T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE KARACİĞER VE UZAK ORGAN HASARINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ROLÜ

Uzm. Biol. Erkan ERMİŞ

ANKARA-2016

T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE KARACİĞER VE UZAK ORGAN HASARINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ROLÜ

Uzm. Biol. Erkan ERMİŞ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Hasibe VERDİ

ANKARA-2016

ONAY SAYFASI

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Erkan Ermiş tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/10/2016

Tez Konusu: "Karaciğer İskemi Reperfüzyon Modelinde Karaciğer ve Uzak Organ Hasarında Endoplazmik Retikulum Stresinin Rolü"

TEZ DANIŞMANI: Yrd. Doç. Dr. Hasibe VERDİ

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. F. Belgin Ataç	Başkent Üniversitesi
Prof. Dr. Şefik Güran	Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Yrd. Doç. Dr. Hasibe Verdi	Başkent Üniversitesi

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun ..07../..10.. / 2016 tarih ve ....160.... Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Rengin ERDAL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tüm hayatım boyunca ,büyük bir sabırla her türlü sorunumla yakından ilgilenen maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan canım aileme…

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübesini, sabrını ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocalarım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ'a ve Tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hasibe VERDİ'ye ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Yahya Ekici'ye…

Eğitimim süresince her türlü desteği veren, bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı bölüm hocalarım Prof. Dr. Meral TUNCER, Prof. Dr. Remzi ERDEM, Doç. Dr. Müge TECDER-ÜNAL ve Doç. Dr. Tolga Reşat AYDOS'a…

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışma şansı bulduğum, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarım Uzm. Biol. Pınar BAYSAN ve Uzm. Biol. Yaprak Yalçın'a'

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan çalışma arkadaşlarım Dr. Oğuzhan Ekin EFE ve Biol. Seda KURŞUNLU'ya

Gazi Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Güldal ESENDAĞLI YILMAZ'a

Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve değerli arkadaşım Utku HORZUM'a

Ve biran olsun desteğini benden esirgemeyen biricik eşim Diğdem YÖYEN-ERMİŞ'e

Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Amaç: Karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarı, pringle manevrası gerektiren karaciğer cerrahisinde ve karaciğer transpantasyonunda geçici iskemi ve sonrasında dolaşımın tekrar sağlanmasıyla oluşmaktadır. Reperfüzyon sırasında açığa çıkan serbest oksijen radikalleri iskemi/reperfüzyon hasarında önemli rol oynamaktadır. Ortaya çıkan bu serbest radikallerin de etkisiyle endoplazmik retikulumda biriken katlanmamış ya da hatalı katlanmış proteinler sonucu endoplazmik retikulum stresi tetiklenmektedir. Bu tez kapsamında karaciğerde oluşan hasarla birlikte hem karaciğerde hem de akciğer, böbrek, beyin gibi uzak organlardaki endoplazmik retikulum stresinin varlığının ve hücre ölümü üzerindeki rolünün araştırılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve yöntem: Çalışmamızda ağırlıkları 180-300 gr arasında değişen 15 adet Wistar Albino cinsi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastlantısal olarak 3 gruba ayrıldı. Grup 1: İskemi/reperfüzyon: Sıçanlar, orta hat insizyonu ile açılarak karaciğere giden hepatik portal ven ve hepatik arter bulldog klemp ile kapatıldı. 60 dk iskemi süresi sonunda, 60 dk reperfüzyona bırakılmışdı. 60 dk'nın sonunda ise sıçanlar sakrifiye edilip karaciğer, akciğer, böbrek ve beyin dokuları alındı. Dokuların bir kısmı patoloji için %10'luk formaldehitde saklanıp diğer kısımları ise RNA izolosyonu için, RNAlater'da saklanıp -80 ºC ye kaldırıldı. Grup 2: Sham: sıçanlar yine orta hat insizyonu ile açılarak 120 dk bekletilip, yine patoloji ve RNA izolasyonu için karaciğer, akciğer, beyin ve böbrekleri alındı. Grup 3: Kontrol: Bu gruptaki sıçanlara hiçbir işlem uygulanmayıp, yine karaciğer, akciğer, beyin ve böbrek dokuları patoloji ve RNA izolasyonu için alındı. Toplanan tüm dokulardan, bir kısmı histopatolojik incelemeler için %10'luk formaline alındı. Bir kısmı ise RNA izolasyonu için kullanıldı. Elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilip, light cycler 480 cihazında ER stres genleri olan GRP78, PERK, ATF6 ve CHOP ifadelenmelerine bakıldı. Sonuçlar istatiksel olarak student- t testi ile değerledirildi. $p \leq 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: Karaciğer, akciğer, böbrek ve beyinde ER stres gen ifadelerinde sham grubuna göre belli oranda bir artış gözlenirken istatiksel olarak anlamlı bulunamadı. Karaciğerde ATF6, PERK ve CHOP genlerinde, aynı zamanda akciğer, böbrek ve beyinde CHOP ifadelenmelerinde istatiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. Ayrıca histopatolojik incelemeler sonucunda İskemi/reperfüzyon grubunda, hepatosit kordonlarında daralma ve hepatoselüler kayıp ile karakterize parankim hücre zedelenmesi ve nötrofil lökosit infiltrasyonu görüldü.

Sonuç: Karaciğer I/R hasarı sonrası karaciğer yanı sıra akciğer, böbrek ve beyin gibi uzak organlarda ER stresinin etkisi gözlendi. Bunun sonucu olarak ER stresinin I/R hem lokal hem de uzak organlarda etkili bir rol oynadığı ve bu stresi azaltmak adına yapılacak olan çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelime: Endoplazmik retikulum stresi, Karaciğer iskemi /reperfüzyon hasarı, katlanmamış protein yanıtı, Uzak organ hasarı

ABSTRACT

Aim: Liver ischemia / reperfusion injury, occurs in pringle maneuver requiring liver surgery and liver transplantation by transient ischemia, and after that re-establishment of circulation. Free oxygen radicals, which emerge during reperfusion, play an important role in ischemia / reperfusion injury. With the effects of these free radicals, unfolded or missfolded proteins in endoplasmic reticulum can trigger endoplasmic reticulum stress. Them aim of this study to understand role of endoplasmic reticulum stress in cell death and the presence of this stress in both liver and in distant organs such as lung, kidney, brain.

Material and Method: Total 15 adult male Wistar Albino rats, weight between 180-300 gr, was used. Rats were randomized into 3 groups. Group 1: Ischemia / reperfusion: Rats were opened with midline incision and hepatic portal vein and the hepatic artery were closed with a bulldog clamp. At the end of 60 minutes ischemia period, 60 minutes of reperfusion was applied. At the end of reperfusion; rats were sacrified and their liver, lung, kidney and brain tissues were collected. Some of these tissues were stored for pathology in 10% formaldehyde and the remaining tissues were stored at -80 ºC in RNA later for RNA isolation. Group 2: Sham: rats were opened with midline incision and after waiting for 120 minutes they were sacrified and their liver, lung, kidney and brain tissues were collected for pathology and RNA isolation. Group 3: Control: No procedures were applied to this group, and again their liver, lung, kidney and brain tissues were collected for pathology and RNA isolation. Some of these collected tissues were taken into 10% formaldehyde for histopathological studies and the remaining parts were used for RNA isolation. RNAs were converted to cDNA and the expression levels of ER stress genes, GRP78, PERK, ATF6 and CHOP, were examined with lightcycler 480 device. Results were evaluated with student-t test $p \leq 0.05$ was accepted as statistically significant.

Results: There was a slight increase in the expression levels of ER stress genes in liver, lung, kidney and brain when copared with sham group but this difference was not statistically significant. There was a statistically significant increase for the expression levels of ATF6, PERK and CHOP genes in liver and the expression level of CHOP gene in lung, kidney and brain. Moreover as a result of histopathological studies; there was parenchymal cell injury and neutrophil leukocytes infiltration which was characterized with narrowing of hepatocytes cords and hepatocellular loss in ischemia reperfusion group.

Conclusion: After liver I/R injury; effect of ER stress was observed in distant organs such as lung, kidney and brain in addition to liver. As a result of this we understand that ER stress after I/R can effect both local and distant organs and this study will set light to further studies for reducing this stress.

Keywords: Endoplsmic reticulum stress, Liver ischemia/reperfusion injury, Unfolded protein response, Remote organ damage

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ONAY SAYFASI i
TEŞEKKÜR ii
ÖZET iii
ABSTRACT iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ v
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
TABLOLAR DİZİNİ ix
RESİMLER DİZİNİ x
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarı 4
2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi 5
2.3. Katlanmamış Protein Yanıtı Sinyal Yolakları 9
2.3.1. PERK (PKR-like eukaryotik iniation factor 2α kinase) Sinyal Yolağı 9
2.3.2. ATF6 (activating transcription factor 6) Sinyal Yolağı 10
2.3.3. IRE1 (inositol requering enzyme 1) Sinyal Yolağı 11
2.4. Endoplazmik Retikulum Stresiyle İndüklenen Apoptoz Yolakları 11
2.4.1. (CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) Homolog Protein) CHOP İndüksiyonu 12
2.4.2. (c-jun NH2- terminal kinaz) JNK Aktivasyonu 12
2.4.3. Kaspaz Aktivasyonu 13
3. GEREÇ ve YÖNTEM 14
3.1. Dokudan RNA İzolasyonu 15
3.3. cDNA Sentezi 18
3.4. Gen İfadelenmesinin Saptanması 18
3.5. Histopatolojik İnceleme 19
4. BULGULAR 20
4.1. Organlara Göre Er Stres Genleri İfadelenme Düzeyleri 20
4.2. Grp 78 İfadelenmesi 20
4.3. Chop İfadelenmesi 22

4.4. Perk İfadelenmesi 25
4.5. Atf6 İfadelenmesi 27
4.6. İskemi/Reperfüzyon Grubu Sıçanlar Arası Chop Karşılaştırılması 30
4.7. Histopatolojik Bulgular 31
4.8. Karaciğer Hepatik Hasar Durumu 31
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 37
KAYNAKLAR 41

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

I/R:	İskemi/reperfüzyon
ER:	Endoplazmik retikulum
KPY:	Katlanmamış protein yanıtı
IRE-1:	İnositol requering enzyme 1
PERK:	PKR-like eukaryotik iniation factor 2α kinase
ATF 6:	Activating transcription factor 6
GRP78:	Glucose-regulated protein
ROT:	Reaktif oksijen türleri
ARDS:	Akut respiratuvar distres sendromu
TNF-α:	Tümör nekrosiz faktör
eIF2α:	Eukaryotic Initiation Factor 2
XBP1:	x-box protein 1
ERAD:	ER aracılıklı degredasyonunda
Atg:	Autophagy releated proteins
PI3K:	Phosphatidylinositide 3-kinas
LC3:	Light Chain 3
APE1:	Aminopeptidaz 1
3MA:	3-metiladenin
ERSE:	ER stres elementleri
EDEM:	ER degradation enhancing- α mannosidase-like protein
CHOP:	CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) Homolog Protein
JNK:	c-jun NH2- terminal kinaz
GADD153:	Growth arrest and DNA-damage inducible gene 153
GADD34:	Growth arrest and DNA-damage inducible gene34
BCL2:	B-cell lymphoma 2
TRAF2:	TNF reseptör ilişkili faktör 2
BBA:	Büyük büyütme alanı
H&E :	Hematoksilen - Eozin
SV:	Santral ven
PA:	Portal alan
ALT:	Alanin aminotransferaz
AST:	Aspartat aminotransferaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. I/R hasarı metabolizması 4
Şekil 2.2. Endoplazmik Retikulum stresi 6
Şekil 2.3. Katlanmamış protein yanıtında rol alan proteinler 9
Şekil 4.1. Organlar arası GRP78 ifadelenmesi (iskemi ve sham grubunun kontrol grubuna göre oranları) 20
Şekil 4.2. Karaciğer GRP78ifadelenmesi 20
Şekil 4.3. Akciğerde GRP78ifadelenmesi 21
Şekil 4.4. Beyin GRP78 ifadelenmesi 21
Şekil 4.5. Böbrek GRP78 ifadelenmesi 22
Şekil 4.6. Organlar arası CHOP ifadelenmesi (iskemi ve sham grubunun kontrol grubuna göre oranları) 22
Şekil 4.7. Karaciğer CHOP ifadelenmesi 23
Şekil 4.8. Akciğer CHOP ifadelenmesi 23
Şekil 4.9. Beyin CHOP ifadelenmesi 24
Şekil 4.10. Böbrek CHOP ifadelenmesi 24
Şekil 4.11. Organlar arası PERK ifadelenmesi (iskemi ve sham grubunun kontrol grubuna göre oranları) 25
Şekil 4.12. Karaciğer PERK ifadelenmesi 25
Şekil 4.13. Akciğer PERK İfadelenmesi 26
Şekil 4.14. Beyin PERK İfadelenmesi 26
Şekil 4.15. Böbrek PERK İfadelenmesi 27
Şekil 4.16. Organlar arası ATF6 ifadelenmesi (iskemi ve sham grubunun kontrol grubuna göre oranları) 27
Şekil 4.17. Karaciğer ATF6 ifadelenmesi 28
Şekil 4.18. Akciğer ATF6 ifadelenmesi 28
Şekil 4.19. Beyin ATF6 ifadelenmesi 29
Şekil 4.20. Böbrek ATF6 ifadelenmesi 29
Şekil 4.21. İskemi/Repefüzyon grubu sıçanlar arasındaki Chop ifadelenmelerinin kontrol grubuna göre oranlarının farklılıkları. 30

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Dokulardan elde edilmiş RNA miktarları ve 260/280 absorbans oranları 17
Tablo 4.1. İskemi/reperfüzyon grubu (1-6), Sham Grubu (7-12) , Kontrol (13-15), ... 31

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Karaciğer iskemisi (Pringle manevrası), hepatik arter ve portal ven klemplemesi 14

Resim 3.2. 60 dk karaciğer iskemisi sonrası karaciğer dokusunda gözle görülebilen hasar 15

Resim 3.3. Gen ifadelenmesinin saptanmasında kullanılan Light Cycler 480 Florasan/zaman ve sıcaklık/zaman grafiği. 18

Resim 3.4. Light cycler 480 programında hedef gen ve referans genlerin dizaynı 19

Resim 4.1. A. İskemi reperfüzyon grubu, Karaciğer parankimi (H&E x100) B: Sham grubu, Karaciğer parankimi (H&E x100) C: Kontrol grubu, normal karaciğer parankimi (H&E x100) 1-10-16 32

Resim 4.2. A. İskemi reperfüzyon grubu, portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu (H&E x400) B: İskemi grubu, portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu (H&E x1000) 2-3 32

Resim 4.3. A. İskemi reperfüzyon, santral ven çevresinde (Zon 3) belirgin konjesyon (H&E x200) B: İskemi reperfüzyon grubu, santral ven çevresinde (Zon 3) belirgin konjesyon (H&E x400) (SV: santral ven) 33

Resim 4.5. A: İskemi reperfüzyon, tek hücre nekrozları (H&E x400) B: İskemi reperfüzyon grubu, Karaciğer parankiminde sinüzodal dilatasyon, asiner transformasyon ve hepatosit kordonlarında daralma (H&E x100) 8-9 34

Resim 4.6. A: Sham grubu, portal alan çevresi (H&E x400) B: Sham grubu, bir portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu (H&E x400) 11-12(PA: portal alan) 34

Resim 4.7. A: Sham grubu, santral ven çevresi (Zon 3) (H&E x200) B: Sham grubu, santral ven çevresi (Zon 3) (H&E x400) C: Sham grubu, Hepatositlerde belirgin hidropik dejenerasyon (H&E x400) 13-14-15(SV: santral ven) 35

Resim 4.8. A: Kontrol grubu, santral ven çevresi (Zon 3) (H&E x200) B: Kontrol grubu, santral ven çevresi (Zon 3) (H&E x400) 19-20(SV: santral ven) 35

Resim 4.9. A: Kontrol grubu, bir portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu (H&E x400) B: Kontrol grubu, Hepatositlerde hafif hidropik dejenerasyon (H&E x400) 18-21 36

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, arteriyal veya venöz kan akımının kesilmesine ya da azalmasına bağlı olarak doku ve organların kanlanmasının ve oksijenlenmesinin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Reperfüzyon ise iskemi sonucu tıkanan bu damarların tekrar açılmasıyla dokuya kan akımının geri döndüğü durumdur. Ancak iskemik dokudaki reperfüzyon, tek başına iskemi ile oluşan hasara göre daha ciddi hasarlara sebep olabilmektedir. Reperfüzyondaki hasarda daha çok serbest radikaller rol oynamaktadır.[1, 2]

Karaciğer iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, hepatik travma, karaciğer transplantasyonu ve rezeksiyonu gibi klinik durumlarda görülebilmektedir. Bu gibi durumlarda kanamanın engellenebilmesi için hepatik pedikül klempleme (Pringle Manevrası) yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulanan bu yöntemle, hepatik arter ve portal ven klemplenmesi ile iskemi, klempin kaldırılmasıyla ise reperfüzyon oluşmaktadır.[3]

İskemik dokunun reperfüzyonla beraber gördüğü hasar akciğer, kalp, karaciğer, böbrek, beyin ve barsak gibi organlarda ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Fakat yine de I/R hasarının fizyopatolojisi henüz aydınlatılamamıştır. İskemi reperfüzyon hasarında serbest radikaller, polimorf nükleer lökositlerin aktivasyonu, kompleman sistemi gibi sistemlerin rol aldığı bilinmektedir. Böylelikle sistemik bir inflamatuvar cevapla birlikte hem lokal hem de uzak organlarda hasar oluşturabilmektedir.[2, 4, 5]

Endoplazmik Retikulum (ER), sekretuar ve membran proteinlerinin, ve lipitlerin sentezlendiği organeldir. Protein fonksiyonu için önemli birçok post translasyonel modifikasyon ER'da gerçekleşir. ER, aynı zamanda hücre içi kalsiyum depolanması ve lipit biyosentezi gibi fonksiyonlara katkıda bulunmaktadır.[6, 7]

ER, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasını katalizleyen, disülfit bağları oluşumuna katılan, hücre içi homeostazı sağlamak için protein kalite kontrolünü düzenleyen moleküler şaperonlara sahiptir. Çeşitli stres durumlarında moleküler şaperonlar, ER'de protein katlanma kapasitesini artırmak, protein translasyonun geçici olarak durmasını engellemek için Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrolü Sistemini uyarırlar. ER kalite kontrol siteminden geçen, doğru katlanmış proteinler, çeşitli organellere, hücre yüzeyine ya da hücreler arası boşluğa gönderilir.[6, 7]

Proteinlerin katlanması, hata olasılığı yüksek olan karmaşık bir süreçtir. N-bağımlı glikolizasyon, hipoksi, oksidatif stres, kalsiyum dengesinin bozulması, enfeksiyonlar ve sıcaklık gibi stres faktörleri ER fonksiyonu etkiler. ER fonksiyonunun bozulması,

katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikmesine neden olur. Bu gerçekleştiğinde Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY), katlanmamış proteinler tarafından oluşan aşırı yükü en aza indirmek için aktive edilir. KPY geçici olarak protein sentezini durdurur ve katlanma kapasitesini artırarak, degredasyon yoluyla yanlış katlanmış protein yükünü azaltma yoluna gider. Buna rağmen ER fonksiyonunda önemli ölçüde bozulma devam ederse, ER stres kaynaklı apoptoz yolakları aktive edilir.[6, 8, 9]

KPY, endoplazmik retikulum membranına bağlı IRE-1 (inositol requering enzyme 1), PERK (PKR-like eukaryotik iniation factor 2α kinase) ve ATF 6 (activating transcription factor 6) ile aktive edilir. Bu 3 farklı transmembran proteinin aktivasyonunu düzenleyen GRP78 (BIP) adı verilen tek bir düzenleyici molekül vardır. ER şaperonlarından en çok bulunan aynı zamanda Binding immunoglobulin protein (BIP) olarak da bilinen 78 kilodaltonluk (glucose-regulated) protein GRP 78, ER permeabilitesini korur. Aynı zamanda proteinlerin katlanmasına ve montajına rehberlik ederek, degradasyon için katlanmamış proteinleri hedefler. ER stresi olmayan durumlarda GRP 78, ER membranına bağlı olan; IRE-1, PERK ve ATF6'nın ER lümenine bakan domainlerine bağlı bulunmaktadır. Lümen içerisinde katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucu GRP 78, bu proteinlerden ayrılarak aktive olmalarını sağlar ve ER stresine yanıt olarak ilgili stres düzenleyici yolakların devreye girmesini sağlar. Hipoksi, I/R, oksidatif stres, metabolik değişiklikler, viral enfeksiyonlar, hücre içi kalsiyum iyonu konsantrasyonundaki değişiklikler, protein sentezi ile ilgili değişiklikler, posttranslasyonel modifikasyon bozuklukları ve mitokondri hasarı gibi durumlarda ER stresi uyarılır. [6, 7, 10]

Karaciğer cerrahisi ve transplantasyonu gibi uzun süreli portal ven oklüzyonu gerektiren durumlarda, karaciğere giden kan akımının tamamının durdurulması ile dokuya giden kan akımı bozulur ve karaciğer iskemisine yol açabilir. Karaciğer I/R hasarı mekanizması karmaşık ve interaktiftir. Kuppfer hücreleri tarafından üretilen Reaktif Oksijen Türleri (ROT) oksidatif stresi başlatır. Karaciğer I/R hasarı oksidatif stres sonucu oluşan bir durumdur[11, 12]. Serbest oksijen radikalleri ve toksinler karaciğerle birlikte, böbrek, kalp, akciğer gibi uzak organ ve dokuları da etkileyebilmektedir. Özellikle transplantasyon sonrasında karaciğer I/R hasarına eşlik eden böbrek hasarı belirgin derecede gözlenmektedir.[13-15]

Karaciğer I/R hasarı, hepatik travma, karaciğer nakli gibi klinik durumlarda meydana gelebilir. Bu hasar karaciğer iskemisinin süresi ile ilgilidir ve karaciğer transplantasyonlarında morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir.[13, 16]

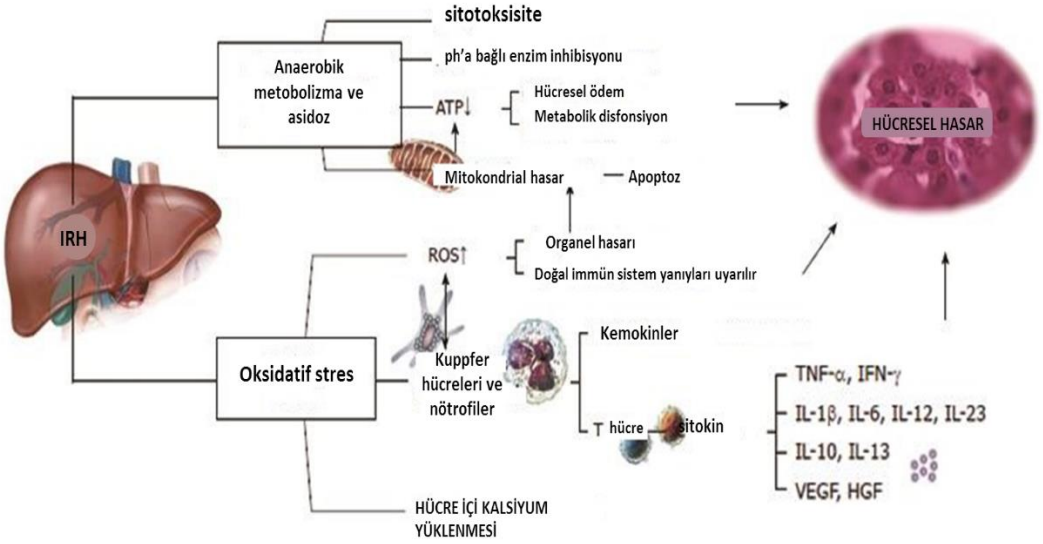
I/R ER stresini uyaran majör etkenlerden biridir. Hücre ölüm yolakları da ER stresi ile başlar ve birçok hastalıkta gösterilmiştir.[17]

Bu bilgiler ışığında, karaciğer I/R hasarı sonrasında, karaciğerin yanı sıra akciğer, böbrek ve beyin gibi uzak organlarda olması beklenen doku hasarında ER stresinin olası rolünün araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Bir organa gelen kan akımının azalmasına bağlı olarak organa gelen oksijen ve gerekli metobolik ürünlerde azalma meydana gelir. Kan akımı normale döndüğünde ise reperfüzyon, iskemik dönemde meydana gelen doku hasarını arttırır. I/R hasarı olarak bilinen bu durum özellikle transplantasyon ve karaciğer cerrahisinde, karaciğerin canlılığına doğrudan ve dolaylı olarak etki etmektedir. [18, 19]



Şekil 2.1. I/R hasarı metabolizması (Lian-Yue Guan ve arkadaşları)

Karaciğer I/R hasarı, soğuk-depolama reperfüzyon hasarı ve sıcak I/R hasarı olarak ayrılmaktadır. Soğuk depolama reperfüzyon hasarı transplantasyondan önce organın korunması sırasında oluşabilmektedir. Sıcak I/R hasarı ise karaciğer cerrahisi sırasında oluşmaktadır. Karaciğer transplantasyonunda kan kaybını ve oluşması beklenen bir takım komplikasyonları azaltılmak için karaciğerde bulunan farklı damarlara ait kan dolaşımının geçici olarak durdurulması gerekmektedir. Bu gibi durumlarda karaciğer iskemi ve bunu takiben de reperfüzyon etkisi altına girmektedir. Sıcak I/R hasarında iki evre bulunmaktadır. Erken evre, reperfüzyon sonrası yaklaşık olarak 2 saatlik bir dönemdir. Bu evrede reaktif oksijen türlerinin etkisiyle hepatositlerde hasar görülmektedir. Geç evre ise reperfüzyondan 6–48 saat sonraki dönemdir. Bu evrede biriken nötrofil lökosit aracılığıyla inflamatuvar bir yanıt gerçekleşmektedir. [13, 18, 20]

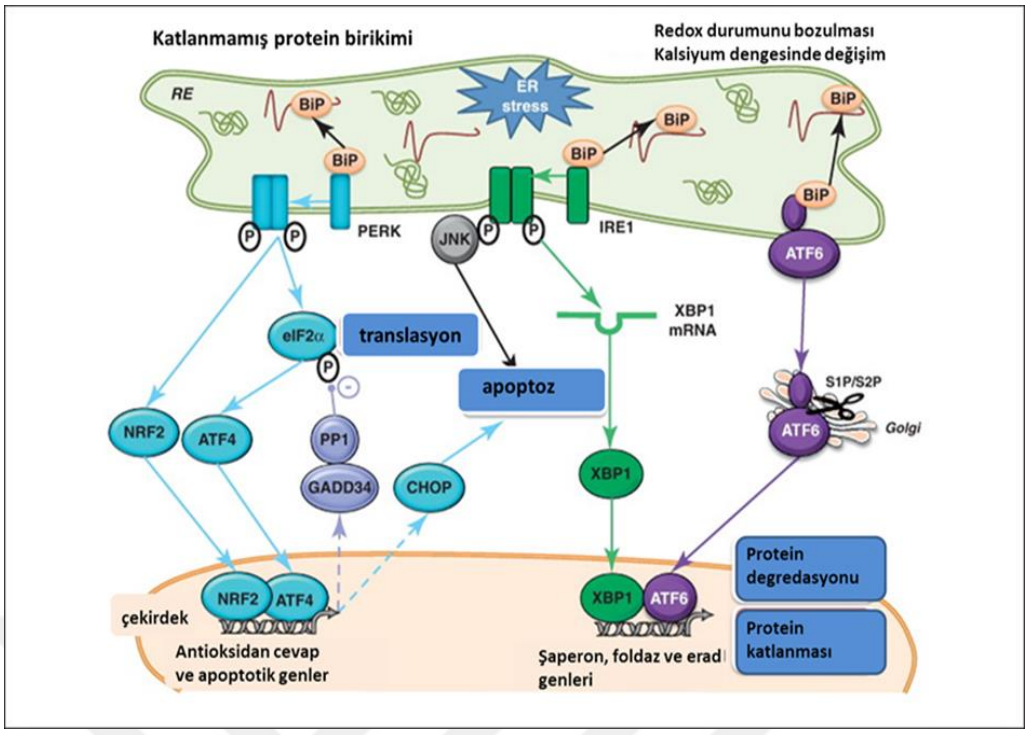
I/R'dan en çok mikrovasküler damarlardaki endotel hücreleri etkilenir. Reaktif oksijen türleri, endotel hücrelerinin şişmesine ve kapiller geçirgenliğin artmasına neden olur. Reperfüzyon sırasında normale dönmekte olan kan akımı ile birlikte, ortamda bol miktarda bulunan inflamatuar substratlar iskemik alana ulaşır. Nötrofiller ve inflamatuar hücreler, hasarın daha çok artmasına yol açar. [21-23]

İskemik dokuda reperfüzyona sonrası oluşan hasar, diğer organları da etkileyebilmektedir. I/R'un uzak organ etkileri daha çok akciğer ve kardiyovasküler sistemde görülmektedir. Akciğer yetersizliğinin, akut akciğer hasarından akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) gibi ciddi bir duruma kadar gidebilmektedir. Transplantasyon sonrası karaciğer fonksiyonundaki bozulmanın nedenlerinden başında hızlı gelişen akciğer yetersizliği olduğu gösterilmiştir. Karaciğer I/R'u sonrasında görülen akciğer yetersizliğinin nedeni ise karaciğerden salınan sitokinler olduğu düşünülmektedir. TNF-α hem karaciğer hem de akciğerde hasar oluşturmaktadır. sıçanlarda, karaciğer I/R modelinde akciğerlerde interstisyel incelme ve lökosit infiltrasyonu ile ilgili değişiklikler olduğu gösterilmiştir.[24-26]

Kupffer hücreleri, I/R sırasında artan TNF-α'nın en önemli kaynağıdır. I/R hasarında artan Kupffer hücre aktivasyonuna bağlı olarak nitrikoksit inhibisyonunun, akut akciğer hasarına neden olduğu saptanmıştır.[11, 26]

2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik Retikulum (ER), hücre içi kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) homeostazı, protein salgılanması ve lipit biyosentezi gibi birçok hücresel işlemde önemli rolü olan bir organeldir. Bu işlemlerin hepsi hücrenin hayatta kalması ve normal hücresel fonksiyonlar için gereklidir. ER yeni sentezlenmiş proteinlerin doğru katlanmasını kontrol etmekte ve bu yeni sentezlenen proteinlerin glikolizasyon ve disülfit bağ oluşumu gibi posttranslasyonel modifikasyonlarını düzenlemektedir. ER stresi çeşitli tetikleyicilere karşı cevap olarak oluşmaktadır. Çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda ER' da katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine sebep olmaktadır. Bunun sonucunda katlanmamış protein yanıtı (KPY) tetiklenerek stres aşılmaya çalışılır.[6]



Şekil 2.2. Endoplazmik Retikulum stresi (Melissa Flamment ve ark.)

Ökaryotik hücrelerde ER membranı ile bağlantılı 3 protein (PKR-like eukaryotik iniation factor 2α kinase) PERK, (inositol requering enzyme 1) IRE1 ve (activating transcription factor 6) ATF6 KPY'yi düzenlemektedir. Bu proteinler normal şartlarda şaperon protein olan glucose-regulated protein GRP78 ile bağlanarak inaktif durumda tutulurlar. Ancak bazı fizyolojik ve patolojik şartlarda ER stresi aktive olur ve bu üç ER transmembran proteini GRP78'den ayrılarak aktif hale geçerler. Bu proteinler ER'nin protein katlama kapasitesini artırıp, yeni oluşmakta olan proteinlerin sentezini durdurur ve proteinlerin degredasyonunu artıracak sinyal iletim sistemlerini harekete geçirir. Böylece ER' de biriken yanlış katlanmış proteinlerin azaltılmasını sağlamaya çalışırlar. Bununla birlikte stres aşılamayacak bir duruma gelirse ER stres kaynaklı apoptotik yolaklar aktive edilir. ER stresi sırasında PERK tarafından eIF2α'nın ser51 üzerinden fosforilasyonu ile birlikte birçok mRNA translasyonunu engellenerek protein sentezi inhibe edilmiş olur. Bu stresli koşullarda ATF4 gibi bazı mRNA'ların translasyonu devam eder. ATF4, ER homeostazını yeniden düzenlemede rol alan genlerin ifadelenmesinde rol alır. ATF6 ise ER stresi durumunda golgiye geçerek, burada bulunan Site 1 proteaz (S1P) ve Site 2 proteazlar (S2P), tarafından kesime uğrayarak N terminal fragmenti çekirdeğe geçer ve KPY genlerinin ifadelenmesini aktive eder. ER stresi durumunda IRE-1, XBP1 mRNA'sının kırpılmasını yapar ve böylece olgun XBP1 oluşur. Kırpılmış XBP1 mRNA'sı bir

transkripsiyon faktörü kodlar. Bu transkripsiyon faktörü ER şaperonları gibi doğrudan protein katlanmasında rol alan genlerin ifadelenmesini sağlar. XBP1 aynı zamanda ER biyogenezinde ve hatalı katlanmış proteinlerin ER aracılıklı degredasyonunda (ERAD) rol alan KPY genlerinin ifadelenmelerini yönetir. Aynı zamanda ER' de meydana gelen stres Ca^{+2}'nin ER' den sitozole salınımına neden olarak apoptoz ve otofaji gibi yolakların aktivasyonunu sağlar.[10, 17, 27]

Otofaji, uzun süreli proteinlerin hücresel makromoleküllerin ve organellerin degredasyonundan sorumlu lizozomal bir yolaktır. Otofaji işlemi çift membranlı otofagozomların oluşumu ile başlar. Otofagozomlar sitoplazmik kargoyu degredasyon için lizozoma taşır. Otofaji hem mayalarda hem de ökaryotlarda kıtlık durumunda makromolekülleri yıkarak bileşenlerini tekrar döngüye katması için gereklidir. Otofaji aynı zamanda hasarlı organellerin ortadan kaldırılması için de çalışır. Otofaji, evrimsel olarak korunmuş otofaji ilişkili proteinler (autophagy releated proteins,(Atg)) tarafından yönlendirilirler. Başlangıç çekirdeklenmesi ve primer otofagozomal membranın oluşması için PI3K, (myristylated protein kinaz) p150 ve Beclin-1'den oluşan kinaz kompleksinin toplanması gereklidir. İzolasyon membranının oluşumu ise iki ubikütin benzeri konjugasyon sistemi (Atg12-Atg5), ve mikrotübül ilişkili protein 1A/1B-Light Chain 3 (LC3) tarafından yönlendirilir. Atg12, Atg7 tarafından aktive edilerek Atg10'a aktarılır daha sonra Atg5 ile konjuge olur. Böylece geri dönüşümsüz Atg12-Atg5 konjugatı oluşmuş olur. Serbest formdaki LC3-1 bir lipide bağlanarak membran bağlı form olan LC3-II haline dönüşür. LC3-II birikimi ve veziküler yapılardaki lokalizasyonu genellikle otofaji belirteci olarak kullanılmaktadır.[10, 17, 28]

Bazal seviyedeki otofaji hasarlı organelleri ortadan kaldırıp, uzun süreli proteinlerin tekrar döngüye katılmasını sağlayarak hücre içi dengenin korunmasını sağlamaktadır. Ayrıca otofajinin hipoksi, radyoterapi, kemoterapi gibi hücre içi ve hücre dışı stres koşullarında ağır strese karşı cevap olarak aktiflendiği fizyolojik ve patolojik bir çok süreçte rol aldığı gösterilmiştir. Otofajinin koruyucu ve hayatta kalıcı cevap mekanizması olarak çalıştığı düşünülüyor olsa bile her zaman hücre hayatta kalımını desteklemez ve bazı koşullarda hücre ölüm mekanizması da olabilir. [27, 29]

ER stresi ise otofajiyi tetikleyen bir mekanizmadır. Ubiquitin proteozom sistemi ile ortadan kaldırılamayan katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler otofaji ile ortadan kaldırılarak ER stresi aşılmaya çalışılıp, hücre ölümüne karşı korunmuş olunur. ER stresi sırasında otofaji ile ilişkili genlerden Atg8, Atg14 ve vasküler hidrolaz aminopeptidaz 1 (APE1) ifadelenmesinin arttığı gösterilmiştir. Memelilerde ER stresinin otofagozom

oluşumunu tetiklediği otofaji indüksiyonu ile strese girmiş hücrelerde yanlış katlanmış ya da hatalı katlanmış proteinlerin uzaklaştırılarak hücrelerin hayatta kalmasını sağladığı gösterilmiştir. [7, 28]

Son zamanlarda elde edilen verilere göre ER stresi aşılamadığı zaman otofaji, hücreyi ölüme götürdüğü gösterilmiştir. Otofajiyi kontrol eden sinyal yolaklarının ve ER stresine karşı oluşan cevabın daha iyi anlaşılması, ER stresi ile ilişkili çeşitli hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımları ortaya çıkartacaktır.[7]

Otofajinin birçok durumda ER stresine karşı koruyucu rolü olduğu bilinmektedir. Otofajinin çeşitli hücre tiplerinde tunikamisin, tapsigargin ve brefeldin A gibi ER stres indükleyicileriyle indüklenen ER stresi sonucu oluşan hücre ölümüne karşı koruduğu gösterilmiştir. Atg5 susturulmuş ve 3-metiladenin (3MA) ile muamele edilmiş hücrelerin, kaspaz 3 aktiviteleri ve ER stresine karşı hassasiyetlerinin arttığı yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu bulgular otofajinin ER stresi ile indüklenen hücre ölümüne karşı önemli bir rol oynadığını göstermektedir.[28, 30]

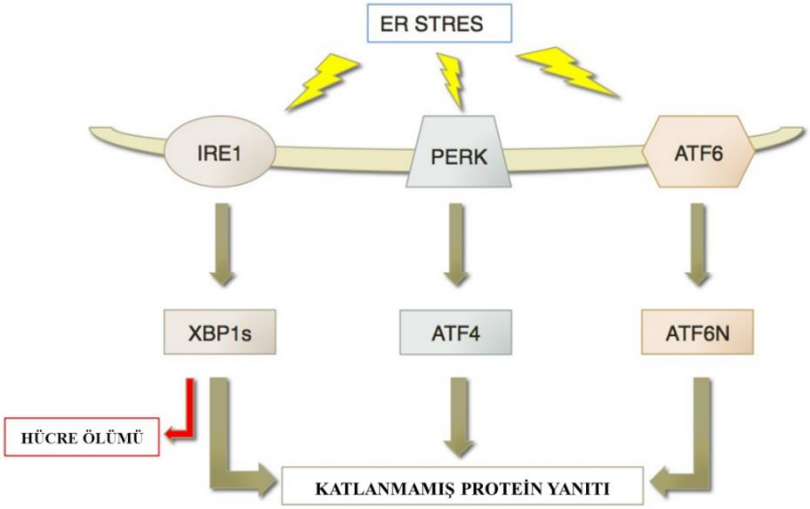
Apoptoz mekanizması bozuk bak-/- bax-/- olan hücrelerde ise ER stresinin nekrotik hücre ölümüne neden olduğu ve otofaji ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. ER stresine cevap olarak bak-/- bax-/- olan hücrelerde ve normal hücrelerde otofaji aynı şekilde indüklenmektedir, fakat verilen bu otofajik cevabın sonuçları farklı olmaktadır. ER stresi durumunda bak-/- bax-/- olan hücrelerde, 3-MA kullanılarak Atg5'in susturulması ile inhibe edilen otofaji, bu hücrelerin canlılığını önemli derecede arttırmıştır. Bu bulgu otofajinin bak-/- bax-/- olan hücrelerde hücre ölümünü artırdığını göstermektedir. Bunun aksine 3-MA'nın, normal hücrelerde ER stresi ile indüklenen hücre ölümünü artırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, normal hücrelerde otofajinin hücrenin hayatta kalma mekanizması olarak çalıştığını, apoptoz mekanizması çalışmayan hücrelerde ise apoptotik olmayan hücre ölümünü tetiklediğini göstermektedir. Aşırı strese bağlı olarak apoptozun indüklenemediği hücrelerde ise, stresin miktarı arttıkça otofaji belirgin bir şekilde tetiklenir ve bunun sonucunda da hücresel hasar ve nekroz meydana gelir. Bu nedenle, ER stresi koşullarında, apoptoz mekanizması ile ilgili bir yetersizlik söz konusu olduğunda, otofajinin nekroz ile ilişki bir ölüm mekanizması olarak çalıştığı düşünülebilir. Otofajinin ER stresi ile ilişkili olduğu biliniyor olsa da ER stresi sırasında hangi mekanizmaların aktive olduğu tam olarak bilinmemektedir.[30, 31]

eIF2α, açlık, viral enfeksiyon ve ER stresi gibi çeşitli stres durumlarında fosforile olur. Bu nedenle eIF2α kinazlarını aktive eden çeşitli stres koşulları olabileceği

düşünülmektedir. Buna ek olarak PERK- eIF2α yolağının ER stres kaynaklı otofaji ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. [10]

Otofaji, yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin ortadan kaldırılmasında ve çeşitli fizyolojik durumların neden olduğu ER stresini hafifletmede oldukça önemlidir. ER stresi ve otofaji arasındaki sinyal yolakları, otofajik kargoların hangi mekanizmalar ile düzenlendiği, ER stresinin indüklediği otofaji ve hücre ölüm yolakları arasındaki bağlantılar ve ER stresi ile ilişkili hastalıklarda otofajinin etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Otofajinin hücrenin durumuna bağlı olarak hem bir hayatta kalma hem de ölüm mekanizması olarak çalışıyor olması, çeşitli hastalıklarda etkili bir tedavi stratejisi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.[7, 32]

2.3. Katlanmamış Protein Yanıtı Sinyal Yolakları



Şekil 2.3. Katlanmamış protein yanıtında rol alan proteinler

2.3.1. PERK (PKR-like eukaryotik iniation factor 2α kinase) Sinyal Yolağı

Memeli hücrelerinde, ER strese verilen ilk yanıt geçici olarak translasyonun durdurulması yada yavaşlatılmasıdır. Bu süreç PERK sinyal yolağı tarafından yönetilmektedir. PERK, ER membranında bulunan, Tip I transmembran serin treonin kinaz proteinidir. Normal şartlarda GRP78 ile beraber bulunarak inaktif durumda kalmaktadır. ER'de oluşan aşırı yükte ya da stres durumunda, beraberinde bulunan GRP78, lümene katlanmaya yardımcı olması için gönderilir. PERK ise homodimer olarak fosforillenir.

Aktive olan PERK daha sonra ökaryotik başlama faktörü eIF2α'daki Serin-51'i fosforiller ve fosforile olan eIF2α, genel translasyonu durdurur. Ancak bazı önemli proteinlerin translasyonu devam eder. Translasyonun inhibe olmasıyla birlikte, kısa ömürlü proteinler ortadan kaldırılır. Bunun en tipik örneği ise siklin D'dir. ER stres durumunda bu proteinin yokluğu memeli hücrelerinin hücre siklusu sırasında G1 fazında kalmasını sağlar.[7, 10]

2.3.2. ATF6 (activating transcription factor 6) Sinyal Yolağı

ATF6, hücrede ER stresi olmadığında, ER membranında GRP78 ile beraber inaktif şekilde tutulur. Bu proteinin memeli hücrelerinde, ATF6α ve ATF6β olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır.[33]

ER stres ile karşılaşınca tıpkı PERK'te olduğu gibi, çok benzer bir mekanizmayla GRP78, lümene katlanmaya yardımcı olmak için gönderilir. ATF6 ise golgide site1 proteaz (S1) vesite2 proteaz (S2) tarafından kırpılarak posttranskripsiyonel modifikasyona uğramaktadır. Ardından kırpılan ATF6 çekirdeğe gönderilir. Burada GRP78, GRP94 gibi ER şaperonlarının ifadesini artırarak ER katlama kapasitesi yükseltir ve strese karşı korunma sağlanmaya çalışılır.[7, 33]

ATF6, 670 aminoasitten oluşan, ER tip II transmembran glikoproteinidir, NH_2 terminal domaini sitozoliktir. Elektroforetik mobilitesi 90kDA olan bu protein KPY'nin anahtar transkripsiyon faktörüdür. Böylece memeli hücrelerinin karşılaştığı çeşitli çevresel ve fiziksel streslere karşı hücre içi dengeyi korumuş olur. ATF6, lösin fermuar protein ailesinin bir üyesidir ve endoplazmik retikulum stres cevap elementi (ERCE) olarak hareket eder. NH_2 terminal domainin 370-380 aminoasitlik kısmı transkripsiyon faktördür bu bölgeyi 21 aminoasitlik transmembran domain ve 270 aminoasitlik ER lümenine bakan kısmı takip eder. [10, 33]

ATF6 ER stresine cevap olarak aktive olduğunda çekirdeğe geçer ve ER stres elementleri (ERSE I,ERSE II), KPY elementleri (UPRE;GRP78,GRP94), cAMP response elementleri (CRE) promotorlarına bağlanarak genlerin ekspresyonunu uyarır. ERAD ve (ER degradation enhancing- α mannosidase-like protein) EDEM katlanmamış proteinlerin temizlenmesine yardımcı olur. XBP1 mRNA düzenlenmesine ek olarak ATF6, XBP1 proteini ile doğrudan etkileşime girer ve KPY kalite kontrol genlerini hedef alır.[31, 33]

Son dönem yapılan çalışmalarda birden fazla ATF6α ile benzer proteinler ortaya çıkmıştır ve bu da geleneksel 3 kollu KPY modelinin tamamının henüz aydınlatılamadığını göstermektedir. Şu ana kadar 5 protein, Oasis (CREB3L1), Luman (Creb3), Tisp40

(CREB3L4), CREBH (CREB3L3) ve BBF2H7 (CREB3L2) tanımlanmıştır. Tüm bu proteinler ATF6α ile yüksek sekans benzerliği göstermektedir. ATF6α ya benzerlikleri yanı sıra, bu faktörlerin her birinin KPY düzenlenmesine özel görevleri bulunmaktadır. Örneğin CREBH lipopolisakkarid ve sitokinlerin indüklediği inflamatuar yanıta karşı akut faz cevabı olarak serum amyloid, serum amyloid P bileşenleri ve C reaktif protein üretimini artırmaktadır.[33, 34]

2.3.3. IRE1 (inositol requering enzyme 1) Sinyal Yolağı

IRE1 transmembran yapıda bir proteindir. İki formu vardır. IRE1-α tüm hücrelerde bulunurken β formu ise bağırsaklarda bulunmaktadır. Her iki izoformu da ER'da transmembran proteini olarak bulunmaktadır. IRE1α, farelerde yaşam için önem taşıyan genlerden biridir.[10]

IRE1, diğer KPY yolakları gibi GRP78 ile kompleks halindeyken inaktiftir. ER stres sırasında GRP78'in ayrılması, IRE1α'nın dimerizasyonunu, oligomerizasyonunu ve trans-otofosforilasyonunu sağlar. Aktif haldeki IRE1'in RNAaz aktivitesi ile X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) mRNA'sından 26 nükleotid uzaklaştırılır ve oluşan kırpılmış XBP1 mRNA'sı translasyona girerek transkripsiyon faktörü kodlar. XBP1 mRNA'sı sitoplazmada normalde de bulunmaktadır. Ancak kırpılmamış şekildedir.[10, 35]

2.4. Endoplazmik Retikulum Stresiyle İndüklenen Apoptoz Yolakları

Hatalı katlanmış proteinlerin birikimi ve ER stresinin üstesinden gelmek için hücrede KPY yolağı aktive olmaktadır. Eğer hatalı katlanmış protein miktarı çok fazla olursa ve stres devam ederse, KPY'nin aktivasyonu ER stresiyle baş etmek için yetersiz kalmaktadır ve böyle bir durumda ER stresi programlı hücre ölümüne yol açar. Ancak ER stresiyle indüklenen apoptozu düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir. PERK, ATF6 ve IRE1 sinyal yolakları yalnızca yaşama işlevlerini sağlayan yolakları başlatmazlar aynı zamanda apoptoz yolaklarını da indüklerler. ER stresi proapoptotik sinyalleri tetiklemektedir. Fakat direk olarak hücre ölümüne yol açmak yerine CHOP ya da JNK gibi yolağın ilerisindeki moleküllerin aktivasyonunu başlatarak etki ederler. [17, 30, 36]

2.4.1. (CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) Homolog Protein) CHOP İndüksiyonu

CHOP, bZIP-içeren transkripsiyon faktörü olarak C/EBP ailesinin üyesi olarak tanımlanmıştır. CHOP, aynı zamanda (growth arrest and DNA-damage inducible gene 153) GADD153 olarak da bilinir. Uzayan ER stres süresinde CHOP, en fazla ifadesi artan genlerden biridir. CHOP'un transkripsiyonu, ER transmembran proteinlerinden PERK, ATF6 ve IRE-1 tarafından aktive edilmektedir.[37, 38]

Pek çok çalışmada ER stres kaynaklı apoptoz CHOP yolağını içermektedir. CHOP'un transkripsiyon ve translasyon seviyesindeki kontrollerine ek olarak, aktivasyonunu artırmak için P38 MAPK 78. ve 81. serinden fosforile ederek posttranslasyonel olarak da kontrol sağlamaktadır. CHOP'un maksimum olarak indüklenmesi için, bütün ER stres cevap yolakları gereklidir[38]. Çünkü CHOP'un promotor bölgesi ATF4, ATF6, XBP-1 ve ATF2/ATF3 tarafından transaktive olan 4 cis-davranışlı elementler tarafından düzenlenmektedir. CHOP'un ifadesi GADD34, ERO1, DR5, karbonik anhidraz VI ve TRB3 gibi proapoptotik proteinlerin indüksiyonuna da yol açmaktadır. ERO1 ER luminal proteinken, diğerleri sitozoliktir. B-cell lymphoma 2 (BCL2) protein ailesinin üyeleri (BCL2, BAX, BAK, BIK) apoptotik hücre ölümünün düzenleyicisi olarak önem taşımaktadır.[30, 37, 39]

Mitokondri aracılı apoptozda olduğu gibi ER stresiyle indüklenen apoptoz da BCL2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. ER stresiyle indüklenen hücre ölümünde BCL2 proteinlerinin ilişkisi açık olmasına rağmen, ER stresi tarafından nasıl düzenlendiği daha az bilinmektedir.[37, 40]

2.4.2. (c-jun NH2- terminal kinaz) JNK Aktivasyonu

ER strese yanıt olarak, IRE1α, adaptör protein TNF reseptör ilişkili faktör 2(TRAF2) ile beraber ER membranında bulunmaktadır. Sinyal iletiminde görevli proteinlerden olan c-jun NH2- terminal kinaz (JNK) ER stresinde başka bir apoptotik yoldur. Gen ekspresyonunu düzenleyerek strese karşı hücrenin yaşamı ve ölümü arasındaki ilişkiyi sağlar. KPY, IRE1-TRAF2-ASK1 kompleksi tarafından aktive olmaktadır. IRE1, Xbp1 kırpılmasındaki rolünden bağımsız olarak JNK sinyal yolunu aktive ederek apoptozu tetiklemektedir. IRE-1- TRAF2 etkileşimi apoptozu tetikleyen transkripsiyonel baskılayıcı faktör olan ATF3'ü de aktive etmektedir. Ayrıca JNK'ın, fosforilasyonla BCL2 proteinlerini düzenlediği de bilinmektedir.[17, 30, 40, 41]

2.4.3. Kaspaz Aktivasyonu

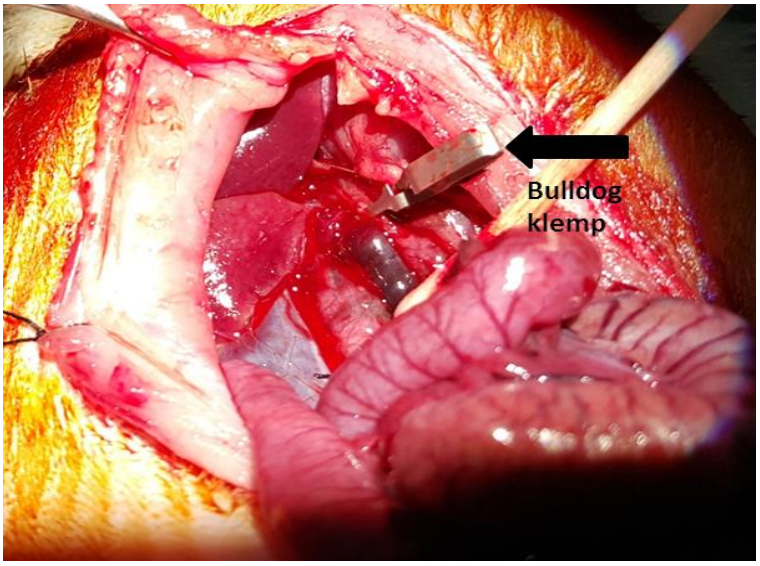
Kaspazlar, ER'la bağlantılı sistein proteaz ailesinin üyesidir. Hücrelerin içinde inaktif halde bulunmaktadır. Apoptozun indüklenmesinden sonra aktif enzim formuna dönüşmek üzere işlenirler. Kaspazların aktivasyonu apoptoz için gereklidir ve kaspaz 12, 3, 6, 7, 8 ve 9'un işlevleri ER stresiyle ilgili çalışmalarda gösterilmiştir. Kaspaz 12, ER stresiyle indüklenen apoptozun anahtar düzenleyicisi olarak önem taşımaktadır. Kaspaz 12, çeşitli yollardan ER stresi ile aktive olabilmektedir. Birinci yol; kalsiyum tarafından aktive olan sitoplazmik proteaz olan kalpainler tarafından aktive olmasıdır. ER'da kaspaz 12'nin aktivasyonundan sonra kaspaz-12 prokaspaz 9'u keser ve kaspaz 9'da kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açar ve sonuçta apoptoz gerçekleşir. İkinci yol; IRE1 ve adaptor protein TRAF2 ile direk bağlantılı olarak aktive olabilmesidir. Üçüncü yol; Kaspaz 7'nin bazı apoptotik uyarılara cevap olarak ER'da transloke olması ve direk olarak kaspaz 12'yi aktive edebilmesiyle gerçekleşmektedir. ER stresiyle diğer kaspazların da bağlantılı olduğunu ve diğer kaspazların aktivasyonunu da indüklediği gösterilmiştir.[28, 30, 40]

3. GEREÇ ve YÖNTEM

DA-15/37 proje numaralı çalışmamızda Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu‟ndan etik kurul izni alındıktan sonra başlanmıştır. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi labaratuarında yapılan çalışmamızda, ağırlıkları 180-300 gr arasında değişen 15 adet Wistar Albino cinsi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastlantısal olarak 3 gruba ayrıldı. Bütün sıçanlar deney öncesi sabit çevre koşulları altında standart sıçan yemi ve su ile beslenerek 7 gün boyunca bekletilip ortama adapte olmaları sağlandı. Sıçanlara 0.5 ml Ketamine (Ketalar 50 mg/ml, Pfizer), 0.1 ml Ksilazin HCl (Alfazyne % 2 20 mg/ml, Alfasan international) ile anestezi uygulandı. Sırt üstü pozisyonda karın tüyleri temizlendikten sonra, karın cildi pavidon iyot ile silinerek cilt antisepsisi uygulandı.

Grup 1 .İskemi/ Reperfüzyon (6 adet)

Sıçanlar, orta hat insizyonu ile açılarak karaciğere giden hepatik portal ven ve hepatik arter pringle manevrası yöntemiyle bulldog klemp ile klemplendi. 60 dk iskemi süresi sonunda, 60 dk reperfüzyona bırakılmıştır. 60 dk'nın sonunda ise sıçanlar sakrifiye edilip karaciğer, akciğer, böbrek ve beyin dokuları alınmıştır. Dokuların bir kısmı patoloji için yüzde 10'luk formaldehitde saklanıp diğer kısımları ise RNA izolosyonu için, RNAlater'da saklanıp -80 C ye kaldırılmıştır.



Resim 3.1 Karaciğer iskemisi (Pringle manevrası), hepatik arter ve portal ven klemplemesi

Grup 2. Sham (6 adet)

Hayvanlar yine orta hat insizyonu ile açılarak grup 1 deki toplam bekleme süresi kadar (120 dk) beklenip daha sonra sakrifiye edildi. Daha sonra yine karaciğer, böbrek, beyin ve akciğer dokuları alınıp grup 1 de olduğu gibi muhafaza edilmiştir.

Grup 3. Kontrol (3 adet)

Bu gruba dahil edilen sıçanlara hiçbir cerrahi işlem uygulanmayıp, normal beslenme ve su ihtiyaçları sağlanmıştır.

Resim 3.2. 60 dk karaciğer iskemisi sonrası karaciğer dokusunda gözle görülebilen hasar

3.1. Dokudan RNA İzolasyonu

- Rna Later dan aldığımız doku örnekleri homjenizatörde homojenize edildi.
- 700 ul RLT+B-merkapto homojenize edilen dokuların üzerine eklendi ve 13000
- rpm de 3 dakika santrifüjlendi.
- Onun üzerine 700ul %70 ethanol eklendi. Yavaş yavaş pipetleyerek karıştırıldı ve bu karışımdan kolona 700 ul aktarıldı.
- 10000rpm 20 saniye santrifüjlendi ve kolonun altındaki sıvıyı döküldü.
- Kolona 700ul Buffer RW1 eklendi ve 10000 rpm 20 saniye santrifüjlenip kolonun altındaki sıvı döküldü.
- Kolona 500ul tampon RPE eklendi ve 10000 rpm 20 saniye santrifüjden sonra kolonun altındaki sıvı döküldü.
- Kolona bir daha 500ul Buffer RPE eklendi.

- 10000 rpm 2 dakika santrifüjlendi ve kolonun altındaki sıvı döküldü. Daha sonra kolonlar boş bir şekilde kurutma amaçlı 13000 rpm de 1 dakida santrifülendi.
- Kolon eppendorf tüpe (DEPC+) aktarıldıktan sonra kolonun tam ortasına 40ul DNAse RNAse free dH2O eklendi.
- 10000 rpm 1 dakika santrifüjlenir ve eppendorfa RNA geçmiş oldu.
- Sonra spektrofotometrede ölçüm yapıldı.

3.2. RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların saflığını kontrolü 260/280 nm de ki absorbans oranı ile saptandı. Epoch Gen5 spektrofotometre cihazı ve all-in-one Reader software programı kullanıldı. DNA ve protein kontaminasyonu taşımayan, iyi kalitede izole edilmiş RNA'da beklenilen 260/280nm absorbans oranı 1,8-2,2'dir.

Tablo 3.1. Dokulardan elde edilmiş RNA miktarları ve 260/280 absorbans oranları

Gruplar	Dokular	Microgram/mikrolitre	260/280
Iskemi1	**Karaciğer**	**1986**	**2,13**
	Akciğer	**356**	**2,13**
	Böbrek	**792**	**2,16**
	Beyin	**115**	**2,21**
Iskemi2	**Karaciğer**	**1789**	**2,13**
	Akciğer	**1073**	**2,15**
	Böbrek	**1714**	**2,15**
	Beyin	**415**	**2,13**
Iskemi3	**Karaciğer**	**926**	**2,14**
	Akciğer	**164**	**2,15**
	Böbrek	**537**	**2,14**
	Beyin	**351**	**2,14**
Iskemi 4	**Karaciğer**	**370**	**2,11**
	Akciğer	**692**	**2,15**
	Böbrek	**242**	**2,14**
	Beyin	**424**	**2,14**
Iskemi5	**Karaciğer**	**1041**	**2,17**
	Akciğer	**337**	**2,15**
	Böbrek	**792**	**2,11**
	Beyin	**345**	**2,17**
Iskemi6	**Karaciğer**	**2465**	**2,11**
	Akciğer	**694**	**2,17**
	Böbrek	**260**	**2,15**
	Beyin	**635**	**2,18**
Sham1	**Karaciğer**	**1993**	**2,12**
	Akciğer	**543**	**2,12**
	Böbrek	**1049**	**2,16**
	Beyin	**431**	**2,13**
Sham 2	**Karaciğer**	**2081**	**2,14**
	Akciğer	**303**	**2,13**
	Böbrek	**917**	**2,17**
	Beyin	**151**	**2,12**
Sham3	**Karaciğer**	**1981**	**2,18**
	Akciğer	**362**	**2,19**
	Böbrek	**865**	**2,10**
	Beyin	**615**	**2,10**
Sham4	**Karaciğer**	**2481**	**2,06**
	Akciğer	**336**	**2,07**
	Böbrek	**408**	**2,07**
	Beyin	**455**	**2,06**
Sham5	**Karaciğer**	**2169**	**2,07**
	Akciğer	**666**	**2,11**
	Böbrek	**1500**	**2,10**
	Beyin	**742**	**2,10**
Sham6	**Karaciğer**	**2406**	**2,06**
	Akciğer	**1503**	**2,08**
	Böbrek	**1026**	**2,09**
	Beyin	**752**	**2,11**
Kontrol1	**Karaciğer**	**720**	**2,14**
	Akciğer	**120**	**2,16**
	Böbrek	**425**	**2,10**
	Beyin	**264**	**2,15**
Kontrol2	**Karaciğer**	**507**	**2,14**
	Akciğer	**294**	**2,13**
	Böbrek	**212**	**2,16**
	Beyin	**148**	**2,16**
Kontrol3	**Karaciğer**	**1293**	**2,11**
	Akciğer	**324**	**2,14**
	Böbrek	**186**	**2,16**
	Beyin	**170**	**2,08**

3.3. cDNA Sentezi

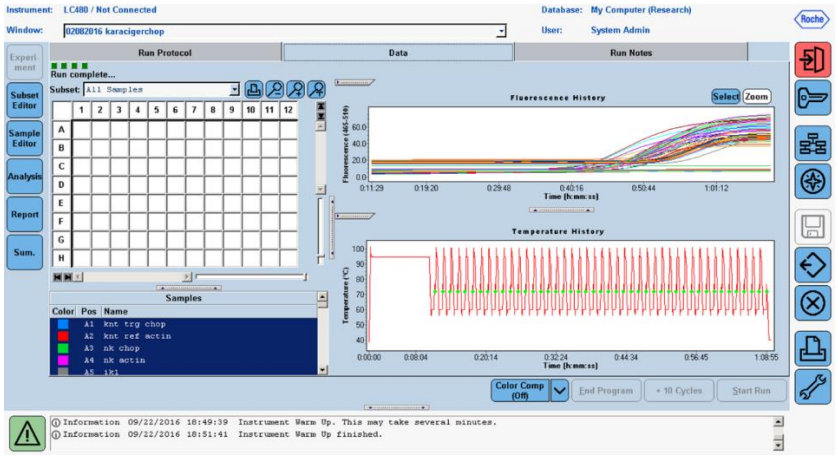
Tez çalışmasında kullanılan RNA örneklerinden ters transkripsiyon, "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için örneklerin RNA konsantrasyonu eşitlendi. Her örnek için;

- 500 ng total RNA
- 1 µl oligo (dT) primer (50 pmol/ml)
- 4 µl transkriptor geri transkriptaz tampon,5x
- 0.5 µl RNase inhibitor, 40U/ µl
- 2 µl deoksiribonükleotid karışımı; (herbiri 10 mM)
- 0.5 µl geri transkriptaz 20U/ µl
- Su ile reaksiyon 20 µl'ye tamamlandı ve karışım pipetle karıştırıldı.

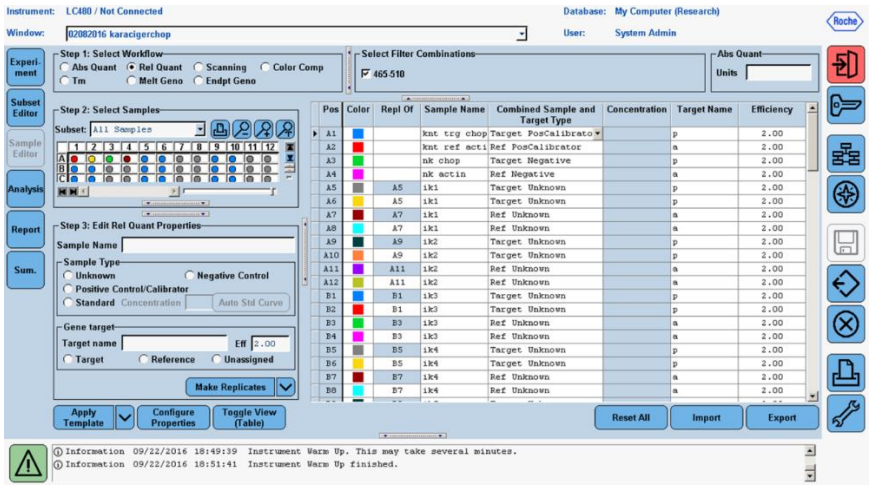
Örnekler 25ºC 10', 55ºC 30', 85ºC 5' termal döngü cihazında inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Cihazdan alınan tüpler ya -20ºC'da saklandı ya da QRT-PCR için kullanıldı.

3.4. Gen İfadelenmesinin Saptanması

ER stres genleri olan GRP78, PERK, CHOP VE ATF6 genlerinin ifadelenmelerini saptamak için her bir sıçan genine ait real time ready prob ile Light Cycler 480 probe master kiti kullanılmıştır. House Keeping gen olarak da β actin kullanılmıştır. Her bir prob light cycler 480 cihazında çalışılmıştır.



Resim 3.3. Gen ifadelenmesinin saptanmasında kullanılan Light Cycler 480 Florasan/zaman ve sıcaklık/zaman grafiği.



Resim 3.4. Light cycler 480 programında hedef gen ve referans genlerin dizaynı

3.5. Histopatolojik İnceleme

İskemi reperfüzyon uygulanan Karaciğer dokusu rezeke edildikten sonra %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda patoloji bölümüne gönderildi. Her karaciğer dokusundan uzun eksene dik, 3mm kalınlığında, 2 adet paralel dilim çıkarıldı. Materyaller standart doku takibi işleminden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında 2 adet ardışık kesit hazırlanarak Hematoksilen Eozin ile boyandı. Işık mikroskopik incelemede hepatik hasar parametreleri olarak lökositik infiltrasyon yoğunluğu, nötrofil varlığı, sinüzoidal dilatasyon, balonlaşma dejenerasyonu, ve konjesyon, steatoz, iskemik koagülatif nekroz ve apopitoz daha önce tanımlanan kriterlere uygun olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Organlara Göre Er Stres Genleri İfadelenme Düzeyleri

4.2. Grp 78 İfadelenmesi

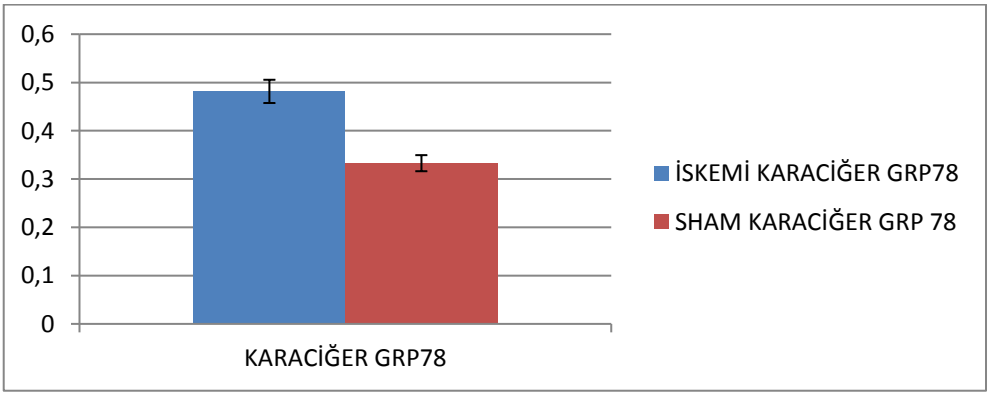
GRP78		İskemi	Sham
Karaciğer	1	0,4697	0,5038
	2	0,7605	0,2
	3	0,7575	0,4312
	4	3,45E-02	0,3064
	5	0,423	0,2564
	6	0,444	0,2993

		İskemi	Sham
Akciğer	1	1,492	0,9762
	2	1,15	
	3	0,8956	1,43
	4	1,815	1,84
	5	6,672	4,281
	6	15,26	1,394

		İskemi	Sham
Beyin	1	0,5196	1,968
	2	0,3627	1,942
	3	5,611	3,747
	4	3,645	1,427
	5	4,078	2,188
	6		2,29

		İskemi	Sham
Böbrek	1	0,758	2,796
	2	2,723	1,248
	3	0,7785	0,9471
	4	2,432	0,2564
	5		0,7837
	6	0,6156	0,9911

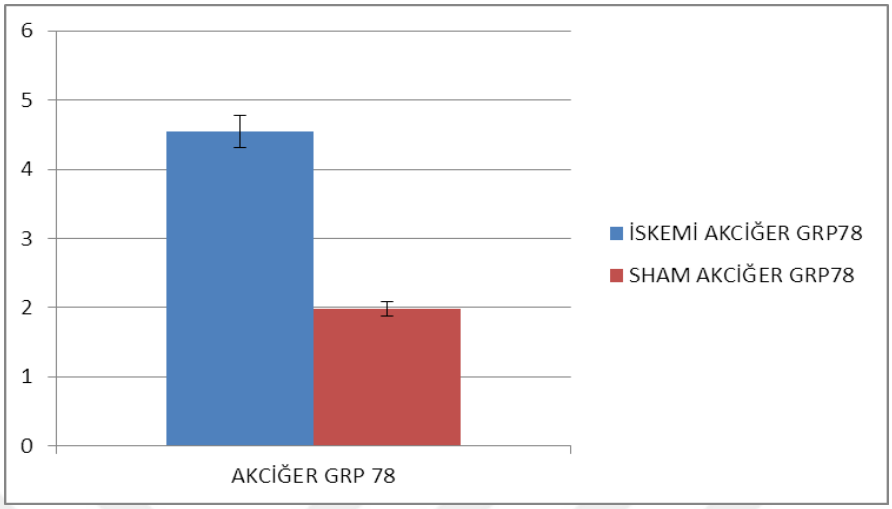
Şekil 4.1. Organlar arası GRP78 ifadelenmesi (iskemi ve sham grubunun kontrol grubuna göre oranları**)**



Şekil 4.2. Karaciğer GRP78ifadelenmesi (p= 0,125368838)

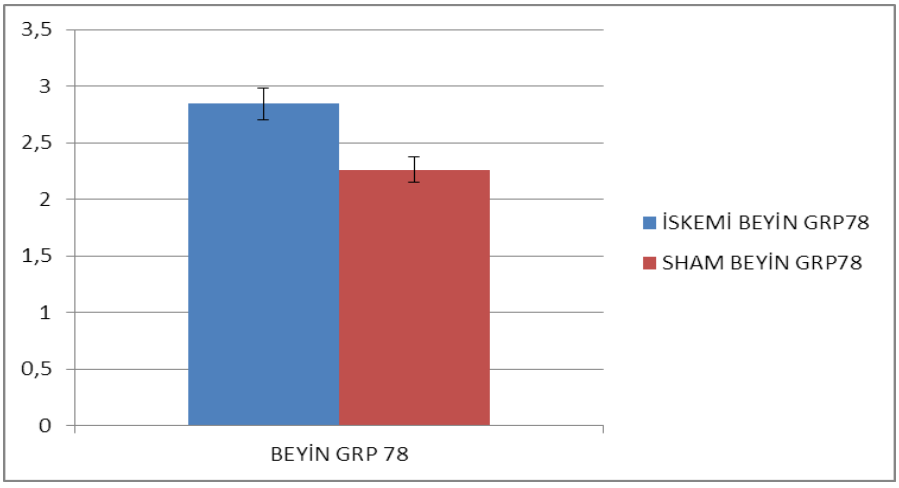
İskemi reperfüzyon ve sham grubu, karaciğer GRP78ifadelenmeleri kontrol grubu karaciğer GRP78 ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon

grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)



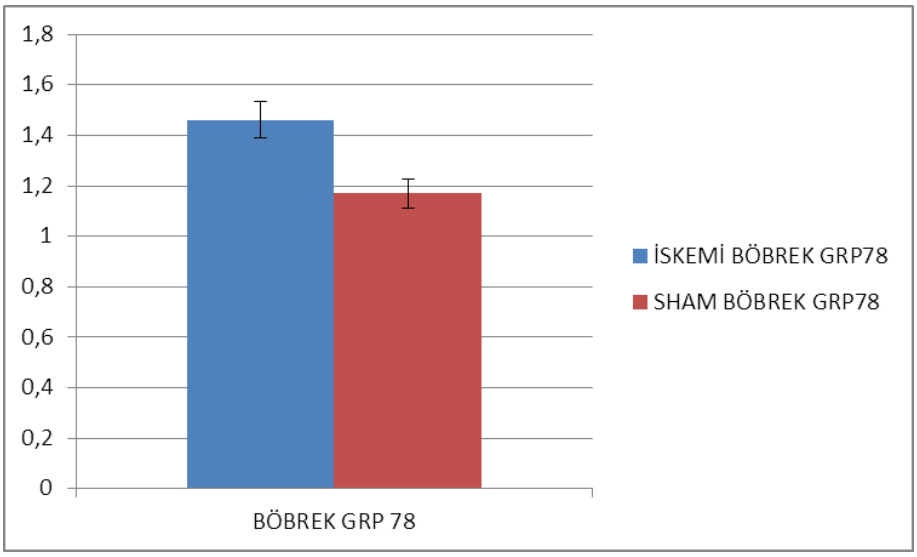
Şekil 4.3. Akciğerde GRP78ifadelenmesi (p=0,324794028)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu, akciğer GRP78 ifadelenmeleri kontrol grubu akciğer GRP78 ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)



Şekil 4.4. Beyin GRP78 ifadelenmesi (p=0,306699418)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu, beyin GRP78ifadelenmeleri kontrol grubu beyin GRP78 ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)



Şekil 4.5. Böbrek GRP78 ifadelenmesi(p=0,314153001)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu böbrek GRP78 ifadelenmeleri kontrol grubu böbrek GRP78 ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)

4.3. Chop İfadelenmesi

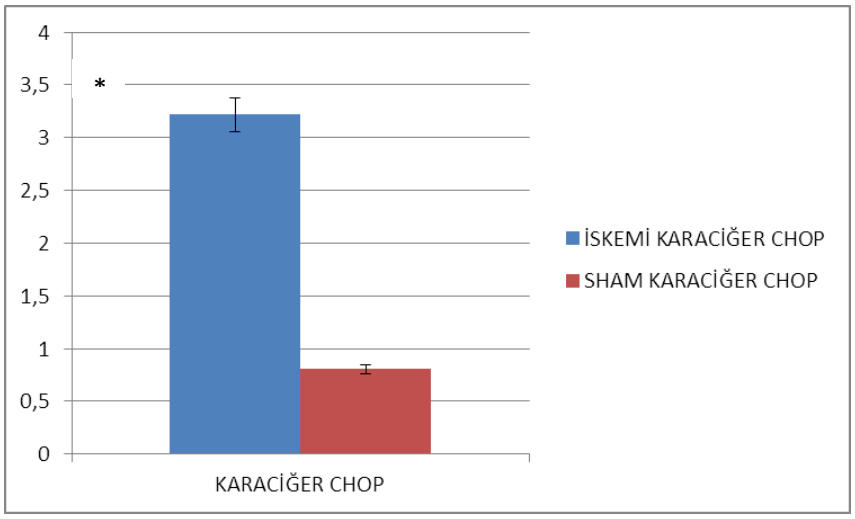
CHOP		İskemi	Sham
Karaciğer	1	1,222	0,727
	2	5,148	0,3037
	3	3,282	1,474
	4	0,2366	1,354
	5	2,561	0,3324
	6	6,87	0,6357

		İskemi	Sham
Akciğer	1	2,489	0,8107
	2	2,296	4,328
	3	2,218	3,661
	4	1,712	2,354
	5	11,17	1,8
	6	20,5	1,41

		İskemi	Sham
Beyin	1	8,1	3,844
	2	6,626	1,768
	3	4,362	5,523
	4	9,922	4,277
	5	4,718	3,919
	6		2,398

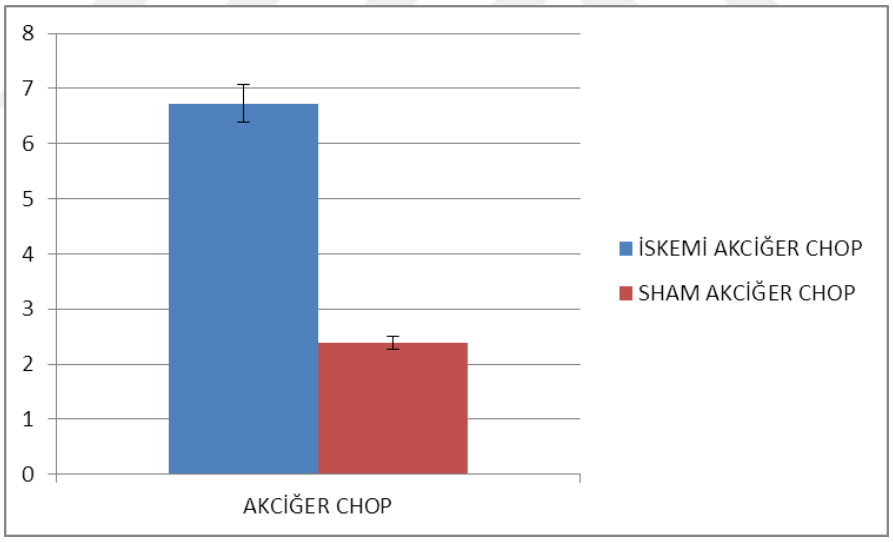
		iboc	Sham
Böbrek	1	6,252	8,693
	2	22,61	5,062
	3	2,539	3,303
	4	6,662	3,92
	5		3,983
	6	2,512	1,384

Şekil 4.6. Organlar arası CHOP ifadelenmesi (iskemi ve sham grubunun kontrol grubuna göre oranları**)**



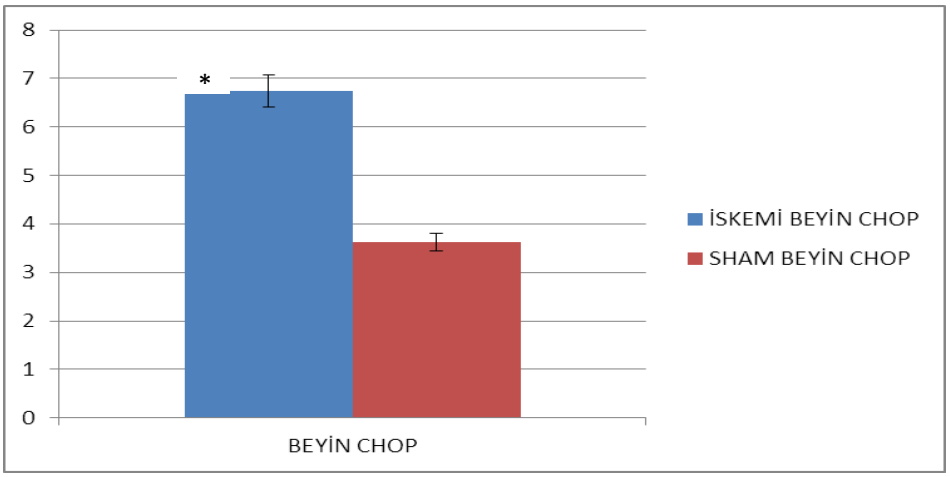
Şekil 4.7. Karaciğer CHOP ifadelenmesi (p=0,032680545)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu karaciğer CHOP ifadelenmeleri kontrol grubu karaciğer CHOP ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda istatiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. ($p \leq 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.)



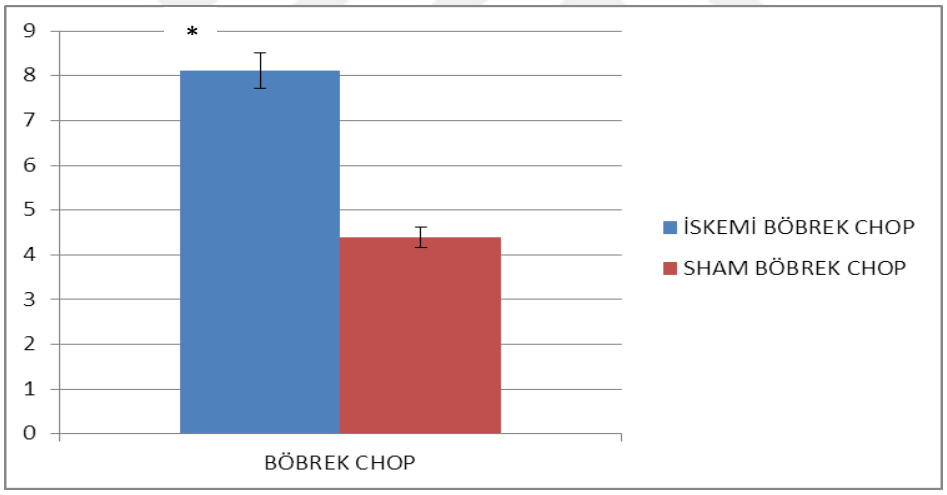
Şekil 4.8. Akciğer CHOP ifadelenmesi (p= 0,114851326**)**

İskemi reperfüzyon ve sham grubu akciğer CHOP ifadelenmeleri kontrol grubu akciğer CHOP ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. ($p \leq 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.)



Şekil 4.9. Beyin CHOP ifadelenmesi (p= 0,019028561)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu beyin CHOP ifadelenmeleri kontrol grubu beyin CHOP ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda istatiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)



Şekil 4.10. Böbrek CHOP ifadelenmesi (p= 0,019028561)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu böbrek CHOP ifadelenmeleri kontrol grubu böbrek CHOP ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda istatiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)

4.4. Perk İfadelenmesi

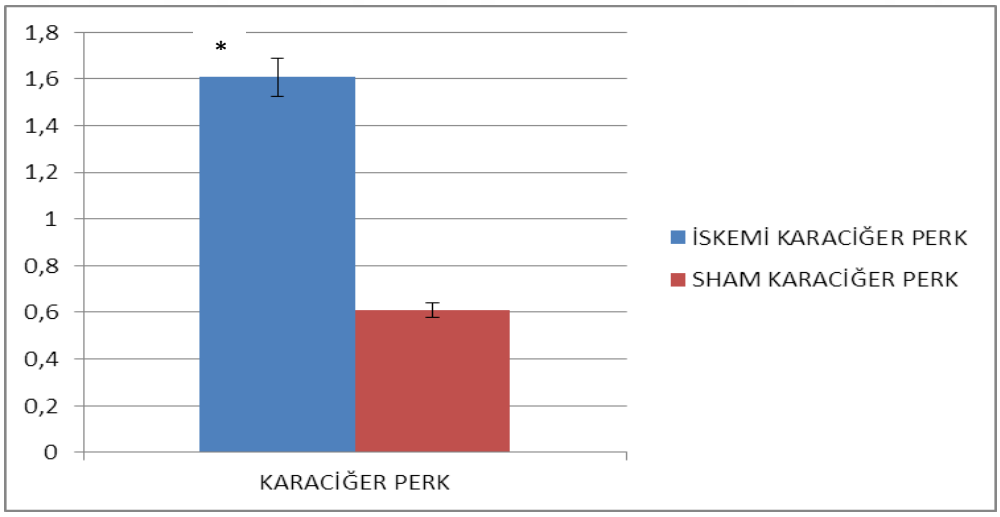
PERK		İskemi	Sham
Karaciğer	1	3,402	0,6305
	2	2,114	0,7891
	3	1,472	0,882
	4	0,1804	0,5828
	5	1,005	0,2244
	6	1,466	0,5474

		İskemi	Sham
Akciğer	1	1,744	0,592
	2	1,611	3,044
	3	1,621	2,28
	4	0,9948	1,048
	5	2,357	0,8314
	6	4,222	0,8696

		İskemi	Sham
Beyin	1	1,651	0,5608
	2	0,3817	0,4673
	3	0,7051	0,5533
	4	0,4507	0,5139
	5	0,3813	0,4238
	6		0,1739

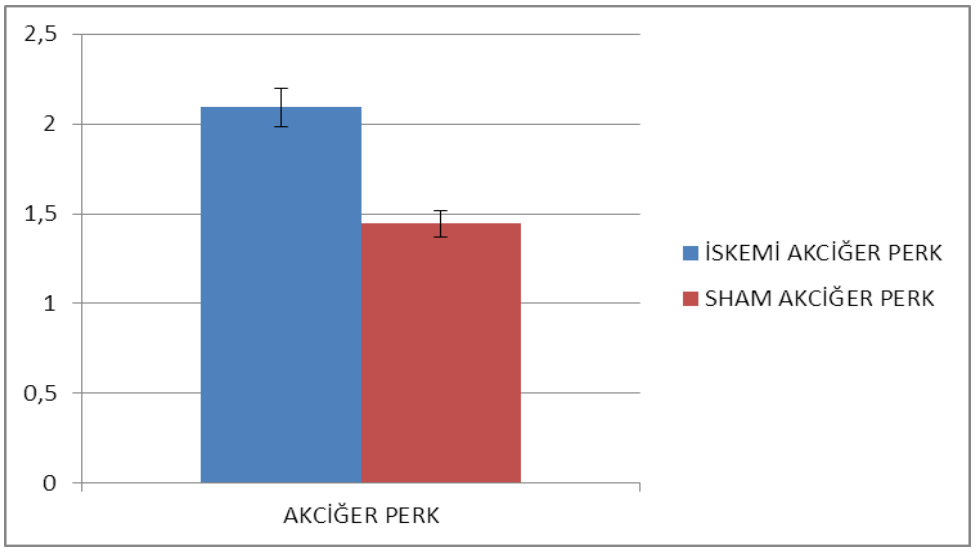
		İskemi	Sham
Böbrek	1	0,4319	0,8876
	2	0,4153	0,4545
	3	0,2419	0,5507
	4	0,5085	0,1109
	5	3,661	0,3758
	6	0,2957	0,1433

Şekil 4.11. Organlar arası PERK ifadelenmesi (iskemi ve sham grubunun kontrol grubuna göre oranları)



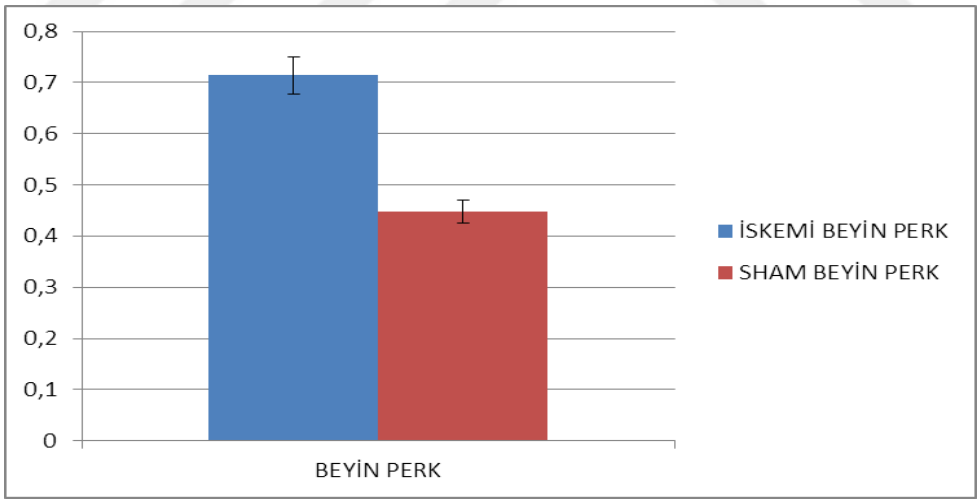
Şekil 4.12. Karaciğer PERK ifadelenmesi (p= 0,039643917)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu karaciğer PERK ifadelenmeleri kontrol grubu karaciğer PERK ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda istatiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. ($p \leq 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.)



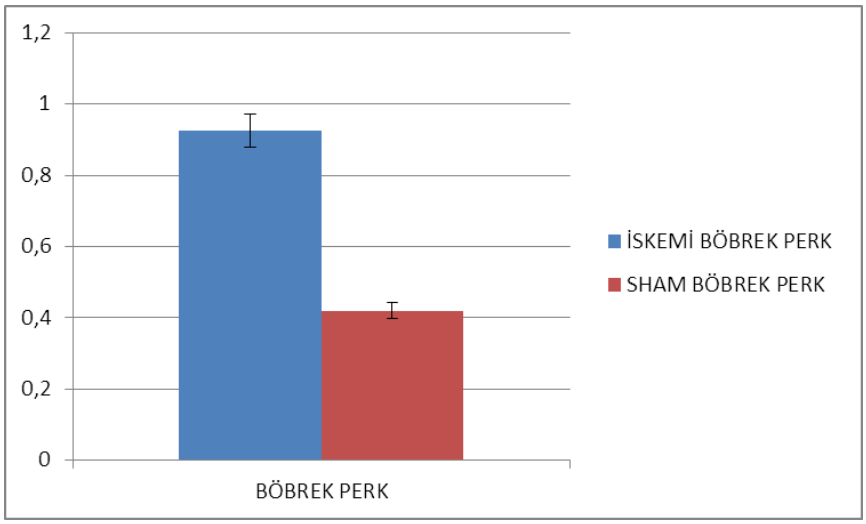
Şekil 4.13. Akciğer PERK İfadelenmesi (p= 0,157438822)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu akciğer PERK ifadelenmeleri kontrol grubu akciğer PERK ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)



Şekil 4.14. Beyin PERK İfadelenmesi (p= 0,173317695)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu beyin PERK ifadelenmeleri kontrol grubu beyin PERK ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)



Şekil 4.15. Böbrek PERK İfadelenmesi (p=0,20446665**)**

İskemi reperfüzyon ve sham grubu böbrek PERK ifadelenmeleri kontrol grubu böbrek PERK ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)

4.5. Atf6 İfadelenmesi

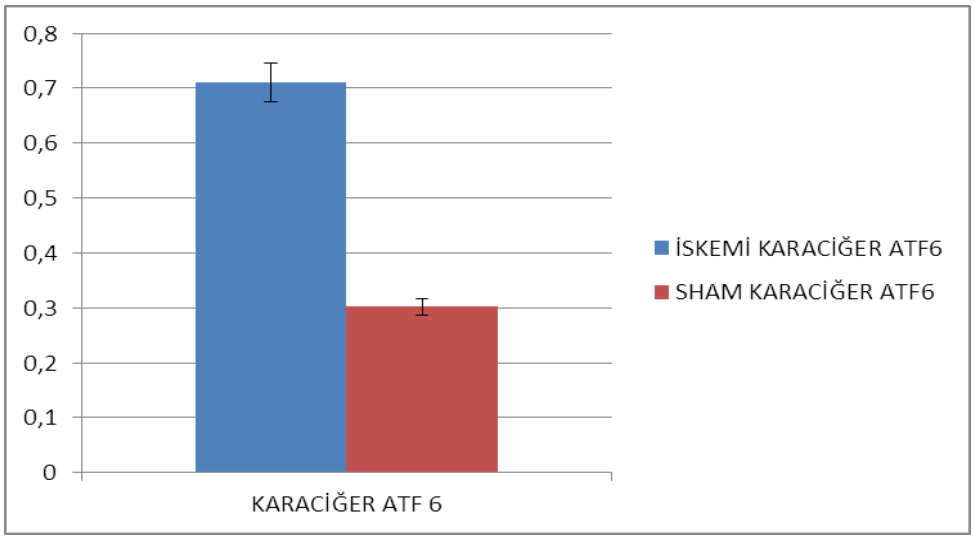
ATF6		İskemi	Sham
Karaciğer	1	1,164	0,419
	2	0,7486	0,1699
	3	1,301	0,328
	4	6,79E-02	0,4225
	5	0,5074	0,1945
	6	0,4774	0,2784

		İskemi	Sham
Akciğer	1	2,803	0,4481
	2	1,315	2,843
	3	0,6455	0,5903
	4	1,156	0,6311
	5	1,359	1,183
	6	1,061	0,195

		İskemi	Sham
Beyin	1	0,242	0,2579
	2	0,2085	0,2161
	3	0,3407	0,2898
	4	0,5966	0,2783
	5	0,3145	0,3344
	6		0,154

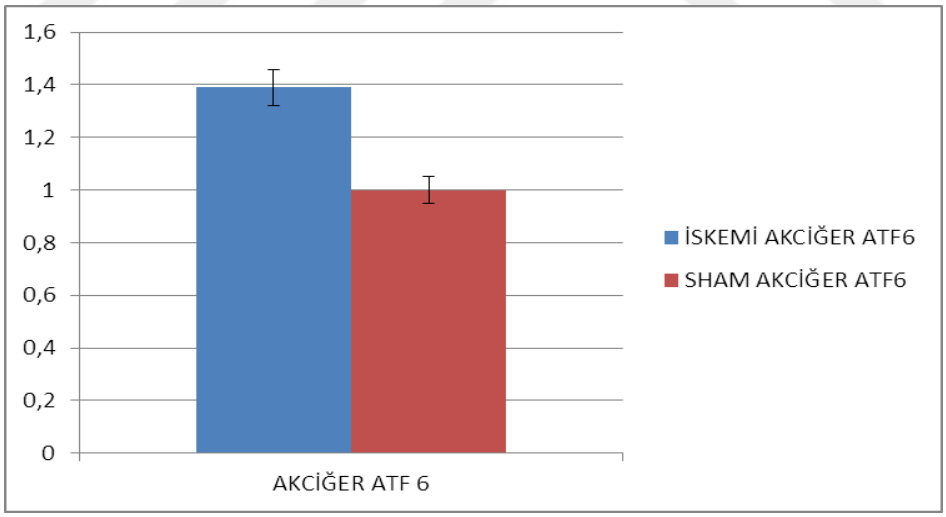
		İskemi	Sham
Böbrek	1	0,6693	0,6403
	2	0,5939	0,1212
	3	0,2045	0,2061
	4	0,4765	0,1077
	5		0,4307
	6	0,1443	8,66E-02

Şekil 4.16. Organlar arası ATF6 ifadelenmesi (iskemi ve sham grubunun kontrol grubuna göre oranları**)**



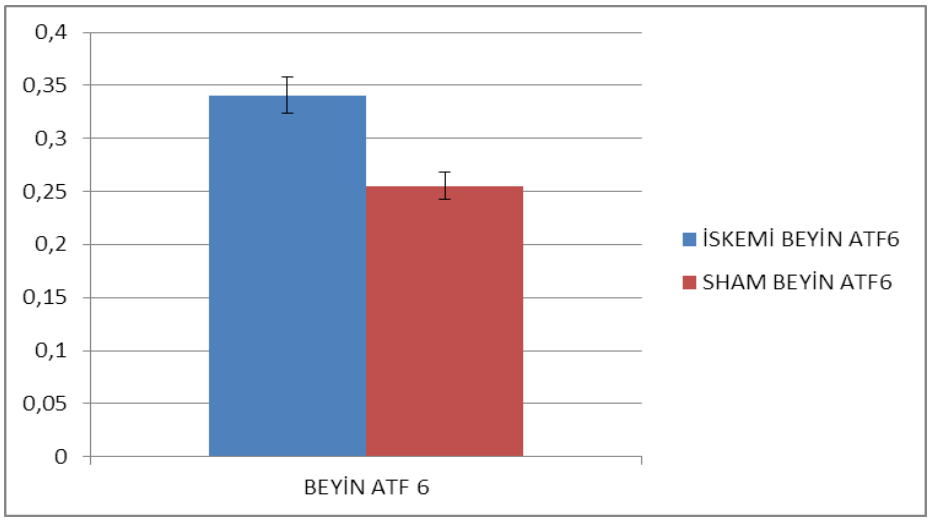
Şekil 4.17. Karaciğer ATF6 ifadelenmesi (p= 0,039458756)

İskemi reperfüzyon grubu karaciğer ve sham grubu karaciğer ATF6 ifadelenmeleri kontrol grubu karaciğer ATF6 ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda istatiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)



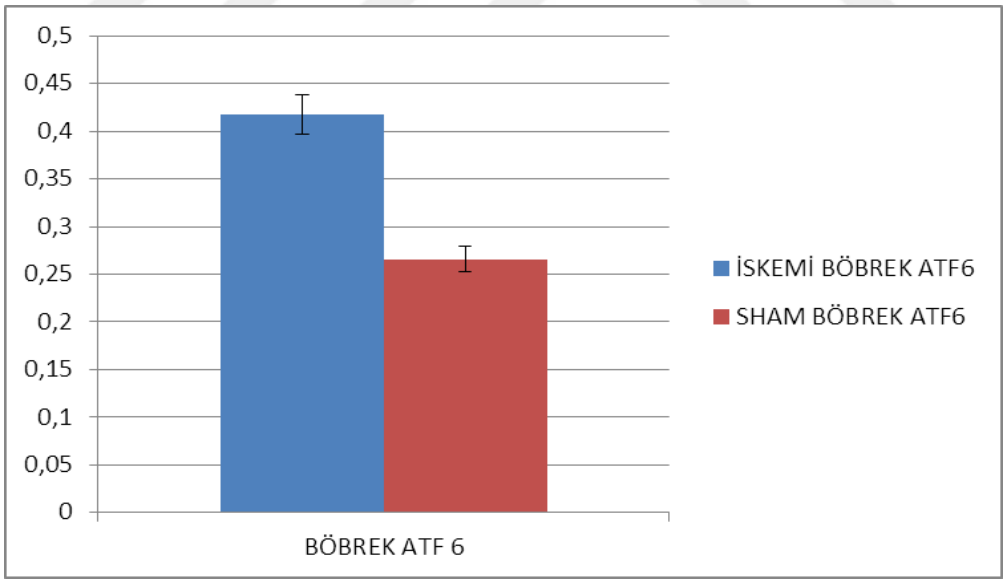
Şekil 4.18. Akciğer ATF6 ifadelenmesi (p= 0,21627953)

İskemi reperfüzyon ve sham grubu akciğer ATF6 ifadelenmeleri kontrol grubu akciğer ATF6 ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. (p≤0.05 anlamlı kabul edilmiştir.)



Şekil 4.19. Beyin ATF6 ifadelenmesi (p= 0,14744585)

İskemi reperfüzyon grubu beyin ve sham grubu beyin ATF6 ifadelenmeleri kontrol grubu beyin ATF6 ifadelenmesiyle karşılatırıldı, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görüldü fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. ($p \leq 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.)

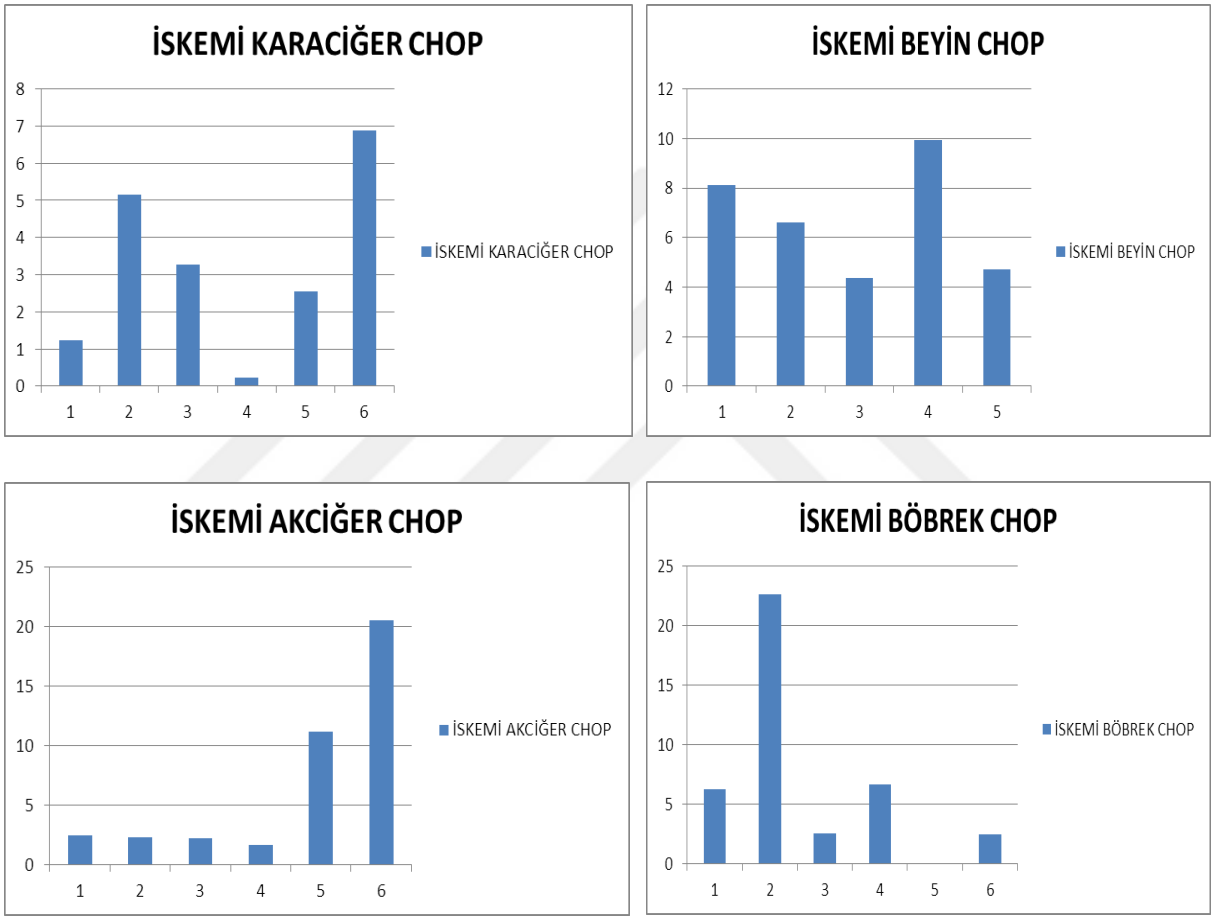


Şekil 4.20. Böbrek ATF6 ifadelenmesi (p= 0,151898666)

İskemi reperfüzyon grubu böbrek ve sham grubu böbrek ATF6 ifadelenmeleri kontrol grubu böbrek ATF6 ifadelenmesiyle karşılatırılmış, sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda bir artış görülmüş fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. ($p \leq 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.)

4.6. İskemi/Reperfüzyon Grubu Sıçanlar Arası Chop Karşılaştırılması

Çalışmamızda I/R grubunda bulunan sıçanlarda iskemi ve reperfüzyon süresi aynı olmasına rağmen, bazı sıçanlarda I/R hasarının etkisi daha çok, bazılarında ise daha az görülmüştür. Bu durumun etkileri hem yapılan immünohistokimyasal çalışmalar sonucunda hem de hasarın moleküler düzeyde en iyi şekilde anlaşılmasını sağlayan parametrelerden biri olan CHOP ifadelenmelerindeki artış farklılıklarıyla ortaya konulmuştur.



Şekil 4. 21. İskemi/Repefüzyon grubu sıçanlar arasındaki Chop ifadelenmelerinin kontrol grubuna göre oranlarının farklılıkları.

4.7. Histopatolojik Bulgular

4.8. Karaciğer Hepatik Hasar Durumu

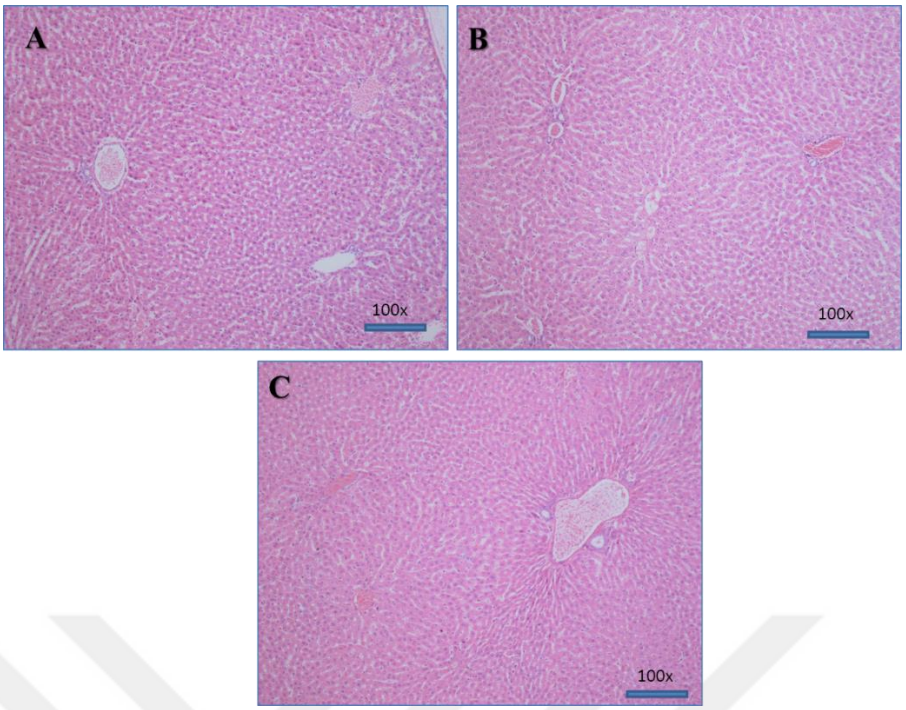
Tablo 4.1. İskemi/reperfüzyon grubu (1-6), Sham Grubu (7-12) , Kontrol (13-15), (BBA: büyük büyütme alanı)

	Sinuzoidal konjesjon	Sitoplazmik vakuolizasyon	Parankim hücre nekrozu	Nötrofil sayısı 50/BBA
1 İSKEMİ	3	0	2	-
2 İSKEMİ	3	0	2	-
3 İSKEMİ	2	1	1	-
4 İSKEMİ	2	1	2	+
5 İSKEMİ	4	0	2	+
6 İSKEMİ	4	0	2	-
7 SHAM	1	4	0	-
8 SHAM	1	3	0	+
9 SHAM	1	4	0	-
10 SHAM	1	3	2	-
11 SHAM	2	3	2	-
12 SHAM	2	4	0	-
13 KONTROL	1	2	2	+
14 KONTROL	0	3	0	-
15 KONTROL	0	3	0	-

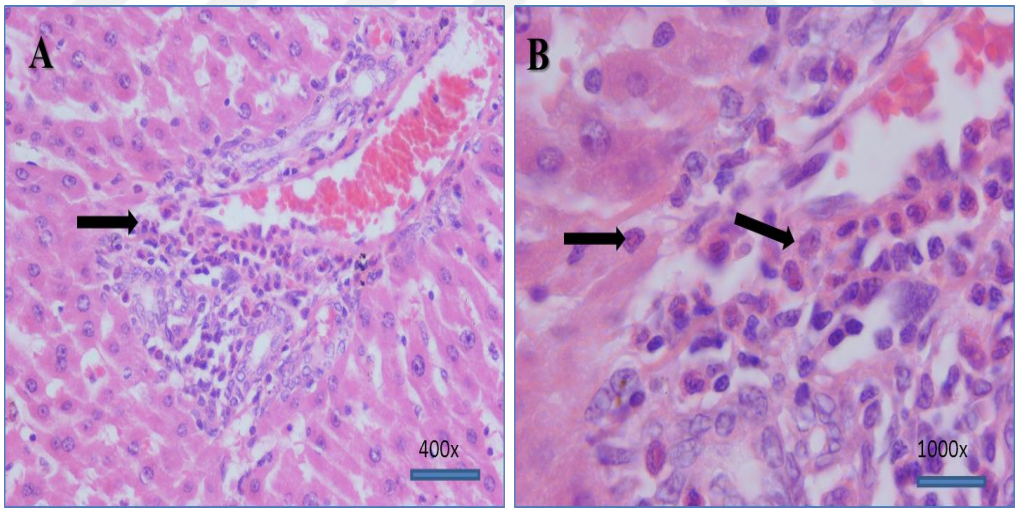
Kontrol grubu, karaciğerinin histopatolojik incelemelerinde, hepatositlerde hafif hidropik dejenerasyon, karaciğerlerin sinuzoid ve morfolojik yapısı normal olarak görüntülendi. Karaciğer hücreleri, intakt ve santral venden perifere normal sinüzoidal dizilim göstermektedir.

İskemi reperfüzyon grubunda, santral ven çevresinden (Zon 3) başlayan hepatosit kordonlarında daralma ve hepatoselüler kayıp ile karakterize parankim hücre zedelenmesi ve santral ven çevresinde (Zon 3) belirgin konjesyon ile birlikte portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu görüldü.

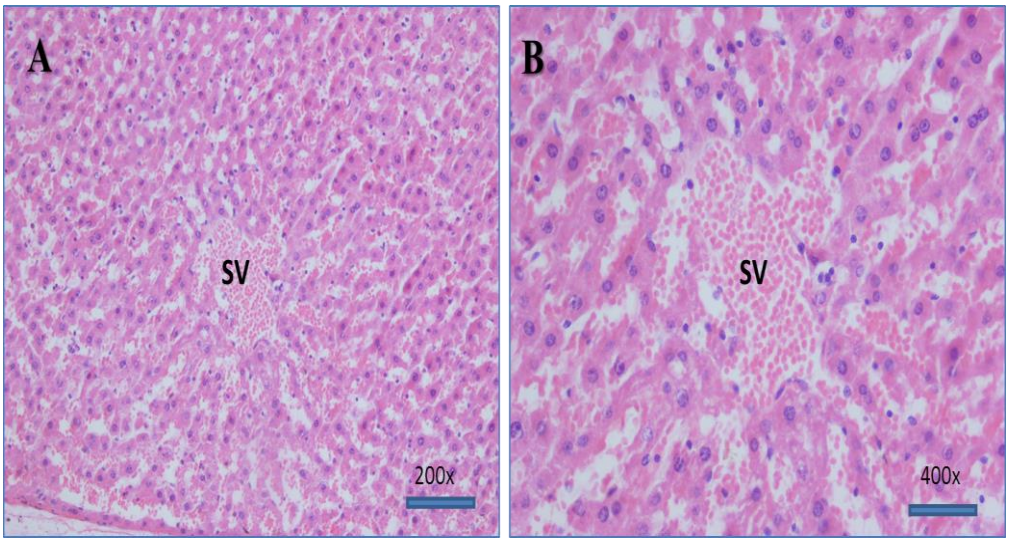
Sham grubunda ise hepatositlerde belirgin hidropik dejenerasyon ile birlikte portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu görüldü.



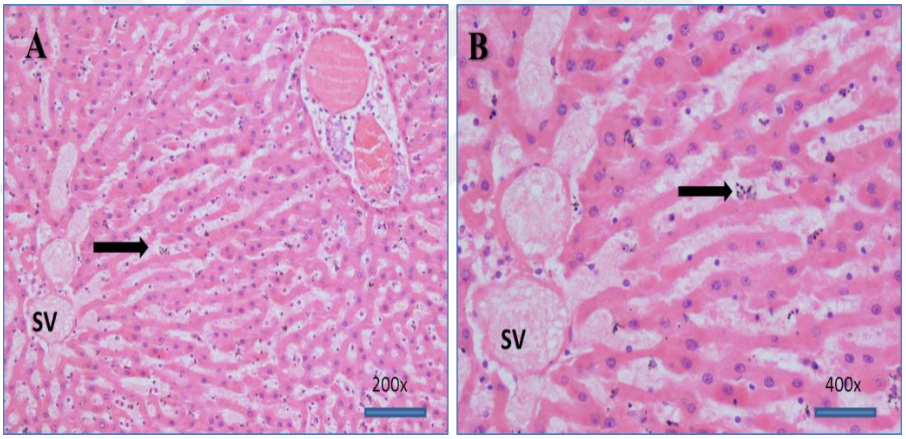
Resim 4.1. A. İskemi reperfüzyon grubu, Karaciğer parankimi (H&E x100) B: Sham grubu, Karaciğer parankimi (H&E x100) C: Kontrol grubu, normal karaciğer parankimi (H&E x100)



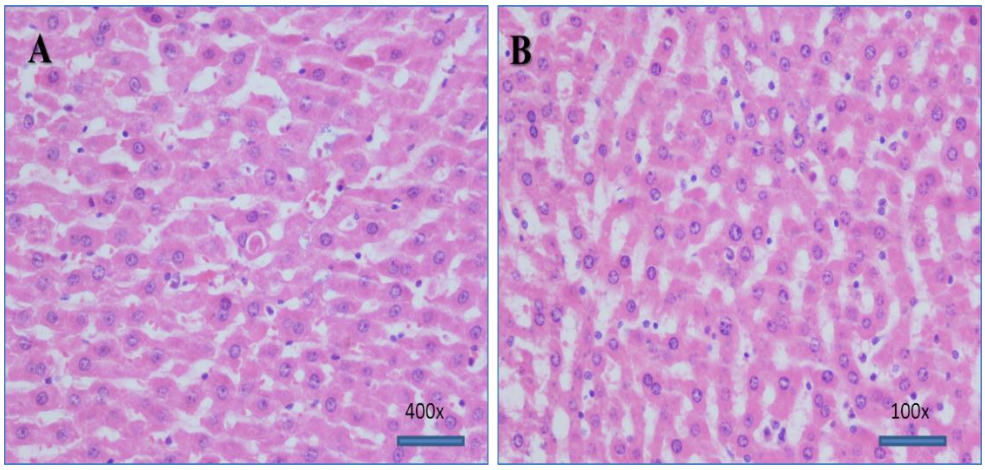
Resim 4.2. A. İskemi reperfüzyon grubu, portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu (H&E x400) B: İskemi grubu, portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu (H&E x1000)



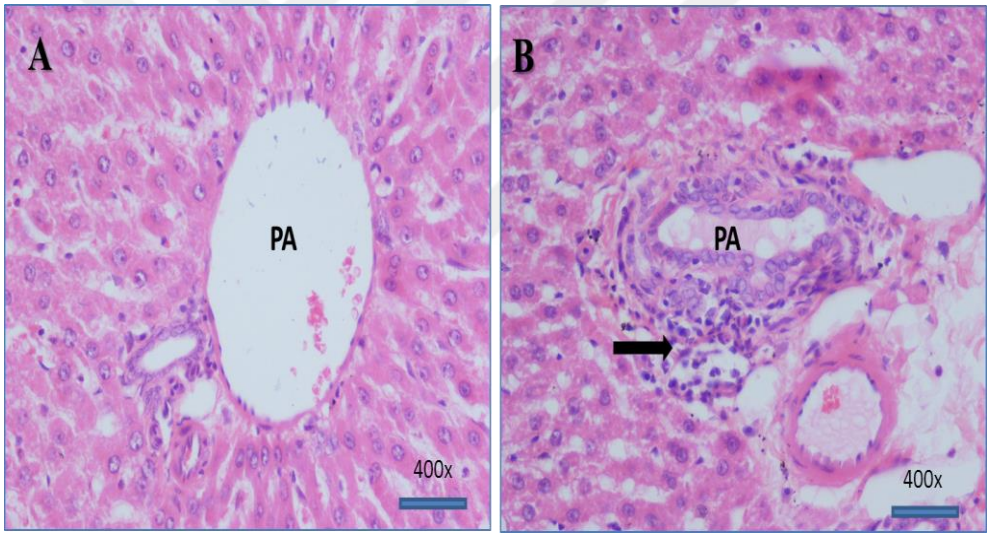
Resim 4.3. A. İskemi reperfüzyon, santral ven çevresinde (Zon 3) belirgin konjesyon (H&E x200) B: İskemi reperfüzyon grubu, santral ven çevresinde (Zon 3) belirgin konjesyon (H&E x400) (SV: santral ven)



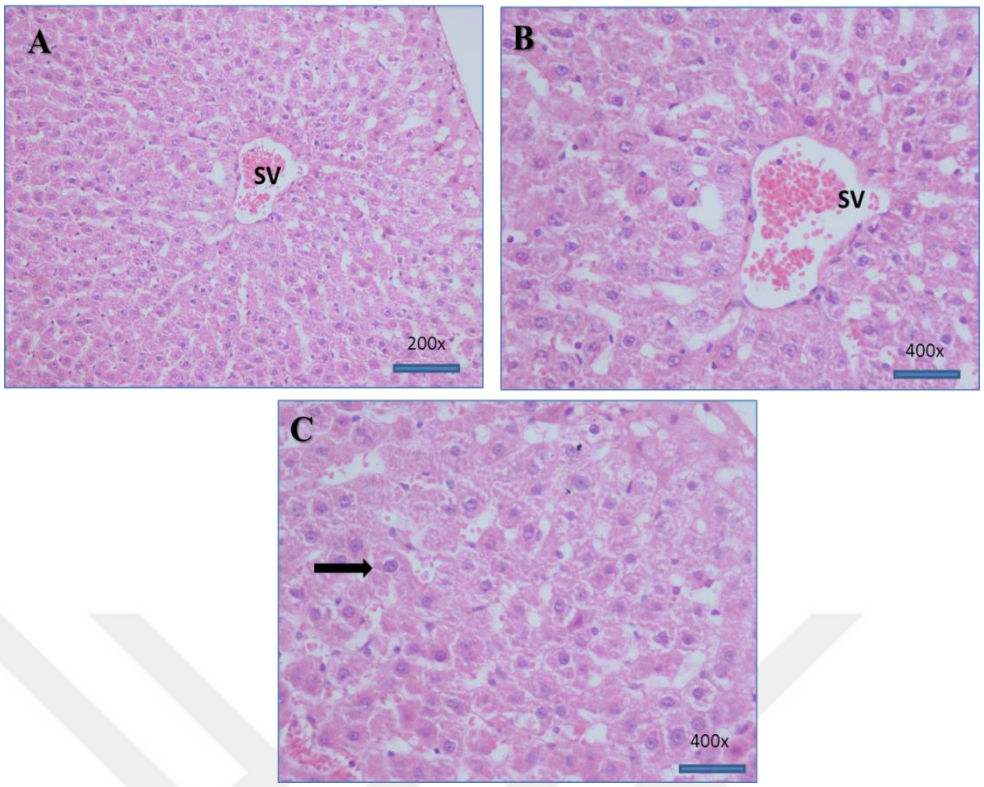
Resim 4.4. A. İskemi reperfüzyon grubu, Santral ven çevresinden (Zon 3) başlayan hepatosit kordonlarında daralma ve hepatoselüler kayıp ile karakterize parankim hücre zedelenmesi (H&E x200) B: İskemi reperfüzyon, Santral ven çevresinden (Zon 3) başlayan hepatosit kordonlarında daralma ve hepatoselüler kayıp ile karakterize parankim hücre zedelenmesi (H&E x400) (SV: santral ven)



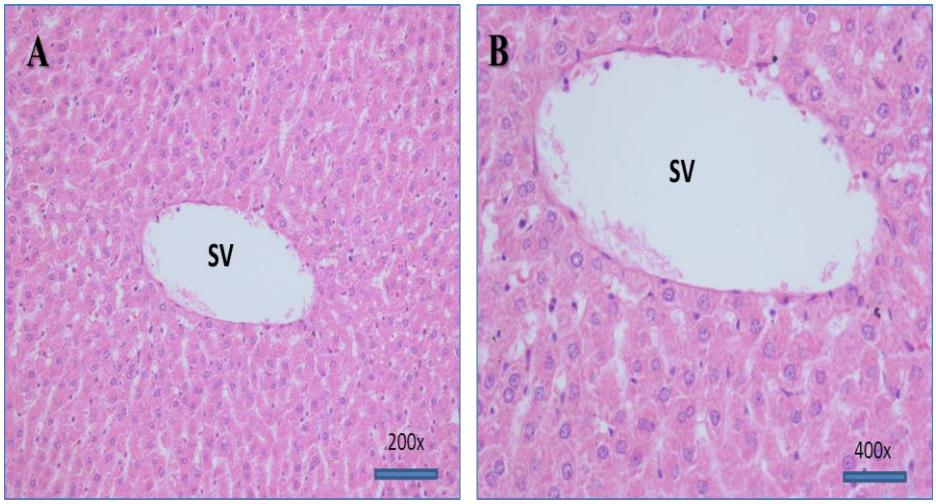
Resim 4.5. A. İskemi reperfüzyon, tek hücre nekrozları (H&E x400) B: İskemi reperfüzyon grubu, Karaciğer parankiminde sinüzodal dilatasyon, asiner transformasyon ve hepatosit kordonlarında daralma (H&E x100)



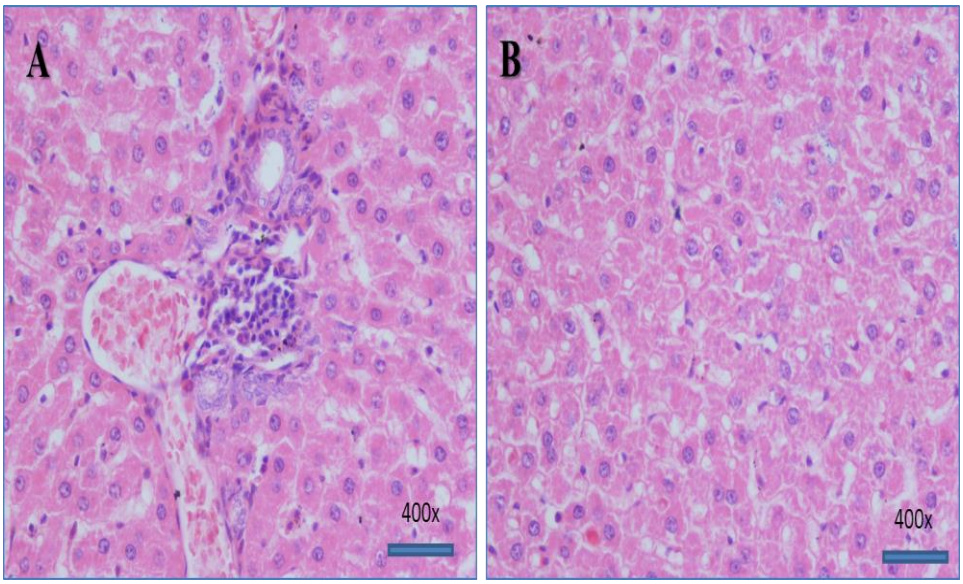
Resim 4.6. A. Sham grubu, portal alan çevresi (H&E x400) B: Sham grubu, bir portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu (H&E x400) (PA: portal alan)



Resim 4.7. A. Sham grubu, santral ven çevresi (Zon 3) (H&E x200) B: Sham grubu, santral ven çevresi (Zon 3) (H&E x400) C: Sham grubu, Hepatositlerde belirgin hidropik dejenerasyon (H&E x400) (SV: santral ven)



Resim 4.8. A: Kontrol grubu, santral ven çevresi (Zon 3) (H&E x200) B: Kontrol grubu, santral ven çevresi (Zon 3) (H&E x400) (SV: santral ven)



Resim 4.9. A. Kontrol grubu, bir portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu (H&E x400)
B: Kontrol grubu, Hepatositlerde hafif hidropik dejenerasyon (H&E x400)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

I/R hasarı karaciğer travmaları, rezeksiyonu ve transplantasyonu sırasında ve sonrasında ortaya çıkabilen önemli bir sorundur. İskemi sonrası reperfüzyonla birlikte dokuya enerji ve gereken oksijen sağlanır, aynı zamanda ise toksik metabolitler uzaklaştırılır. Fakat sistemik dolaşıma katılan toksik metabolitlerin dönmesiyle birlikte ortamda ciddi sorunlara yol açarak doku hasarını arttırır.[18] Reperfüzyonla ortaya çıkan toksik ürünler ve inflamasyonla birlikte, akciğer, kalp, beyin, böbrek gibi uzak organlarda hasar oluşturur.[13] Kan akımının ve oksijenin geçici olarak azalması ya da tamamen durması ile oluşan iskemi dönemi ve kan akımının tekrar sağlanması ile birlikte serbest oksijen radikallerinin, sitokinlerin salınması, adhezyon moleküllerinin artması ve buna bağlı olarak organ hasarı ile sonuçlanan reperfüzyon dönemini içerir.[4, 5] I/R hasarı, organ transplantasyonu ve rezeksiyonu, inme, yanık, şok, miyokard infaktüsü, sepsis, travma gibi bir çok durumda görülmesine rağmen gelişim mekanizması hala tam olarak bulunamamıştır. I/R hasarı karaciğer cerrahisinde oluşan morbiditenin en önemli nedenidir.[24]

Karaciğer transplantasyonunda ve operasyonlarında kanamanın engellenmesi için hepatik pedikül klempleme (Pringle manevrası) yöntemi sıkça kullanılmaktadır.[3] I/R hasarı sonrasında karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılan yöntemler biyokimyasal olarak ALT AST enzim düzeylerinin karşılaştırılması ve histopatolojik olarak ise sinuzoidal konjesyon, sitoplazmik vakuolizasyon, hepatosellüler nekroz ve nötrofil infiltrasyonu gibi parametrelerle karaciğer fonksiyonuna bakılmasıdır [13, 18]. Bizim çalışmamızda, sıçanlarda orta ve sol lateral hepatik lobları besleyen hepatik portal ve ven 60 dakika süreyle klempe edildikten sonra mikrovasküler klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon sağlanmıştır. Oluşturulan karaciğer I/R sonucu karaciğer dokusunda meydana gelen patolojik değişiklikler histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Karaciğer I/R modeli oluşturulan çalışmada Crockett ET ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada karaciğer iskemisi uygulanan deney grubunda ALT enzim düzeylerinde artma meydana geldiğini ve histopatolojik değerlendirmelerde ise sitoplazmik vakuolizasyon, sinuzoidal konjesyon, nötrofil infiltrasyonu ve hepatosellüler nekroz gözlendiğini raporlanmıştır [42]. Başka bir çalışmada ise Ferdinand Serracino-Inglott ve arkadaşları karaciğer iskemisi uygulanan grupta karaciğer ALT, AST enzim düzeylerinde artışla beraber, hepatositlerde nekroz polimorfnükleer hücre infiltrasyonu ve sinuzoidal

genişleme varlığını saptamışlardır[43]. Yani karaciğer iskemisi uygulanan hayvanlarda yapılan histopatolojik incelemelerde genel olarak hepatositlerde nekroz, hepatik kordonlarda daralma ve ayrılma, nötrofil lökosit infiltrasyonu, hemoraji, karaciğer parankiminde sinüzodal dilatasyon, asiner transformasyon ve sinuzoidlerde genişleme gözlenir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise karaciğer dokusunda oluşan histopatolojik hasar Crockett ET ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde iskemi grubunda santral ven çevresinden başlayan hepatosit kordonlarında daralma ve hepatoselüler kayıp ile parankim hücre zedelenmesi, santral ven çevresinde belirgin konjesyon ile birlikte portal alanda nötrofil lökosit infiltrasyonu görüldü. Fakat yapılan diğer çalışmalarda histopatolojik değerlendirmeler sonucu oluşan hasar, yalnızca iskemi grubunda görülmektedir. Kontrol ve sham grubunda bu tip hasar bu derecede olmamaktadır. Bizim çalışmamızda ise, kontrol grubunda hepatositlerde hafif derecede olsa bile bir hidropik dejenerasyon, sham grubunda da belirgin şekilde hidropik dejenerasyonla birlikte portal alanda nötrofil ve lökosit infiltrasyonu görüldü. Bu durumda rastgele seçilen sıçanlarda iskemiye bağlı olmaksızın başka bir hastalıkları olabileceğini düşündürmektedir.

Çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda olduğu gibi karaciğer I/R hasarı sonrasında Endoplazmik Retikulumda katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi sonucunda katlanmamış protein yanıtı oluşmaktadır. Katlanmamış protein yanıtı sonucu hücre ya apoptoza gitmekte ya da tekrar hayatta kalmayı sağlama yönünde tercih yapmaktadır[12]. Qing X. ve arkadaşları beyin iskemisinde, iskemi süresine bağlı olarak endoplazmik retikulum stres genlerinin hem gen düzeyinde hem de protein düzeyinde ifadelenmelerini arttığını göstermiştir[44]. Ayrıca Emma Folch-Puy ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda karaciğer transplantasyonlarında ve greft ameliyatlarında oluşan karaciğer hasarlanmasında ER stresinin rolünün azımsanamayacak kadar önemli olduğunu ortaya koymuşlardır[45]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise karaciğer dokusunda ATF6, PERK ve CHOP gen düzeylerinde istatiksel olarak bir artış gözlenmiştir. GRP78 düzeyinde de bir artış görülmesine rağmen istatiksel olarak anlamlı bulunamadı.

I/R hasarı modeli çalışmalarında, oluşan sistemik bir inflamasyon sonucu hasar oluşturulan organ dışındaki uzak organlarda da hasar oluşturabileceği bilinmektedir. Stringa P. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bağırsak iskemisi sonrası uzak organlarda da hasar oluşabileceğini göstermişlerdir. Fakat daha önce yapılan hiçbir çalışmada karaciğer

I/R hasarı sonrası karaciğer dışındaki diğer organlarda oluşan endoplazmik retikulum stresi gösterilmemiştir[4].
Bu çalışmada I/R hasarı sonrası karaciğerde ve beyin, böbrek, akciğer gibi uzak organlarda endoplazmik retikulum stresi gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda endoplazmik retikulum stres genleri olan GRP78, PERK, ATF6, ve CHOP ifadelenmelerine karaciğer, akciğer, böbrek ve beyinde bakılmış ve tüm genlerde sham grubuna kıyasla bir artış gözlenmiştir. Özelikle CHOP ifadelenmesi akciğer hariç diğer organlarda istatiksel olarak anlamlı olarak artmıştır.

I/R hasarı sonrası hatalı katlanmış proteinlerin birikimiyle birlikte endoplazmik retikulum stresin üstesinden gelmek için hücrede KPY yolağını aktive etmektedir. Eğer stres devam ederse, KPY'nin aktivasyonu ER stresiyle baş etmek için yetersiz kalır ve böyle bir durumda ER stresi programlı hücre ölümüne yol açar. ER stresiyle tetiklenen proapoptotik sinyalleri direkt olarak hücre ölümüne yol açmak yerine CHOP yolağın ilerisindeki moleküllerin aktivasyonunu başlatarak etki ederler. Çok uzun süren ER stresi ile birlikte CHOP, en fazla ifadesi artan genlerden biri olduğu bilinmektedir. CHOP'un transkripsiyonu, ER transmembran proteinlerinden PERK, ATF6 ve IRE-1 tarafından aktive edilmektedir. Pek çok çalışmada ER stres kaynaklı apoptoz CHOP yolağını içermektedir. CHOP'un maksimum olarak indüklenmesi için, bütün ER stres cevap yolakları gereklidir.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda da hem karaciğerde hem de diğer organlarda CHOP ifadesinin anlamlı derecede artması karaciğer I/R hasarı sonrası endoplazmik retikulumda KPY yolağının aktive olup, hücrelerde ER stresi oluştuğunu göstermektedir.

Çalışmamızda kullanılan sıçanların hepsinin aynı derecede sağlıklı olmayışı, ayrıca sıçanlara uygulanan iskemi sürelerinin aynı olmasına rağmen, I/R hasarının aynı derecede gözlenememesi özellikle CHOP ifadelenmelerinin farklı oluşmasına sebep olmuştur. Bu yüzden ilerde yapılması planlanan başka çalışmalarda sonuçların daha anlamlı olması adına, aynı yaşta daha sağlıklı inbred sıçanlar kullanılıp, sıçanlarda oluşan iskemik hasarların birbirine yakın olduğu gruplar seçilerek hem gen, hem de protein düzeyinde daha anlamlı sonuçların çıkması beklenmektedir.

Günümüzde özellikle karaciğer transplantasyonlarında kullanılan pringle manevrası yöntemi ve sonrasında oluşması beklenen I/R hasarında ER stresinin rolü azımsanmayacak derecede fazladır. Hatta oluşan bu stres sonucu yalnızca karaciğer değil, diğer uzak

organlar bile etkilenmektedir. Bu yüzden karaciğer cerrahisi öncesi bu stresin önüne geçebilmek ve hasarın en aza indirilmesi adına daha çok çalışma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Peralta, C., M.B. Jimenez-Castro, and J. Gracia-Sancho, *Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu.* J Hepatol, 2013. **59**(5): p. 1094-106.
2. Zhu, J., et al., *Rapamycin Attenuates Mouse Liver Ischemia and Reperfusion Injury by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress.* Transplant Proc, 2015. **47**(6): p. 1646-52.
3. Maurer, C.A., et al., *Liver resections can be performed safely without Pringle maneuver: A prospective study.* World J Hepatol, 2016. **8**(24): p. 1038-46.
4. Stringa, P., et al., *Pretreatment Combination Reduces Remote Organ Damage Secondary to Intestinal Reperfusion Injury in Mice: Follow-up Study.* Transplant Proc, 2016. **48**(1): p. 210-6.
5. Cao, S., et al., *Brain death is associated with endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rat liver.* Transplant Proc, 2014. **46**(10): p. 3297-302.
6. Oakes, S.A. and F.R. Papa, *The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology.* Annu Rev Pathol, 2015. **10**: p. 173-94.
7. Senft, D. and Z.A. Ronai, *UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response.* Trends Biochem Sci, 2015. **40**(3): p. 141-8.
8. Hetz, C., *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 89-102.
9. Grootjans, J., et al., *The unfolded protein response in immunity and inflammation.* Nat Rev Immunol, 2016. **16**(8): p. 469-84.
10. Gardner, B.M., et al., *Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(3): p. a013169.
11. Brenner, C., et al., *Decoding cell death signals in liver inflammation.* J Hepatol, 2013. **59**(3): p. 583-94.
12. Zhou, H., et al., *The Dichotomy of Endoplasmic Reticulum Stress Response in Liver Ischemia-Reperfusion Injury.* Transplantation, 2016. **100**(2): p. 365-72.
13. Abu-Amara, M., et al., *Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review.* Liver Transpl, 2010. **16**(9): p. 1016-32.
14. Park, S.W., J.W. Kang, and S.M. Lee, *Role of Kupffer cells in ischemic injury in alcoholic fatty liver.* J Surg Res, 2015. **194**(1): p. 91-100.

15. Sun, Y., et al., *N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury.* World J Gastroenterol, 2014. **20**(41): p. 15289-98.
16. Ji, C., *Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury.* J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23 Suppl 1**: p. S16-24.
17. Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J.C. Reed, *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions.* J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2656-64.
18. Zhai, Y., et al., *Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(2): p. 79-89.
19. Bejaoui, M., et al., *Carbonic Anhydrase Protects Fatty Liver Grafts against Ischemic Reperfusion Damage.* PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134499.
20. Guan, L.Y., et al., *Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide.* World J Gastrointest Surg, 2014. **6**(7): p. 122-8.
21. Chu, M.J., et al., *The impact of hepatic steatosis on hepatic ischemia-reperfusion injury in experimental studies: a systematic review.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 192029.
22. Tiriveedhi, V., et al., *The role of molecular chaperonins in warm ischemia and reperfusion injury in the steatotic liver: a proteomic study.* BMC Biochem, 2012. **13**: p. 17.
23. Xu, Z.C., et al., *Grape seed proanthocyanidin protects liver against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress.* World J Gastroenterol, 2015. **21**(24): p. 7468-77.
24. Rocker, G.M., *Ischaemia/reperfusion, inflammatory responses and acute lung injury.* Thorax, 1997. **52**(10): p. 841-2.
25. Mikrou, A., et al., *Molecular studies of the immunological effects of the sevoflurane preconditioning in the liver and lung in a rat model of liver ischemia/reperfusion injury.* Mol Immunol, 2016. **72**: p. 1-8.
26. Ogawa, K., et al., *Influence of Kupffer cells and platelets on ischemia-reperfusion injury in mild steatotic liver.* World J Gastroenterol, 2013. **19**(9): p. 1396-404.
27. Kolattukudy, P.E. and J. Niu, *Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway.* Circ Res, 2012. **110**(1): p. 174-89.
28. Rashid, H.O., et al., *ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection.* Autophagy, 2015. **11**(11): p. 1956-1977.
29. Zhang, J., et al., *Autophagy is involved in endoplasmic reticulum stress-induced cell death of rat hepatocytes.* J Surg Res, 2013. **183**(2): p. 929-35.

30. Sano, R. and J.C. Reed, *ER stress-induced cell death mechanisms.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3460-70.
31. Szegezdi, E., et al., *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.* EMBO Rep, 2006. **7**(9): p. 880-5.
32. Zaouali, M.A., et al., *AMPK involvement in endoplasmic reticulum stress and autophagy modulation after fatty liver graft preservation: a role for melatonin and trimetazidine cocktail.* J Pineal Res, 2013. **55**(1): p. 65-78.
33. Rao, J., et al., *ATF6 mediates a pro-inflammatory synergy between ER stress and TLR activation in the pathogenesis of liver ischemia-reperfusion injury.* Am J Transplant, 2014. **14**(7): p. 1552-61.
34. Tang, X., et al., *ATF6 pathway of unfolded protein response mediates advanced oxidation protein product-induced hypertrophy and epithelial-to-mesenchymal transition in HK-2 cells.* Mol Cell Biochem, 2015. **407**(1-2): p. 197-207.
35. Li, B., et al., *Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response.* Virus Res, 2007. **124**(1-2): p. 44-9.
36. Mosbah, I.B., et al., *IGL-1 solution reduces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rat liver transplantation.* Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e279.
37. Oyadomari, S. and M. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress.* Cell Death Differ, 2004. **11**(4): p. 381-9.
38. Cao, S., et al., *C/EBP homologous protein-mediated endoplasmic reticulum stress-related renal apoptosis is involved in rats with brain death.* Transplant Proc, 2015. **47**(2): p. 354-8.
39. Tabas, I. and D. Ron, *Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress.* Nat Cell Biol, 2011. **13**(3): p. 184-90.
40. Lee, H., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced JNK activation is a critical event leading to mitochondria-mediated cell death caused by beta-lapachone treatment.* PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21533.
41. Seki, E., D.A. Brenner, and M. Karin, *A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches.* Gastroenterology, 2012. **143**(2): p. 307-20.
42. Crockett, E.T., et al., *Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists.* BMC Clin Pathol, 2006. **6**: p. 3.
43. Serracino-Inglott, F., et al., *Differential nitric oxide synthase expression during hepatic ischemia-reperfusion.* Am J Surg, 2003. **185**(6): p. 589-95.
44. Xin, Q., et al., *Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia.* Neurochem Int, 2014. **68**: p. 18-27.

45. Folch-Puy, E., et al., *Relevance of Endoplasmic Reticulum Stress Cell Signaling in Liver Cold Ischemia Reperfusion Injury.* Int J Mol Sci, 2016. **17**(6).