / MD-1500 / Çin
Mikropipet seti (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf / Germany
PHmetre	HANNA / HI 98127 / Romania
RNA Spektrofotometre	Maestro/ MN-913/ Taiwan
Santrifüj	Hettich Zentrifugen / D78532 / Germany
Steril Hava Kabini	Heraeus / HSP 12 / Germany
Thermal Cycler	Corbett Research / CG1-96 / Australia
Vorteks	BIOSAN / FV-2400 / Latvia

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. Thioacetamide (TAA)

Açık Formülü:



Bilinen adları : Ethanethioamide

Kapalı formülü : CH₃CSNH₂

Molekül ağırlığı : 75.13

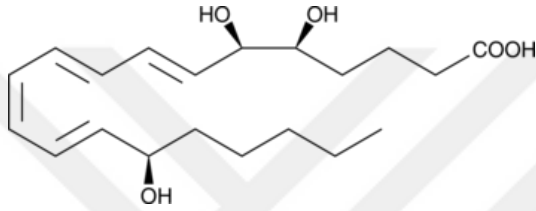
Safılığı : ≥99.0%

CAS No : 62-55-5

TAA, her fare için 100 mg/kg oranında olacak şekilde fosfat tampon çözeltisi (150mM NaCl, 30mM KCl, 15mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4) (PBS-[Sigma-Aldrich]) içerisinde hazırlandı (Lot:A0321068 CAS:62-55-5). Bu oranın belirlenmesinde bu etken madde ile ilgili daha önce yapılan çalışmada kullanılan konsantrasyon referans olarak alındı (90).

2. Lipoxin A4 (LXA4)

Açık Formülü:



Bilinen adları : AT-Lipoxin A₄, 15-*epi* Lipoxin A₄, 15(R)-LXA₄

Kapalı formülü : C₂₀H₃₂O₅

Molekül ağırlığı : 352.5

Safılığı : ≥95%

CAS No: 171030-11-8

LXA₄, her fare için 0,5 µg/100ul dozunda olacak şekilde PBS içerisinde hazırlandı (Batch:0442259-27 Item:90415, Cayman Chemical Company, USA). LXA₄ dozunun belirlenmesinde bu etken madde ile ilgili daha önce yapılan çalışmalar referans olarak alındı (8).

3. Agaroz (Lonza)
4. Amonyum klorür (NH₄Cl; FW: 53,491; J.T. Baker)
5. Borik asit (H₃BO₃; FW: 61.83 ; Sigma)
6. EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈. 2H₂O; FW: 372.24; Sigma)
7. Etanol (C₂H₆O; Merck)
8. Etidyum Bromür (Bio basic inc.)
9. Formaldehit (CH₂O; Merck)
10. Phosphate-buffered saline (Sigma)

11. Tripan mavi boyası (Gibco)
12. Tris Baz ($C_4H_{11}NO_3$; FW: 121.14 ; Sigma)

3.2. Metot

3.2.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

Yapılan çalışmada deney hayvanları toplam 4 gruba gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu (n=10): Bu gruba herhangi bir uygulama yapılmadı.

LXA4 Grubu (n=10): 0.5 μ g/100ul dozunda LXA4 iki hafta boyunca haftada 2 kez i.p. olarak uygulandı. LXA4'ün son enjeksiyonundan sonraki gün deney sonlandırıldı.

TAA Grubu (n=10): BALB/c türü erkek deney farelerine PBS içerisinde çözdürülen TAA, her hayvana 100 mg/kg konsantrasyonda TAA olacak şekilde 12 hafta süresince haftada 3 gün i.p. olarak uygulandı. 12. haftanın sonunda hayvanlar sakrifiye edildi.

TAA+LXA4 Grubu (n=10): 12 hafta TAA uygulanan farelere 0.5 μ g/100ul dozunda LXA4, iki hafta boyunca haftada 2 kez i.p. olarak uygulandı. LXA4'n son enjeksiyonundan sonraki gün deney sonlandırıldı.

3.2.2. Ağırlık lm

Deney süresi boyunca, enjeksiyon günlerinde (haftada 3 kez) ve deney sonunda tüm farelerin vücut ağırlıkları tartıldı. Ayrıca deney süresi sonunda karaciğer ağırlıkları tartıldı.

3.2.3. Doku ve Kan rneklerinin çıkarılması

TAA grubu için 12. haftada kesim yapılmak üzere fareler i.p. 3-5 mg/kg Diazepam+50-150 mg/kg Ketamin ile anesteziye edildi. Daha sonra steril şartlarda orta hat insizyonuyla batınları açıldı. Kalp, akciğer, böbrek, ince bağırsak, pankreas, dalak, testis, karaciğer dokuları ve vena kavadan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örnekleri -80 $^{\circ}$ C'da saklandı. Hassas terazi ile karaciğer ağırlıkları ölçülerek kaydedildi.

3.2.4. Biyokimyasal Analizler

Karaciğer fonksiyon testleri olan AST (aspartat aminotransferaz), ALT (serum alanin aminotransferaz) ve ALP (alkalen fosfataz) düzeyleri serum örneklerinden kantitatif testler ile otomatize kapalı sistemde (Abbot Architect C8000) çalışıldı.

3.2.5. Histopatolojik Analiz Yöntemleri

Histolojik incelemeler İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Histolojik hasarın belirlenmesi ve düzeyinin saptanması amacıyla her gruptaki deney hayvanlarının karaciğerleri makroskopik inceleme sonrası %10'luk nötral tamponlu formaldehit (NTF) ile tespit edildi ve rutin doku takip işlemleri sonunda parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan bu parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2145) ile 5 µm. kalınlığında kesitler lam üzerine alınarak Mayer's H&E yöntemi ile boyandı. Bağ ve destek doku oluşumları Gomori'nin tek basamaklı trikrom boyama yöntemi ile gerçekleştirildi. Kesitler kör bir araştırmacı tarafından ışık mikroskopunda (Leica DFC280) incelendi ve görüntü analiz sisteminde (LeicaQWin) görüntülendi. Hasar, inflamasyon düzeyi ve rejenerasyonun sayısal olarak analizi için karaciğer fibrozisinde sıklıkla kullanılan Knodell skorlama sistemi takip edildi. Buna göre değerlendirme ana kriterleri bölük-parçalı nekroz; intralobular dejenerasyon, portal inflamasyon ve fibroz ana başlıkları olarak belirtildi. Bu ana başlıklarda bölük-parçalı nekroz için hiç (0 puan); hafif (1 puan); orta şiddette (3 puan); belirgin (4 puan); orta şiddette ve köprülü nekroz (5 puan), belirgin ve köprü nekrozlu (6 puan), çok loblu nekroz (10 puan) olarak değerlendirildi. İntralobular dejenerasyon ise; hiç (0 puan), hafif (1 puan), orta şiddette (3 puan), belirgin (4 puan) olarak değerlendirildi. Portal inflamasyon; hiç (0 puan), hafif (1 puan), orta (3 puan), belirgin (4 puan) olarak değerlendirildi. Fibroz başlığı ise; hiç (0 puan); portal dağılımlı fibroz (1 puan), köprülü fibroz (3 puan), siroz (4 puan) olarak değerlendirildi. Histolojik puan yukarıda sayılan 4 değerlendirmenin toplamını ifade etmektedir.

3.2.6.Moleküler Analiz Yöntemleri

3.2.6.1. Fare Karaciğer Dokusundan RNA izolasyonu

Total RNA, fare karaciğer dokularından RNeasy® Plus Mini kit (50) (Cat. No. 74134 Lot:148032608) ile izole edildi. Çalışmaya başlamadan önce 1 ml buffer RLT'ye 10 µl β-merkaptoetanol eklendi. Buffer RPE'ye ise 4 volüme etanol (%96-100) eklendi. Moleküler analiz için alınan karaciğer dokusu (20-30 mg) 350-600 µl buffer RLT Plus solüsyonu ile steril petri kaplarında yaklaşık olarak 1 dk içinde iyice homojenize edildi. Homojenatlar 1,5 ml'lik tüplere koyularak yüksek devirde 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant 2 ml'lik koleksiyon tüpleri içindeki spin kolona (gDNA elimination kolon) aktarıldı. 30 sn 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda kolon çıkarılıp atıldı ve koleksiyon tüpündeki sıvılara 600 µl %50 etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. 700 µl'lik karışım spin kolona aktarıldı ve 15 sn 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. 700 µl buffer RW1 kolonlara eklendi ve 15 sn 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası alt kısım atıldı. Kolonlara 500 µl buffer RPE eklendi ve 15 sn 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası alt kısım atıldı ve kolonlara 500 µl buffer RPE eklendi ve 2 dk 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası spin kolon yeni bir koleksiyon tüpüne konuldu. Boş olarak 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alt kısım atıldı ve kolonlar 1,5 ml'lik tüplere yerleştirildi. Kolonlara 30-50 µl RNaz free su eklendi ve 1 dk 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası kolon çıkarılıp atıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları belirlendikten sonra, cDNA'da kullanım için buz üstünde bekletildi. Uzun süreli depolama için ise -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.6.2. RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri

Agaroz bir erlenmeyerin içerisinde tartıldı ve üzerine 1X TAE (Tris-asetat) tamponu eklendi. Solüsyon mikrodalga fırında ısıtılıp çözüldü. Erlenmeyer içerisindeki jel 50-60 °C sıcaklığa düşünce 0,5 µg/mL Etidyum Bromür eklendi ve agaroz jel tankına döküldü. 0,25 µg/µl DNA Ladder (100 bp-3000 bp) ilk kuyucuğa yüklendikten sonra, diğer kuyucuklara Qiagen RNeasy® Plus Mini kit ile karaciğer örneklerinden saflaştırılan 20ng/µl konsantrasyonda 15µl örnek DNA kontaminasyonunu uzaklaştırmak amacıyla 70 °C'de 1 dakika ısıtılarak ve ısıtılmadan 3 µl 6X yükleme boyasından olan karışım yüklendi. Daha sonra RNA, 100 voltta yarım saat süresince

yürütüldü. Jellerin görüntüsü, Kodak Gel Logic 2200 Imaging System jel görüntüleme cihazında elde edildi. 28S ve 18S keskin ribozomal RNA bantlarının elde edildiği ve herhangi bir yıkımın olmadığı RNA'lar cDNA işleminde kullanıldı. Görüntüler KODAK Molecular Imaging programı kullanılarak kaydedildi.

3.2.6.3. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi

Her örnekten 1µl kullanılarak nanodrop ile ölçüldü. Nanodrop ölçümü az miktarda örnek hacmi gerektirdiği için tercih edildi, her ilk ölçümde distile su ile ölçüm alınarak nanodrop kalibrasyonu sağlandı. 260 (nükleik asit) / 280 (protein) > 1,8 ise RNA miktarı yeterliydi. 1,8'den büyük ölçüm RNA kontaminasyonuna işaret ederken, 1,8 den küçük değerler protein kontaminasyonuna işaret etmekteydi. cDNA yapımında ortalama 1µg RNA kullanıldı.

3.2.6.4. Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

Bu çalışma için QIAGEN, RT² HT First Strand Kit (96)(Cat.No.330411)(Lot No. 7480743) kullanıldı. -20°C'de saklanan Buffer GE2 ve BC4 Reverse Transcriptase Mix tüpleri çıkarıldı ve buz üzerinde kısa bir süre erimesi beklendi. Daha sonra Buffer GE2 ve BC4 Reverse Transcriptase Mix hafif vortekslendi. 6 µl Buffer GE2, PZR tüplerine pipetlendi. Üzerine 1 µg RNA eklendi ve tüpler spin yapıldı. Sonrasında tüpler 5 dakika 37 °C sıcaklıkta ısı bloğunda bekletildi. 5 dakika sonra BC4 Reverse Transcriptase Mix'ten 6 µl eklendi ve pipetaj sonrasında tüpler spin yapıldı. PZR tüpleri Thermal cyler cihazına yerleştirildi. Cihaz 42°C'de 15 dakika, 95°C'de 5 dakikaya ayarlandı. Thermal cyler programı bittikten sonra cDNA'lar, gerçek zamanlı PZR için kullanıma hazır oluncaya kadar buz üstünde bekletildi. Uzun süreli depolama için ise -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.6.5. Gerçek Zamalı PZR ile *ATF2*, *MKK4*, *MKK7*, *TGF-β*, *GAPDH*

Gen İfadelerinin Tayini

Bu çalışma için QIAGEN, RT² SYBR Green qPCR Mastermix(8) (Cat.No.330501) (Lot No.7480757) kiti kullanıldı. PZR miksi gen sayısına göre hazırlandı. Her gen için bir 1,5 ml'lik tüp alındı ve gerekli işaretleme yapıldı (*ATF2*, *MKK4*, *MKK7*, *TGF-β*, *GAPDH*). cDNA'lara 91 µl dH₂O eklendi. Hafifçe sallandı ve spin yapıldı. Büyük hacimden küçük hacime doğru pipetleme yapıldı. RT2 SYBR

Green Mastermix'ten bir örnek için 12,5 µl, RNase-free sudan 6,5 µl, RT2 qPCR Primer Assay'den 1 µl tüpün tam ortasına pipetlendi. Hazırlanan gen miksi hafif vortekslendi ve spin yapılarak, ilgili gen tüplerine 20'şer µl olarak dağıtıldı. Daha sonra cDNA 5 µl tüpün tam ortasına pipetlendi. Tüplerin ağzı kapatılarak gerçek zamanlı PZR çarkına yerleştirildi. Çark Rotor Gene cihazına yerleştirilerek çalışma başlatıldı. Gerçek zamanlı PZR koşulları; 95 °C'de 10 dk -1 döngü, 95 °C'de 15 sn-40 döngü, 60 °C'de 1 dk olacak şekilde ayarlandı.

3.2.6.6. Gerçek Zamanlı PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ürünlerinin görüntülenmesi için %2'lik agaroz jeli hazırlandı. 0,25 µg/µl DNA Ladder (100 bp-3000 bp) ilk kuyucuğa yüklendikten sonra, diğer kuyucuklara 15 µl PZR ampliconu ve 4 µl 6X yükleme boyasından oluşan karışım yüklendi. Daha sonra DNA, 100 voltta yarım saat süresince yürütüldü. Jellerin görüntüsü Kodak Gel Logic 2200 Imaging System jel görüntüleme cihazında elde edildi ve kaydedildi.

3.2.7. İmmünolojik Analizler

3.2.7.1. Akım sitometri Analizleri

1. Dalaktan Hücre İzolasyonu

Gruplarda yer alan deney hayvanlarından aseptik koşullarda dalak çıkarıldı. Dalaktan mononükleer hücre izolasyonu için dokular bistüri yardımı ile çok sayıda küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra bu küçük parçalar tek hücre düzeyine getirildi. Elde edilen homojenat 15 ml'lik steril tüplere eklendi ve PBS (pH:7.4) ile 5 ml'ye tamamlanarak 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım atıldı ve eritrositleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla eritrosit lizis solusyonu hücreler üzerine uygulandı, 3 dk oda ısısında beklenildi. Bu işlem sonrasında hücreler Ficoll-Hypaque solusyonu kullanılarak mononükleer hücrelerin izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için 5ml Ficoll-Hypaque solusyonu bulunan tüplere hücreler yüklenerek 2500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası Ficoll'un hemen üzerinde ince bir tabaka halinde oluşan Floopy tabakası cam pasteur pipetle temiz bir tüpe transfer edildi ve üzerine 9 ml'e kadar PBS eklendi. Daha sonra tüpler 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonunda üst

kısım atılarak PBS ile 2 kez daha 1500 rpm'de 5 dk yıkama işlemi yapılarak hücre izolasyon işlemi tamamlandı.

2. Neubaer Lamda Hücre Sayımı

İzolasyon sonrası hücreler %0.4'lük trypan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldı ve Neubaer lamı kullanılarak ışık mikroskopunda hücre sayım işlemi gerçekleştirildi ve hücrelerin canlılık düzeyi tespit edildi. İzole edilen hücreler tüm deneysel çalışmalarda %95'den fazla canlılık yüzdesine sahipti.

3. Hücrelerin Antikorlarla İşaretlenmesi

Hücre sayımı sonrası 10^6 hücre/dalak tüplere dağıtılarak floresan boya ile işaretli antikorlar ile boyama gerçekleştirildi. Hücrelerin fenotip analizinde; Fluorescein isothiocyanate (FITC) ile işaretli sıçan anti-fare CD3, sıçan anti-fare CD69 ve streptavidin, Phycoerythrin (Pe) işaretli sıçan anti-fare CD19, sıçan anti-fare CD4, peridinin chlorophyll (Per-Cp) işaretli sıçan anti-fare CD8, biotin işaretli sıçan anti-fare CD127 antikorları kullanıldı (BD BioScience, USA).

Hücrelerin boyanması öncesi çapraz bağlanmayı engellemek amacıyla 1/100 oranında sulandırılmış Fc blok tüm hücreler üzerinde uygulandı. Ardından hücreler uygun tüplerde ve uygun floresan işaretli antikorlar ile eşleştirilerek işaretlendi. İşaretleme sonrası hücrelerin analizi akım sitometri cihazında gerçekleştirildi (FACSCanto™ II, BD BioSciences). Veriler BD FACS DIVA Software v6.1.3 (BD BioScience) analiz programında analiz edildi. Her analizde her örnek için en az 20000 hücre sayıldı.

3.2.7.2. ELISA Yöntemi ile TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IL-23, IFN- γ Sitokinlerinin Ölçümü

Fare serum örneklerinden TNF- α , IL-4, IL-2, IL-23, IL-10, IL-17, IFN- γ sitokinlerinin düzeyleri ELISA yöntemi ile kit içerisindeki talimatlara uygun şekilde belirlendi. (eBioscience, Austria). Serum örnekleri ve sitokinlere ait standartlar 96 kuyucuklu mikropiplaklarda uygun kuyucuklara yerleştirildikten sonra inkübasyon tamponu ile inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklara Biotin konjugat konulup, plaklar oda ısısında tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu ile yıkandı ve Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Oda ısısında

inkübasyonu takiben, plaklar tekrar yıkama solüsyonu ile yıkandı. Son aşamada kuyucuklara substrat solüsyonu konulup, plaklar oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Oluşan reaksiyon Stop solüsyonu ile durduruldu. Kuyucuklardaki absorbans değerleri ise ELISA okuyucusunda 450 nm’de okutularak değerlendirildi. Standart eğri, her plak için uygun olan sitokin standartları ile oluşturuldu. Örnekler ait sitokin düzeyleri, standart eğri üzerinde işaretlenerek pg/ml cinsinden belirlendi.

3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiki analizinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart sapma) yanı sıra; gruplar arası karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanıldı. Karşılaştırmalarda “p” değerinin 0.05’den küçük bulunduğu değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmada farelerin canlı ağırlık ve karaciğer ağırlıkları, biyokimyasal analiz bulguları, histolojik bulguları, immünolojik bulguları ile moleküler analiz (Gerçek zamanlı PZR) bulguları değerlendirilmiştir.

4.1. Karaciğerin Makroskopik Bulguları

Deney süresi sonunda sakrifiye edilen farelerin karaciğer doku örnekleri ilk olarak makroskopik olarak incelendi. Bu inceleme sonucunda kontrol grubundaki fare karaciğerlerinin parlak kahverengi-kırmızı renkte, yumuşak ve esnek kıvamda olduğu görüldü. Karaciğer yüzeyi ise düzgün ve pürüzsüzdü. TAA grubunu oluşturan hayvanlarda, karaciğer renginin kontrol grubuna kıyasla bozulduğu saptandı. Bu gruba ait karaciğerlerin kıvamları sertleşmiş olup renkleri mat ve kahverengi olarak gözlemlendi. Karaciğer yüzeyi düzgün değildi. Ayrıca bazı farelerde karaciğer, bağırsaklar ve diğer organların birbirine yapışmış olduğu bir oluşum da gözlemlendi.

4.2. Fare Canlı Ağırlık ve Karaciğer Ağırlık Bulguları

TAA ile karaciğer fibrozisinin oluşturulması deneklerde kontrol grubuna göre belirgin düzeyde vücut/karaciğer ağırlık oranında azalmaya neden olurken, fibrozisli gruba LXA4 enjeksiyonu bu oranda artışa neden oldu. Ancak bu artış fibrozisli grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Farelerin vücut/karaciğer ağırlık bulguları.

Gruplar	Vücut/Karaciğer Ağırlık
Kontrol	20,271 ± 1,34
LXA4	18,869 ± 2,36
TAA	15,916 ± 1,73*
TAA+LXA4	16,263 ± 3,44

*: TAA grubunun kontrol ve LXA4 grupları ile istatistiksel farkını simgelemektedir (p<0,05).

4.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları

Karaciğer fonksiyonu ile ilişkili belirteçler olan ALT, AST ve ALP düzeylerinin TAA ile fibrozisin oluşturulması sonrası belirgin düzeyde arttığı gözlemlendi. Fibrozis oluşturulan gruba LXA4 enjeksiyonunun ise ALT ve AST düzeylerini belirgin düzeyde düşürdüğü belirlendi (Tablo 4.2).

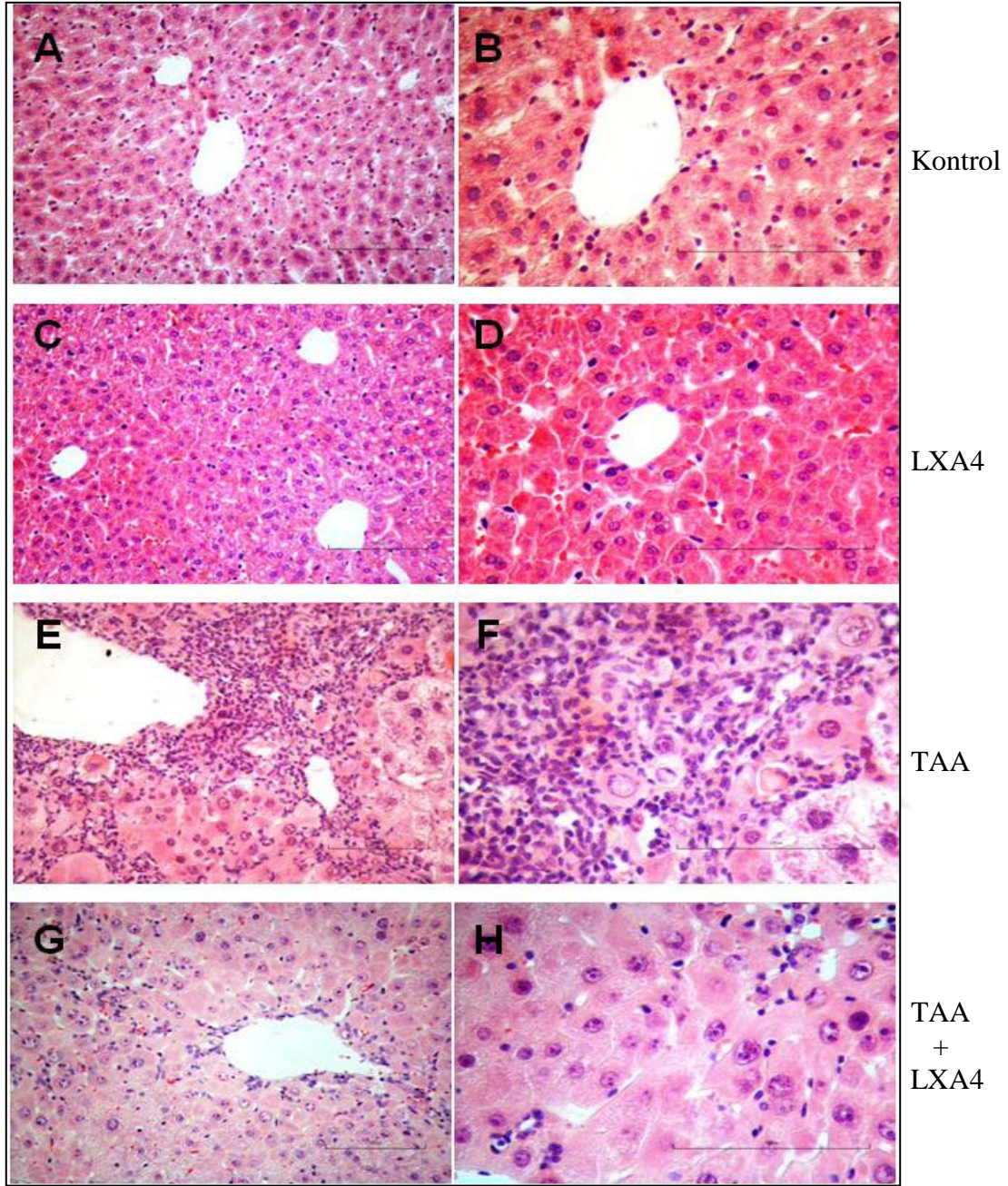
Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarının biyokimyasal bulguları.

Grup	ALT (U/L.)	AST(U/L.)	ALP (U/L.)
Kontrol	29,40 ± 8,58	139,80 ± 29,32	33,18 ± 7,62
LXA4	36,60 ± 12,45	109,20 ± 14,26	87,12 ± 9,48*
TAA	255,56 ± 71,04 [#]	247,87 ± 33,38 ^t	151,95 ± 14,44 ^{\$}
TAA+LXA4	77,40 ± 13,74	169,50 ± 14,13	132,93 ± 17,57

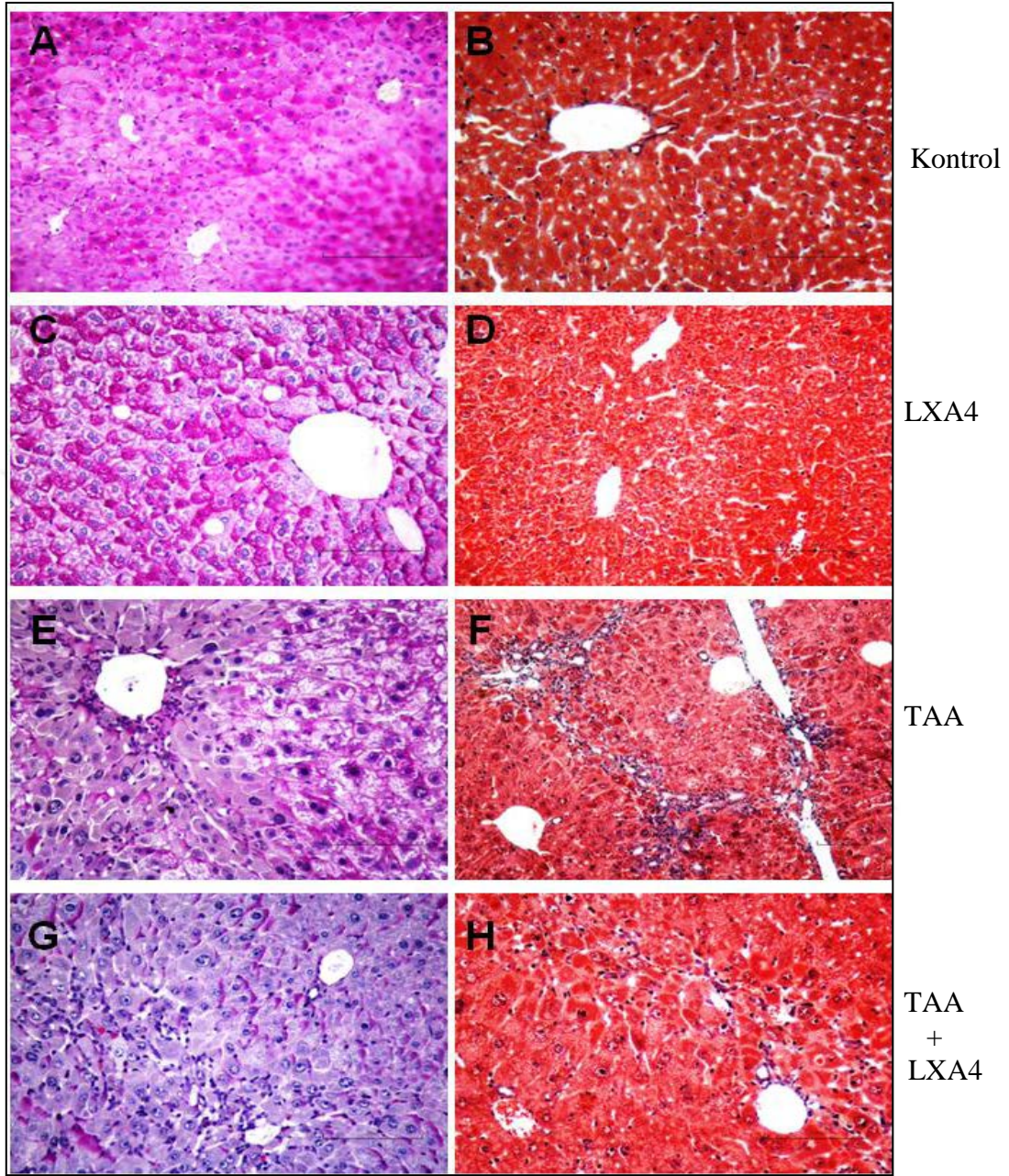
Tablodaki değerler tüm deneklerden elde edilen analiz sonuçlarının ortalaması ± standart hata'yı göstermektedir. [#], ^t: TAA grubunun kontrol, LXA4 ve TAA+LXA4 grupları ile istatistiksel farkını simgelemektedir (p<0,05). ^{\$}: TAA grubu ile kontrol grubun istatistiksel farkını simgelemektedir (p<0,05). *: Kontrol grubu ile LXA4 grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir (p<0,05).

4.4. Histopatolojik Bulgular

Karaciğer dokusunda histolojik değerlendirmede inflamasyon düzeyi, fibroz oluşumu hematoksilin-eozin boyama ile saptandı (Şekil 4.1A-1H). Fibroz oluşumuna eşlik eden bağ ve destek dokusu oluşumu Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama yöntemi ile saptanırken (Şekil 4.2A-2G), karaciğerin glikojen depolama durumu, sitoplazmik inklüzyonların dağılımı ve seroid pigmentin hepatosit içindeki varlığı Gomori'nin trikrom boyama yöntemi ile saptandı (Şekil 4.2B, D, F, H). Histolojik kantitatif değerlendirme karaciğer hastalıklarının patolojik değerlendirmesinde sıklıkla kullanılan Knodell skorlama sistemi ile gerçekleştirildi. Buna göre; TAA ile oluşturulan karaciğer fibrozu belirgin düzeyde erezyonal nekroza, inflamasyona, lobular nekroz ve fibroz oluşumuna neden olmaktadır. TAA ile beraber LXA4 verilmesi karaciğerde inflamasyon, erezyonal nekroz, lobular nekroz ve fibroz parametrelerinde TAA grubuna göre belirgin azalmaya neden olmaktadır. Toplam değerlendirmede TAA ile fibroz oluşturulan gruba LXA4 enjeksiyonu belirgin düzeyde iyileşmeye neden olmaktadır (Tablo 4.3).



Şekil 4.1. LXA4'ün karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonuna ve inflamasyon gelişimine etkisinin H&E boyama ile analizi. A, C, E, G 20x ve B, D, F, H 40x objektif büyütmelerinde görüntülenmiştir. Şekilde, Kontrol (A,B); sadece LXA4 enjekte edilmiş (C, D); fibroz grubu (E, F) ve fibroz oluşturulmuş gruba LXA4 enjekte edilmiş (G,H) farelerin temsili karaciğer dokularından histolojik görüntüler sunulmuştur.



Şekil 4.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Trikrom boyama analizleri. Fibroz oluşumuna eşlik eden bağ ve destek doku oluşumu Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama ile analizi (A, C, E, G); karaciğer hücrelerinde glikojen depolama durumu inklüzyonların dağılımı ve seroid pigmentin hepatosit içindeki varlığının trikrom boyama (B, D, F, H) ile analizi (20x). Şekilde, kontrol (A,B); sadece LXA4 enjekte edilmiş (C,D); fibroz grubu (E,F) ve fibroz oluşturulmuş gruba LXA4 enjekte edilmiş (G,H) farelerin temsili karaciğer dokularından histolojik görüntüler sunulmuştur.

Tablo 4.3. Karaciğer dokularında histolojik değerlendirme.

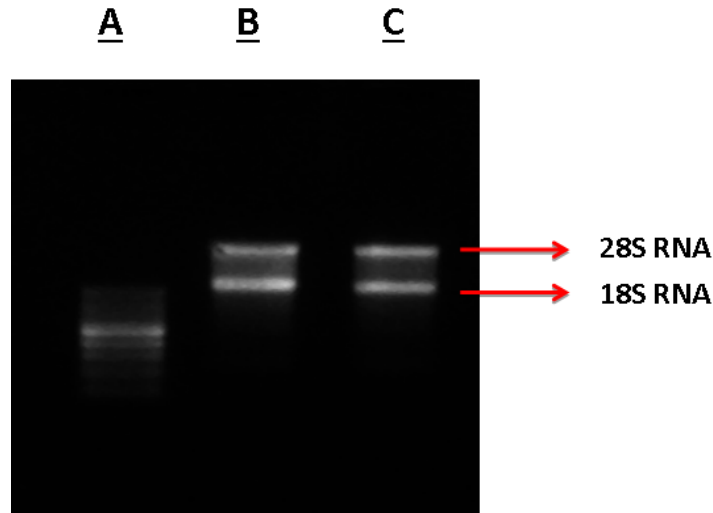
Gruplar	Patolojik Özellikler				Toplam
	Erezyon Nekroz	Lobular Dejenerasyon ve Fokal Nekroz	Fibroz	İnflamasyon	
Kontrol	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,15	0,3/53
LXA4	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,13	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,13	0,5/53
TAA	4,7 ± 0,77*	2,3 ± 0,36*	2,4 ± 0,30*	2,7 ± 0,30*	12,1/53*
TAA+LXA4	1,9 ± 0,48	0,7 ± 0,15	1,0 ± 0,26	1,4 ± 0,26	5/53

Tablodaki değerler tüm deneklerden elde edilen analiz sonuçlarının ortalaması ± standart hata'yı göstermektedir. *: TAA grubu ile TAA+LXA4 grubu değerleri arasındaki istatistiksel farkı simgelemektedir ($p < 0.05$).

4.5. Moleküler Analiz Bulguları

4.5.1. RNA'nın Agaroz Jel Elektrofrezisi Bulguları

RNA bütünlüğü agaroz jel elektrofrezisi ile kontrol edildi. 28S ve 18S ribozomal bantların varlığı ve yoğunluğu çalışmada izole edilen RNA'ların bütünlüğünü koruduğunu gösterdi.



Şekil 4.3. Karaciğerden elde edilen RNA'ların jel elektrofrezisinde görüntülenmesi. A. 100bp'lik DNA marker; B. RNA örneği 70 °C 1 dakika ısıtılmadan; C. RNA örneği 70 °C 1 dakika ısıtıldıktan sonra %1'lik jeldeki 28S ve 18S RNA görüntüsü.

4.5.2. Gerçek zamanlı PZR ile Gen İfadesi Analizi Bulguları

Gerçek zamanlı PZR ile gen ifadesi analizinde house-keeping gen olan *GAPDH* geni dahil olmak üzere tüm hedef genlerin (*ATF2*, *MKK4*, *MKK7*, *TGF-β1*) Threshold Cycle (CT) değerleri hesap edildi. Ardarda house-keeping gen ile tüm hedef genler arasındaki CT değerlerinin farkı hesap edilerek delta CT (ΔCT) değeri saptandı. Bunu takiben ΔCT deney grubu- ΔCT kontrol grubu hesaplaması yapılarak delta delta CT ($\Delta\Delta CT$) değeri bulundu. Hedef gen ifadesindeki artış miktarı kat değişimi olarak ifade edildi. Kat değişimi de $2^{-\Delta\Delta CT}$ hesaplama ile bulundu (94).

$\Delta CT = \text{Hedef gen Ct değeri} - \text{House keeping gen Ct değeri}$

$\Delta\Delta CT = \text{Delta Ct deney} - \text{Delta Ct kontrol}$

Kat Değişimi = $2^{-\Delta\Delta CT}$ olarak hesaplandı.

TAA ile karaciğer fibrozu oluşturulduğunda karaciğer hücrelerinde *TGF-β1* gen ifadesinin kontrol grubuna göre belirgin arttığı saptandı (Şekil 4.4). Buna karşın, karaciğer fibrozis olan deneklere LXA4 enjeksiyonu *TGF-β1* gen ifadesinde artışa neden olmamaktaydı. Karaciğer hücre yenilenmesinden sorumlu genlerden *ATF2* ve *MKK7* gen ifadeleri TAA ile karaciğer fibrozu oluşturulan deneklerde kontrol grubuna göre belirgin bir fark saptanmadı. Karaciğer fibrozu olan deneklere LXA4 enjekte edilmesi *ATF2* ve *MKK7* gen ifadelerinde diğer gruplara göre belirgin bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 4.5-6). Buna karşın *MKK4* gen ifadesi TAA ile karaciğer fibrozu oluşturulan grupta artarken, fibrozlu deneklere LXA4 enjekte edilen (TAA+LXA4) grupta fibrozlu gruba göre belirgin düzeyde düşük saptandı. Ancak, TAA+LXA4 grubundaki düşük *MKK4* gen ifadesi sağlıklı gruba göre belirgin düzeyde yüksek bulundu (Şekil 4.7).

Tablo 4.4. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *ATF2* ve *GAPDH* genleri için Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	Sağlıklı Grup Ct Değerleri	LXA4 Grup Ct Değerleri	TAA Grup Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup Ct Değerleri
1	<i>ATF2</i>	22,58	23,92	23,37	21,66
2	<i>ATF2</i>	23,88	22,30	24,30	21,17
3	<i>ATF2</i>	20,61	33,00	20,47	22,73
4	<i>ATF2</i>	21,24	22,43	21,58	23,53
5	<i>ATF2</i>	25,12	23,35	20,24	22,57
6	<i>ATF2</i>	24,13	21,73	23,66	22,68
7	<i>ATF2</i>	22,61	23,27	25,17	23,48
8	<i>ATF2</i>	24,44	21,60	23,17	22,64
9	<i>ATF2</i>	25,15	23,58	24,24	25,26
10	<i>ATF2</i>	22,68	21,27	24,48	25,29
1	<i>GAPDH</i>	16,93	19,80	17,13	16,68
2	<i>GAPDH</i>	19,37	14,94	16,00	14,47
3	<i>GAPDH</i>	15,03	16,01	13,77	16,57
4	<i>GAPDH</i>	15,91	15,62	14,65	17,92
5	<i>GAPDH</i>	18,42	17,54	13,49	16,30
6	<i>GAPDH</i>	17,12	14,87	16,73	15,84
7	<i>GAPDH</i>	17,13	15,13	17,35	16,81
8	<i>GAPDH</i>	17,13	14,60	16,82	16,03
9	<i>GAPDH</i>	16,54	17,46	18,44	19,28
10	<i>GAPDH</i>	18,90	14,83	19,68	19,35

Tablo 4.5. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *ATF2* geni için ortalama Δ Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	Sağlıklı Grup Δ Ct Değerleri	LXA4 Grup Δ Ct Değerleri	TAA Grup Δ Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup Δ Ct Değerleri
1	<i>ATF2</i>	5,33	7,84	6,96	4,73
2	<i>ATF2</i>	6,63	6,22	7,89	4,24
3	<i>ATF2</i>	3,36	16,92	4,06	5,80
4	<i>ATF2</i>	3,99	6,35	5,17	6,60
5	<i>ATF2</i>	7,87	7,27	3,83	5,64
6	<i>ATF2</i>	6,88	5,65	7,25	5,75
7	<i>ATF2</i>	5,36	7,19	8,76	6,55
8	<i>ATF2</i>	7,19	5,52	6,76	5,71
9	<i>ATF2</i>	7,90	7,50	7,83	8,33
10	<i>ATF2</i>	5,43	5,19	8,07	8,36

Tablo 4.6. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *ATF2* geni için ortalama $\Delta\Delta$ Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	LXA4 Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri	TAA Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri
1	<i>ATF2</i>	1,84	0,96	-1,26
2	<i>ATF2</i>	0,22	1,89	-1,75
3	<i>ATF2</i>	10,92	-1,93	-0,19
4	<i>ATF2</i>	0,35	-0,82	0,60
5	<i>ATF2</i>	1,27	-2,16	-0,35
6	<i>ATF2</i>	-0,34	1,25	-0,24
7	<i>ATF2</i>	1,19	2,76	0,55
8	<i>ATF2</i>	-0,47	0,76	-0,28
9	<i>ATF2</i>	1,50	1,83	2,33
10	<i>ATF2</i>	-0,80	2,07	2,36

Tablo 4.7. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *ATF2* geni için $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.

Örnek Numarası	Gen	LXA4 Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri	TAA Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri	TAA+LXA4 Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri
1	<i>ATF2</i>	0,27	0,51	2,39
2	<i>ATF2</i>	0,85	0,26	3,36
3	<i>ATF2</i>	0,05	3,81	1,14
4	<i>ATF2</i>	0,78	1,76	0,65
5	<i>ATF2</i>	0,41	4,47	1,27
6	<i>ATF2</i>	1,27	0,41	1,18
7	<i>ATF2</i>	0,43	0,14	0,67
8	<i>ATF2</i>	1,39	0,58	1,21
9	<i>ATF2</i>	0,35	0,27	0,19
10	<i>ATF2</i>	1,74	0,23	0,19

Tablo 4.8. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *MKK4* ve *GAPDH* genleri için Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	Sağlıklı Grup Ct Değerleri	LXA4 Grup Ct Değerleri	TAA Grup Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup Ct Değerleri
1	<i>MKK4</i>	25,16	24,74	23,20	22,78
2	<i>MKK4</i>	32,57	22,34	23,42	21,22
3	<i>MKK4</i>	23,81	23,11	20,32	23,66
4	<i>MKK4</i>	24,92	23,05	20,82	25,02
5	<i>MKK4</i>	27,62	23,59	19,61	23,18
6	<i>MKK4</i>	27,66	21,47	19,87	22,86
7	<i>MKK4</i>	29,57	22,02	21,20	23,45
8	<i>MKK4</i>	28,90	21,66	25,31	23,09
9	<i>MKK4</i>	29,41	25,00	24,06	25,39
10	<i>MKK4</i>	27,93	21,28	23,00	26,44
1	<i>GAPDH</i>	16,93	19,80	17,13	16,68
2	<i>GAPDH</i>	19,37	14,94	16,00	14,47
3	<i>GAPDH</i>	15,03	16,01	13,77	16,57
4	<i>GAPDH</i>	15,91	15,62	14,65	17,92
5	<i>GAPDH</i>	18,42	17,54	13,49	16,30
6	<i>GAPDH</i>	17,12	14,87	16,73	15,84
7	<i>GAPDH</i>	17,13	15,13	17,35	16,81
8	<i>GAPDH</i>	17,13	14,60	16,82	16,03
9	<i>GAPDH</i>	16,54	17,46	18,44	19,28
10	<i>GAPDH</i>	18,90	14,83	19,68	19,35

Tablo 4.9. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *MKK4* geni için ortalama Δ Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	Sağlıklı Grup Δ Ct Değerleri	LXA4 Grup Δ Ct Değerleri	TAA Grup Δ Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup Δ Ct Değerleri
1	<i>MKK4</i>	7,91	8,66	6,79	5,85
2	<i>MKK4</i>	15,32	6,26	7,01	4,29
3	<i>MKK4</i>	6,56	7,03	3,91	6,73
4	<i>MKK4</i>	7,67	6,97	4,41	8,09
5	<i>MKK4</i>	10,37	7,51	3,20	6,25
6	<i>MKK4</i>	10,41	5,39	3,46	5,93
7	<i>MKK4</i>	12,32	5,94	4,79	6,52
8	<i>MKK4</i>	11,65	5,58	8,90	6,16
9	<i>MKK4</i>	12,16	8,92	7,65	8,46
10	<i>MKK4</i>	10,68	5,20	6,59	9,51

Tablo 4.10. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *MKK4* geni için ortalama $\Delta\Delta$ Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	LXA4 Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri	TAA Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri
1	<i>MKK4</i>	-1,84	-3,71	-4,65
2	<i>MKK4</i>	-4,24	-3,49	-6,21
3	<i>MKK4</i>	-3,47	-6,59	-3,77
4	<i>MKK4</i>	-3,53	-6,09	-2,41
5	<i>MKK4</i>	-2,99	-7,30	-4,25
6	<i>MKK4</i>	-5,11	-7,04	-4,57
7	<i>MKK4</i>	-4,56	-5,71	-3,98
8	<i>MKK4</i>	-4,92	-1,60	-4,34
9	<i>MKK4</i>	-1,58	-2,85	-2,04
10	<i>MKK4</i>	-5,30	-3,91	-0,99

Tablo 4.11. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *MKK4* geni için $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.

Örnek Numarası	Gen	LXA4 Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri	TAA Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri	TAA+LXA4 Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri
1	<i>MKK4</i>	3,59	13,11	25,13
2	<i>MKK4</i>	18,98	11,25	74,12
3	<i>MKK4</i>	11,13	96,52	13,65
4	<i>MKK4</i>	11,60	68,25	5,32
5	<i>MKK4</i>	7,98	157,89	19,05
6	<i>MKK4</i>	34,69	131,85	23,78
7	<i>MKK4</i>	23,69	52,44	15,79
8	<i>MKK4</i>	30,41	3,03	20,27
9	<i>MKK4</i>	3,00	7,22	4,11
10	<i>MKK4</i>	39,58	15,06	1,98

Tablo 4.12. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *MKK7* ve *GAPDH* genleri için Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	Sağlıklı Grup Ct Değerleri	LXA4 Grup Ct Değerleri	TAA Grup Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup Ct Değerleri
1	<i>MKK7</i>	22,58	25,48	22,59	22,58
2	<i>MKK7</i>	24,40	23,21	22,55	20,11
3	<i>MKK7</i>	20,57	24,35	19,94	23,31
4	<i>MKK7</i>	19,83	24,40	20,61	24,26
5	<i>MKK7</i>	25,12	25,27	19,15	22,04
6	<i>MKK7</i>	22,50	23,25	22,49	21,31
7	<i>MKK7</i>	22,45	23,02	23,46	22,34
8	<i>MKK7</i>	22,17	23,25	22,71	22,64
9	<i>MKK7</i>	21,47	26,12	23,30	23,06
10	<i>MKK7</i>	20,98	21,91	25,32	26,25
1	<i>GAPDH</i>	16,93	19,80	23,49	16,68
2	<i>GAPDH</i>	19,37	14,94	16,00	14,47
3	<i>GAPDH</i>	15,03	16,01	13,77	16,57
4	<i>GAPDH</i>	15,91	15,62	14,65	17,92
5	<i>GAPDH</i>	18,42	17,54	13,49	16,30
6	<i>GAPDH</i>	17,12	14,87	16,73	15,84
7	<i>GAPDH</i>	17,13	15,13	17,35	16,81
8	<i>GAPDH</i>	17,13	14,6	16,82	16,03
9	<i>GAPDH</i>	16,54	17,46	18,44	19,28
10	<i>GAPDH</i>	18,90	14,83	19,68	19,35

Tablo 4.13. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *MKK7* geni için ortalama Δ Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	Sağlıklı Grup Δ Ct Değerleri	LXA4 Grup Δ Ct Değerleri	TAA Grup Δ Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup Δ Ct Değerleri
1	<i>MKK7</i>	5,33	9,40	5,54	5,65
2	<i>MKK7</i>	7,15	7,13	5,50	3,18
3	<i>MKK7</i>	3,32	8,27	2,89	6,38
4	<i>MKK7</i>	2,58	8,32	3,56	7,33
5	<i>MKK7</i>	7,87	9,19	2,10	5,11
6	<i>MKK7</i>	5,25	7,17	5,44	4,38
7	<i>MKK7</i>	5,20	6,94	6,41	5,41
8	<i>MKK7</i>	4,92	7,17	5,66	5,71
9	<i>MKK7</i>	4,22	10,04	6,25	6,13
10	<i>MKK7</i>	3,73	5,83	8,27	9,32

Tablo 4.14. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *MKK7* geni için ortalama $\Delta\Delta$ Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	LXA4 Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri	TAA Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri
1	<i>MKK7</i>	4,44	0,59	0,69
2	<i>MKK7</i>	2,17	0,55	-1,77
3	<i>MKK7</i>	3,31	-2,05	1,42
4	<i>MKK7</i>	3,36	-1,38	2,37
5	<i>MKK7</i>	4,23	-2,84	0,15
6	<i>MKK7</i>	2,21	0,49	-0,57
7	<i>MKK7</i>	1,98	1,46	0,45
8	<i>MKK7</i>	2,21	0,71	0,75
9	<i>MKK7</i>	5,08	1,30	1,17
10	<i>MKK7</i>	0,87	3,32	4,36

Tablo 4.15. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *MKK7* geni için $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.

Örnek Numarası	Gen	LXA4 Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri	TAA Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri	TAA+LXA4 Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri
1	<i>MKK7</i>	0,04	0,66	0,61
2	<i>MKK7</i>	0,22	0,68	3,41
3	<i>MKK7</i>	0,10	4,16	0,37
4	<i>MKK7</i>	0,09	2,61	0,19
5	<i>MKK7</i>	0,05	7,19	0,89
6	<i>MKK7</i>	0,21	0,71	1,48
7	<i>MKK7</i>	0,25	0,36	0,72
8	<i>MKK7</i>	0,21	0,61	0,59
9	<i>MKK7</i>	0,02	0,40	0,44
10	<i>MKK7</i>	0,54	0,09	0,04

Tablo 4.16. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *TGF- β* ve *GAPDH* genleri için Ct değerleri.

Örnek Numarası	Gen	Sağlıklı Grup Ct Değerleri	LXA4 Grup Ct Değerleri	TAA Grup Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup Ct Değerleri
1	<i>TGF-β</i>	20,38	23,03	19,57	21,66
2	<i>TGF-β</i>	25,25	21,62	20,27	21,17
3	<i>TGF-β</i>	19,50	22,17	18,63	22,73
4	<i>TGF-β</i>	20,08	21,56	19,46	23,53
5	<i>TGF-β</i>	22,10	23,35	17,72	22,57
6	<i>TGF-β</i>	21,46	19,59	20,59	22,68
7	<i>TGF-β</i>	22,61	20,34	18,52	23,48
8	<i>TGF-β</i>	22,32	20,44	20,94	22,64
9	<i>TGF-β</i>	23,01	23,45	21,80	25,26
10	<i>TGF-β</i>	23,62	20,96	20,49	25,29
1	<i>GAPDH</i>	16,93	19,80	17,13	16,68
2	<i>GAPDH</i>	19,37	14,94	16,00	14,47
3	<i>GAPDH</i>	15,03	16,01	13,77	16,57
4	<i>GAPDH</i>	15,91	15,62	14,65	17,92
5	<i>GAPDH</i>	18,42	17,54	13,49	16,30
6	<i>GAPDH</i>	17,12	14,87	16,73	15,84
7	<i>GAPDH</i>	17,13	15,13	17,35	16,81
8	<i>GAPDH</i>	17,13	14,60	16,82	16,03
9	<i>GAPDH</i>	16,54	17,46	18,44	19,28
10	<i>GAPDH</i>	18,90	14,83	19,68	19,35

Tablo 4.17. Sağlıklı, LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *TGF-β* geni için ortalama Δ Ct değerleri.

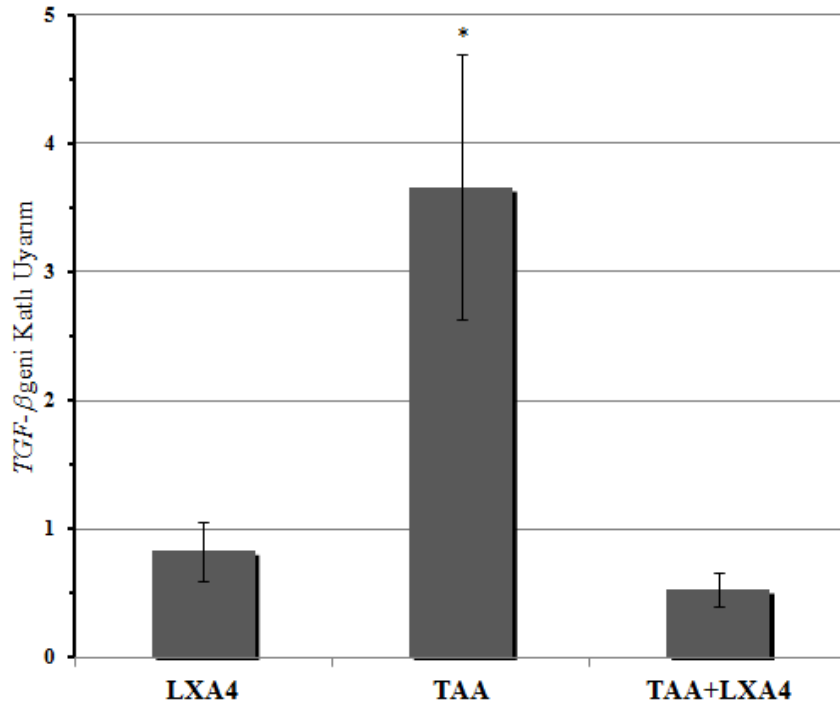
Örnek Numarası	Gen	Sağlıklı Grup Δ Ct Değerleri	LXA4 Grup Δ Ct Değerleri	TAA Grup Δ Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup Δ Ct Değerleri
1	<i>TGF-β</i>	3,13	6,95	3,16	4,73
2	<i>TGF-β</i>	8,00	5,54	3,86	4,24
3	<i>TGF-β</i>	2,25	6,09	2,22	5,80
4	<i>TGF-β</i>	2,83	5,48	3,05	6,60
5	<i>TGF-β</i>	4,85	7,27	1,31	5,64
6	<i>TGF-β</i>	4,21	3,51	4,18	5,75
7	<i>TGF-β</i>	5,36	4,26	2,11	6,55
8	<i>TGF-β</i>	5,07	4,36	4,53	5,71
9	<i>TGF-β</i>	5,76	7,37	5,39	8,33
10	<i>TGF-β</i>	6,37	4,88	4,08	8,36

Tablo 4.18. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *TGF-β* geni için ortalama $\Delta\Delta$ Ct değerleri.

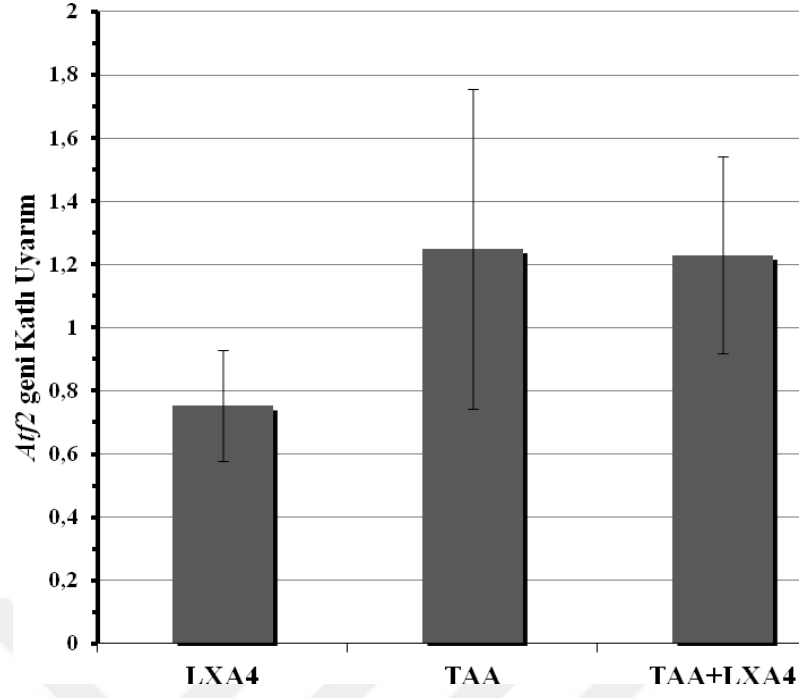
Örnek Numarası	Gen	LXA4 Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri	TAA Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri	TAA+LXA4 Grup $\Delta\Delta$ Ct Değerleri
1	<i>TGF-β</i>	2,16	-1,62	-0,04
2	<i>TGF-β</i>	0,75	-0,92	-0,53
3	<i>TGF-β</i>	1,30	-2,56	1,02
4	<i>TGF-β</i>	0,69	-1,73	1,82
5	<i>TGF-β</i>	2,48	-3,47	0,86
6	<i>TGF-β</i>	-1,27	-0,60	0,97
7	<i>TGF-β</i>	-0,52	-2,67	1,77
8	<i>TGF-β</i>	-0,42	-0,25	0,93
9	<i>TGF-β</i>	2,58	0,60	3,55
10	<i>TGF-β</i>	0,09	-0,70	3,58

Tablo 4.19. LXA4, TAA ve TAA+LXA4 gruplarında yer alan örneklere ait *TGF-β* geni için $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.

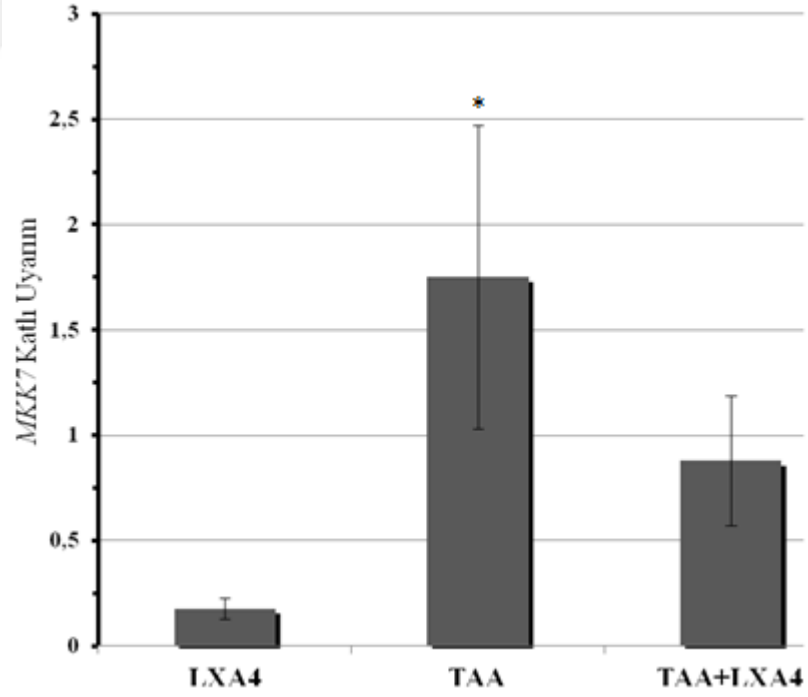
Örnek Numarası	Gen	LXA4 Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri	TAA Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri	TAA+LXA4 Grup $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Değerleri
1	<i>TGF-β</i>	0,22	3,07	1,03
2	<i>TGF-β</i>	0,59	1,89	1,45
3	<i>TGF-β</i>	0,40	5,90	0,49
4	<i>TGF-β</i>	0,61	3,31	0,28
5	<i>TGF-β</i>	0,17	11,08	0,55
6	<i>TGF-β</i>	2,41	1,51	0,51
7	<i>TGF-β</i>	1,43	6,36	0,29
8	<i>TGF-β</i>	1,34	1,18	0,52
9	<i>TGF-β</i>	0,16	0,65	0,08
10	<i>TGF-β</i>	0,93	1,62	0,08



Şekil 4.4. Gruplara göre *TGF-β* gen ifadelerinin karşılaştırılması.
*: TAA grubunun diğer gruplar ile istatistiksel farkını simgelemektedir.

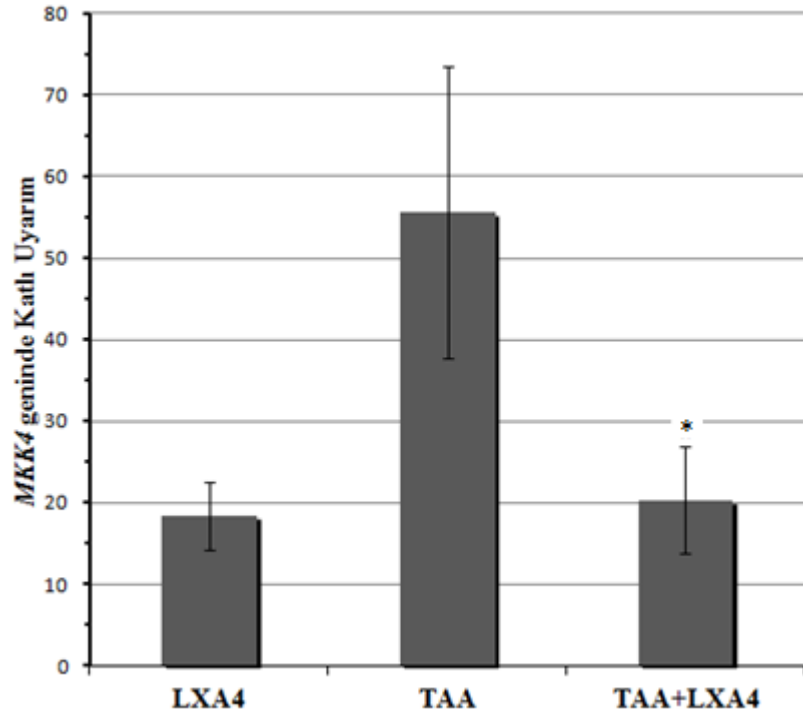


Şekil 4.5. Gruplara göre *ATF2* gen ifadelerinin karşılaştırılması.



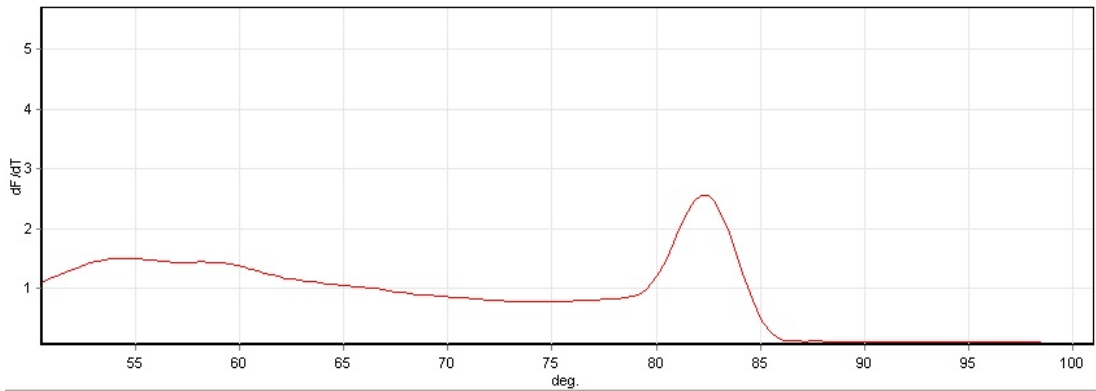
Şekil 4.6. Gruplara göre *MKK7* gen ifadelerinin karşılaştırılması.

*: TAA grubu ile LXA4 grubu arasındaki istatistiksel farkı simgelemektedir ($p < 0.05$).

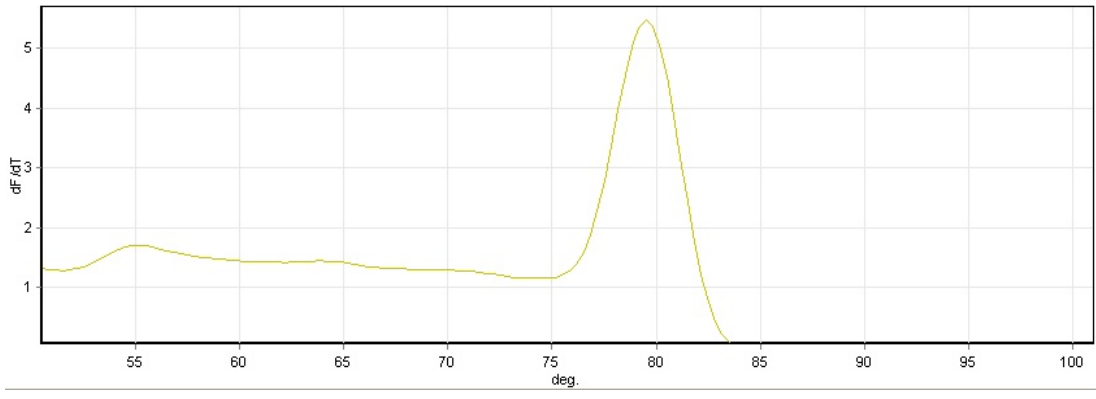


Şekil 4.7. Gruplara göre *MKK4* gen ifadelerinin karşılaştırılması.
*: TAA+LXA4 grubunun TAA grubu ile istatistiksel farkını simgelemektedir ($p < 0.05$).

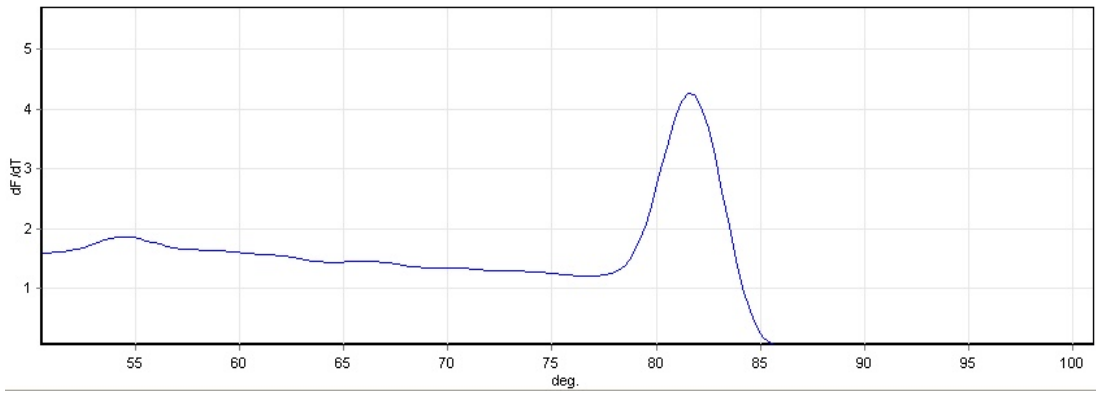
Her bir gen için melting point grafiği aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.8-12).



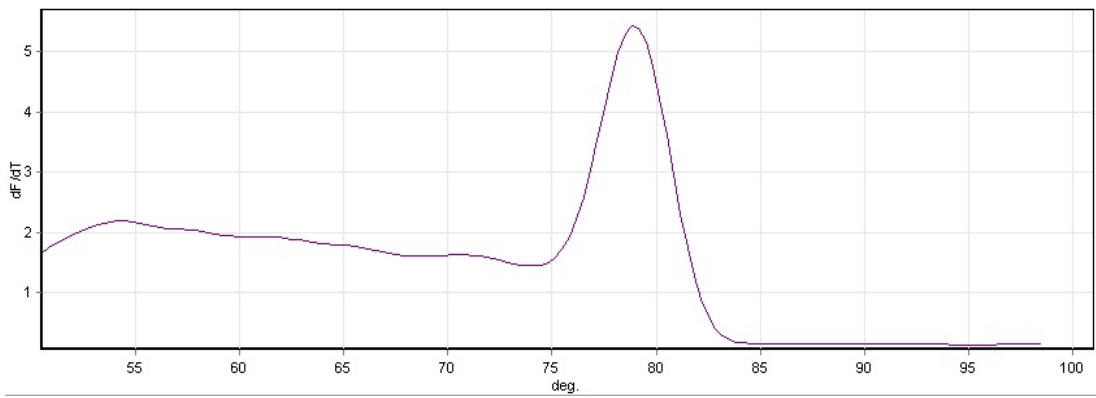
Şekil 4.8. *ATF2* geninin erime noktası grafiği



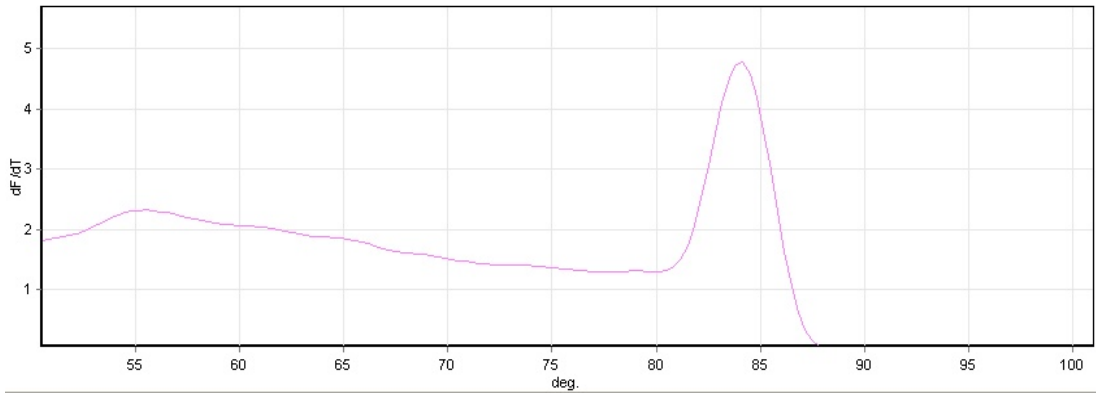
Şekil 4.9. *MKK4* geninin erime noktası grafiği



Şekil 4.10. *MKK7* geninin erime noktası grafiği



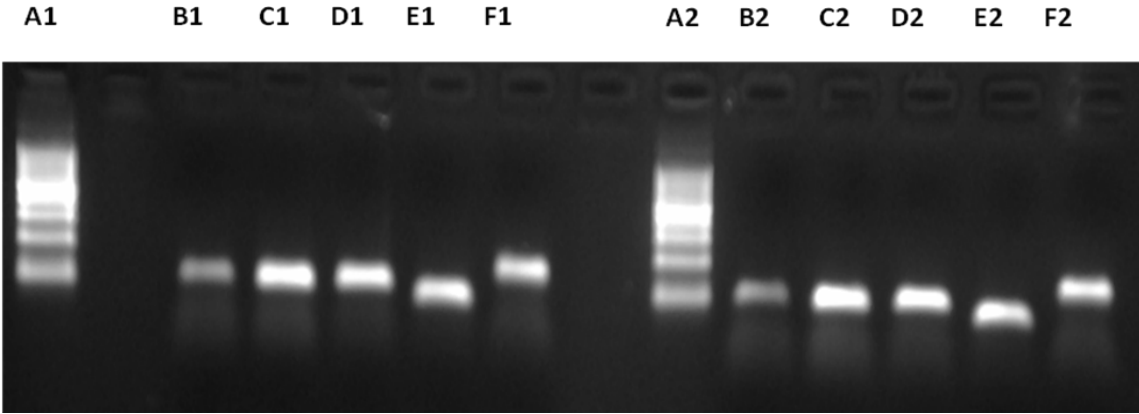
Şekil 4.11. *TGF- β 1* geninin erime noktası grafiği



Şekil 4.12. *GAPDH* geninin erime noktası grafiği

4.5.3. Gerçek zamanlı PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları

ATF2, MKK4, MKK7, TGF- β 1 ve GAPDH'in gerçek zamanlı PZR'da çoğaltılarak elde edilen elde edilmiş ürünleri %2'lik agaroz jele yüklendi ve PZR sonuçlarının tek ve istenen boyda bir DNA bandı oluşturduğu gözlemlendi.

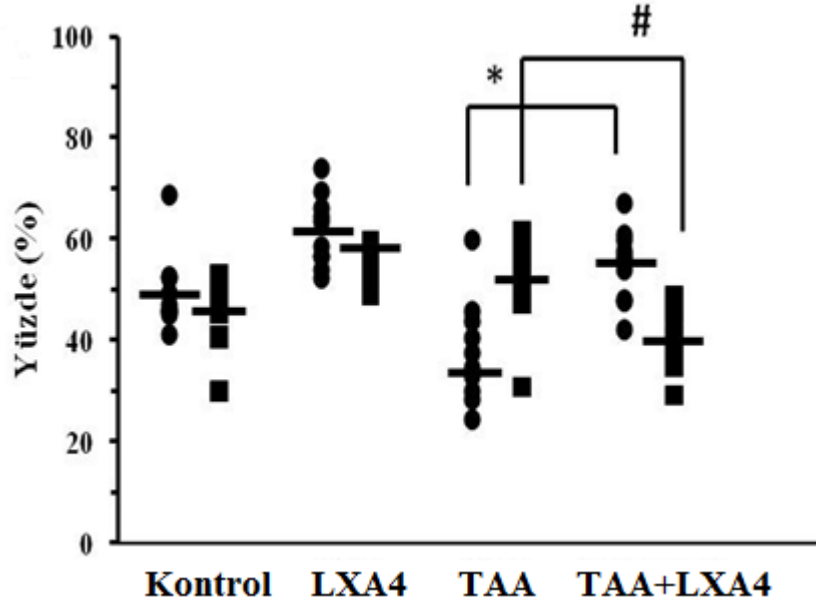


Şekil 4.13. Gerçek zamanlı PZR sonunda PZR ürünlerinin jel elektrofrezinde görüntülenmesi. A1 ve A2, 100bp'lik DNA marker; B1 ve B2, *ATF2* (92bp); C1 ve C2, *MKK4* (89bp); D1 ve D2, *MKK7* (93bp); E1 ve E2, *TGF- β 1* (63bp); F1 ve F2 *GAPDH* (140bp) DNA örneklerini göstermektedir.

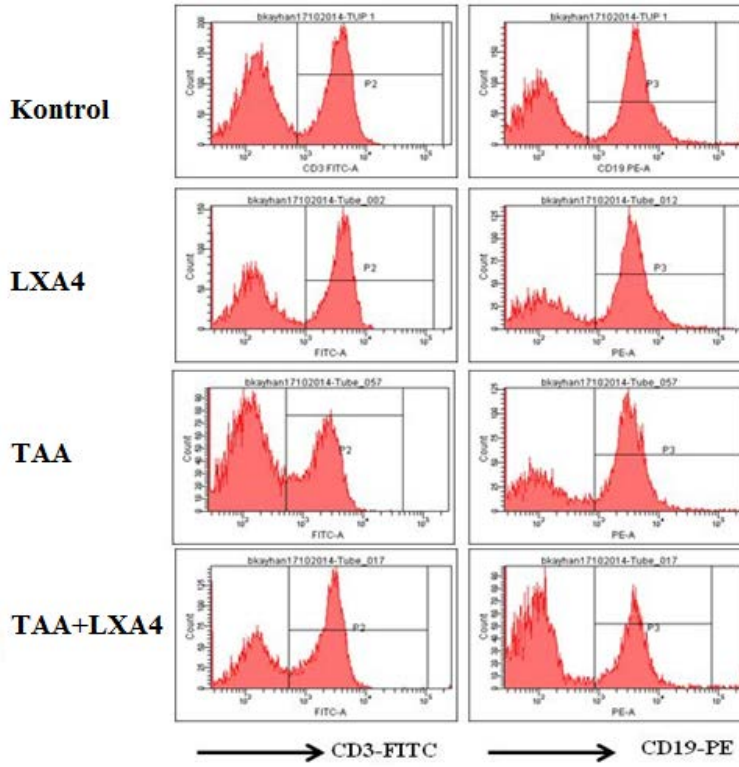
4.6. İmmünolojik Analiz Bulguları

4.6.1. Dalak Hücre Populasyonu ve Aktive T-lenfosit Dağılımı

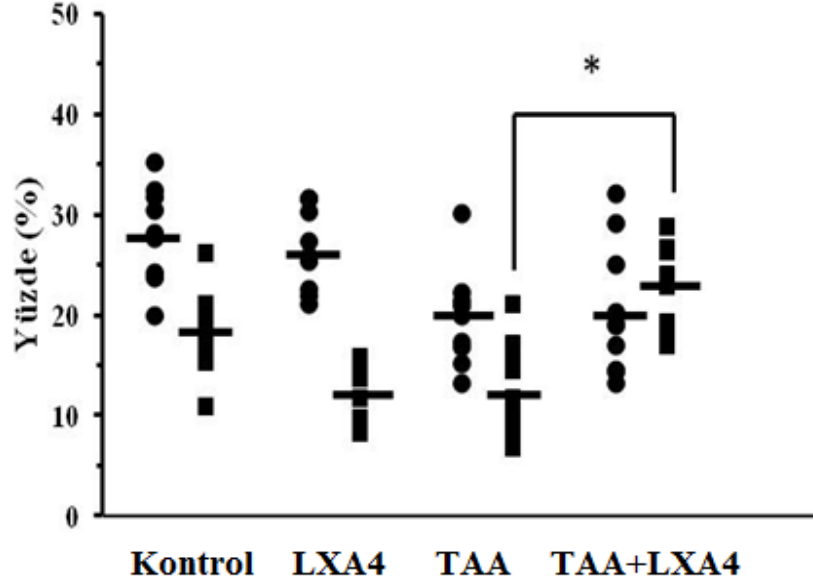
İmmün fenotipleme çalışmasında karaciğer fibrozu esnasında ve LXA4 ile tedavi sonrası sistemik immün yanıtta rol alan hücrelerin düzeyi ve aktivasyon düzeyleri araştırıldı. Buna göre karaciğer fibrozu esnasında CD3⁺ T lenfosit populasyon yüzdesinin sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin düzeyde azaldığı saptandı. CD19⁺ B lenfosit yüzdesi ise karaciğer fibrozu esnasında sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin düzeyde artmaktaydı. LXA4 enjeksiyonu karaciğer fibrozunda CD3⁺ T lenfosit yüzdesinin artmasına neden olurken; CD19⁺ B lenfosit yüzdesini belirgin düzeyde azaltmaktaydı (Şekil 4.14-15). T lenfosit alt grupları olan yardımcı T-lenfosit (CD3⁺CD4⁺) ile sitotoksik T lenfosit (CD3⁺CD8⁺) düzeyleri de araştırıldı (Şekil 4.16-17). Karaciğer fibrozu esnasında CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfosit yüzdesi kontrol grubuna göre belirgin düzeyde düşük bulundu. Karaciğer fibrozu esnasında LXA4 enjeksiyonu CD8⁺ lenfosit yüzdesini fibrozis grubuna göre belirgin düzeyde arttırsa da, bu artış sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin düzeyde düşük kalmaktaydı (Şekil 4.16-17). Lenfosit alt gruplarının aktivasyon belirteçleri araştırılarak fibrozis esnasında ve LXA4 uygulanması sonunda aktive lenfosit yüzdesi belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla, aktive T lenfositlerde yoğun şekilde bulunan CD69 ve CD127 aktivasyon belirteçlerini taşıyan yardımcı ve sitotoksik T lenfosit yüzdeleri araştırıldı. Buna göre karaciğer fibrozu CD4⁺CD69⁺ ve CD8⁺CD69⁺ hücre yüzdesinde belirgin bir artışa neden olmaktaydı. Fibroz esnasında LXA4 uygulanması aktive sitotoksik T lenfosit (CD8⁺CD69⁺) yüzdesini belirgin düzeyde azaltmaktaydı. Ancak benzer etki aktive CD4⁺ populasyon yüzdesinde saptanmadı. Karaciğer fibrozu gelişen deneklerde LXA4 uygulanması sonrası elde edilen aktive CD4⁺ ve aktive CD8⁺ hücre yüzdesi sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin düzeyde yüksek bulundu (Şekil 4.18-19). Bir diğer T lenfosit aktivasyon belirteci olan CD127'yi taşıyan yardımcı ve sitotoksik T lenfosit dağılımı araştırıldı. Buna göre TAA ile karaciğer fibrozu oluşturulması CD127 taşıyan yardımcı ve sitotoksik T lenfosit yüzdesini sağlıklı gruba göre belirgin düzeyde arttırmıştı. Ne var ki, tedavi amaçlı olarak fibrozlu gruba verilen LXA4, karaciğer fibrozunda artan aktive T lenfosit yüzdesi üzerinde belirgin bir azalma göstermemişti (Şekil 4.20-21).



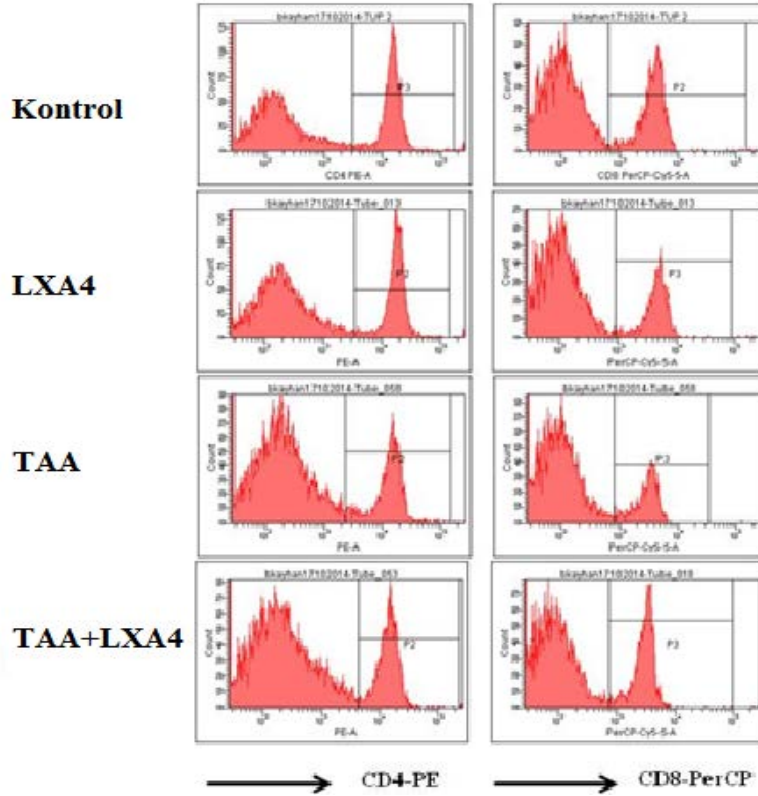
Şekil 4.14. T lenfosit (CD3⁺)(•) ve B lenfosit (CD19⁺) (•) hücre popülasyonlarının yüzdesel dağılımı. Her bir deneye ait veriler ve ortalama değerleri sunulmuştur. *, #: CD3 ve CD19 popülasyon yüzdeselerindeki istatistiksel farkı göstermektedir.



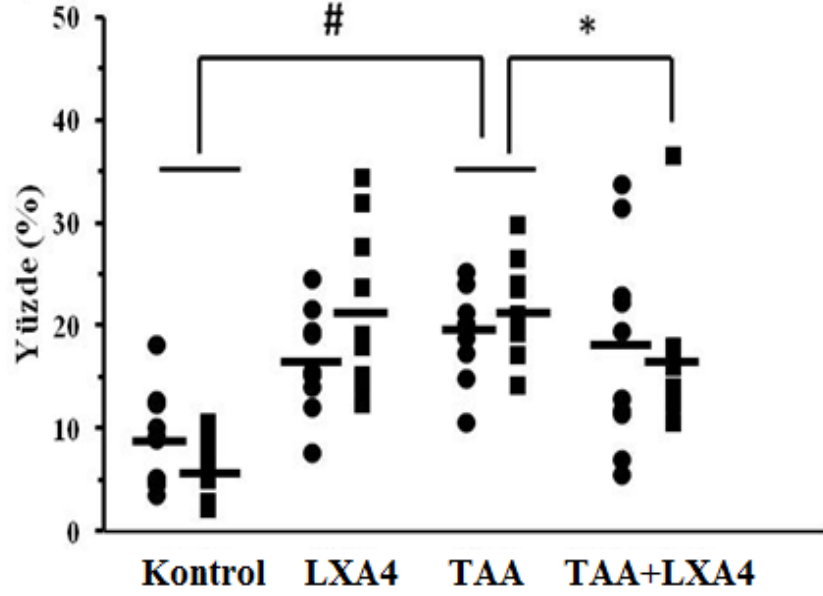
Şekil 4.15. Lenfosit kapısı alındıktan sonra CD3 ve CD19 popülasyonlarının dağılımının temsili histogram görüntüsü.



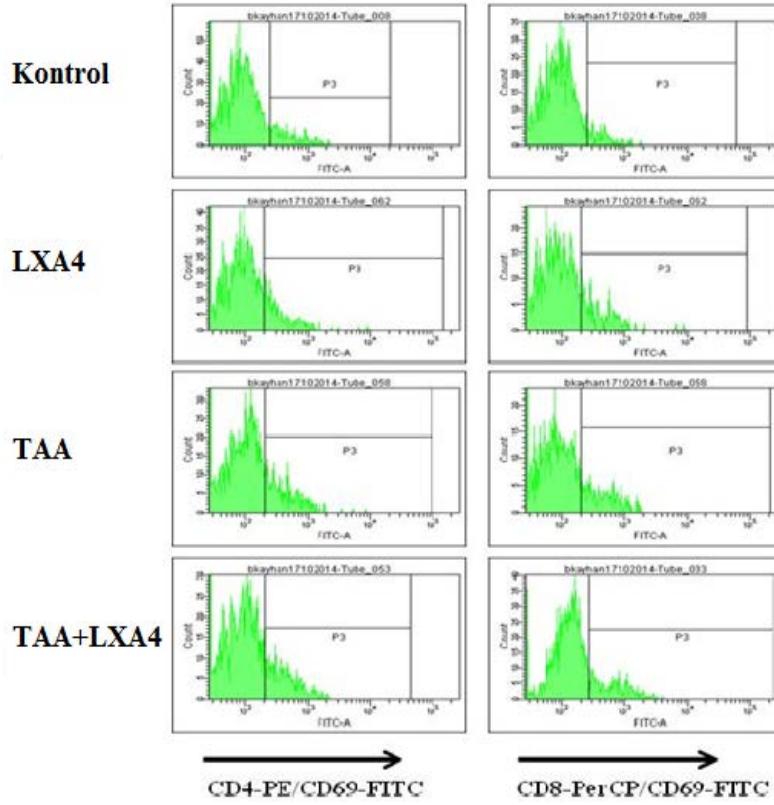
Şekil 4.16. Yardımcı T-lenfosit (CD4⁺) (●) ve sitotoksik T-lenfosit (CD8⁺) (■) hücre popülasyonlarının yüzdesel dağılımı. Her bir deneye ait veriler ve ortalama değerleri sunulmuştur. *: CD8 popülasyon yüzdesindeki istatistiksel farkı göstermektedir.



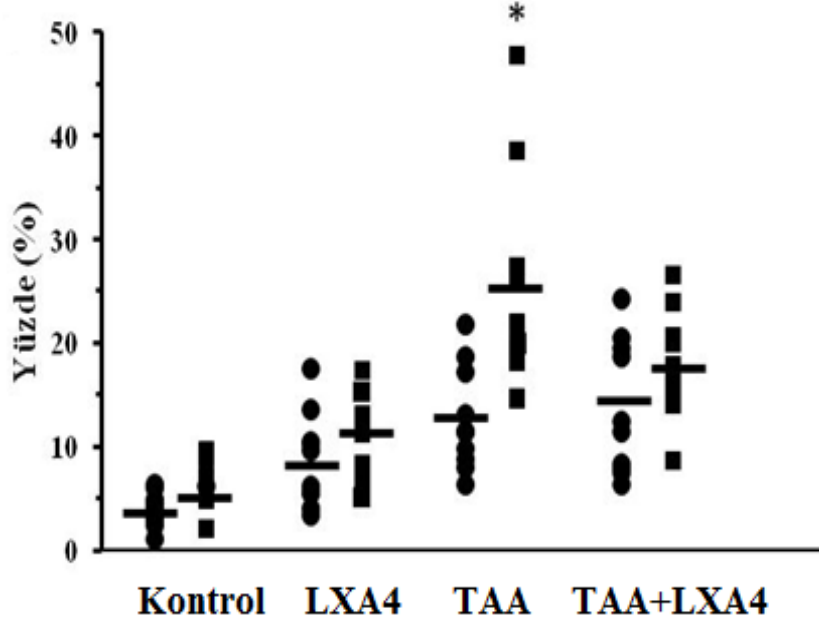
Şekil 4.17. Lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4 ve CD8 popülasyonlarının dağılımının temsili histogram görüntüleri.



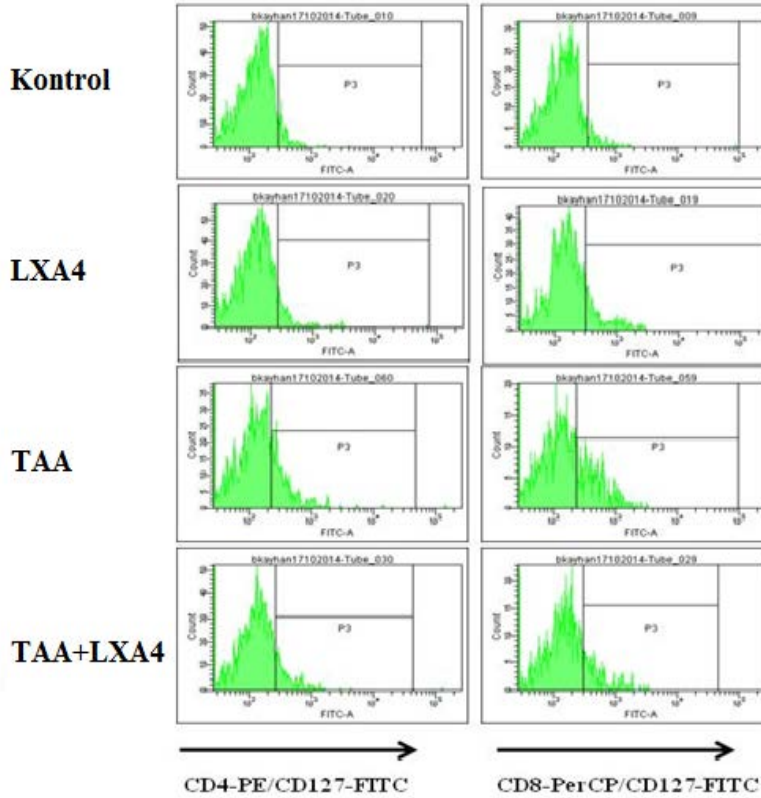
Şekil 4.18. CD4⁺CD69⁺(●) ve CD8⁺CD69⁺(■) hücre popülasyonlarının yüzdesel dağılımı. Her bir deneye ait veriler ve ortalama değerleri sunulmuştur. *, #: Popülasyon yüzdesindeki istatistiksel farkı göstermektedir.



Şekil 4.19. Lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4/CD8/CD69 popülasyon dağılımının temsili histogram görüntüleri.



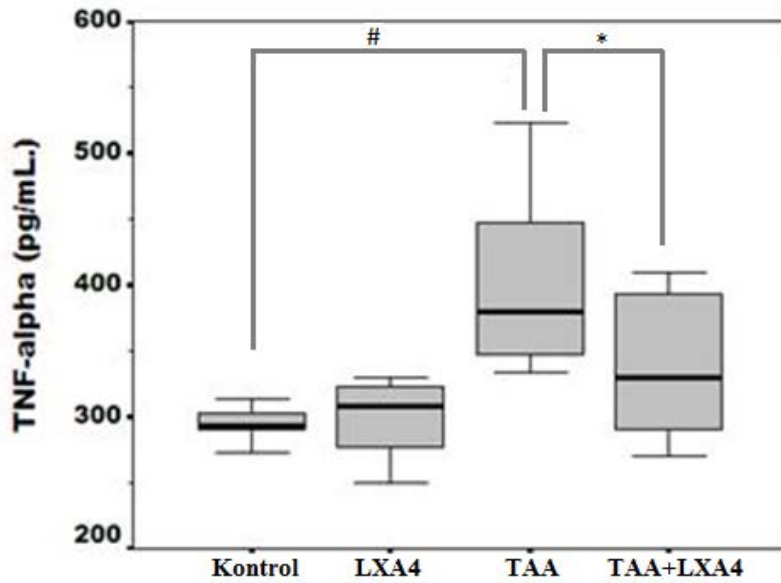
Şekil 4.20. CD4⁺CD127⁺(●) ve CD8⁺CD127⁺ (■) hücre populasyonlarının yüzdesel dağılımı. Her bir deneğe ait veriler ve ortalama değerleri sunulmuştur. *: Populasyon yüzdeselerindeki istatistiksel farkı göstermektedir.



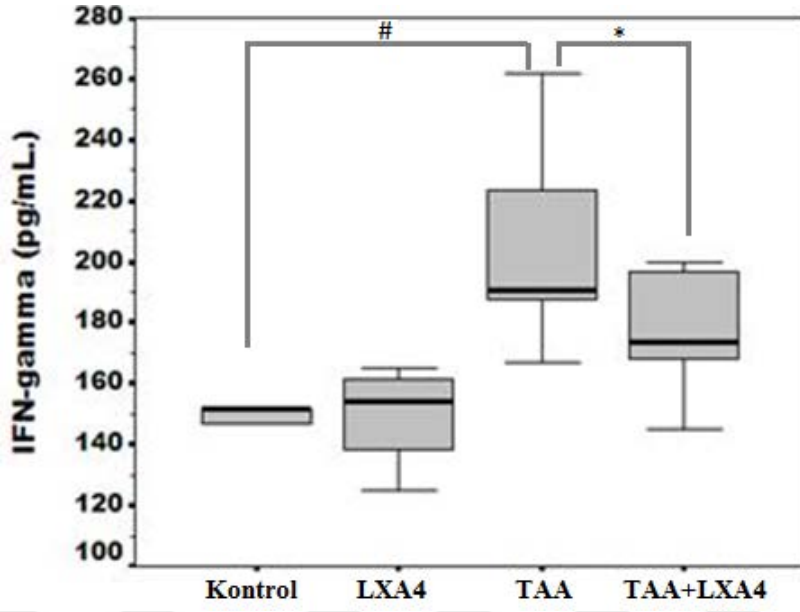
Şekil 4.21. Lenfosit kapısı alındıktan sonra CD4CD127/CD8CD127 populasyon dağılımının temsili histogram görüntüleri.

4.6.2. ELISA Yöntemi ile TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IL-23, IFN- γ Sitokinlerinin Ölçüm Bulguları

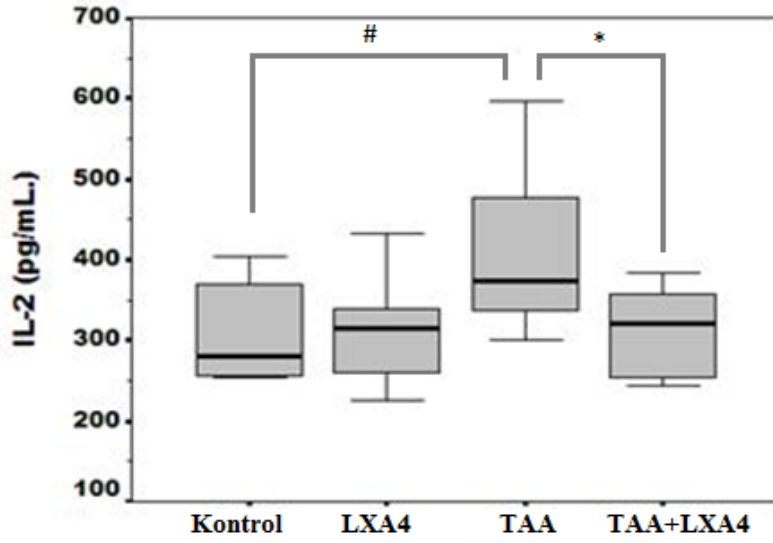
Aktive T lenfosit yüzdeleri belirlendikten sonra sistemik dolaşımında inflamatuvar (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-23) ve anti-inflamatuvar (IL-4, IL-10) sitokin düzeyleri ELISA yöntemiyle araştırıldı. Araştırmamız sonucunda; TAA ile karaciğer fibrozunun oluşturulması TNF- α , IFN- γ , IL-2 düzeylerinde sağlıklı gruba göre belirgin bir artışa neden olmaktadır (Şekil 4.22-23-24). Ne var ki; Th17 yardımcı T lenfosit grubunca salgılanan IL-17 ve Th17 lenfosit grubunun farklılaşmasından sorumlu IL-23 sitokin düzeyleri fibroz grubu ile sağlıklı grup arasında belirgin bir fark göstermemekteydi (Şekil 4.25-26). Anti-inflamatuvar yanıtı veren sitokinlerden olan IL-4 ve IL-10 düzeylerinde ise karaciğer fibroz grubu ile sağlıklı grup arasında belirgin bir fark saptanamadı (Şekil 4.27-28). LXA4'ün karaciğer fibroz grubuna enjekte edilmesi inflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IFN- γ ve IL-2 düzeylerinde belirgin azalmaya neden olmaktadır. Ancak, fibrozis esnasında LXA4 enjeksiyonu Th17 yanıtında etkin olan IL-17 ve IL-23 sitokin düzeylerinde bir değişikliğe neden olmamıştı. Bu aşamada en ilginç sonuç IL-10 sitokin düzey analizinde gerçekleşti. Fibroz grubuna LXA4 enjeksiyonu TAA+LXA4 grubunda tedavi almamış gruba göre belirgin düzeyde yüksek IL-10 saptandı. Ne var ki; LXA4 sağlıklı deneklere enjeksiyonu bu etkiye neden olamadı (Şekil 4.28).



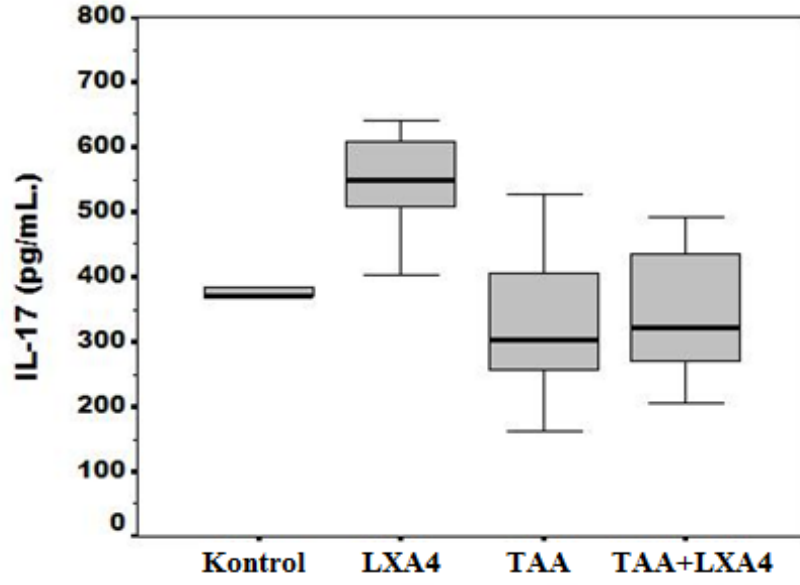
Şekil 4.22. Gruplara göre serum TNF- α düzeyleri. #: Kontrol grubu ile TAA grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). *: TAA grubu ile TAA+LXA4 grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$).



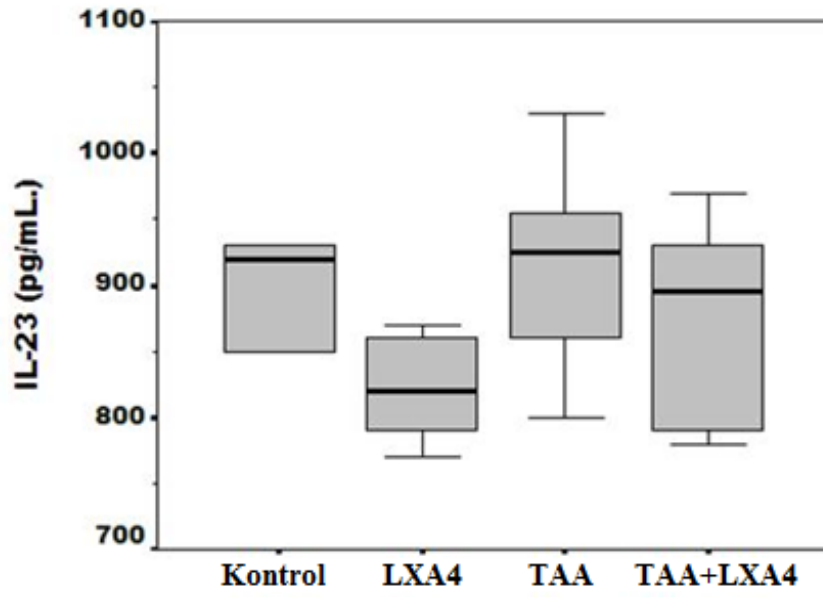
Şekil 4.23. Gruplara göre serum IFN- γ düzeyleri. #: Kontrol grubu ile TAA grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). *: TAA grubu ile TAA+LXA4 grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$).



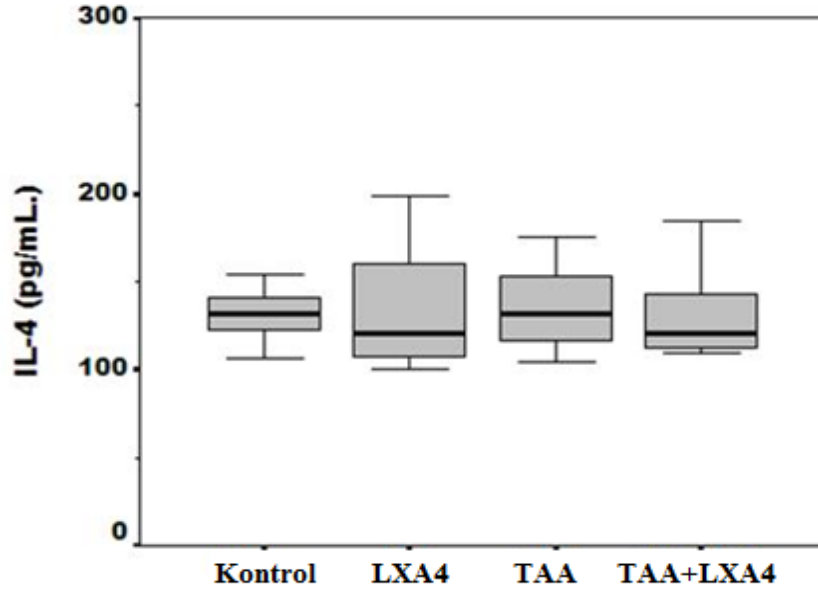
Şekil 4.24. Gruplara göre serum IL-2 düzeyleri. #: Kontrol grubu ile TAA grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). *: TAA grubu ile TAA+LXA4 grubu arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$).



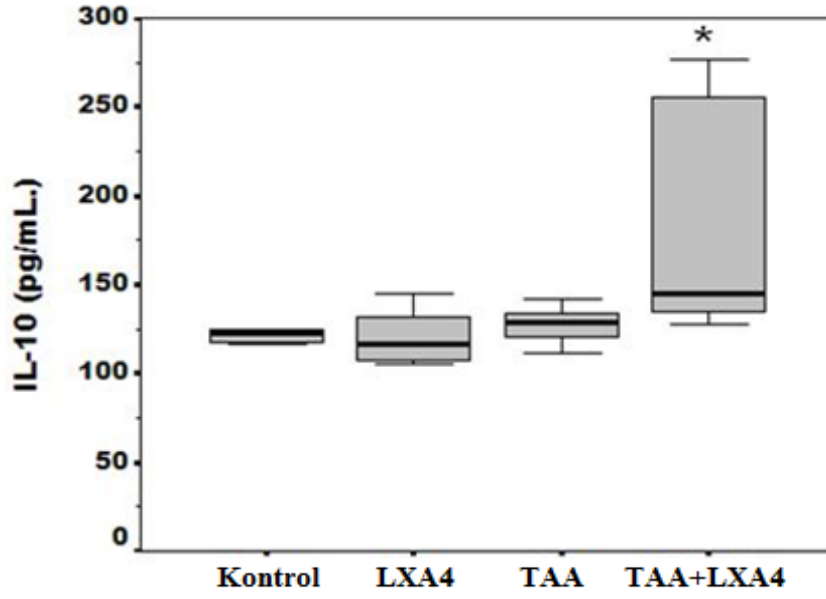
Şekil 4.25. Gruplara göre serum IL-17 düzeyleri



Şekil 4.26. Gruplara göre serum IL-23 düzeyleri.



Şekil 4.27. Gruplara göre serum IL-4 düzeyleri.



Şekil 4.28. Gruplara göre serum IL-10 düzeyleri. *: TAA+LXA4 grubundaki verilerin diğer gruplar ile istatistiksel farkını göstermektedir ($p < 0.05$).

5. TARTIŞMA

Fibrozis, kronik karaciğer hasarı olan hemen hemen tüm hastalarda ortaya çıkan geri çevrilebilir bir yara iyileşme yanıtıdır. Nihayetinde ise hepatik fibrozis, nodül oluşumu ve organ küçülmesi ile ilişkili olan siroza yol açabilmektedir (4). Hepatik fibrozisi durdurmak ve/veya geri döndürmek hepatosellüler karsinomaya ilerlemeyi önlemek için önemli bir yaklaşım olabilir. Şimdiye kadar, tanı ve tedavide belli bir ilerleme olmasına rağmen, karaciğer fibrozisinin çözülmesi için etkili bir tedavi henüz tam olarak belirlenmemiştir. Bu nedenle daha etkili ve güvenilir antifibrozis ilaçların geliştirilmesi çözülmeyi bekleyen önemli bir problemdir (49). Son yıllarda, çalışmalar karaciğer yaralanmasını, inflamasyonu ve fibrozisi sürdüren moleküler mekanizmaları anlamak üzerine odaklanmıştır. Bu mekanizmalar sitokinlerin ve kan hücrelerinin kompleks bir etkileşimini kapsamaktadır (1). İnflamasyon, etkili konak savunmasında anahtar bir süreçtir. Mikrobiyal invazyon ve doku yaralanması için önemli bir yanıt ve lökositlerin aktivasyonu ve bölgeye spesifik toplanmasına göre karakterize edilmektedir. İnflamatuar yanıtların çözülmesi aşırı doku yaralanmasını sınırlayan ve kronik inflamasyonun gelişmesini minimize eden homeostasisin yeniden kurulması için gereklidir ve apoptoziste ve inflammatuar hücrelerin temizlenmesinde olduğu gibi çeşitli hücre tipleri tarafından ifade edilen değişik anti-inflamatuar ve ön-çözücü araçların biyolojik etkilerine bağlıdır. Sürecin herhangi bir adımındaki başarısızlık olası diğer doku yıkımı ile kronik inflamasyona, fibrozis ve nihayetinde organ yetmezliğine neden olabilir. İnflamasyonun başlama fazı esnasında prostaglandinler ve lökotrienleri içeren eikosanoidler, lökositlerin güçlü kemotaktik yanıtına yol açan bir inflammatuar ortamın gelişmesinde lokal aracı olarak önemli rol oynarlar. Bu iki fazlı bir işlemdir; ikinci adım inflamasyonu aktif olarak sınırlayan ve çözülmeyi ilerleten lipid araçların biyosentezi ile birleşmiştir. Ön çözücü araçların yeni sınıfı, ω (omega)-3 yağ asidinden köken alan son zamanlarda keşfedilmiş resolvinler ve protektinler gibi lipoksinleri ve aspirin tetikleyici carbon-15 epimerleri (ATL) içermektedir (7). Çözülme süreci ile ilgili elde edilen bilgiler akuttan kronik inflamasyona geçişi önlemede anahtardır. Çözülmedeki bir başarısızlık kontrol dışı bir inflamasyonun ana nedenidir ve süreklilik gösterebilir. Bilindiği gibi karaciğer fibrozisi de temelde kronik inflamasyonun sonucudur. Bu nedenle, inflamasyonun çözülmesi, karaciğer fibrozisinin ortaya çıkmasını ve gelişmesini inhibe etmek için faydalıdır. LX'ler de anti-inflamasyonda ve çözülme öncesi etkin dönemde fonksiyona sahiptir (49). LXA4 ve onların metabolik olarak

kararlı analogları ise PMN'lerin toplanmasını inhibe eder ve vasküler endotel ve epitelyum hücrelerine nötrofil aracılı doku yaralanmasına karşı koruma sağlarlar (43).

Araştırmamızda LXA4'ün karaciğer fibrozisine etkisi TAA ile uyarılmış fareler üzerinde araştırılmıştır. TAA, deney hayvanlarında karaciğer fibrozisi oluşturmada, karaciğer fibrozisinin altında yatan mekanizmayı araştırmada sıklıkla kullanılan bir kimyasaldır. Kemirgenlerde TAA ile oluşturulan karaciğer fibrozisi ile insandaki karaciğer fibrozisi arasında patolojik olarak benzerlikler görülmektedir (5). Bu anlamda diğer kimyasallar kullanılarak uygulanan modellere göre TAA'nın daha fazla geçerliliği ve kullanım kolaylığı olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda uyguladığımız TAA ile indüklenmiş fare karaciğer fibrozis modelinin hem etik hem de bilimsel anlamda uygun model olması elde ettiğimiz verileri değerli kılmaktadır. TAA ile karaciğer fibrozis modeli oluşturulması sonrasında LXA4'ün uygulandığı tedavi grubunda, LXA4'ün tek başına uygulandığı önleyici grupta ve sağlıklı kontrol grubunda karaciğer fonksiyonu ile ilgili bilgi veren biyokimyasal parametreler (AST, ALT ve ALP düzeyleri) ölçülmüştür. ALT ve AST birçok organ ve dokuda yaygın olarak bulunan hücre içi enzimlerdir. Hepatosit yıkımının artması ile artan permeabilite sonucu bu enzimler hücre zarı dışına çıkar ve serum düzeyleri yükselir. ALP enzimi ise karaciğer, kemik, plasenta, böbrek ve ileal mukozada yüksek miktarda bulunan bir enzimdir (95). Bu enzimler normalde serumda düşük seviyelerde bulunur (96). Bu enzimlerin serum seviyelerindeki değişiklikler karaciğerdeki hasarı yansıtabilmektedir (5). Çalışmamızda AST, ALT ve ALP değerleri; yalnızca TAA uygulanan gruplarda sağlıklı kontrol ve LXA4 uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bu bulgular ışığında TAA'nın düzenli olarak uygulanmasının karaciğerde hasara yol açtığı ve bu hasar sonucunda ise artan permeabilite ile hücre içi enzimler olan AST, ALT ve ALP'nin hücre dışına çıkarak serumdaki konsantrasyonlarının arttığı ve karaciğer fibrozisinin başarılı bir şekilde oluşturulduğu düşünülmektedir. TAA uygulamasından sonra LXA4'ün uygulandığı tedavi gruplarında ise AST, ALP ve ALT değerlerinin TAA grubundan daha düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ise bizde LXA4'ün karaciğerdeki inflamasyonu ve de dolayısıyla hepatosellüler hasarı azalttığı ön düşüncesini oluşturmuştur. Birçok çalışmada gösterilmiştir ki; TAA uygulaması sonrasında oluşturulan fibrozis gruplarındaki farelerin vücut ağırlıklarında bir azalma, karaciğer ağırlıklarında ise kollajen ve ESM'nin birikmesi nedeniyle bir artış meydana gelmektedir (97, 98). Bizim

çalışmamızda ise; deneyin son gününe kadar ölçülen deney hayvanlarının vücut ağırlık ortalamalarının karaciğer ağırlığına oranının analizine bakıldığında; TAA ile karaciğer fibrozisinin oluşturulması deneklerde kontrol grubuna göre belirgin düzeyde vücut/karaciğer ağırlık oranında azalmaya neden olurken, LXA4 enjeksiyonunun bu oranın artmasında belirgin düzeyde etkin olmadığını görmüştür.

Karaciğer dokusunda histolojik değerlendirmede; TAA ile oluşturulan karaciğer fibrozisi belirgin düzeyde erezyonal nekroza, inflamasyona, lobular nekroz ve fibroz oluşumuna neden olmaktadır. TAA ile beraber LXA4 verilmesi ise karaciğerde inflamasyon, erezyonal nekroz, lobular nekroz ve fibroz parametrelerinde TAA grubuna göre belirgin ölçüde azalmaya neden olmaktadır. LXA4'ün TAA kaynaklı karaciğer fibrozunda mononükleer hücre infiltrasyonunu azalttığı, dejenerasyon ve buna bağlı nekrotik yapı oluşumunu belirgin düzeyde azalttığı saptanmıştır. Zhang ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada karbon tetraklorür (CCl₄) uygulanan farelere 1mg/kg dozunda olacak şekilde bir LXA4 reseptör agonisti olan BML-111 verilmiştir. Yapılan biyokimyasal ve histolojik değerlendirme sonucunda ise BML-111 tedavisinin ALT ve AST yüksekliğini belli bir ölçüde azalttığı görülürken, ayrıca CCl₄'ün inflamatuvar hücrelerin akışının olduğu sentrilobular alanlarda ciddi hepatosit nekrozisi meydana getirdiği görülmüştür. Her iki hepatosellüler nekrozis ve lökosit infiltrasyonu BML-111 uygulanan farelerde de çarpıcı bir biçimde azalmıştır (99). Zhou ve arkadaşları 2013 yılında bir LXA4 reseptör agonisti olan BML-111 (5S,6R-trihydroxy-7-heptanoicacid, methyl ester)'in CCl₄ ile karaciğer fibrozu oluşturulmuş sıçanlardaki etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla; BML-111 ratlara 1 mg/kg dozunda hafta iki kez ve dört hafta boyunca uygulanmıştır. Çalışmada; hepatic nekro-inflamasyonu ve fibrozisi belirlemek için histopatoloji ve kollajen miktarları dikkate alınmıştır. BML-111 uygulanmayan yalnızca CCl₄ uygulanan sıçanlarda şiddetli karaciğer yaralanması ve fibrozis geliştiği görülmüş ve bu da hepatositlerin belirgin steatozu, perisellüler ve periportal köprüleşen fibrozis ve karaciğer lobular hasarına göre kanıtlanmıştır. Önleyici ve tedavi gruplarının her ikisinde ise BML-111 uygulamasının karaciğer histolojisindeki değişiklikleri belli bir biçimde azalttığı, hepatic nekro-inflamasyonu iyileştirdiği görülmüştür. Ayrıca, önleyici grubun tedavi grubuna göre daha iyi olduğu görülmüştür (49). El-Agamy ve arkadaşları farede acetaminophen-indüklü akut karaciğer yaralanmasına karşı LXA4 reseptör agonisti olan BML-111'in etkilerini araştırmak amacıyla 1 mg/kg dozunda günde iki kez ve beş gün için farelere

BML-111'i i.p. yoldan enjekte etmişlerdir. Deneyin sonunda ise; BML-111'in acetaminophen indüklü patolojik değişiklikleri önemli ölçüde tersine çevirdiği gözlenmiştir. Ayrıca BML-111 AST, ALT ve ALP artışını da önlemekle birlikte acetaminophen indüklü nekrozis ve inflamasyonu da belirgin bir biçimde iyileştirmiştir (100). Araştırmamızda histolojik incelemeler sonucunda LXA4'ün TAA kaynaklı karaciğer fibrozunda mononükleer hücre infiltrasyonunu azalttığı, dejenerasyon ve buna bağlı nekrotik yapı oluşumunu belirgin düzeyde azalttığı ancak bunun sağlıklı karaciğer düzeyine indirgenemediği saptanmıştır.

Karaciğerin inflamatuvar hastalıklarında; immün aktivasyon ile birlikte T hücresi infiltrasyonu ve bununla birlikte proinflamatuvar ve profibrotik özellikte çeşitli sitokinlerin düzeylerinde artış saptanmaktadır (101, 102). LX'ler ise nötrofillerin aktivasyon durumunu azalttığı gibi aynı zamanda inflamasyonun farklı modellerindeki proinflamatuvar sitokin salınımını da azaltırlar (8). LX'lerin antijen sunan hücre fonksiyonlarını baskıladığı ve sitokinlerin sürdürdüğü immün reaksiyonlarını Th2 yanıtları yönüne doğru devam ettirdiği görülmüştür (103). Th1/Th2 profili karaciğer fibrozisinin gelişmesinde çok önemlidir ve olası bir terapötik hedef sunmaktadır. Ancak; fibrojenesis esnasında Th1/Th2 dengesini düzenlemede işe karışan mekanizmalar henüz tam olarak açık değildir (102). Th1 alt tipi çoğunlukla IL-2, IFN- γ ve TNF- α salgılayan, diğer taraftan Th2 ise daha çok IL-4 ve IL-10 üretmektedir (103). Börgeson ve arkadaşlarının yapmış olduğu deneysel renal fibrozisin oluşturulduğu bir çalışmada, LXA4 tedavisinin, IFN- γ ve TNF- α sitokinlerinin ifadesini azaltarak ve IL-10 seviyelerinin artmasına yol açarak sitokin ifade profilinde bir değişim meydana getirdiği gösterilmiştir (47). Liao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise LXA4'ün sıçan karaciğer transplantasyonunda Th1/Th2 sitokin dengesini değiştirmesi yoluyla akut rejeksiyonu iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada karaciğer yaralanma derecesini ölçmek amacıyla ALT ve AST değerleri de hesaplanmıştır. IFN- γ ve IL-10'un mRNA ve protein ifadeleri gerçek zamanlı PZR, western blot ve ELISA testleri ile belirlenmiştir. Transplantasyon sonrası yapılan incelemelerde; LXA4 grubundaki sağkalımın kontrol grubundan belirgin ölçüde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu dikkat çeken bir akut rejeksiyona sahipken, LXA4 gruplarına ait hepatik dokularda belirli bir reaksiyon saptanmamıştır. Normal tuz uygulanan kontrol grubu ve LXA4 gruplarının serum AST ve ALT değerleri karşılaştırıldığında, LXA4 uygulamasının hepatik doku yaralanmasını iyileştirdiği ve karaciğer fonksiyonunu

ilerlettiği gözlenmiştir. Th1 ilişkili sitokin olan IFN- γ 'nın mRNA ve protein ifadelerinin LXA4 gruplarında büyük ölçüde azaldığı görülmüştür. Th2 ile ilişkili sitokin olan IL-10'un ifadesinin ise normal tuz uygulanan kontrollere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (104). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ELISA ile ölçülen serum TNF- α konsantrasyonları, karaciğer hasarı oluşturulan grup ve hasar sonrasında BML-111 uygulanan grupta, BML-111 tarafından baskılanarak azalmıştır (99). Xia ve arkadaşlarının, tavşanlarda parasetamol indüklü karaciğer hasarını önlemede lipoxin A4'ün rolünü araştırdıkları bir çalışmada TNF- α ifadesi LXA4 uygulanan gruplarda parasetamol uygulanan gruplara göre daha düşük seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Bunun aksine IL-10 seviyelerinin ise LXA4 grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bunun dışında ayrıca LXA4 uygulanan grupların daha yüksek sağ kalım oranlarına sahip olduğu gösterilmiştir. Araştırma sonucunda, Lipoxin A4'ün anti-inflamasyon etkisi bakımından önemli bir rol oynayabilmesinden dolayı, anlamlı biçimde parasetamol indüklü hepatik hasarı azaltabildiği sonucuna varılmıştır (105). Zhangye Xu ve arkadaşları fare endometrium kanseri modelinde LXA4'ün etkilerini çalışmışlar, bu amaçla IL-6, IL-10 ve IFN- γ genlerinin ifadelerini ve ELISA testi ile bu faktörlerin protein seviyelerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucuna göre ise LXA4'ün inflamasyon ile ilgili faktörlerin ifadesini (IL-6, IL-10 ve IFN- γ) aşağı çektiği görülmüştür. Genel olarak; oksidatif stres IL-6 ve IFN- γ 'yı içeren inflamatuvar sitokinleri üretmektedir. Diğer taraftan bu inflamatuvar sitokinler de oksidatif stresi indüklemektedirler. Sonuç olarak, süreç kronik olduğu zaman, oksidatif stres ve inflamatuvar sitokin üretiminin kısır bir döngüsü başlamaktadır (8). El-Agamy ve arkadaşları farede acetaminophen ile uyarılmış akut karaciğer yaralanmasına karşı LXA4 reseptör agonisti BML-111'in etkilerini araştırdıkları çalışmada, acetaminophen indüklemesiyle artan TNF- α seviyelerinin BML-111 uygulaması sonucunda önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir. Biyokimyasal, histolojik bulgular ve TNF- α 'nın ELISA bulguları BML-111'in farede karaciğer yaralanmasına karşı hepatoprotektif etki gösterdiğini desteklemektedir. Bu koruyucu etkiler ise, BML-111'in inflamatuvar ROS üretimine karşı koyma ve sitokin etkilerini düzenleme yeteneklerine atfedilmektedir (100). Xi-Hong Ye ve arkadaşları ise bir LXA4'ün stable sentetik analogu olan 5 (S), 6 (R)-lipoxin A4 methyl ester (LXA4 ME)'in sıçanlardaki serebral iskemi reperfüzyon hasarına karşı etkisini incelemişlerdir. LXA4 ME'li tedavi, nötrofil infiltrasyonunu baskılamış ve TNF- α sitokin ifadesinin azalmasına yol açmıştır ve ayrıca iskemik

beyinde antiinflamatuvar sitokinler IL-10 ve TGF- β 1'in ifadelerini arttırmıştır. Bu sonuçlar göstermiştir ki; LXA4 ME tedavisi serebral iskemi reperfüzyon hasarına karşı güçlü nöro koruyucu etkiye sahiptir ve bu etkileri ise anti-inflamatuar özellikleri ile ilişkili olabilmektedir (50). IL-10, B lenfositler üzerinde hücre proliferasyonunu ve Ig sekresyonunu uyarıcı etki yapmaktadır. IL-10 sitotoksik T hücreler için büyüme faktörü olarak etki etmektedir. Böylelikle IL-10, hücrel immünite ve allerjik inflamasyonla ilişkili sitokinleri inhibe ederken humoral ve sitotoksik immün yanıtı uyarmaktadır (106). Bizim çalışmamızda ise; sistemik dolaşımda pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar yanıtı yön veren sitokinlerin (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IL-23) düzeyleri tespit edilmiştir. Fibrozis gruplarında TNF- α , IFN- γ , IL-2 düzeyleri sağlıklı gruba göre belirgin şekilde artarken, fibrozis grubuna LXA4 enjeksiyonu TNF- α , IFN- γ ve IL-2 düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. IL-10 seviyeleri ise fibrozis grubuna LXA4 enjeksiyonu yapılan grupta tedavi almamış fibrozis grubuna göre belirgin düzeyde yüksek olarak saptanmıştır. Bilindiği gibi TAA ve CCl4 gibi ajanlarla indüklenen hepatosit proliferasyonu yüksek derecede inflamatuvar bir ortamda ve nekroze bir yanıt olarak ortaya çıkmaktadır. Kupffer hücrelerinden TNF- α gibi araçların salınmasıyla yaralanma daha da şiddetlenmektedir. Örneğin; Simeonova ve arkadaşları TNFR1 knockout farelerde CCl4 gibi hepatotoksik ajan enjeksiyonundan sonra hepatik inflamasyonun azaldığını bulmuşlardır (107). Literatürdeki pek çok çalışma ile uyumlu bulduğumuz bu sonuçlar, anti-inflamatuar özelliklere sahip olması nedeniyle LXA4'ün koruyucu etki gösterdiği düşüncesini desteklemektedir. Ancak, fibrozis esnasında LXA4 enjeksiyonu Th17 yanıtında etkin olan IL-17 ve IL-23 sitokin düzeylerinde bir değişikliğe neden olmamıştır.

LXA4'ün karaciğer fibrozisi esnasında rejenerasyondan sorumlu genlerin üzerine etkisi ilk defa bizim çalışmamızda gösterilmiştir. Wuestefeld ve arkadaşları *MKK4* gen ifadesinde azalma, buna karşın *MKK7* ve *ATF2* genlerinin ifadesindeki artışın karaciğer hücre yenilenme kapasitesini arttıracak yönde etkide bulunduğunu belirtmektedirler. Bu çalışmada, *MKK4* baskılanmasının *ATF2*'nin aktivasyonuna bağlı ve *MKK7*'nin ifadesinin artması yoluyla hepatosit rejenerasyonunun arttığı vurgulanmıştır. Araştırmacılar, çalışmalarında RNAi aracılığıyla *MKK4* ifadesini baskılayarak hepatositlerin rejeneratif kapasitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca *MKK4* knockdown edilmesi daha hızlı hücre döngüsüne giriş ve ilerlemenin artması yoluyla hepatosit rejenerasyonunun arttığı belirtilmiştir (78). Bu analizden yola çıkarak

araştırmamızda fibrozis varlığında ifade düzeyi artan *TGF-β1* ve rejenerasyondan sorumlu *MKK4*, *MKK7* ve *ATF2* gen ifadeleri araştırılmıştır. Karaciğer fibrozisi esnasında *TGF-β1* geninin karaciğer hücrelerince ifade edilme düzeyi artmakta ve bu da karaciğer hasarına işaret etmektedir. Araştırmamız sonucunda LXA4'ün *TGF-β1* ifade düzeyini fibroz grubuna göre belirgin düzeyde düşürdüğü bulunmuştur.

Zhou ve arkadaşlarının BML-111'in etkisini araştırdıkları çalışmada ise, *TGF-β1*'in fibrojenizde önemli bir rol oynaması nedeniyle sıçanlarda western blot yöntemi ile protein seviyelerine bakılmıştır ve CCl4 grubunda daha yüksek yoğunlukta olmakla birlikte önleyici grupta *TGF-β1* seviyelerinin azalmış olduğu görülmüştür. ELISA yöntemi ile sonuçlarında da görülmüştür ki, önleyici ve tedavi grubunda BML-111, *TGF-β1* seviyelerini inhibe etmiştir. Sonuç olarak; Zhou ve arkadaşları araştırmaları sonucunda, BML-111'in inflamasyonu bloke etme yoluyla CCl4 indüklü hepatik fibrozisi önleyebildiğini fakat daha ileri araştırmalarla bu konunun desteklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır (49). Çalışmamızda hücre yenilenmesine bakıldığında ise LXA4 ile tedavi uygulanmış grupta p38 ve JNK yolları ile ilişkili olan ve bu yolların hepatosit proliferasyonu ve karaciğer rejenerasyonu üzerinde antagonistik olarak etki ettiği bilinen *MKK4* gen ifadesi azalırken *MKK7* ve *ATF2* gen ifadelerinde ne sağlıklı gruba göre ne de fibroz grubuna göre belirgin bir fark saptanmamıştır. Nishina ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada belirtildiği gibi *MKK4* ve *MKK7* yetişkin farede tüm organlarda her zaman ifade edilmesine rağmen; *MKK7*'nin karaciğerdeki mRNA ifade seviyeleri *MKK4*'ten daha düşüktür (108). Sonuç olarak LXA4'ün anti-inflamatuar ve ön çözücü etkisine bağlı olarak meydana gelen *MKK4* ifadesindeki azalmanın *ATF2* ve *MKK7*'den bağımsız yollarla gerçekleştiği ve hepatosit rejenerasyonunda *ATF2* ve *MKK7* genlerinin düşük etkiye sahip oldukları düşünülmektedir. Ayrıca ileriki araştırmalarda gruplar arasında, karaciğerdeki apoptotik hepatosit hücre sayısındaki farklılıklar belirlenerek *MKK4* ifadesi ile uyumluluğu test edilebilir. Bazı biyokimyasal çalışmalar ise; *MKK4*/JNK yolağının T hücre reseptör-CD3 ve CD28 ko-stimülasyonu tarafından aktive olduğunu ve IL-2 üretimi ve proliferasyonu için gerekli TCR-CD3 ve CD28 ko-stimülasyon sinyalinin birleşmesinde bu yolağın muhtemel bir rolü olduğunu göstermektedir (80). LXA4 tedavi grubunda *MKK4* gen ifadesinin düşük olması, aktive T lenfosit yüzdesinin düşük olmasını da açıklamaktadır. Gelecekteki bir çalışmada karaciğer dokusunun yanı sıra T lenfosit hücrelerinde de *MKK4* gen ifadesine bakılması yararlı olacaktır. Ayrıca *ATF2* ve *MKK7*

ifadelerinin kontrol ve fibrozis grupları arasında anlamlı bir değişikliğe neden olmaması karaciğerdeki ifadelerinin düşük olabilirliği ile açıklanabilirken, bundan sonraki yapılacak çalışmalarda periferal kan hücrelerindeki ifadelerinin de dikkate alınması gerektiği önemli bir noktadır.

Deneysel karaciğer fibrozis modellerinde ve insan hepatik fibrozisinde TGF- β 'nın mRNA seviyesinin belirgin olarak arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Yang ve arkadaşlarının çalışmasında HSH aktivasyonunun hepatik fibrozisin gelişmesinde önemli role sahip olduklarını ve TGF- β 1'in HSH aktivasyonunda ana stimüle edici faktör olduğu belirtilmiştir (109).

Garcia ve arkadaşları fibrotik karaciğerdeki reaktif oksijen ürünlerinin artmış üretimini, kollajen sentezini artıran TGF- β geninin ifadesindeki düzensizliğe karşı bir cevap olabileceğini rapor etmişlerdir. TGF- β 'nın artan ifadesinin baskılanması fibrotik dokularda önem taşımaktadır. TGF- β 'nın potansiyel olarak fibrojenik etkileri ekstrasellüler matriks proteinlerin ifadesinin stimülasyonu, hepatik stellat hücrelerde metalloproteinaz doku inhibitörlerin ifadesini artırarak matriks metalloproteinazlar tarafından parçalanmasını azaltması ve ekstrasellüler matriks reseptör ifadesinin düzenlenmesini içermektedir (110).

Çalışmamızda ayrıca periferal lenfoid organ olan dalaktaki lenfosit ve lenfosit alt gruplarının yüzdesel dağılımı ile bu hücrelerin ne kadarının aktive olduğu analiz edilmiştir. LXA4 enjeksiyonu sonrası fibroz kaynaklı inflamasyonun tamamıyla ortadan kalkmadığı sistemik immün yanıtta rol alan hücrelerin fenotip analizinde de saptanmıştır. Fibroz esnasında T-lenfosit düzeyinde sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin düzeyde azalma saptanırken LXA4 ile tedavi T-lenfosit yüzdesi sağlıklı kontrol düzeyine yükseltmektedir. B-lenfosit düzeyinde fibroz esnasında artış saptanırken, LXA4 ile tedavi bu düzeyi sağlıklı kontrol düzeyine çekmektedir. Novobreantseva ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada karaciğerde fibrozis gelişiminde B-lenfositlerin etkin rol oynadığı gösterilmiştir (111). LXA4 tedavisinde B-lenfosit düzeyinde azalmanın tespit edilmesi ilk defa çalışmamızda saptanmıştır. Ne var ki bu azalmanın karaciğerde de olup olmadığı ileride planlanan çalışmalarımızda gösterilebilecektir. İmmünfenotipleme çalışmasında elde ettiğimiz bir diğer sonuç ise aktive T-lenfosit düzeylerinde saptanmıştır. Fibrozis esnasında CD4+ ve CD8+ T-lenfosit aktivasyonu sağlıklı kontrol grubuna göre artmaktadır. LXA4 ile tedavi sonrası CD8+ T-lenfosit aktivasyonu fibrozis grubuna göre azalma gösterirken sağlıklı gruba göre yüksek

düzyeyde olduğu saptanmıştır. Belki de bu yúzden histolojik analizde de saptadığımız gibi karaciğer dokusunda LXA4 tedavisi sonrası inflamasyon varlığı devam etmektedir. Bu konuda da ileri çalışmalara ve özellikle karaciğer organı úzerinde yoğunlaşılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Benzer çoğu deneysel fibrozis modellerinde, CD4+ T hücresler hastalığın ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. Özellikle CD4+ T hücre yanıtının tipi çok önemlidir. Fibrojenizin Th2 CD4+ T hücre yanıtının gelişmesi ile güçlü şekilde ilişkili olduğu çeşitli sitokin defektli farelerde yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (112).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğer fibrozisi günümüzde engellenebilir ve geri dönebilir bir süreç olarak düşünülmektedir. Karaciğer fibrozisi ile ilgili çalışmalar ise bu sürecin anlaşılması ve engellenmesi alanında yoğunlaşmaktadır. Bu süreçte rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri ise inflamatuvar yanıttır. LXA4 ise anti-inflamatuvar etki gösteren doğal bir moleküldür. Bu çalışmada farelerde TAA uygulaması ile oluşturulan karaciğer fibrozisi üzerine LXA4'ün iyileştirici etkinliğinin olup olmadığı biyokimyasal, histolojik, immünolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda LXA4'ün, karaciğer fibrozisinde TAA'nın neden olduğu histolojik, biyokimyasal, immünolojik ve moleküler bulguları iyileştirici etkisi olduğu yönünde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, bundan sonraki aşamalarda LXA4'ün etki mekanizmalarının araştırılması, karaciğer fibrozisine karşı kullanımına yönelik çalışmaların daha ileri düzeylerde ve farklı parametrelerle detaylı olarak yapılması ve karaciğer fibrozisindeki immün etkileşimlerin genetik kontrollerinin de aydınlatılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Henderson Neil C, Iredale John P. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science* 2007, 112 (5): 265-80.
2. Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007, 22 (s1): S79-S84.
3. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005, 115 (2): 209-18.
4. Friedman SL. Hepatic fibrosis—Overview. *Toxicology* 2008, 254 (3):120-9.
5. Salguero Palacios R, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, Gressner OA, Weiskirchen R, Graf J. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Laboratory Investigation* 2008, 88 (11): 1192-203.
6. Bannenberg GL. Therapeutic Applicability of Anti-Inflammatory and Proresolving Polyunsaturated Fatty Acid-Derived Lipid Mediators. *Scientific World Journal* 2010, 10: 676-712.
7. Maderna P, Godson C. Lipoxins: revolutionary road. *Br J Pharmacol* 2009, 158 (4): 947-59.
8. Xu Z, Zhao F, Lin F, Chen J, Huang Y. Lipoxin A4 Inhibits the Development of Endometriosis in Mice: The Role of Anti-Inflammation and Anti-Angiogenesis. *Am J Reprod Immunol* 2012, 67 (6): 491-7.
9. Çimen A. *Anatomi*, 6. Baskı ed. Bursa, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları, 1996.
10. Talley NJ LK, Vargas HE. *Practical Gastroenterology And Hepatology : Liver And Biliary Disease*. USA, Wiley-Blackwell 2010: p3-15.
11. Alçay Çağlar YE. Azotlu Gübre Uygulamasının Fare Karaciğer ve Böbrek Dokusu Üzerine Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi. *Kafkas Üniv Fen Bil Enst Derg* 2010, 3 (2): 1-10.
12. Hill C. *Anatomy and physiology. Liver Diseases: An Essential Guide for Nurses and Health Care Professionals*. Oxford, Wiley-Blackwell 2009: p1-5.
13. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*. Malatya, Medipress Matbaacılık Yayıncılık Ltd 2009: 107-20.
14. Sherlock S. *Karaciğer ve Safra Yolları Hastalıkları*. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1975.

15. Tucer D. Kronik Viral Hepatitli Hastalarda Noninvaziv Serum Belirteçlerinin Karaciğer Fibrozis Derecesini Belirlemedeki Rollerini. Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı. Yandal Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi, 2008.
16. Dodig M, Mullen KD. New mechanism of selective killing of activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003 Oct, 38 (4): 1051-3.
17. Duval F, Moreno-Cuevas JE, Gonzalez-Garza MT, Rodriguez-Montalvo C, Cruz-Vega DE. Liver fibrosis and protection mechanisms action of medicinal plants targeting apoptosis of hepatocytes and hepatic stellate cells. *Adv Pharmacol Sci* 2014.
18. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013 Oct, 14 (10): 996-1006.
19. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008 May, 134 (6): 1641-54.
20. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol* 2015 May-Jul, 44-46: 147-56.
21. Ahmad A, Ahmad R. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic approaches. *Saudi J Gastroenterol* 2012 May-Jun, 18 (3): 155-67.
22. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011 Apr, 25 (2): 195-206.
23. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014 Mar, 14 (3): 181-94.
24. Temel S, Gökçimen A. Karaciğer Yıldızsı Hücreleri (Ito Hücreleri). *T Klin Tıp Bilimleri* 2002, 22: 342-8.
25. Arias IM. The Liver: Biology and pathobiology. New York, Raven Press; 1982.
26. DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology* 2015 May, 61 (5): 1740-6.
27. Savaş C. Hepatik Fibrozisin Patogenezi. *J Int Med Sci* 2005, 1(16): 5-10.
28. Rauterberg J, Voss B, Pott G, Gerlach U. Connective tissue components of the normal and fibrotic liver. I. Structure, local distribution and metabolism of

- connective tissue components in the normal liver and changes in chronic liver diseases. *Klinische Wochenschrift* 1981 Jul 15, 59 (14): 767-79.
29. Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999 Jul, 14 (7): 618-33.
 30. Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000, 35 (9) : 665-72.
 31. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis tissue repair* 2013, 6 (1): 19.
 32. Duval F, Moreno-Cuevas JE, Gonzalez-Garza MT, Maldonado-Bernal C, Cruz-Vega DE. Liver fibrosis and mechanisms of the protective action of medicinal plants targeting inflammation and the immune response. *Int J Inflamm* 2015.
 33. de Torres M, Poynard T. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 2003 Jan-Mar, 2 (1): 5-11.
 34. Xu R, Zhang Z, Wang FS. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Cell Mol Immunol* 2012 Jul, 9 (4): 296-301.
 35. Yükselen V. Karaciğer Fibrozisi: Tanım ve Etioloji. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005, 1 (16): 1-4.
 36. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011, 6: 425-56.
 37. Jeong WI, Gao B. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 Mar, 23 Suppl 1: 112-8.
 38. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007 Mar, 117 (3): 539-48.
 39. Göral V. Karaciğer Fibrozisinde Tedavi. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005, 1 (16): 44-8.
 40. Schwab JM, Serhan CN. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2006 Aug, 6 (4): 414-20.

41. Ramon S, Bancos S, Serhan CN, Phipps RP. Lipoxin A(4) modulates adaptive immunity by decreasing memory B-cell responses via an ALX/FPR2-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 2014 Feb, 44 (2): 357-69.
42. Maldonado-Perez D, Golightly E, Denison FC, Jabbour HN, Norman JE. A role for lipoxin A4 as anti-inflammatory and proresolution mediator in human parturition. *FASEB J* 2011 Feb, 25 (2): 569-75.
43. Filep JG, Khreiss T, Jozsef L. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in neutrophil adhesion and signal transduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005 Sep-Oct, 73 (3-4): 257-62.
44. Serhan CN, Chiang N. Lipid-derived mediators in endogenous anti-inflammation and resolution: lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins. *Scientific World Journal* 2002 Jan 22; 2: 169-204.
45. McMahon B, Godson C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 Feb, 286 (2): 189-201.
46. Kuhn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 2006 Jul, 45 (4): 334-56.
47. Borgeson E, Docherty NG, Murphy M, Rodgers K, Ryan A, O'Sullivan TP, Guiry PJ, Goldschmeding R, Higgins DF, Godson C. Lipoxin A(4) and benzo-lipoxin A(4) attenuate experimental renal fibrosis. *FASEB J* 2011 Sep, 25 (9): 2967-79.
48. Huang YH, Wang HM, Cai ZY, Xu FY, Zhou XY. Lipoxin A4 inhibits NF-kappaB activation and cell cycle progression in RAW264.7 cells. *Inflammation* 2014 Aug, 37(4): 1084-90.
49. Zhou XY, Yu ZJ, Yan D, Wang HM, Huang YH, Sha J, Xu FY, Cai ZY, Min WP. BML-11, a lipoxin receptor agonist, protected carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Inflammation* 2013 Oct, 36 (5): 1101-6.
50. Ye XH, Wu Y, Guo PP, Wang J, Yuan SY, Shang Y, Yao SL. Lipoxin A4 analogue protects brain and reduces inflammation in a rat model of focal cerebral ischemia reperfusion. *Brain research* 2010 Apr 6, 1323: 174-83.
51. Rodriguez M. Characterization Of Eicosanoid Lipid Mediators And Identification of Regulatory Mechanisms In The Non-Obese Diabetic Mouse. Doctor of Philosophy, USA: University of Florida, 2006.

52. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005 Dec, 6 (12): 1191-7.
53. Bannenberg G, Moussignac RL, Gronert K, Devchand PR, Schmidt BA, Guilford WJ, Bauman JG, Subramanyam B, Perez HD, Parkinson JF, Serhan CN. Lipoxins and novel 15-epi-lipoxin analogs display potent anti-inflammatory actions after oral administration. *Br J Pharmacol* 2004 Sep, 143 (1): 43-52.
54. Das U. HLA-DR expression, cytokines and bioactive lipids in sepsis. *Arch Med Sci* 2014 May 12, 10 (2): 325-35.
55. Zhang B, Jia H, Liu J, Yang Z, Jiang T, Tang K, Li D, Huang C, Ma J, Shen GX, Ye D, Huang B. Depletion of regulatory T cells facilitates growth of established tumors: a mechanism involving the regulation of myeloid-derived suppressor cells by lipoxin A4. *J Immunol* 2010 Dec 15, 185 (12): 7199-206.
56. Zhou M, Chen B, Sun H, Deng Z, Andersson R, Zhang Q. The protective effects of Lipoxin A4 during the early phase of severe acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2011 Feb, 46 (2): 211-9.
57. Karşıyaka Hendek M, Erdemir EO. Periodontal Hastalık ve Lipoksinler. *KÜ Tıp Fak Derg* 2012, 14 (2): 24-32.
58. Chiang N, Serhan CN, Dahlen SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE, Shimizu T, Yokomizo T, Brink C. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev* 2006 Sep, 58 (3): 463-87.
59. Parkinson JF. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006 Apr, 5 (2): 91-106.
60. Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S. Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J Immunol* 2000 Mar 1, 164 (5): 2660-6.
61. Scully M, Gang C, Condron C, Bouchier-Hayes D, Cunningham AJ. Protective role of cyclooxygenase (COX)-2 in experimental lung injury: evidence of a lipoxin A4-mediated effect. *J Surg Res* 2012 Jun 1, 175 (1): 176-84.
62. Machado FS, Johndrow JE, Esper L, Dias A, Bafica A, Serhan CN, Aliberti J. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med* 2006 Mar, 12 (3): 330-4.

63. Das UN. Radiation resistance, invasiveness and metastasis are inflammatory events that could be suppressed by lipoxin A4. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2012 Jan-Feb, 86 (1-2): 3-11.
64. Shimizu S, Ogawa T, Seno S, Kouzaki H, Shimizu T. Pro-resolution mediator lipoxin A4 and its receptor in upper airway inflammation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2013 Nov, 122 (11): 683-9.
65. Walker J, Dichter E, Lacorte G, Kerner D, Spur B, Rodriguez A, Yin K. Lipoxin a4 increases survival by decreasing systemic inflammation and bacterial load in sepsis. *Shock* 2011 Oct, 36 (4): 410-6.
66. Motohashi E, Kawauchi H, Endo H, Kondo H, Kitasato H, Kuramoto H, Majima M, Unno N, Hayashi I. Regulatory expression of lipoxin A4 receptor in physiologically estrus cycle and pathologically endometriosis. *Biomed Pharmacother* 2005 Jul, 59 (6): 330-8.
67. Medeiros R, Rodrigues GB, Figueiredo CP, Rodrigues EB, Grumman A, Jr., Menezes-de-Lima O, Jr., Passos GF, Calixto JB. Molecular mechanisms of topical anti-inflammatory effects of lipoxin A(4) in endotoxin-induced uveitis. *Mol Pharmacol* 2008 Jul, 74 (1): 154-61.
68. Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR, Colgan SP, Madara JL. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry* 1995 Nov 7, 34 (44): 14609-15.
69. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* 2008, 3: 279-312.
70. Guilford WJ, Parkinson JF. Second-generation beta-oxidation resistant 3-oxa-lipoxin A4 analogs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005 Sep-Oct, 73 (3-4): 245-50.
71. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunology* 2007, 25: 101-37.
72. Pouliot M, Clish CB, Petasis NA, Van Dyke TE, Serhan CN. Lipoxin A(4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry* 2000 Apr 25, 39 (16): 4761-8.

73. Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005 Sep-Oct, 73 (3-4): 141-62.
74. Karp CL, Flick LM, Park KW, Softic S, Greer TM, Keledjian R, Yang R, Uddin J, Guggino WB, Atabani SF, Belkaid Y, Xu Y, Whitsett JA, Accurso FJ, Wills-Karp M, Petasis NA. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat Immunol* 2004 Apr, 5 (4): 388-92.
75. Bonnans C, Vachier I, Chavis C, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Lipoxins are potential endogenous antiinflammatory mediators in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Jun 1, 165 (11): 1531-5.
76. Pajaud J, Ribault C, Ben Mosbah I, Rauch C, Henderson C, Bellaud P, Aninat C, Loyer P, Morel F, Corlu A. Glutathione transferases P1/P2 regulate the timing of signaling pathway activations and cell cycle progression during mouse liver regeneration. *Cell Death Dis* 2015, 6: e1598.
77. Uçar A. The Expression of Bcl-2 Family Of Genes During Liver Regeneration. Degree of Master, Bilkent University 2001.
78. Wuestefeld T, Pesic M, Rudalska R, Dauch D, Longerich T, Kang TW, Yevsa T, Heinzmann F, Hoenicke L, Hohmeyer A, Potapova A, Rittelmeyer I, Jarek M, Geffers R, Scharfe M, Klawonn F, Schirmacher P, Malek NP, Ott M, Nordheim A, Vogel A, Manns MP, Zender L. A Direct in vivo RNAi screen identifies MKK4 as a key regulator of liver regeneration. *Cell* 2013 Apr 11, 153 (2): 389-401.
79. Doğan AL, Güç D. Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004, 35 (1): 34-42.
80. Cuenda A. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4). *Int J Biochem Cell Biol* 2000 Jun, 32 (6): 581-7.
81. Emekli S. Endometriyum Hücrelerinde Lityumun Etkilerinin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Bilim Üniversitesi, 2010.
82. Bilgen T. Malign Epitelyal Over Tümörlerinde Metastaz Supresör Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi ve MDR1 Geninin İlaç Dirençliliği Üzerine Etkisinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Antalya: Akdeniz Üniversitesi, 2008.

83. Kragelj J, Palencia A, Nanao MH, Maurin D, Bouvignies G, Blackledge M, Jensen MR. Structure and dynamics of the MKK7-JNK signaling complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 Mar 17, 112 (11): 3409-14.
84. Wang X, Destrumont A, Tournier C. Physiological roles of MKK4 and MKK7: insights from animal models. *Biochim Biophys Acta* 2007 Aug, 1773 (8): 1349-57.
85. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudla B. Transforming growth factor beta1 (TGF β) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol* 2013, 64 (5): 384-96.
86. Luther NC. The Role of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 During Oval-Cell Mediated Liver Regeneration. USA: University of Florida 2009.
87. Wettter AJNJV. Pathogenesis of Liver Fibrosis and Regeneration in the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). Raleigh, North Carolina: North Carolina State University 2012.
88. Yu T, Li YJ, Bian AH, Zuo HB, Zhu TW, Ji SX, Kong F, Yin de Q, Wang CB, Wang ZF, Wang HQ, Yang Y, Yoo BC, Cho JY. The regulatory role of activating transcription factor 2 in inflammation. *Mediators Inflamm* 2014, 2014: 950472.
89. Diring J, Camuzeaux B, Donzeau M, Vigneron M, Rosa-Calatrava M, Kedinger C, Chatton B. A cytoplasmic negative regulator isoform of ATF7 impairs ATF7 and ATF2 phosphorylation and transcriptional activity. *PloS one* 2011, 6 (8): e23351.
90. Jang JH, Kang KJ, Kim YH, Kang YN, Lee IS. Reevaluation of experimental model of hepatic fibrosis induced by hepatotoxic drugs: an easy, applicable, and reproducible model. *Transplant Proc* 2008 Oct, 40(8): 2700-3.
91. Hajovsky H, Hu G, Koen Y, Sarma D, Cui W, Moore DS, Staudinger JL, Hanzlik RP. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2012 Sep 17, 25 (9): 1955-63.
92. Stankova P, Kucera O, Lotkova H, Rousar T, Endlicher R, Cervinkova Z. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicol In Vitro* 2010 Dec, 24 (8): 2097-103.

93. Shirai M, Arakawa S, Miida H, Matsuyama T, Kinoshita J, Makino T, Kai K, Teranishi M. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J Toxicol Pathol* 2013 Jun, 26 (2): 175-86.
94. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001 Dec, 25 (4): 402-8.
95. Savaş N. Karaciğer Fonksiyon Testi Bozukluğuna Yaklaşım. *Turkish Family Physician* 2014, 5 (3): 1-7.
96. Ahmet UYGUN ZP. Viral Hepatit Dışı Serum Transaminaz Düzeyinde Artışa Neden Olan Hastalıklar. *Güncel Gastroenteroloji* 2009, 13 (4): 211-24.
97. Chen IS, Chen YC, Chou CH, Chuang RF, Sheen LY, Chiu CH. Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. *J Sci Food Agric* 2012 May, 92 (7): 1441-7.
98. Ramadan A. Saad MFE-B, Abir A. Shalaby. Attenuation of acute and chronic liver injury by melatonin in rats. *Journal of Taibah University for Science* 2013, 7 (2): 88-96.
99. Zhang L, Wan J, Li H, Wu P, Jin S, Zhou X et al. Protective effects of BML-111, a lipoxin A(4) receptor agonist, on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Hepatol Res* 2007 Nov, 37 (11): 948-56.
100. El-Agamy DS, Makled MN, Gamil NM. Protective effects of BML-111 against acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *J Physiol Biochem* 2014 Mar, 70 (1): 141-9.
101. Demir N. Kronik Hepatit C Virüs Enfeksiyonu Bulunan Hastaların Serumlarında Bazı Sitokin Düzeylerinin Elıza Yöntemiyle Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2008.
102. Xing ZZ, Huang LY, Wu CR, You H, Ma H, Jia JD. Activated rat hepatic stellate cells influence Th1/Th2 profile in vitro. *World J Gastroenterol* 2015 Jun 21, 21 (23): 7165-71.
103. Zhou XL, Yang QS, Ni SZ, Tu XP, Zhao Y, Xu B, Pan ZQ, Shen J. Protective effects of lipoxin A4 in testis injury following testicular torsion and detorsion in rats. *Mediators Inflamm* 2014, 2014: 898056.

104. Liao W, Zeng F, Kang K, Qi Y, Yao L, Yang H, Ling L, Wu N, Wu D. Lipoxin A4 attenuates acute rejection via shifting TH1/TH2 cytokine balance in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 2013 Jul-Aug, 45 (6): 2451-4.
105. Xia J, Zhou XL, Zhao Y, Zhu YQ, Jiang S, Ni SZ. Roles of lipoxin A4 in preventing paracetamol-induced acute hepatic injury in a rabbit model. *Inflammation* 2013 Dec, 36 (6): 1431-9.
106. Aksu K. Aspirin Duyarlı Astımlı Hastalarda, Aspirin Desensitizasyon Tedavisinin Periferik Kandaki CD4 Ve CD8 Lenfositlerden IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ Salınımına ve Plazmadaki Lipoksin A4 ve 15-Epi-Lipoksin A4 Seviyelerine Etkisi. Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2012.
107. McMahan RS. The Role of TNF-alpha Converting Enzyme in Liver Injury and Regeneration USA: University of Washington 2011.
108. Nishina H, Vaz C, Billia P, Nghiem M, Sasaki T, De la Pompa JL and et al. Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4. *Development* 1999 Feb, 126 (3): 505-16.
109. Yang AT, Hu DD, Wang P, Cong M, Liu TH, Zhang D and et al. TGF-beta1 Induces the Dual Regulation of Hepatic Progenitor Cells with Both Anti- and Proliver Fibrosis. *Stem cells international* 2016, 2016: 1492694.
110. Seydel GŞ. Hepatosellüler Karsinomaya Neden Olan Genlerin Gen Ekspresyonunun Kantitatif Ölçümü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2011.
111. Novobrantseva TI, Majeau GR, Amatucci A, Kogan S, Brenner I, Casola S and et al. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J Clin Invest* 2005 Nov, 115 (11): 3072-82.
112. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature reviews Immunology* 2004 Aug, 4 (8): 583-94.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Elçin Latife KURTOĞLU
Doğum Yeri : MALATYA
Doğum Tarihi : 04.04.1984
E-mail : elcinkurtoglu@hotmail.com

Eğitim Durumu:

Lisans : Karadeniz Teknik Üniversitesi, Giresun Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2002-2006)
Y. Lisans : İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D. (2007-2010)
Doktora : İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D. (2010-2016)
Y.L. Tezi : Takrolimus'un Genotoksik Etkileri
Y.L. Tez Danışmanı : Doç.Dr. Şengül YÜKSEL
D. Tezi : Karaciğer Fibrozu Esnasında Lipoksin A4'ün Karaciğer Hücre Rejenerasyonu ve İmmün Yanıt Üzerine Etkisinin Araştırılması
D. Tez Danışmanı : Prof.Dr. Başak KAYHAN
Yabancı Dil : İngilizce

Akademik Görevler

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi (2010-2016)

Eserler Listesi

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Kayhan B, **Kurtoglu EL**, Taskapan H, Piskin T, Sahin I, Oflu G, Unal B. HLA-A, -B, -DRB1 Allele and Haplotype Frequencies and Comparison With Blood Group Antigens in Dialysis Patients in the East Anatolia Region of Turkey. Transplant Proc. 2013 Jul-Aug;45(6):2123-8.
2. Erdogan Kayhan G, Gul M, Kayhan B, Gedik E, Ozgul U, **Kurtoglu EL**, Durmus M, Ersoy MO. Dexmedetomidine ameliorates TNBS induced colitis by inducing immunomodulator effect. Journal of Surgical Research. 2013 Aug;183(2):733-41.
3. **Kurtoğlu E.L**, Yüksel Ş. Genotoxic Effects of Tacrolimus on Human Lymphocyte Cells. Russian Journal of Genetics, 2012, Vol. 48, No. 6, pp. 651–655.
4. Yüksel Ş, Yeşilada E, Gülbay G, **Kurtoğlu E.L**, Üren N, Savacı S. Protective Effect Of Myricetin Against E2-Induced Genotoxic Damage In Human Lymphocytes. Fresenius Environmental Bulletin. Volume 21 – No 4a. 2012.
5. Öztürk F, Yüksel Ş, Toy E, **Kurtoğlu E.L**, Küçük E.B. Genotoxic effects of banding procedure with different orthodontic cements on human oral mucosa cells. Turk J Med Sci, 42, (2012), 1157-1165.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Kayhan B, **Kurtoğlu EL**. A DNA aptamer binds to hCD3+ T-lymphocytes and granulocytes but does not bind to hCD19+ B-lymphocytes. 3rd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress (MIMIC-III). April 27-30, 2016, Belek, Antalya, Turkey.
2. Gulbay G, Yesilada E, **Kurtoğlu EL**. Frequency of Cystic Fibrosis Mutation in Malatya: A Retrospective Study. The 2nd Middle East Molecular Biology Congress 2015 – Istanbul, 17-20 September 2015.
3. Yesilada E, Gulbay G, Tekedereli İ, **Kurtoglu EL**. Frequencies of CYP2D6*4 and HLA-B27 allele in city of Malatya. The 2nd Middle East Molecular Biology Congress 2015 – Istanbul, 17-20 September 2015.

4. **Kurtoglu EL**, Savacı S. Investigation of Y chromosome microdeletions in infertile male patients by multiplex PCR. The 2 nd Middle East Molecular Biology Congress 2015 – Istanbul, 17-20 September 2015.
5. **Kurtoglu EL**, Gulbay G, Yesilada E, Kayhan B, Tekedereli İ. HLA-DQ2/DQ8 Genotypes in Patients Prediagnosed as Celiac Disease. 5th International Congress of Molecular Medicine, İzmir, 20-22 May 2015.
6. **Kurtoglu EL**, Gulbay G, Yesilada E, Kayhan B, Tekedereli İ. HLA-B27 Frequency in Patients Prediagnosed as Ankylosing Spondylitis in Malatya: A Retrospective Study. 5th International Congress of Molecular Medicine, İzmir, 20-22 May 2015.
7. Öztürk F, Yüksel Ş, Toy E, **Kurtoğlu EL**, Küçük E.B. Genotoxic Effects Of Banding Procedures With Different Orthodontic Cements On Human Oral Mucosa Cells. European Orthodontic Society, 88th Congress Santiago de Compostela, Spain, 18-23 June 2012.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **Kurtoglu EL**, Gülbay G, Yeşilada E, Tekedereli İ. Ankilozan Spondilit Düşünülen Olgularda HLA-B*27 ve CYP2D6*4 Allellerinin Sıklığı. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2016; 5 (2): 1-4.
2. Kayhan B, Kayabaş Ü, Kölgeliler S, Otlu B, Gül M, **Kurtoğlu EL**, Bayındır Y. Mystery of Immune Response in Relapsed Brucellosis: Immunophenotyping and Multiple Cytokine Analysis Running. Mediterranean Journal Infection, Microbes and Antimicrobials 2016; vol 5: 1-13
3. **Kurtoglu EL**, Savacı S, Ekici C, Yaşar E, Beytur A, Yeşilada E. 46,XX Testiküler Bozukluğu Olan Erkek Hasta: Bir Olgu Sunumu. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2015; 4 (2): 23-26.
4. **Kurtoglu EL**, Tekedereli İ. DNA Onarım Mekanizmaları. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi 2015; 4 (3): 169-177.
5. **Kurtoglu EL**, Şahin İ, Taşkapan H, Yeşilada E, Kayhan B. Diyaliz Hastalarında Panel Reaktif Antikor Düzeyinin Tespiti: İki Yöntem ve İki Analizin Karşılaştırılması. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2015; 4 (1): 22-25.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Yiğitcan B, Gül M, Kayhan B, **Kurtoğlu EL**, Bahar L. BALB/C türü farelerde TAA indüklü-testis hasarına karşı Lipoksin A4'ün koruyucu etkileri. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı). 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Çeşme, İzmir.
2. Yiğitcan B, Gül M, **Kurtoğlu EL**, Kayhan B. BALB/C türü farelerde TAA indüklü-böbrek hasarına karşı Lipoksin A4'ün koruyucu etkileri. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı). 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Çeşme, İzmir.
3. Ekici C, **Kurtoğlu EL**, Savacı SS, Yüksel Ş, Korkmaz S, Yeşilada E. Prevalence of Klinefelter Syndrome in Malatya between 2014 and 2015. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri, Turkey.
4. Ekici C, **Kurtoğlu EL**, Yüksel Ş, Savacı SS, Korkmaz S, Yeşilada E. Distribution of pericentric inversion chromosome 9 and association with certain diseases in city of Malatya and around. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri, Turkey.
5. **Kurtoğlu EL**, Savacı SS. 46,XX karyotipli erkek hastanın moleküler ve sitogenetik analizi: bir olgu sunumu. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Fethiye Ölüdeniz, 27-30 Ekim 2015.
6. Yeşilada E, Gülbay G, **Kurtoğlu EL**, Erkurt MA. Venöz Tromboz ön tanısı almış hastalarda Faktör V (G1691A), Protrombin (G20210A) ve Metilentetrahidrofolat Reduktaz (MTHFR) (C677T) gen mutasyonlarının sıklığı. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Fethiye Ölüdeniz, 27-30 Ekim 2015.
7. Savacı SS, **Kurtoğlu EL**. İnfertil erkek hastaların genetik olarak değerlendirilmesi. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Fethiye Ölüdeniz, 27-30 Ekim 2015.
8. Kayabaş Ü, Hopoğlu SM, **Kurtoğlu EL**, Kayhan B, Kölgelir S, Toplu S, Çağaşar Ö, Aksöz S, Bayındır Y, Otlu B. İmmün Yanıtı Yönlendiren STRE-1, sHLA-G5 ve HLA-DR faktörlerinin akut brusellozlu hastalardaki düzeylerinin araştırılması. XVII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Antalya, 25-29 Mart 2015.

9. Kayhan B, **Kurtoglu EL**, Otlu G, Piskin T, Sahin I, Unal B, Taskapan H. Doğu Anadolu Bölgesinde Diyaliz Hastalarında HLA-Sınıf-1 ve HLA-Sınıf-2 Sıklığı ve Kan Grubu İle İlişkisinin Araştırılması. 22. Ulusal İmmünoloji Kongresi, İzmir, 2013.
10. Kayhan B, Kayabaş Ü, **Kurtoglu EL**, Pişkin T, Ünal B, Taşkapan H, Şahin İ. Travma Kaynaklı Akut Renal Rejeksiyona İmmünolojik Parametreler İle Yaklaşım. 22. Ulusal İmmünoloji Kongresi, İzmir, 2013.
11. Kayhan B, Kayabaş Ü, **Kurtoglu EL**, Kolgelier S, Otlu B, Gül M, Bayındır Y, Doğanay M. Relaps Bruselloz Hastalarında İnflamatuar ve Anti-İnflamatuar Sitokin Düzeyleri. 22. Ulusal İmmünoloji Kongresi, İzmir, 2013.
12. Erdogan Kayhan G, Kayhan B, Gül M, Gedik E, Ozgul U, **Kurtoglu EL**, Durmus M, Ersoy Mo. İnflamasyon Esnasında Bir Anestezi Ajan Olan Deksmetomidin'in Sistemik Ve Lokal İmmün Yanıtta Etkisi. 22. Ulusal İmmünoloji Kongresi, İzmir, 2013.
13. **Kurtoglu EL**, Yüksel Ş. Takrolimus'un Genotoksik Etkileri. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi. Antalya, 2011.
14. Kayhan B, **Kurtoglu EL**, Piskin T, Ünal B, Taşkapan H, Şahin İ, Tabel Y, Bayındır Y, Toprak H. Diyaliz Hastalarında Panel Reaktif Antikor İncelemesi: İki Yöntem ve İki Analizin Karşılaştırılması. 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi, Marmaris, 2011.
15. Yüksel Ş, Yeşilada E, Gülbay G, **Kurtoglu EL**, Üren N, Savacı S. Estradiol-17β İle İndüklenmiş Genotoksiteye Karşı Myrisetin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi, Bodrum-Muğla, 2009.

Katıldığı Kongreler, Kurslar ve Sempozyumlar

1. Tıbbi Genetik ve Genetik Uygulamalar Kongresi, Kayseri Erciyes Üniversitesi, 11-13 Şubat 2016, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
2. İNÜBAT Bilim Günleri-5: Genetik Semineri, 16 Ocak 2016, İnönü Üniversitesi, Malatya.
3. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası katılımlı). Fethiye-Ölüdeniz. 27-30 Ekim 2015.
4. The 2 nd Middle East Molecular Biology Congress, İstanbul Congress Center, 17-20 September 2015, İstanbul.

5. 5th International Congress of Molecular Medicine, Dokuz Eylül University, 20-22 May 2015, İzmir.
6. TÜBİTAK 1000-Üniversitelerin Araştırma Proje Potansiyelinin Geliştirilmesine Yönelik Destek Programı, Proje Yazma Eğitimi. 12-13 Ocak 2015, İnönü Üniversitesi, Malatya
7. TÜBİTAK 1000-Üniversitelerin Araştırma Proje Potansiyelinin Geliştirilmesine Yönelik Destek Programı, Proje Yazma Eğitimi. 12-14 Aralık 2014, İnönü Üniversitesi, Malatya
8. TÜBİTAK 2237-Proje Eğitimi Etkinliklerini Destekleme Programı, Proje Yazma Eğitimi. 27-29 Ocak 2014, İnönü Üniversitesi, Malatya
9. Türk İmmünoloji Derneği Bölgesel Sempozyumları IX. 15-17 Mayıs 2014, İnönü Üniversitesi, Malatya
10. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011, Antalya
11. I. Kök Hücre Uygulama ve Araştırmaları Konferansı, Erciyes Üniversitesi, 07-09 Ekim 2011, Kayseri
12. Hibridoma Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi Kursu, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, 19-23 Eylül 2011, Kocaeli
13. TÜBA II. Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, Ankara Üniversitesi, 24-25 Haziran 2011, Ankara.
14. Moleküler İmmünoloji Teknikleri Kursu, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, 23-27 Mayıs 2011, Kocaeli
15. Deney Hayvanları Kursu, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 14-22 Şubat 2011, Malatya.
16. Burslardan Yararlanma ve Bilimsel Proje Hazırlama Çalıştayı, İnönü Üniversitesi, 9-10 Ocak 2010, Malatya

Projelerde Yaptığı Görevler

1. Karaciğer Fibrozu Esnasında Lipoksin A4'ün Karaciğer Hücre Yenilenmesi Ve İmmün Yanıt Üzerine Etkisinin Araştırılması. TUBİTAK Proje No: 114S161. **Araştırmacı.** Proje Tarihi: 2014-07-15
2. İmmün Yanıtı Yönlendiren sTREM-1, sHLA-G5 ve HLA-DR Faktörlerinin Akut Brusellozlu Hastalardaki Düzeylerinin Araştırılması BAP Proje No: 2011/176 **Araştırmacı.** Proje Tarihi: 2011-01-01

3. Sepsis ve Ağır Sepsis Tanısında sTREM-1, HLA-DR ve HLA-G Düzeylerinin ve Aralarındaki İlişkinin Araştırılması. BAP Proje No: 2011/162 **Araştırmacı**. Proje Tarihi: 2011-01-01
4. Takrolimus'un Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. BAP Proje No: 08-69. **Araştırmacı**. Proje Tarihi: 2010-09-05



EK-2. DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL ONAYI



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 26-02-2014
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2014/A-15
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : BALB/c
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soy : Fare
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 55 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 6-8 haftalık/18-20 g

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Başak KAYHAN'ın yürütücüsü olduğu "Karaciğer Fibrozu Esnasında Lipoksin A4'ün Karaciğer Hücre Rejenerasyonu ve İmmün Yanıt Üzerine Etkisinin Araştırılması" isimli 2014/A-15 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Doç.Dr.M.Ahif ALADAĞ Başkan	 Prof. Dr. Nigar YARDI- Üye	 Doç. Dr. Yılmaz ÇİGREMİŞ Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
 Salih AVCI Sivil Üye	 Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	