

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**D-GALAKTOZ İLE İNDÜKLENMİŞ YAŞLANMA MODELİNDE
GELİŞEN KARACİĞER FİBROZİSİNDE
SIRT2 İNHİBİSYONUNUN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. ASLI NUR BAHAR**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. K. GONCA AKBULUT**

**ANKARA
MART 2022**



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**D-GALAKTOZ İLE İNDÜKLENMİŞ YAŞLANMA MODELİNDE
GELİŞEN KARACİĞER FİBROZİSİNDE
SIRT2 İNHİBİSYONUNUN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. ASLI NUR BAHAR**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. K. GONCA AKBULUT**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TTU-2021-7192 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
MART 2022**

KABUL VE ONAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Aslı Nur Bahar
Baba Adı	Mehmet Ali
Doğum Yeri/Tarihi	Acıpayam/21.08.1992
Diploma Tarihi / Diploma No	31.08.2017/166
Mezun Olduğu Fakülte	Gülhane Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Fizyoloji Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 3 Ay:10
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: D-Galaktoz ile İndüklenmiş Yaşlanma Modelinde Gelişen Karaciğer Fibrozisinde SIRT2 İnhibisyonunun Etkisi

JÜRİ KARARI: Fizyoloji Anabilim Dalında Arş. Gör. Dr. olarak çalışmakta olan Aslı Nur BAHAR'ın "D-Galaktoz ile İndüklenmiş Yaşlanma Modelinde Gelişen Karaciğer Fibrozisinde SIRT2 İnhibisyonunun Etkisi" başlıklı tezi komisyonumuzca yapılan tez sınavında başarılı bulunmuş ve uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir. Dr. Aslı Nur BAHAR uzmanlık sınavına girmeye hak kazanmıştır.

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

Prof. Dr. Sami AYDOĞAN
Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ÜYE

Prof. Dr. Çiğdem ÖZER
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ÜYE

Prof. Dr. Kazime Gonca AKBULUT
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışmanım Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Aldığım uzmanlık eğitiminde büyük payları olan mesleki duruşlarıyla bana rol model olan başta değerli hocalarım; Prof. Dr. Sibel DİNÇER'e, Prof. Dr. Çiğdem ÖZER'e, Prof. Dr. Şevin GÜNEY'e ve Dr. Öğr. Üyesi A.Meltem SEVGİLİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Uzmanlık eğitimimde desteklerini esirgemeyen çok sevgili Öğr. Görevlisi Dr. Pelin TÜRKKAN'a ve Öğr. Görevlisi Dr. Hilal KORKMAZ'a da çok teşekkür ederim. Tezimin deneysel çalışmaları aşamasında yardımcı olan deneyimlerini benimle paylaşan ve imkân sağlayan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı hocalarından Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a başta olmak üzere katkılarından dolayı F.Gizem SONUGÜR, S.Özen AKARCA DIZAKAR ve tez çalışmalarım sırasında bana destek olan Arzu KESKİN AKTAN'a, eğitimim boyunca aralarında olmaktan, birlikte çalışmaktan büyük zevk ve onur duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca benim için en iyisini isteyen, beni en iyi şekilde yetiştiren, her zaman yanımda olan, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan canımdan çok sevdiğim aileme, destek ve güvenlerini her zaman hissettiğim, benim için zorlu olan asistanlık hayatımda her türlü fedakârlığa katlanan eşim Mecit ve canım oğlum Kerem'e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmamızı gerçekleştirebilmemiz için olanak sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
AD	Alzheimer Disease (Alzheimer Hastalığı)
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri
AGK-2	Arabidopsis Guanylate Kinase-2
aHSC	Aktive Hepatik Stellat Hücre
ALT	Alanin Aminotransferaz
ALP	Alkalın Fosfataz
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
APRI	AST Platelet Ratio Index
APS	Amonyum Per Sülfat
AST	Aspartat Aminotransferaz
Bax	Bcl-2 Associated X Protein
BCA	Biskononinik Asit
Bcl-Xl	Bcl-Extra Long
Bim	Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death
BSA	Bouine Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
CAT	Katalaz
CCl ₄	Karbon Tetraklorür
c-GMP	Siklik-Guanozin Monofosfat
CK	Kazein kinaz I
Co-SMAD	Ortak SMAD
COX2	Siklooksijenaz 2
CREB	Siklik AMP'ye Yanıt Veren Element Bağlayıcı Protein
Ct	Cycle Threshold
D-GAL	D-galaktoz

Dkk	Dickkopf
ECM	Hücre dışı Matris
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
EndMT	Endotelyal Mezenkimal Geçiş
ERK	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
ETC	Elektron Taşıma Zinciri
Et-OH	Etanol
Fz	Frizzled reseptörü
FOXO-1	Forkhead Box Protein-1
FOXO-3a	Forkhead Box Protein-3a
GGT	Gama Glutamiltransferaz
G6P	Glikoz-6-Fosfat
G6PD	Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz 3 β
GRx	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH-Px (GPx)	Glutasyon Peroksidaz
GZ-PZR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HD	Huntington Disease (Huntington Hastalığı)
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HE	Hematoksilen Eosin
HRP	Horseradish Peroksidaz
HSC	Hepatik stellat hücre
IHC	İmmunohistokimyasal Analiz
IL-1β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
I-SMAD	İnhibitör SMAD
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LRP5/6	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör Protein 5/6

LSEC	Karaciğer Sinüzoidal Endotel Hücre
MAPK-1	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz Fosfotaz – 1
MDB	Membran Desalting Buffer
MnSOD	Manganez Bağımlı SOD
MPP	Matriks Metalloproteinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
mRNA	Messenger RNA
mHtt	Mutant Huntingtin
MT	Masson's Trichrome
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NASH	Non-alkolik steatohepatit
NF-kB	Nükleer Faktör-Kappa B
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
Nrf2	Nükleer Faktör Ertroit-2 İlişkili Faktör-2
O.D.	Optical Density
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksiguanozini
PBS	Fosfat Tamponu
PD	Parkinson Disease (Parkinson Hastalığı)
PDGF	Platelet Türevli Büyüme Faktörü
PGC1α	Ppar Gamma Koaktivator 1 α
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-kinaz/aktinomisin
PON1	Paraksonaz-1
PLT	Platelet
P-SMAD	FosfoSMAD
R-SMAD	Reseptör Tarafından Düzenlenen SMAD
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
sFRP	Soluble Frizzled-Related Protein
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SIRT (1-7)	Sirtuin (1-7)
SMA	Düz Kas Aktin

SLM	Salermıt
SOD	Süperoksıt Dısmutaz
TAA	Thıoasetamıd
TBS	Trıs Baz
TBS-T	Trıs Buffered Salıne wıth Tween 20
TC	Total Kolestrol
TCF/LEF	T hücre faktörü/lenfoid güçlendirme faktörü
TEMED	Tetrametıl- Etilendıamın
TG	Trıglıserıt
TGF -α	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TβRI	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Tıp I Reseptörü
TβRII	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Tıp II Reseptörü
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör - α
UUO	Tek Taraflı Üretral Obstrüksıyon
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
YYD	Yüksek Yağlı Dıyet
α-Syn	α -Sınükleın
WIF	WNT inhibitör faktörü
WLS	Wntless Proteını

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	
Kısaltmalar	
İçindekiler	
Çizelgelerin Listesi	
Şekillerin Listesi	
Resimlerin Listesi	
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Yaşlanma	6
2.1.1. Yaşlanma ve Karaciğer	7
2.2. Karaciğer Fibrozisi	9
2.3. Karaciğer Fibrozis Sinyal Yolakları	12
2.3.1. TGF- β sinyali	12
2.3.2. Wnt/ β -katenin sinyali	16
2.3.3. PDGF sinyali	20
2.4. D-Galaktoza Bağlı Yaşlanma Modeli	24
2.5. D-Galaktoz ve Karaciğer Fibrozisi	27
2.5.1. D-Galaktoz'un karaciğer fonksiyonları üzerine etkisi	27
2.5.2. D-Galaktoz'un karaciğer inflamasyonu üzerine etkisi	29
2.5.3. D-Galaktoz'un fibrojenik sinyal yolakları ile ilişkisi	30
2.6. Sirtuinler	31

2.6.1. Sirtuinler ve Fibrozis	32
2.7. Sirtuin 2	34
2.7.1. SIRT2 ve Yaşlanma	34
2.7.2. SIRT2 ve inhibisyonunun fibrozis üzerine etkisi	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Gereç	39
3.1.1. Araştırma planı ve deney grupları	39
3.1.2. Kullanılan laboratuvar aletleri ve cihazlar	41
3.1.3. Kullanılan ticari kitler, antikorlar ve kimy sarf maddeler	43
3.2. Yöntem	46
3.2.1. SIRT2 protein ekspresyonunun Western-Blotting/SDS-PAGE metodu ile tayini	47
3.2.2. Dokularda TGF- β , β KATENİN ve PDGFBB ekspresyon düzeyinin Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması	58
3.2.3. NFKB, IL1 β , IL6, Paraksonaz protein ekspresyonunun Sandviç ELISA yöntemi ile tayin edilmesi	66
3.2.4. Histolojik yöntem	74
3.2.5. İmmunohistokimyasal analiz	75
3.2.6. Kullanılan istatistiksel yöntem	77
4. BULGULAR	78
4.1. Karaciğer indeksi	78
4.2. Karaciğer fonksiyon testleri ve diğer biyokimyasal analizleri	79

4.3. SIRT2 protein ekspresyonundaki değişimler	83
4.4. NFkB, IL1β, IL6, Paraksonaz protein ekspresyonundaki değişimler	84
4.5. TGF-β, β KATENİN ve PDGFBB ekspresyon düzeyi değişimleri	87
4.6. Histopatolojik Bulgular ve İmmunohistokimyasal Analiz Sonuçları	91
4.6.1. Karaciğer dokularının histopatolojik skorlaması	91
4.6.2 Kontrol ve deney gruplarının kolajen lif yoğunluğu değişimleri	94
4.6.3. Karaciğer dokularının fibronektin immunreaktivitesi	96
4.6.4. Karaciğer dokularının tip I kolajen immunreaktivitesi	96
4.6.5. Karaciğer dokularının tip III kolajen immunreaktivitesi.	97
4.6.6. Karaciğer dokularının α-SMA immunreaktivitesi	98
4.6.7. Korelasyon Sonuçları	100
5. TARTIŞMA	107
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	121
7. KAYNAKLAR	123
8. ÖZET	139
9. ABSTRACT	140
10. EKLER	141
11. ÖZGEÇMİŞ	142

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelgeler	Sayfa
Çizelge 2.1. Sirtuinlerin Hücre Lokalizasyonu ve Enzimatik Aktiviteleri	32
Çizelge 3.1. Kontrol ve deney grupları	40
Çizelge 3.2. Laboratuvarında kullanılan donanımlar	42
Çizelge 3.3. Kimyasal ve Sarf maddeler	43
Çizelge 3.4. Ticari kitler	45
Çizelge 3.5. Antikorlar ve uygun dilüsyon oranları	45
Çizelge 3.6. Kontrol ve deney grupları total RNA izolasyonu sonrası elde edilen RNA miktarları ve saflık oranları	62
Çizelge 3.7. GZ-PZR amplifikasyonunda kullanılacak olan gen ve prob dizileri	64
Çizelge 3.8. GZ-PZR kullanılacak olan qpcr mix deney setleri	64
Çizelge 3.9. Deney setleri cihaza yüklenmeden önce yapılan ayarlamalar	65
Çizelge 4.1. Ağırlık ölçümlerinin ve karaciğer organ indeksinin ortalama değerleri	78
Çizelge 4.2. Karaciğer fonksiyon analizi için ALT ve AST düzeyi, AST/ALT Oranı, APRI İndeksi ortalama $\pm$ standart hata değerleri	81
Çizelge 4.3. Kontrol ve deney gruplarının NF κ B, IL1 β , IL6 düzeyi ortalama $\pm$ standart hata değerleri	85
Çizelge 4.4. Kontrol ve deney gruplarının Fibronektin, Tip I kolajen, Tip III kolajen, α -SMA, Histopatolojik skor, Kolajen lif yoğunluğu, SIRT2, β -katenin Ortalama $\pm$ standart hata değerleri	99

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekiller	Sayfa
Şekil 2.1. Yaş ile karaciğer hastalıkları ilişkisi	8
Şekil 2.2. Yaşlanmanın karaciğerde fibrotik yanıtı karşı duyarlılığı artırma mekanizması	10
Şekil 2.3. Stellat hücre aktivasyonu ve miyofibroblast kaynakları	12
Şekil 2.4. TGF- β 1 ile SMAD yolunun aktivasyonu	13
Şekil 2.5. β -katenin yoluyla WNT Sinyal aktivasyonu	18
Şekil 2.6. TGF- β ve WNT / β -katenin sinyal yolları arasındaki ilişki	19
Şekil 2.7. PDGF ve TGF β sinyal yolları arasındaki ilişki	23
Şekil 2.8. Normal ve yüksek dozda D-galaktoz metabolizması	25
Şekil 2.9. D-galaktoz kaynaklı yaşlanma ile ilgili olası altta yatan mekanizmalar	26
Şekil 2.10. Yaşlanma ve NF- κ B sinyali ilişkisi	30
Şekil 2.11. SIRT2 ve Fibrosis ile ilişkili hücre içi sinyal mekanizması	38
Şekil 3.1. IL6'nın standart eğri R^2 değeri	68
Şekil 3.2. IL1 β 'nin standart eğri R^2 değeri	70
Şekil 3.3. NF- κ B'nin standart eğri R^2 değeri	72
Şekil 4.1. Plazma LDL, HDL, Total kolesterol, VLDL, Trigliserit düzeylerindeki değişimler	80
Şekil 4.2. Plazma hemoglobin, PLT, AST, ALT, AST/ALT, AST/PLT değişimleri	82
Şekil 4.3. Karaciğer dokusunda SIRT2 protein ekspresyonundaki değişimler	83

Şekil 4.4. Karaciğer dokusunda IL 1 β , IL 6, NF-kB, Paraksonaz düzeyleri ve plazma paraksonaz seviyesindeki değişimler	86
Şekil 4.5. TGF β geni için GZ-PZR de yapılan optimizasyon eğrisi	87
Şekil 4.6. Beta katenin geni için GZ-PZR de yapılan optimizasyon eğrisi	88
Şekil 4.7. PDGF BB geni için GZ-PZR de yapılan optimizasyon eğrisi	88
Şekil 4.8. β -aktin geni için GZ-PZR de yapılan optimizasyon eğrisi	89
Şekil 4.9. Karaciğer dokusunda TGF β 1 ve β -katenin mRNA ekspresyon değişimleri	90
Şekil 4.10. D-galaktoz uygulaması ile artan ve azalan parametreler	106
Şekil 4.11. AGK2 uygulaması ile azalan parametreler	106

RESİMLERİN LİSTESİ

Resimler	Sayfa
Resim 4.1. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri SIRT-2 immunohistokimyasal görüntüleri	84
Resim 4.2. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri Beta katenin immunohistokimyasal görüntüleri	91
Resim 4.3. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer dokularının Hematoksilen- Eosin ile boyanmış görüntüleri	93
Resim 4.4. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer dokularında kolajen lif dağılımı	95
Resim 4.5. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri Fibronektin immunohistokimyasal görüntüleri	96
Resim 4.6. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri Tip I Kolajen immunohistokimyasal görüntüleri	97
Resim 4.7. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri Tip III Kolajen immunohistokimyasal görüntüleri	98
Resim 4.8. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri α -SMA immunohistokimyasal görüntüleri	99

1. GİRİŞ

Yaşlanma, bireyin hastalık gelişimine yatkınlığını artıran moleküler, hücrel ve fizyolojik değişikliklerle karakterize edilen çok faktörlü bir süreçtir [1, 2]. Yaşlı nüfusun artması sonucu, 2010'da 524 milyon olan 65 yaş ve üstü bireylerin sayısının, 2050'de yaklaşık 1,5 milyara yaklaşması beklenmektedir. Beklenen yaşam süresinin artması ile birlikte yaşlılarda görülen kronik hastalıklar da artmaktadır [3]. Yaşlanma fibrozis için risk faktörü olarak kabul edilir ve bu süreç ile ilişkili olan karaciğer fibrozisi, kronik karaciğer hastalıklarının artan prevalansına ve ciddiyetine katkıda bulunur [4]. Fibrozis tedavi edilmediğinde; portal hipertansiyon, karaciğer yetmezliği ve karaciğer kanseri gibi ciddi komplikasyonları olan siroz ile sonuçlanabilir. Karaciğer fibrozisi için etkili ilaç olmaması, nakil yapılmak zorunda kalınması ve naklin yaşa bağlı komorbiteler nedeniyle başarı şansının az olması önemli sorunlardır [5].

Yaşlanma sürecinde karaciğerde, belirgin yapısal fonksiyonel değişiklikler gözlenir [6]. İlerleyen yaşla beraber bu değişiklikler karaciğerde fibrozise duyarlılığı artırır. Karaciğer fibrozisi kronik hasara yanıt olarak ekstrasellüler matriks (ECM) ve kolajen proteinlerinin birikimi ile birlikte geri dönebilen bir süreçtir. Karaciğer hasarı olduğunda, ECM'nin bileşimi ve yoğunluğu değişir. ECM bileşenlerinin üretimi neredeyse 6-8 kat artar. Fibrojenik olmayan tip IV kolajen, fibrojenik tip I ve II kolajen ile değiştirilir ve hücre dışı matrikse fibronektin, hyaluronik asit ve alfa düz kas aktin (α -SMA) salgısına yol açar. Karaciğer parankimi ilerleyici skar dokusu ile yer değiştirir [7-9].

D-galaktoz kaynaklı yaşlanma modeli doğal yaşlanma sürecine benzemesi, uygulamasının kolay olması ve deney süresi boyunca hayvanların hayatta kalma oranlarının yüksek olması nedeniyle yaygın olarak tercih edilen bir modeldir. Vücutta D-galaktoz, galaktoz oksidaz tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturmak üzere oksitlenir. D-Galaktoz yaşlanma modelinin, karaciğer fonksiyon parametrelerini bozduğu ve fibrojenik yanıtı aktive ettiği gösterilmiştir [10-13]. D-Galaktozun kronik uygulamalarının karaciğerde oksidatif stres üzerinden inflamatuvar süreçleri aktive ettiği bilinmektedir [10].

Uzun yaşam proteini olarak adlandırılan sirtuinler, genom stabilitesini ve homeostazisi devam ettirme özelliği ile yaşam süresini arttırabilen, Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD) bağlı sınıf III histon/protein deasetilaz ailesinin üyelerindendir. Tanımlanan yedi sirtuin (SIRT) proteini vardır. Ailenin üyelerinin yaşlanma üzerinde rolleri farklıdır. SIRT2 seviyeleri yaşlanma ile artış gösterir. SIRT2nin, özellikle beyinde, hipokampus ve oligodendrositlerde yaşa bağlı olarak arttığı [14], böbrek, pankreas, testis, karaciğer ve yağ dokusunda ifade edildiği gösterilmiştir [15]. SIRT2 karaciğer fibrojeninde kritik rol oynar ve insan fibrotik karaciğer hücrelerinde ekspresyonu artar [16].

TGF- β , Wnt/ β -katenin ve PDGFB sinyalleri yaşlanma ile artmakta ve karaciğer yıldız hücreleri (HSC) aktivasyonunda rol oynamaktadır. TGF- β sinyalindeki artış, hücre dejenerasyonuna, doku fibrozisine, inflamasyona, rejenerasyon kapasitesinin azalmasına ve metabolik işlev bozukluğuna yol açabilir [17]. Hayvan modellerinde ve insanlarda viral hepatit dahil fibrotik karaciğer hastalıklarında serum ve karaciğer dokusunda TGF- β düzeylerinin arttığı

belirtilmiştir. TGF- β 'nin aşırı ekspresyonunun, dokularda belirgin fibrotik değişiklikleri indüklediği, Wnt/ β -katenin sinyal aktivasyonunun karaciğer fibrozisine neden olduğu gösterilmiştir [18-21]. β -katenin sinyalindeki değişikliklerin, fibrozis için gerekli olan yıldız hücrelerinin aktivasyonuna yol açtığı, inhibe etmenin tedavi edici faydaları çalışmalarla gösterilmiştir [22, 23].

Farelerde, asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarı modelinde, SIRT2 inhibisyonu hepatotoksisiteyi önemli ölçüde azaltmıştır [24]. AGK2 (2-Cyano-3-(5-(2,5-dichlorophenyl)-2-furanyl)-N-5-quinoliny-2-propenamide) uygulaması; karbon tetraklorür (CCl₄) ve tiyoasetamid (TAA) tarafından indüklenen karaciğer hasarı modelinde karaciğer fibrozunu azaltmıştır [16].

SIRT2 inhibisyonu, TGF- β 1 tarafından indüklenen SMAD2/3'ün fosforilasyonunu azaltarak fibrozisi azaltmıştır [25]. SIRT2'nin β -katenin ile etkileşime girerek, β -katenin aracılı transkripsiyonel gen aktivasyonunu baskıladığı, Wnt sinyal yolunu engellediği ortaya konmuştur [26].

SIRT2 inhibisyonunun in vitro ve in vivo modellerde fibrozisi baskıladığını gösteren çalışmalar mevcuttur [27, 28]. SIRT2 insan karaciğerlerinde kolajen1A1 ve α -SMA ekspresyonu için kritik olan ERK aktivasyonunu düzenleyerek fibrojenizi arttırdığı gösterilmiştir [16].

D-galaktozun inflamatuvar yanıtı tetiklediği belirtilmiştir. D-galaktoz verilen hayvanların , karaciğer dokularında TNF- α , IL-6, IL-1 β , NF- κ B, NOS ve siklooksijenaz 2 (COX2) gibi inflamatuvar belirteçlerde artış gözlenmiştir [10, 29].

SIRT2 karaciğerde inflamasyona neden olurken, SIRT2 inhibiyonunun CCl₄ ile indüklenen fibrotik fare karaciğerinde inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir [16].

Çalışmamızda, D-galaktoz uygulamasının karaciğer dokusunda yapısal, fonksiyonel değişikliklere etkisi ve SIRT2 ile ilişkisi araştırılmıştır. Ayrıca AGK-2 ile yapılan SIRT2 inhibisyonunun karaciğer fonksiyon parametreleri, fibrotik sinyal yolları ve inflamatuvar sitokinler üzerindeki etkileri belirlendi. SIRT2 ve fibrozis ile ilgili çalışmalar literatürde çok kısıtlıdır. Dolayısıyla, bu çalışma ile ortaya konabilecek muhtemel ilişkiler, parametreler arasındaki korelasyonlar karaciğer yaşlanmasına ve fibrozisi kontrol eden yolların aydınlatılmasına önemli katkı sağlayacaktır.

Bu bağlamda çalışma için belirlenen spesifik hedefler şöyledir:

- 1- D-galaktoza bağlı yaşlanma modelinde karaciğer dokusunda izlenen karaciğer indeksi (karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı), biyokimyasal (ALT, AST, trombosit miktarı, AST-ALT Oranı, AST-Trombosit Oranı İndeksi (APRI), lipid paneli (LDH, HDL, VLDL, total kolestrol, trigliserit), histolojik, fibrotik değişiklikler (kolajen 1,3 ve α -SMA) ve Fibronektin, β -katenin, SIRT-2'nin immünohistokimyasal analiz ile belirlenmesi
- 2- Yaşlanma modelinde karaciğer SIRT2 düzeyi western blot, NF κ B düzeyi, paraksonaz, IL1 β ve IL 6 düzeyi ELISA ile TGF β , β -katenin genlerinin ifade düzeyinin gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi ve bu parametrelerin SIRT2 ile ilişkisinin kurulması

3- SIRT2 inhibisyonunun karaciğer dokusunda, biyokimyasal ve histolojik parametreler, TGF β , β katenin, PDGFB ve SIRT2 aktiviteleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve korelasyonların araştırılması hedeflenmektedir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar yaşlanma sürecinde insidansı belirgin olarak artan kronik karaciğer hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde yeni hedefler tanımlanmasını da sağlayabilecektir.

Çalışmamızda, 10 hafta boyunca subkutan D-galaktoz (150 mg/kg) uygulaması ile oluşturulan kolaylaştırılmış yaşlanma modelinde karaciğer dokusunda yapısal, fonksiyonel, biyokimyasal değişiklikler ve fibrozis mekanizması ile SIRT2 inhibitörü olarak AGK-2 uygulamasının, bu sürece olan etkisinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaşlanma

Yaşlanma, birçok organ sistemindeki aşamalı yapısal değişikliklerin yanı sıra hücresel fonksiyonun kademeli olarak azalması ile karakterize doğal, ilerleyici bir süreçtir. Aynı zamanda kalp, böbrek, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve diabetes mellitus gibi birçok kronik hastalığın gelişmesinde önemli bir risk faktörüdür [30, 31]. Tüm dünyada yaşlı nüfus oranı artmaktadır. Birleşmiş Milletler raporuna göre 2015 yılında 60 yaş ve üzeri %12 iken 2050 yılında %22 beklenmektedir [32]. Yaşlılıkta izlenen hastalık sıklığındaki bu artış, bazı hastalık mekanizmaları ile yaşlanma mekanizmaları arasında benzerlikler olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla yaşlanma sürecinin geciktirilmesine yönelik hedeflerin belirlenmesi, zamanla gelişebilecek değişiklikleri önlemede önemli olacaktır.

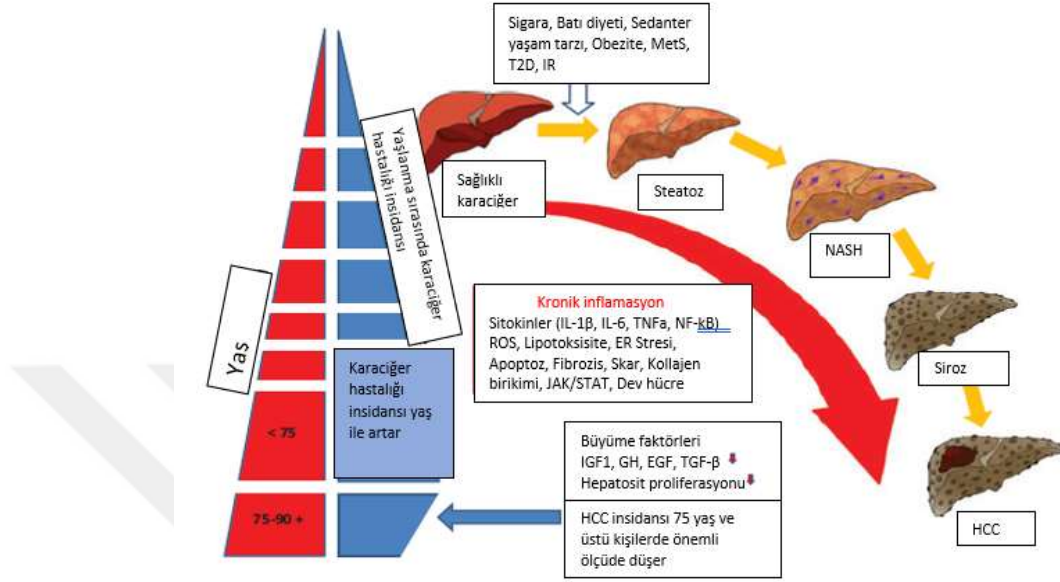
Karaciğer, makro besinlerin metabolizması, lipid ve kolesterol homeostazı, protein sentezi, kan hacminin düzenlenmesi, kan pıhtılaşması için gerekli çeşitli faktörlerin sentezi, büyüme sinyal yollarının endokrin kontrolü ve çok sayıda sinyal yolunun modülasyonu, immünolojik fonksiyonlar, ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizma ve detoksifikasyonundan sorumlu vücudun en büyük organıdır [33]. Yaşa bağlı olarak karaciğer hacim, kan akımı, fonksiyonlarında görülen azalma yapısal ve hücresel değişimler fibrozisle sonuçlanabilir. Yaşlanma, karaciğer fibrozunun ilerlemesi için önemli bir risk faktörüdür [34].

2.1.1. Yaşlanma ve Karaciğer

Karaciğerde yaşa bağlı değişikliklerden en belirgin olan morfolojik özellik hacmindeki azalmadır. Şekil 2.1’de görüldüğü gibi, karaciğer hücrelerinin hacmi, olgunluğa yaklaştıkça kademeli olarak artarken yaşlanma ile azalmaya başlar [35]. Yaşlanma ile birlikte karaciğer hacmi %20-40 azalmaktadır. Bu durum karaciğer kan akımındaki azalmayla ilişkilidir [36, 37]. Yaşlanma ile 65 yaş ve üzerindeki bireylerin, karaciğer kan akımı, 40 yaş ve altındakilere kıyasla yaklaşık %35 oranında azalır. Kan akımındaki ve hacimdeki değişiklikler karaciğer metabolizmasını etkilemektedir [38].

Yaşlanma; sinüzoidal endotel hücrelerinin kalınlığında %50 artma, endotelyal fenestraların sayısında ve çapında azalma, perisinüzoidal bazal laminada kolajen birikimi, von Willebrand faktör ve kolajen ekspresyonunda artış, caveolin-1 ekspresyonunda azalma ile birliktedir [39].

Stellat hücre; İto hücresi, yağ depolayan hücre, perisinüzoidal hücre, yıldız hücre veya liposit olarak da bilinmektedir. Disse'nin hücre dışı boşluğunda bulunan sinüzoidal endotel hücreleri saran uzun sitoplazmik uzantılara sahip bir perisittir. İto hücresi, A vitamini açısından zengin birçok lipid damlacıkları içerir. Birçok kronik karaciğer hastalığının erken evrelerinde, aktive olur ve kolajen gibi hücre dışı matris bileşenleri üreterek fibrozise katkıda bulunan bir hücredir. Stellat hücre aktif duruma geçtiğinde, lipid damlacıklarını kaybeder ve miyofibroblastik hale gelir [40]. Yaşlanma, stellat hücreler, içerdikleri lipid damlacıklarının boyutunda ve sayısında artışa neden olmaktadır [41].



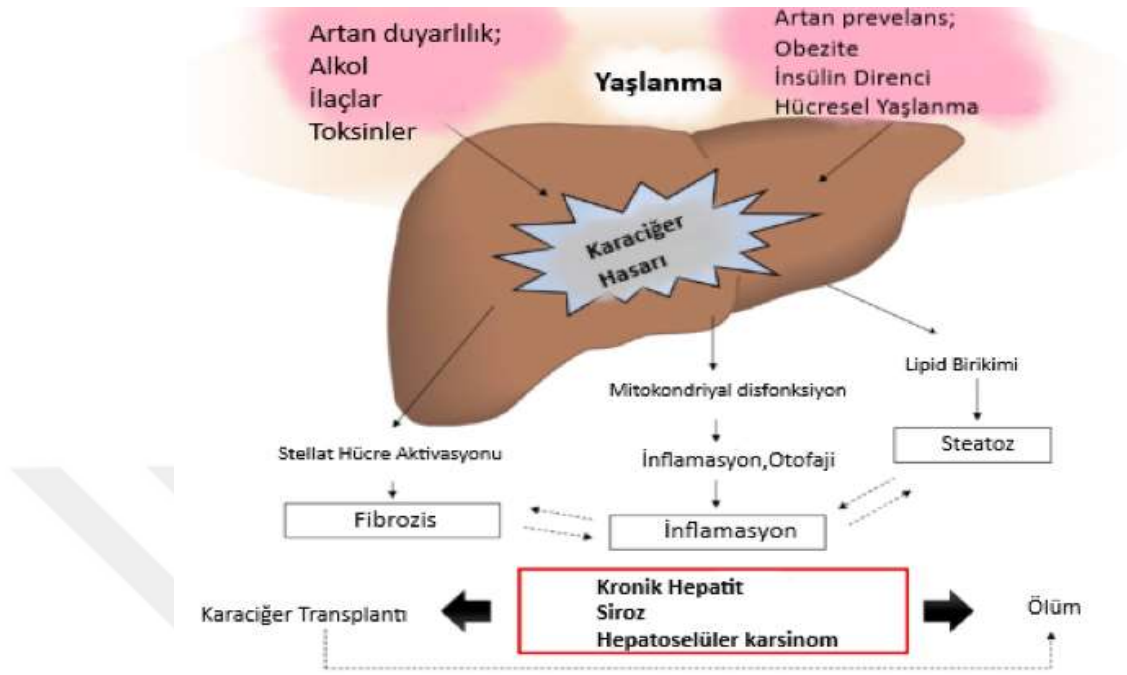
Şekil 2.1.Yaş ile karaciğer hastalıkları ilişkisi [4].

Hepatositlerin vakuolasyonu ve multifokal nekroz ve apoptoz artışı yanı sıra hepatosit kordonlarının ışınal düzenleniminde bozulma, hepatosit dejenerasyonu ve karaciğer sinüzoidlerinde dilatasyon yaşanmaya eşik eden diğer değişikliklerdir. Yaşlanma ile ECM'de; Fibrojenik olmayan tip IV kolajen, Fibrojenik tip I ve III kolajen ile değiştirilir ve hücre dışı matrikse fibronektin, hyaluronik asit ve α -SMA salgısı artar [8, 9]. Hepatositlerin bazal membranındaki mikrovillusların yanı sıra endotelial hücre pencereleri kaybolur. Yaşlanma karaciğerde hücreler olarak, poliploidi (çekirdekler), karaciğer hücreleri içinde yoğun cisimciklerin (lipofuscin) birikmesi, düz endoplazmik retikulum alanı, mitokondri sayısı ve işlevinin azalmasına yol açar [36]. Yaşlanma, karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri (LSEC'ler), Kupffer hücreleri ve yıldız hücreleri

(HSC'ler) üzerinde etkilidir [35]. Yaşlı bireylerin karaciğerinde poliploid hepatositlerin oranı %42'ye yükselir [42, 43]. 24 aylık farelerin karaciğerlerinde poliploidi ile genişlemiş çekirdekler içeren hepatosit sayısının arttığı, gözlenirken; bu durum genç farelerde gözlenmemiştir [44].

2.2. Karaciğer Fibrozisi

Yaşlanma ile ilişkili olan karaciğer fibrozisi, kronik karaciğer hastalıklarının prevalansının ve şiddetinin artmasına katkıda bulunur [4]. Şekil 2.2' de gösterildiği gibi, klinik açıdan büyük önem taşıyan karaciğer fibrozisi tedavi edilmediği takdirde, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinoma (HCC) kadar ilerleyebilmektedir [45]. Siroz ve hepatosellüler kanser hastaları sosyal ve finansal yük oluşturur. Karaciğer hastalıkları, dünya çapında her yıl yaklaşık 2 milyon ölümden sorumludur; bunların yarısı siroz komplikasyonlarından, kalanı ise viral hepatit ve HCC'den kaynaklanmaktadır [46]. Siroz ve HCC şu anda dünya çapında en yaygın 11. ve 16. ölüm nedeni olarak kabul edilmektedir. Birlikte dünya çapındaki tüm ölümlerin %3,5'ini oluştururlar [47].



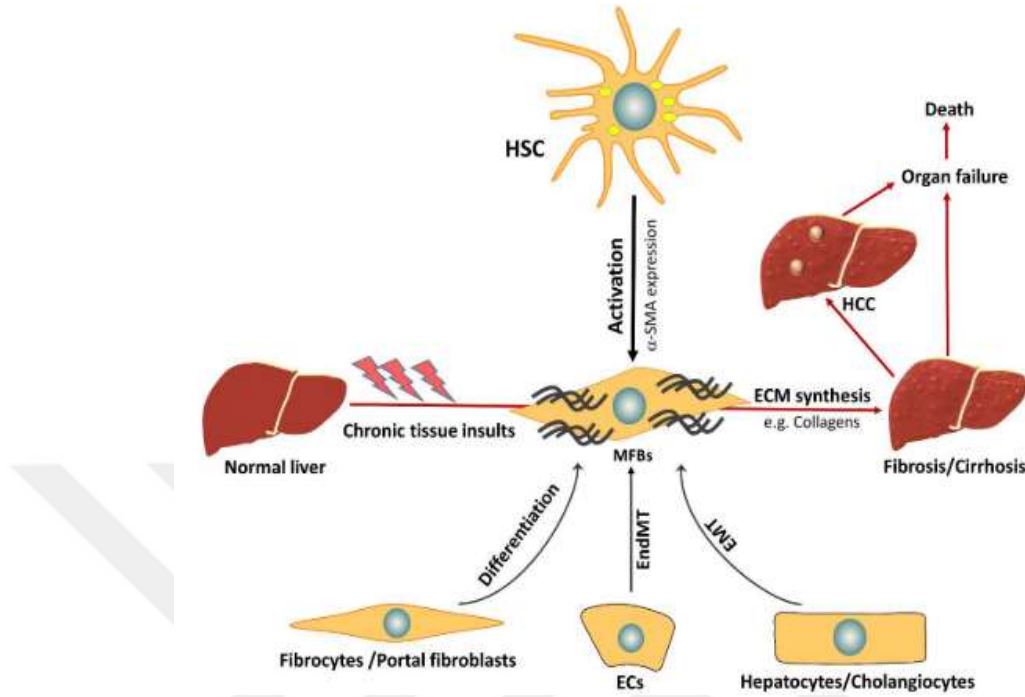
Şekil 2.2.Yaşlanmanın karaciğerde fibrotik yanıtı karşı duyarlılığı artırma mekanizması [2, 48].

Karaciğer fibrozisi, karaciğer hasarını takiben hücre ECM birikimi ile karakterize edilen geri dönüşümlü bir yara iyileşme yanıtıdır. Yanıt akut veya kendi kendini sınırlıyor ise, bu değişiklikler geçicidir ve karaciğer yapısı normal kompozisyonuna geri döner. Hasar devam ederse, kronik inflamasyon ve ECM birikimi ile karaciğer parankimi ilerleyici skar dokusu ile yer değiştirir.

Karaciğer fibrojenez, miyofibroblast aktivasyonu ve proliferasyonu ile başlatılır. Aktive edilmiş miyofibroblastlar, hasarlı karaciğerdeki ECM'nin ana kaynağını oluşturur. Şekil 2.3’de görüldüğü gibi, karaciğer fibrozisinin etiolojisine bağlı olarak farklı hücre tipleri (endojen portal fibroblastlar, fibrositler, kemik iliği kaynaklı hücreler) miyofibroblastları aktive edebilir. Ancak aktive stellat hücreler fibrotik karaciğerdeki miyofibroblastların ana kaynağıdır [49]. Normal karaciğerde, HSC'ler Disse boşluğunda bulunur. Karaciğer hasarı sonucunda aktive olarak,

miyofibroblast benzeri hücrelere transdiferansiye olur. Böylelikle kontraktıl, proinflamatuvar ve fibrojenik özellikler kazanır. Aktive HSC'ler (aHSC'ler) karaciğerde önemli bir kolajen kaynağıdır, fibrotik karaciğerdeki toplam fibriler kolajen I'in %80'ini oluşturur [50, 51].

Sirotik karaciğerin, sağlıklı bir organdan altı kata kadar daha fazla kolajen ve proteoglikan içerdiği bilinmektedir. Aynı zamanda ECM proteinlerini, metaloproteinazların doku inhibitörlerini ve matriks metalloproteinazları (MMP'ler) bol miktarda salgılayabilirler [52]. HSC'lerin aktivasyonunda büyüme faktör sinyalleri (PDGF, EGF, TGF - α) önemli bir role sahiptir. Bu büyüme faktörleri, ECM'nin yeniden şekillenmesini teşvik ederek kolajen oluşumuna neden olur. Karaciğer fibrozu sırasında, özellikle kolajen I ve III açısından son derece zengin olan ekstraselüler matriksin sürekli birikimi, skar birikimine ve karaciğer fibrozisine yol açar [26, 53].



Şekil 2.3. Stellat hücre aktivasyonu ve miyofibroblast kaynakları [5].

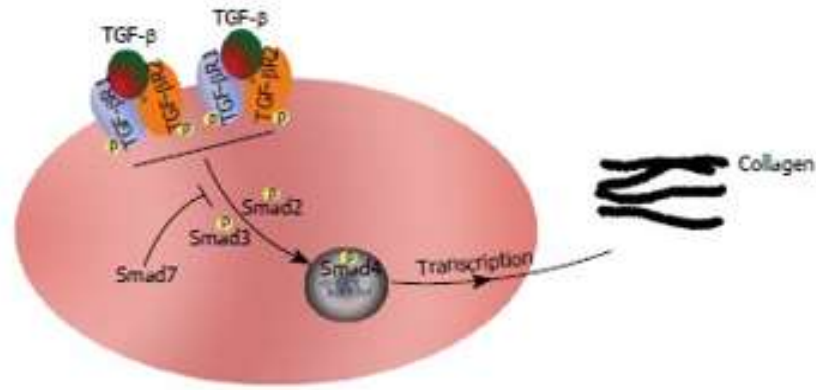
HSC aktivasyonu ve fibrozis ilerleme sürecinde, Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- β), Platelet Türevli Büyüme Faktörü (PDGF), WNT/ β -katenin sinyal yolları önemli roller oynamaktadır.

2.3. Karaciğer Fibrozis Sinyal Yolakları

2.3.1. TGF- β sinyali

TGF- β sinyal yolları, doku ve organların homeostazı için gerekli olan çoğalma, farklılaşma, göç veya hücre ölümü dahil olmak üzere farklı hücresel süreçlerin düzenlenmesinde ve çeşitli patolojik durumlarda önemli roller oynar. TGF- β 1 sinyali, karaciğer fibrojenizde stellat hücrelerin aktivasyonuna neden olan önemli ana sinyal yolu olarak bilinmektedir. TGF- β 1 plazma seviyesinin, genç ve yaşlı insanlarda karşılaştırıldığında yaşlanma ile arttığı gösterilmiştir [54]. TGF- β sinyalindeki artışın, hücre dejenerasyonuna, doku fibrozisine, inflamasyona,

rejenerasyon kapasitesinin azalmasına ve metabolik işlev bozukluğuna sebep olduğu belirtilmiştir [17]. Hayvan modellerinde, TGF- β 'nin aşırı ekspresyonunun, çeşitli dokularda belirgin fibrotik değişiklikleri indüklediği gösterilmiştir [18]. Viral hepatit dahil fibrotik karaciğer hastalıklarında serum ve karaciğer dokusunda TGF- β düzeylerinin yükseldiği bulunmuştur. TGF- β , karaciğer hasarından inflamasyon ve fibroze, fibrozisden siroz gelişimi ve hepatoselüler karsinoma kadar hastalığın ilerleme süreçlerinin tüm aşamalarına önemli rol oynamaktadır [5, 19-21].



Şekil 2.4. TGF- β 1 ile SMAD yolunun aktivasyonu [5].

TGF- β ailesi; TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere üç benzer yapısal proteinden oluşur. TGF- β reseptörleri; tip I reseptörü (T β RI) ve tip II reseptörü (T β RII) olmak üzere TGF- β 'nin sinyal iletimine aracılık eden serin-treonin kinaz ailesine ait reseptörlerdir. TGF- β ailesi üyeleri (TGF- β 1, - β 2 ve - β 3) çeşitli fibrotik hastalıklarda indüklenir ve aktive edilir. TGF-beta'nın üç izoformu arasında, alt tip TGF- β 1, matriksi parçalayan proteolitik enzimlerin sentezini inhibe ederken, hücre dışı matriks proteinlerinin üretimini indükleyerek karaciğer fibrozis patogenezi ile

ilişkilendirilmiştir. TGF- β 1, üç mekanizma yoluyla fibrogenezi destekler. İlk olarak, matris metalloproteinazları (MMP) baskılayarak ve metalloproteinazın doku inhibitörü (TIMP), plazminojen aktivatör inhibitörü gibi proteaz inhibitörlerini arttırarak ECM üretimini teşvik eder ve bozulmasını engeller. İkinci olarak, TGF- β 1, tübüler EMT yoluyla miyofibroblast oluşumunu indükler. Üçüncü olarak, SMAD3 bağımlı veya SMAD bağımlı olmayan mekanizmalar yoluyla matris üretimini indükler [19, 55]. SMAD'a bağımlı TGF- β sinyal yolu çok iyi tanımlanmıştır. Normalde, TGF- β 1 inaktif bulunur. TGF- β 1, TGF- β R2'ye bağlanır. Sinyal iletimi için Tip II reseptörlere bağlanmış ligand kompleksinin tip I reseptörleri fosforile etmesi gerekmektedir. Aktivasyonun ardından, tip I reseptör, hücre çekirdeğine sinyal taşıyan SMAD proteinlerini fosforlar ve aktive eder. SMAD 2/3 (R-SMAD) fosforilasyonu gerçekleşir. SMAD 4 (Co-SMAD) ile etkileşime girer. SMAD 2/3/4 kompleksi oluşur. Bu kompleks hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için diğer transkripsiyon faktörleriyle iş birliği yaptığı çekirdeğe transloke olur. Böylelikle profibrotik genleri ve kolajen tip I ekspresyonunu indükleyebilir. TGF- β sinyal iletiminde, önemli role sahip olan SMAD proteinlerinin inhibisyonu ile TGF- β sinyal cevabı negatif yönde düzenlenebilmektedir. SMAD 6 ve 7 ise TGF- β sinyal iletimini bloke eden, inhibitör SMAD grubu olarak bilinmektedir. R-SMAD'lar, zara bağlı serin/treonin reseptörlerine bağlanır ve kinaz aktiviteleri ile aktive edilir. Bir yardımcı faktör olarak, Co-SMAD, çekirdeğe yer değiştiren bir kompleks oluşturmak için aktive edilmiş R-SMAD'lara bağlanır. I-SMAD'lar, R-SMAD'ların etkilerine karşı koyar, böylece çeşitli mekanizmalarla TGF- β 1 sinyali üzerinde engelleyici bir etki ortaya

koyar [56]. Özetle TGF- β 'deki artış, miyofibroblastlarda nükleer SMAD2/3 birikimine neden olur ve inhibitör SMAD 6 ve SMAD 7'yi azaltır, böylece çok sayıda pro-fibrotik genin aktivasyonunu indükler [21, 57]. SMAD yoluna ek olarak, TGF- β reseptörleri ayrıca MAP kinazlar, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/AKT, Ras, Rho ve NF- κ B dahil olmak üzere diğer alternatif yollar ile etkileşim yoluyla karaciğerde SMAD olmayan sinyal yanıtlarını başlatabilir [56].

TGF- β sinyali hem karaciğer gelişimini hem de rejenerasyonu düzenler. TGF- β , gelişen karaciğer parankiminde hepatoblastların hepatositlere veya kolanjiyositlere farklılaşması ve biliyer morfogenez sürecinde etki eder. TGF- β ayrıca fenotipik dönüşümleri de düzenler, özellikle epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) yönlendirir. TGF- β 'nın hepatositlerde, fetal, neonatal ve erişkinlerde EMT'yi indüklediği gösterilmiştir [21].

TGF- β , HSC aktivasyonu ve hücre dışı matriks üretimindeki rolü nedeniyle profibrojenik bir sitokin olarak kabul edilir. Karaciğer hasarı sırasında nekrotik hepatositler tarafından salınır. Karaciğerde hepatik stellat hücrenin (HSC) aktive olmasında ve ECM salgılayan miyofibroblastlara farklılaşmasında rol alarak fibrojenik yanıtı katılır [58]. TGF- β 1 sinyali, HSC apoptozunu inhibe eder ve HSC'leri, fibronektin ve kolajen tip I, III ve IV gibi aşırı miktarda matris proteini sentezlemeye teşvik eder [59]. Ayrıca TGF- β tarafından oksidatif stres indüksiyonu ve PDGFR- β ekspresyonu artar ve tüm bunlar HSC'ye proliferatif özellik kazandırır [5, 60].

SMAD proteinlerinin genel yapısı, çeşitli SMAD kategorileri arasında birkaç farklılık dışında benzerdir. SMAD 3 doğrudan DNA'ya bağlanırken SMAD2

bağlanmadığından, bu iki SMAD'ın hedef genlerin düzenlenmesi üzerinde farklı etkileri olabilir. Hem SMAD2 hem de SMAD 3, karaciğer fibrozunda güçlü bir şekilde aktive olurken [61], sadece SMAD 3, fibrozisden sorumlu sinyal iletim yollarında anahtar rol oynar. Birçok fibrojenik gen (kolajen) ve belirteç (α -SMA ve E-cadherin) SMAD 3'e bağımlıdır ve SMAD 3, bu hedef genleri düzenleyen DNA dizilerine doğrudan bağlanır. TGF- β -aracılı SMAD 2/3 aktivasyonu, tip I ve III kolajenin transkripsiyonunu indükler ve karaciğer fibrozunu teşvik eder. Aynı zamanda TGF- β ile indüklenen SMAD 3, TIMP-1'i indükler, fibroblastlarda MMP-1 aktivitesini inhibe eder böylece ECM bozulmasını engeller. SMAD 7'nin aşırı ekspresyonu sadece SMAD 2/3'ün aktivasyonunu inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda karaciğer fibrozisi ve inflamasyon sırasında NF- κ B sinyalini de bloke eder [62]. TGF- β sinyal yoluyla HSC'lerin aktivasyonu, hem deneysel hayvan modellerinde hem de insan karaciğer hasarında ileri NASH'da önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [63, 64].

2.3.2. Wnt/ β -katenin Sinyali

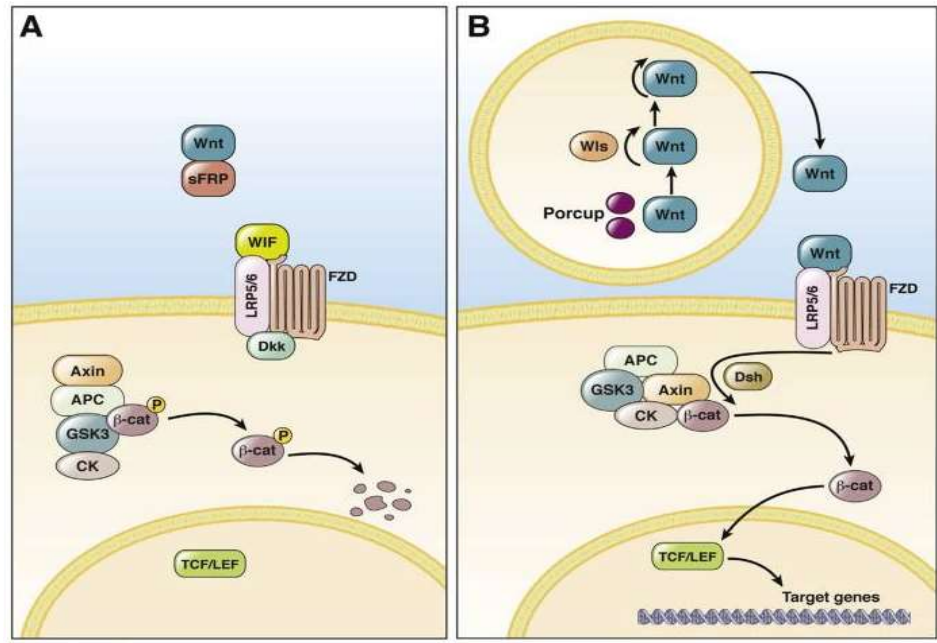
Wnt/ β -katenin sinyal yolu hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesi, embriyonik gelişim, homeostazın korunması, organ gelişimi gibi birçok fizyolojik süreç ile ilişkilidir [65]. Bununla birlikte, Wnt/ β -katenin sinyali aktivasyonu, akciğer, böbrek, deri ve karaciğer dahil olmak üzere bir dizi organ sisteminde fibroze neden olmaktadır [23, 48, 66]

β -katenin, WNT sinyal yolunda hücre içi sinyal dönüştürücü olarak görev yapan ve CTNNB1 tarafından kodlanan, hücre yüzeyi kaderin protein

kompleksinin bir alt birimidir. β -katenin genellikle sitoplazmada bulunur ve yetişkin karaciğeri boyunca eksprese edilir. Santral veni çevreleyen hepatositlerde sitoplazmik ve nükleer yerleşime sahip olmasına rağmen, hepatik lobül boyunca hücre yüzeyinde de gözlenir [23]. β -katenin fonksiyonları, esas olarak, ~40 kDa moleküler ağırlığa sahip sisteinden zengin glikoproteinler olan ve ECM'de salgılanan Wnt proteinleri tarafından düzenlenir. Bu nedenle β -katenin, WNT sinyal yolunun kritik bir bileşenidir. Genellikle kazein kinaz I (CK), glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β), adenomatöz polipozis koli gen ürünü (APC), diversin ve axin içeren bir multiprotein degradasyon kompleksine bağlı bir şekilde bulunur. WNT inhibitör faktörü (WIF), soluble frizzled-related proteinler (sFRP'ler), Dickkopf (Dkk) ve cerberus gibi WNT inhibitörlerinin varlığında, WNT sinyali kapalı durumdadır [67]. Wnt/ β -katenin sinyali aktif olmadığında, β -katenin'nin serin ve treonin kalıntıları degradasyon kompleksinde bulunan kinazlar tarafından (ilk olarak kazein kinaz I tarafından daha sonra GSK3 β) fosforile edilir ve β -transdusin içeren protein tarafından tanınır. Ardından ubiquitination ve proteozomal degradasyona uğrar [68].

WNT proteinleri, biyoaktif hale dönüşmesi için endoplazmik retikulumda Porcup tarafından palmitoillenir ve glikosile edilir [69]. Ardından wntless (WLS) proteini tarafından Golgi aygıtından salgılanmak üzere zara taşınır [70]. Salgılanan WNT, aktif WNT hücre yüzeyi reseptörüne (FZD) ve yardımcı reseptörüne (düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilgili protein 5 veya 6 (LRP5/6) otokrin veya parakrin bir şekilde bağlanarak β -katenin degradasyon kompleksini etkisiz hale getirir. Bozunma kompleksinin inhibisyonu üzerine, β -katenin salınır ve nükleer

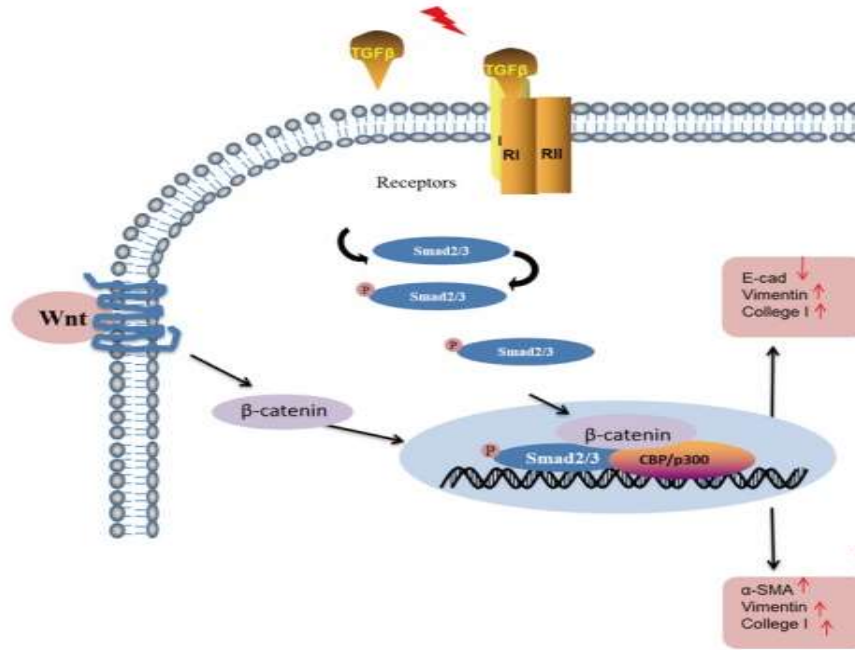
translokasyona uğrar, burada hedef gen ekspresyonunu düzenlemek için T hücre faktörü/lenfoid güçlendirme faktörü (TCF/LEF) transkripsiyon faktörü kompleksine bağlanır. β -katenin ile çeşitli transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşimler, karaciğer hücrelerinin birçok farklı fonksiyonunu kontrol etmesine izin verir. Örneğin, fibroblastların çoğalmasını, göçünü ve miyofibroblastlara dönüşümünü bu yolla indükleyebilir [65, 71]. Wnt/ β -katenin sinyalinin HSC aktivasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. β -katenin sinyallindeki değişikliklerin, fibrozis için gerekli olan yıldız hücrelerinin aktivasyonuna ve karaciğer fibrozuna neden olduğu belirtilmiştir. β -katenini inhibe etmenin tedavi edici faydaları çalışmalarla gösterilmiştir [22, 23].



Şekil 2.5. β -katenin yoluyla WNT Sinyal aktivasyonu [23]

WNT/ β -katenin ve TGF- β etkileşimi:

WNT/ β -katenin sinyali ve TGF- β sinyali arasında bir etkileşim olduğu tanımlanmıştır. Çalışmalarda fibrotik yanıtın tetiklenmesi için bu iki yolun karşılıklı birlikte aktivasyonunun gerekli olduğu ortaya konmuştur. Birçok organda TGF- β 'nin kanonik WNT sinyal yolunu aktive etme yeteneği ve bu mekanizmanın fibrotik süreçler üzerindeki fonksiyonel etkisi bildirilmiştir [72, 73]. Karaciğer fibrozisinde WNT yolu bileşenlerinin ve β -katenin ekspresyonunun arttığı, β -katenin'in TGF- β 1/SMAD2/3 sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla fibroblast-miyofibroblast dönüşümü ve epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) desteklediği belirtilmiştir [74].



Şekil 2.6. TGF- β ve WNT / β -katenin sinyal yolları arasındaki ilişki [72].

İnsan fibrotik doku örneklerinde Wnt proteinlerinin ekspresyonunun arttığı ve Dickkopf-1'in ekspresyonunun azaldığını gözlenmiştir. TGF- β , Dickkopf-1'in ekspresyonunu azaltarak kanonik Wnt sinyalini p38'e bağlı bir şekilde uyarmaktadır [75]. TGF- β , PI3K aktivasyonu ile Akt fosforilasyonunu artırır. β -katenin yıkımında rol oynayan bir enzim olan GSK3 β 'yi inaktive eder ve fibrotik etki gösterir [73]. Tüm bu bulgular, kanonik Wnt sinyalinin TGF- β -aracılı fibroz için gerekli olduğunu kanıtlar.

β -katenin ve NF- κ B sinyali arasında karşılıklı bir ilişki olduğunu gösterilmiştir. β -katenin kaybının, hücrelerde NF- κ B aktivasyonuna yol açtığı tam tersi artışının ise NF- κ B'yi baskıladığı bildirilmiştir [76]. TGF- β ve TNF- α , aktive edilmiş stellat hücrelerde NF- κ B'yi arttırdığı gösterilmiştir. NF- κ B'nin artışı, TGF- β ile uyarılan apoptozise yol açmıştır. TGF- β , NF- κ B, bcl-xL ve p21WAF1'i artırarak ve p53 gen ekspresyonunu azaltarak stellat hücrelerde apoptozu inhibe etmiştir [77].

2.3.3. PDGF SİNYALİ

PDGF sinyal yolu, çeşitli uyaranlara yanıt olarak kalıcı aktivasyon göstererek karaciğer fibrozun ilerlemesini kolaylaştırır. Aktive edilmiş HSC'nin önemli bir özelliği proliferatif olmalarıdır. Bu proliferatif etki büyük ölçüde PDGF'ye bağlanmaktadır. PDGF, stellat hücreler için en güçlü aktive edici faktör olduğu ve fibrotik karaciğerde ekspresyonunun arttığı ve inhibisyonunun deneysel karaciğer fibrogenezini zayıflattığı belirtilmiştir [53].

PDGF büyüme faktörleri ailesi, dört farklı gen tarafından kodlanan dört farklı polipeptit zincirinden oluşur. Klasik PDGF zincirleri olarak bilinenler,

PDGF-A ve PDGF-B 'dir. Yeni PDGF zinciri olarak adlandırılan PDGF-C ve PDGF-D zincirleri ise daha sonradan keşfedilen diğer formlardır. Dört PDGF zinciri, homodimerizasyon veya heterodimerizasyon yoluyla disülfid bağlı dimerler halinde birleşerek beş farklı dimerik izoform oluşturur. Bunlar; PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC ve PDGF-DD'dir. PDGF-C ve PDGF-D zincirlerini içeren heterodimer formu bulunmamaktadır [78]. PDGF'ler esas olarak parakrin şekilde hareket eder, ancak aynı zamanda otokrin veya endokrin tarzda da hareket ederek reseptörlerine bağlanabilir. PDGF ligandlarının bağlandığı, sınıf III Reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesine ait olan ve protein tirozin kinaz işlevi gören PDGF alfa reseptörü (PDGF α R; Mw = 123 kDa) ve beta reseptörü (PDGF β R; Mw = 124 kDa) olmak üzere iki adet hücre yüzey reseptörü mevcuttur [79]. PDGF reseptörlerini tanıdığına, reseptör alt birimlerinin dimerizasyonunu ve otofosforilasyonunu destekleyen bir dizi olay ile hücrel çoğalma başlatılır. Bu süreç, Ras-mitojenle aktive olan protein kinaz yolu aktivasyonunu başlatır, hücre içi kalsiyumu artırır ve protein kinaz C aktivasyonu ile sonuçlanır [80-82].

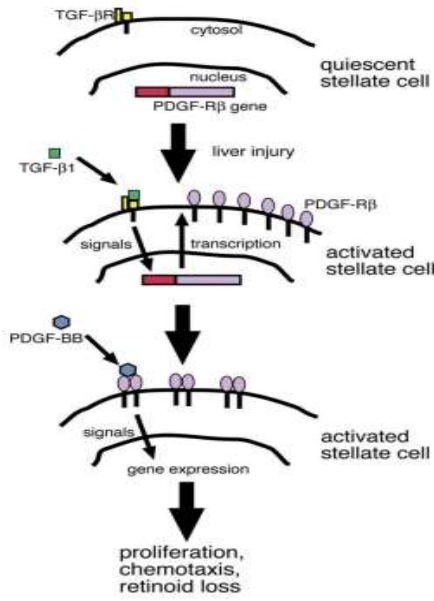
Dört PDGF alt biriminin, hepatik fibrozisin patogenezinde farklı roller üstlendiği gösterilmiştir. Karaciğer fibrozunda en belirgin olan PDGF izoformu PDGF-BB'dir. Ayrıca PDGF-B HSC'ler için en güçlü mitojenik faktör olarak bilinmektedir [51, 80]. PDGF-B aracılı PDGFR β sinyalinin karaciğer fibrozunda önemli bir rol oynadığı çalışmalar da gösterilmiştir. Sirozlu ve hepatitli hastaların karaciğerinde artmış PDGF-B ve PDGFR β ekspresyonu olduğu ortaya konmuştur [83].

PDGF-BB, trombositler, monositler ve makrofajlar, aktive edilmiş Kupffer hücreleri, hepatositler, kolanjiyositler, stellat hücreler ve miyofibroblastlar gibi karaciğerin yerleşik ve infiltre edici hücreleri tarafından salgılanır. Karaciğer fibrojenezden sorumlu stellat hücreler, karaciğer hasarından sonra belirgin PDGFR β ekspresyonu göstermektedir. Aktive edilmiş stellat hücreler ve miyofibroblastlar, PDGF-BB üretir ve diğer hücrelerin katkısı olmaksızın otokrin profibrotik döngü oluşturur. Böylelikle, PDGF-BB'nin karaciğer fibrojenezi sırasında stellat hücre proliferasyonuna aracılık eden önemli izoform olduğu görülmektedir. PDGF-BB ligandı, PDGFR- β 'ye bağlanır, Ras'ı aktive eder ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt/70-kDa ribozomal S6 kinaz (p70S6K) sinyal kaskadları başlatılır. Bu iki yol, HSC'lerde protein sentezini, profibrojenik genlerin transkripsiyonunu, çoğalmayı, hücre döngüsü kontrolünü ve apoptozu düzenler. PDGF-BB'nin inhibisyonu ve PI3K/Akt/p70S6K ve ERK sinyal yollarının bloke edilmesi sonucunda HSC apoptozunu indüklediği ve karaciğer fibrozunu azalttığı gösterilmiştir [7, 84, 85].

PDGF ve TGF β sinyali etkileşimi:

PDGF-BB ve TGF- β en belirgin iki profibrotik büyüme faktörüdür ve karaciğer fibrozunun gelişiminde etkileşim içindedir. PDGF-BB, TGF- β ile birlikte fibroblast aktivasyonunu ve farklılaşmasını da indükleyerek, bu hücrelerde α -SMA ekspresyonunun artmasına neden olur [86]. TGF- β 1'in PDGF-AA'yı indüklediğini ancak PDGF-BB'nin mitojenik etkisinde bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu seçici etkinin, PDGFR β mRNA seviyesinin ve PDGF-BB hücre

yüzeyi bağlanma bölgelerinin yukarı regülasyonu nedeniyle olduğu belirtilmiştir [87]. Aynı zamanda TGF- β 1'in karaciğer stellat hücrelerinde, güçlü bir PDGFR β indükleyicisi olduğu, bu nedenle çeşitli fibrotik hastalıklarda PDGF reseptörlerinin dokuya özgü önemli düzenlemelerinin olduğu görünmektedir [60, 88].



Şekil 2.7. PDGF ve TGF β sinyal yolları arasındaki ilişki [88].

Karaciğer fibrojenezinde yıldız hücrelerinin aktivasyonu sırasında otokrin veya parakrin kaynaklardan gelen TGF- β 1, sessiz yıldız hücrelerinde PDGFR β 'nin transkripsiyonunu uyardığı Şekil 2.7'de gösterilmiştir [88].

2.4. D-Galaktoz'a bağlı yaşlanma modeli

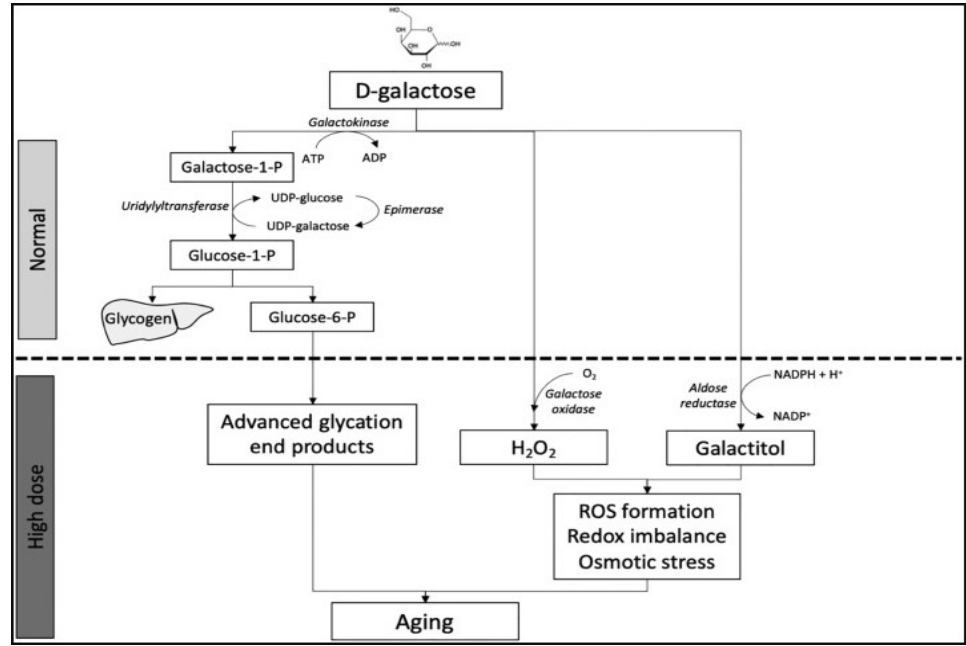
Yaşlanma modelleri arasında, kolay uygulanması, yan etkinin az olması, deney hayvanına zarar vermemesi ve deney süresi boyunca yüksek hayatta kalma oranı nedeniyle en çok tercih edilen modellerden biridir. D-galaktoz verilen 3 aylık sıçanların, 16-24 aylık yaştaki sıçanlara yapısal ve fonksiyonel olarak benzediği ve doğal yaşlanmaya benzer olduğu belirtilmiştir [89]. D galaktoz uygulaması ile ilgili olarak literatürde farklı doz (50 ila 1250 mg/kg/gün) ve süreler (6 ila 12 hafta) ve yaş grupları (6 hafta ila 6 ay) bildirilmiştir [90].

D-galaktoz, vücutta ve birçok gıdada (bal, pancar, peynir, yoğurt, tereyağı, süt, kivi, soya sosu, erik, kuru incir, kiraz, kereviz) doğal olarak oluşan indirgen bir şeker olan aldoheksozdur. Kandaki normal D-galaktoz konsantrasyonu 10 mg/dL'den azdır [91]. Sağlıklı bir yetişkin için, önerilen maksimum günlük doz 50g galaktoz dur ve alımından sonra yaklaşık 8 saat içinde vücuttan atılır [92].

Normalde D-galaktoz, galaktokinaz ve galaktoz-1-fosfat uridiltransferaz enzimleri tarafından glikoza metabolize edilir, daha sonra glikoz glikoliz yoluna girer veya karaciğer, kas ve yağ dokusunda glikojen olarak depolanır [93]. Kemirgenlere uygulanan uzun süreli D-galaktoz enjeksiyonu, galaktozun tamamen metabolize edilmesini engeller. Fazla D- galaktoz vücutta birikerek toksik etkileri olan galaktitole indirgenir. Galaktitol daha sonra enziminin etkisiyle galaktoz aldehit ve hidrojen peroksite oksitlenir. Bir reaktif oksijen türü (ROS) olarak hidrojen peroksit, reaksiyondan sonra hidroksil radikalleri üreterek, in vivo antioksidan aktivitenin azalmasına neden olur. Serbest radikallerin in vivo birikimi,

reaktif oksijen türleri tarafından daha da şiddetlenir. D- galaktoz ayrıca hücre içi Ca^{+2}/Mg^{+2} oranının artmasına mitokondriyal disfonksiyon ve fosfolipaz A2 aktivasyonunun uyarılmasına neden olur [94, 95].

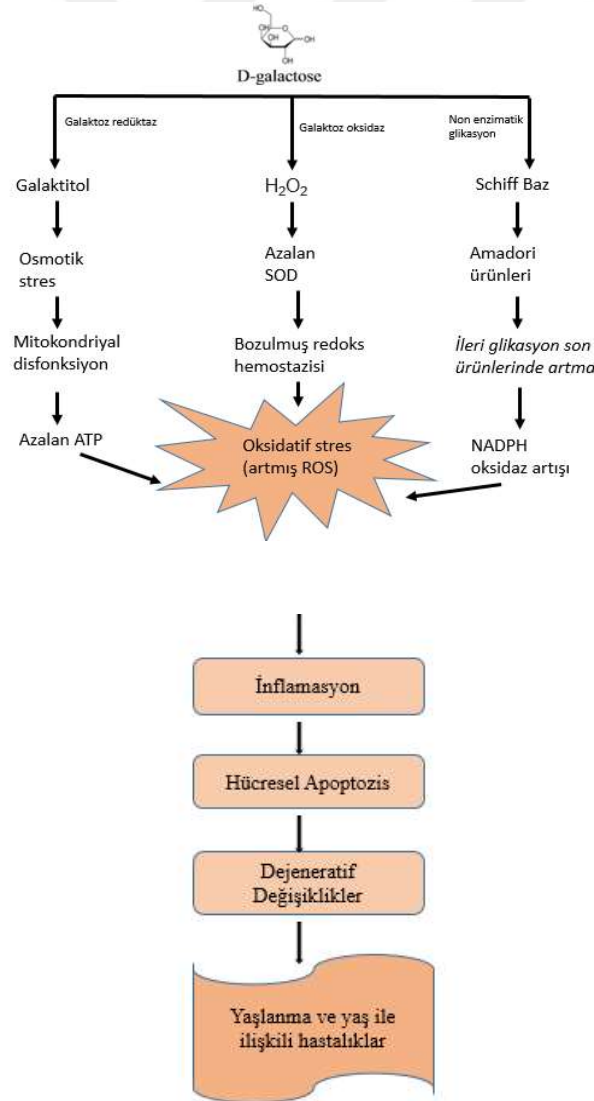
Yüksek doz D-galaktoza bağlı yaşlanmadan sorumlu olan mekanizmalar, Şekil 2.8’de gösterildiği gibi; oksidatif stres ve antioksidan savunma, inflamasyon, apoptoz olarak tanımlanabilir [96].



Şekil 2.8. Normal ve yüksek dozda D-galaktoz metabolizması [3].

1. Galaktoz uygulamasına bağlı olarak interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), nükleer faktör kappa b (NF-kB) gibi inflamatuvar sitokinlerin seviyelerinde artış, hücresel yaşlanma ile ilişkili genler olan p16 , p53, p21 gen ekspresyonunda artma gösterilmiştir [10, 12, 96, 97].

2. D- Galaktozun; karaciğer dokularında nitrik oksit (NO), MDA ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozini (8-OHdG) artırarak ve katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), SOD, nitrik oksit sentaz (NOS), glutatyon (GSH) ve toplam antioksidan kapasiteyi azaltarak oksidatif stresi indüklediği belirtilmiştir. Artan ROS karaciğer de HSC aktive ederek onları myoblastlara döndürmekte ve fibrojenik yanıtı aktive etmekte ve fibrotik alanlarda artışa neden olmaktadır [10-13, 98].



Şekil 2.9. D -galaktoz kaynaklı yaşlanma ile ilgili olası altta yatan mekanizmalar [97].

2.5. D-Galaktoz ve Karaciğer Fibrozisi

2.5.1. D-Galaktoz' un Karaciğer fonksiyonları üzerine etkisi

Normal karaciğer fonksiyonları, aşırı etanol tüketimi, kronik hepatit B ve C virüsü enfeksiyonları, aflatoksinlerle kontamine gıdalar, obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklar gibi çeşitli etiyolojik faktörler tarafından değişebilir [99][100]. Alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkaline fosfatase (ALP) ve gama-glutamyltransferaz (GGT) karaciğer fonksiyonunu gösteren belirteçlerdir. Karaciğer inflamasyonu veya disfonksiyonu sırasında bu enzimlerin aktivitesinin arttığı bilinmektedir. D-galaktoz uygulaması plazma, serum veya karaciğerde AST, ALP ve GGT enzimlerini aktivitesini artırır. Chen ve ark. yaptığı çalışmada, 150 mg /kg dozdan 8 hafta boyunca subkutan D-galaktoz uygulaması sonucunda; yüksek serum ALT ve AST seviyeleri, apoptoz ve inflamatuvar hücre artışı gözlenmiştir [12]. Saleh ve ark. yaptığı çalışmada 300 mg/kg dozdan 6 hafta boyunca intraperitoneal D-galaktoz uygulaması sonucunda AST ve ALT serum seviyelerinde sırasıyla %45 ve %35 oranında artış göstermişlerdir [11].

Yaşlanma bozulmuş lipid metabolizması ile beraberdir. Yaşlanma ile birlikte, serumda trigliserit (TG) düzeyi artarken, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir [101]. Zhou ve ark. yaptığı çalışmada, D-galaktoz uygulanan farelerin karaciğerlerinde belirgin lipid birikimi olduğu trigliserit seviyelerinin arttığı, HDL kolesterol ve HDL-TG oranının azaldığını

bildirilmiştir. D-galaktozun karaciğer hasarı için önemli bir risk faktörü olarak farelerin karaciğerlerinde lipid birikimi yoluyla oksidatif strese neden olduğu belirtilmiştir [98].

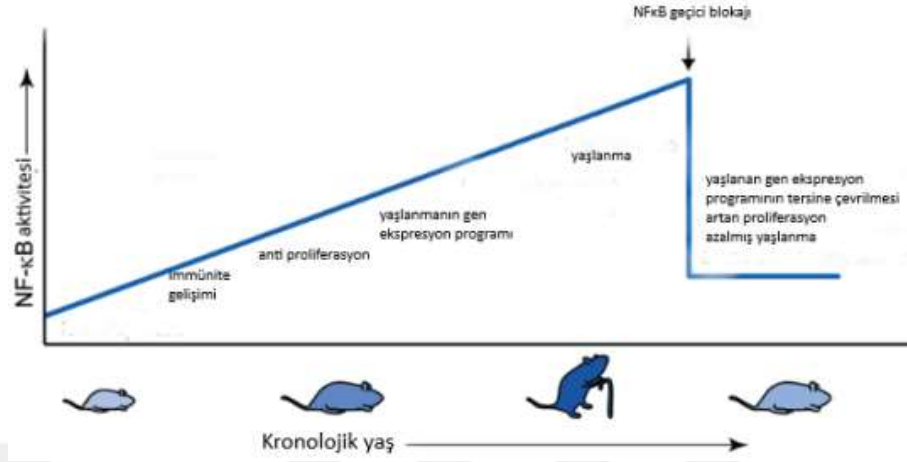
Paraksonaz-1 (PON1) karaciğerde sentezlenen bir enzimdir. Plazmada HDL ile birlikte bulunur. PON1'un en iyi bilinen ve ilk tanımlanan fonksiyonu, organofosfatlı nörotoksinleri, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisidleri hidroliz etme yeteneğidir. PON1, LDL-kolesterolü oksidasyondan koruma, makrofajların 'köpük hücrelere' dönüşümünü ve homosistein tiolakton katabolizmasını azaltma gibi ana rolleri ile önemli bir antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-aterojenik etkiye sahiptir [102]. Serum PON1 aktivitesi, yeni doğan ve prematüre infantlarda erişkin düzeyin yarısı kadardır. Erişkin düzeylerine doğumdan bir yıl sonra ulaşılır. PON1 aktivitesi, yetişkin değerlerine ulaştığında zaman içinde oldukça sabittir. Sıçanlarda, 3 ve 24 aylık hayvanlar arasında plazma ve karaciğer PON1 aktivitesinde hiçbir fark bulunmamıştır [103]. İlerleyen yaşla birlikte serum PON1 aktivitesinde bir azalma ve buna bağlı olarak HDL'nin koruyucu işlevlerinde azalma olduğunu belirtilmiştir [104].

PON1 düzeyinde azalmanın karaciğer hasarına karşı duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir. Kronik karaciğer hastalıklarında serum PON1 aktivitesinin azaldığı, serum PON1 konsantrasyonu ve hepatik PON1 protein ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir [105, 106]. Ferre ve ark yaptığı çalışmada, kronik hepatit ve karaciğer sirozunun erken evrelerinde gözlenen artmış oksidatif strese yanıt olarak veya artmış kolajen ekspresyonunun bir sonucu olarak serum PON1 aktivitesi ve karaciğer PON1 ekspresyonunun azaldığını bildirmiştir. Kronik karaciğer

hastalıklarında oksidatif stres, fibrozis ve karaciğer hücre apoptozunun düzenlenmesinde PON1'in aktif bir rolü olduğunu bildirmişlerdir [107].

2.5.2. D-Galaktoz 'un Karaciğer inflamasyonu üzerine etkisi

İnflamasyon karaciğer fibrojenizinde önemli rol oynamaktadır. Stellat hücrelerin aktivasyonunda , doğal öldürücü (NK) hücreler, T hücreleri, Kupffer hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve endotel hücreleri gibi diğer birçok hücre tipi rol almaktadır [19]. Kupffer hücre aktivitesi, nükleer faktör-kappa β 'nın aktivitesini artırır ve proinflamatuvar sitokin salgılanması artar. İnflamatuvar ve fibrojenik hücreler arasında pozitif geri besleme döngüsü vardır ve bu da artan fibrozis ile sonuçlanmaktadır [1]. Uyaran yokluğunda, NF- κ B genellikle sitoplazmada aktif olmayan bir biçimde bulunur. Çeşitli inflamatuvar faktörler (IL-1 β , IL-6, TNF- α) tarafından uyarıldığında, NF- κ B hedef genlerin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu düzenlediği çekirdeğe hızla yer değiştirir [108]. Şekil 2.10'da görüldüğü gibi, NF- κ B yaş ile artar. NF- κ B, COX2 ve NOS üzerinden inflamasyonla ilişkili enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu düzenler. D-galaktoz uygulaması ile NF- κ B'nin aktive olduğu gözlenmiştir. NF- κ B'nin aktivasyonu ise, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin yukarı doğru regülasyonu ve IL-4 ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin aşağı doğru regülasyonuna neden olur. İnflamatuvar kaskadın tetiklenmesi, karaciğer hücrelerinin apoptozisine, karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına ve fibroze yol açar [109-112].



Şekil 2.10. Yaşlanma ve NF-κB sinyali ilişkisi [113].

Artmış NF-κB sinyalinin erken ve normal yaşlanmaya katkı sağladığı ortaya konmuştur. NF-κB sinyalin bloke edilmesinin yaşlanmayı önlediği bildirilmiştir [113].

D-galaktozun oksidatif stres ile bağlantılı olarak, inflamatuvar yanıtı tetiklediği bilinmektedir. D-galaktoz verilen hayvanların , karaciğer dokularında TNF- α , IL-6, IL-1 β , NF-κB, NOS ve siklooksijenaz2 (COX2) gibi inflamatuvar belirteçlerde artış gözlenmiştir [10].

2.5.3. D-Galaktoz‘ un fibrojenik sinyal yolları ile ilişkisi

Yaşlanan dokularda fibrozis sinyal yollarının (Wnt/ β -katenin ve TGF- β) indüklendiği bilinmektedir. D-Galaktoz uygulanan sıçanlarda fibrojenin aktivasyonunda anahtar molekül olarak kabul edilen TGF- β düzeyinin karaciğer dokusunda arttığı gösterilmiştir [11]. D-galaktoz verilmesini takiben, ROS yapımının artışı karaciğer hasarında TGF- β salınımını indükler. Böylelikle ROS hem fibrozisi başlatır hem de devam ettir [114].

D- Galaktozun intraperitoneal uygulamasının karaciğer dokusunda fibrozis skorunu ve AGE'leri arttırdığı gösterilmiştir. AGE'lerin oluşumu artan ROS üretimi ile karaciğer dokusunda oksidatif strese neden olur. Böylelikle dokuda fazla kolajen lif üreten miyofibroblastların aktivasyonunu ve çoğalmasını uyarır [13].

2.6. Sirtuinler

Uzun yaşam proteini olarak adlandırılan sirtuinler, genom stabilitesini ve homeostazisi devam ettirme özelliği ile yaşam süresini arttırabilen, Nikotinamid Adenin Difosfat (NAD) bağlı sınıf III histon/protein deasetilaz ailesinin üyelerindendir. Sirtuinler, yaşlanma, DNA onarımı, hücre döngüsü, enerji metabolizması ve stres koşulları altında hayatta kalma dahil olmak üzere sayısız hücresel sürecin düzenlenmesinde rol oynar. Sirtuinlerin işlevleri bulundukları yere, enzim aktivitelerine ve doku tiplerine göre değişir. Sirtuin ekspresyonundaki değişiklikler metabolik sendrom, diyabet, kanser, böbrek hastalıkları ve yaşlanma gibi çeşitli hastalıklarda kritik öneme sahiptir. SIRT1'den SIRT7'ye kadar olmak üzere memelilerde tanımlanan yedi sirtuin (SIRT) proteini vardır. SIRT1 ve SIRT2 hem çekirdekte hem sitoplazmada, SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 mitokondride, SIRT 6 ve SIRT7 nükleusta bulunur. SIRT2 sitoplazmada en çok bulunan sirtuindir [115, 116]. Ayrıca SIRT2 hücre döngüsüne bağlı bir şekilde çekirdeğe geçici olarak geçebilir [117]. Sirtuinler arasında SIRT1 en geniş substrat yelpazesine sahip ve en fazla sayıda fizyolojik yolu etkileyerek ailesinin en çok çalışılan üyesidir.

SİRTUİNLER	SINIF	LOKALİZASYON	ENZİMATİK AKTİVİTE
SIRT1	I	Nukleus, Sitozol	Deasetilasyon
SIRT2	I	Sitozol, Nukleus	Deasetilasyon, Demiristolasyon
SIRT3	I	Mitokondri	Deasetilasyon
SIRT4	II	Mitokondri	ADP-ribosilasyon
SIRT5	III	Mitokondri	Deasetilasyon, Demalonilasyon, Destüksinilasyon
SIRT6	IV	Nukleus	Deasetilasyon, ADP-ribosilasyon
SIRT7	IV	Nukleolus	Deasetilasyon

Çizelge 2.1. Sirtuinlerin Hücre Lokalizasyonu ve Enzimatik Aktiviteleri [15].

2.6.1. Sirtuinler ve Fibrozis

Sirtuinler, fibrozisin başlangıcından ve gelişiminden sorumlu moleküler yolları modüle etmede önemli rollere sahiptir. Sirtuinler, EMT, endotelyal mezenkimal geçiş (EndMT) gibi birçok fibrojenik sürecin ve TGF- β , Wnt/ β -katenin dahil olmak üzere fibrozis sırasında aktive olan hücre içi fibrojenik sinyal yollarının modülasyonu ile fibrojenik yanıt üzerinde etkilidir. Ayrıca sirtuinler, ROS seviyeleri, NF- κ B gibi fibrozisin diğer sinyal belirleyicilerini de düzenler [118]. Sirtuinlerin açık bir şekilde fibrozisi düzenlemesine rağmen, SIRT izoformlarına özgü, ilgili hücre tipleri açısından farklılıklar vardır. Bunlar, yanıtlardaki farklılıkları da açıklar.

Miyofibroblast farklılaşmasına ve aktivasyonuna katılan başlıca sinyal yolları kanonik ve kanonik olmayan TGF- β ve Wnt/ β -catenin yolaklarıdır. Sirtuinlerin hem kanonik hem de kanonik olmayan TGF- β sinyal yollarında yer alan proteinlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir. SIRT1, SMAD proteinlerini deasetile ederek fibrotik süreçleri inhibe eder. SIRT1, SMAD4'ün deasetilasyonu, MMP-7'nin aktivitesini baskılayarak pro-fibrotik TGF- β sinyalini inhibe ettiği belirtilmiştir [119]. Yaşlanma ile SIRT1 ekspresyonunun azalması, karaciğer hücreleri ve stellat hücrelerde alkolik karaciğer hasarını ve fibrozu şiddetlendirmektedir [120]. Çalışmalarda SIRT1 ekspresyonunun dokulardaki fibrotik yanıtı iyileştirdiği bildirilmiştir [121].

SIRT3 aktivitesinin antifibrotik süreçlerle ilgili olduğu, SIRT3 ün, SMAD3'ün deasetilasyonu aracılığıyla kanonik TGF- β sinyal yolunu inhibe ettiği ve fibrotik yanıtı azalttığı gösterilmiştir [122]. Yapılan invivo/invitro çalışmalar, SIRT3 artışının mitokondriyal dinamiklerin ve NF-kB/TGF- β 1/SMAD sinyal yolunun düzenlenmesi yoluyla fibrotik yanıtı azalttığını göstermiştir [123].

SIRT4, SMAD4'ü deasetilleyerek antifibrotik aktivite gösterebilir [124]. Bununla birlikte SIRT4 'ü profibrotik, SIRT5'i ise antifibrotik olarak gösteren çalışmalar da mevcuttur [125].

SIRT6 aktive edilmiş HSC'ler ve fibrotik karaciğer üzerine yapılan çalışmalarda, antifibrotik aktivite göstermiştir. SIRT6 hem kanonik hem de kanonik olmayan TGF- β sinyal yolları ile etkileşime girerek antifibrotik aktivite sergilemiştir. SIRT6, fibrojenik protein SMAD2'yi deasetile ederek inhibe eder. Aynı hücresel sistemde SIRT6'nın TGF β 1-SMAD3 sinyal iletim yolunu inhibe

ettiği ve bu nedenle EMT'yi bloke ettiği ve bir antifibrotik ajan gibi davrandığı bildirilmiştir [126].

SIRT7; SMAD2, 3, 4 ve ERK proteinlerini düzenler. SIRT7'nin, TGF- β aktivitesini azaltarak kolajen ve α -SMA seviyelerini baskıladığı ve SMAD3 seviyelerini azaltarak antifibrotik ortaya koyduğu gösterilmiştir [127]. Ancak SIRT7'nin profibrotik veya antifibrotik etkisi farklı çalışmalarda bildirilen uyumsuz sonuçlar nedeniyle tartışmalıdır. [128]

SIRT1, β -katenin'i bağlar ve deasetile eder, böylece çekirdeğe yer değiştirmesini ve Wnt'ye bağlı gen ekspresyonunu inhibe eder. SIRT1'in azalması Wnt/ β -katenin sinyalinde artışa neden olduğunu göstermiştir [129]. Benzer şekilde, SIRT2, β -katenin'i bağlayarak Wnt sinyalini inhibe eder [26]. Aksine, SIRT3 artan Wnt sinyal aktivitesi ilişkilendirilmiştir [130]. SIRT6, çekirdekte β -katenin ile moleküler bir kompleks oluşturur ve β -katenin hedef genlerinin promotör bölgelerindeki histonları deasetile eder. Sonuç olarak, profibrotik gen transkripsiyonu ortadan kalkar [126].

2.7. Sirtuin 2

2.7.1. SIRT2 ve Yaşlanma

Sirtuin 2 (SIRT2), NAD⁺'ya bağımlı sınıf III protein deasetilazlar olan sirtuin ailesine aittir. Hücre döngüsünün düzenlemesinde, enerji metabolizmasında, inflamasyonda ve uzun ömürde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. SIRT2'nin vücutta çok çeşitli doku ve organda eksprese edildiği görülmektedir. Esas olarak beyinde, özellikle hipokampus, striatum ve oligodendrositlerde [14], bununla birlikte böbrek, pankreas, testis, karaciğer ve farelerde yağ dokusu dahil olmak

üzere metabolizma ile ilgili organlarda ekprese edilir [15]. SIRT2 α -tübülünü deasetilasyona uğratarak mikrotübül dinamiklerini düzenler ve hücre döngüsünün ilerlemesinde rol alır [117]. SIRT2 protein ekspresyon seviyelerinin de hücre döngüsünün mitotik fazı sırasında arttığı ve aşırı ekspresyonunun mitozu geciktirdiği bildirilmiştir [131, 132]. Ayrıca SIRT2'nin inhibisyonunun antiapoptotik etkiye neden olduğu gösterilmiştir [133].

Yaşlanma sürecinde nörodejenerasyonu önlemede; SIRT1 aktivasyonu ile SIRT2 inhibisyonunun koruyucu olduğu gösterilmiştir [134].

SIRT2 inhibisyonunun yaşlanma ile artan çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda nöron koruyucu etkisi bildirilmiştir. PD (Parkinson hastalığı) modelinde, SIRT2 α -tübülün ve α -sinükleini deasetiller, mikrotübül dinamiklerini etkiler otofaji ve nöronal disfonksiyona katkıda bulunur. Aynı zamanda SIRT2, FOXO3a asetilasyonunu artırarak Bim seviyelerinde azalmaya yol açar, böylece apoptozu azaltır ve sonuçta Parkinson hastalığına yol açabilir. HD (huntington hastalığı) modelinde, SIRT2'nin inhibisyonu, kolesterol sentezini düzenleyerek ve birikmiş mutant Huntingtin (mHtt) proteinini azaltarak nöron koruyucu etki sağlamaktadır [29, 135-138]. Yaşlanma ile sıçan beyin dokularında (serebral korteks, hipokampus) ve kolonik mukozada SIRT2 düzeyinin arttığı bildirilmiştir. [133, 139].

2.7.2. SIRT2 ve inhibisyonunun fibrozis üzerine etkisi

SIRT2'nin fibrozis üzerindeki etkileri konusunda birbiri ile çelişkili çalışmalar mevcuttur. Farklı modellere bağlı (D-galaktoz, CCl₄, TAA gibi)

oluşturulan fibrozis mekanizmasında organ fonksiyon bozukluğu ve fibrojenin artması gerçekleşir. Bizim modelimizde D-galaktoz uygulamasına bağlı gelişen karaciğer fibrozisinde, SIRT2 protein düzeyi arttı. Çalışmamızla uyumlu olarak, CCl₄ ile indüklenen fibrotik fare karaciğerlerindeki stellat hücrelerde SIRT2'nin eksprese edildiği bildirilmiştir. İnsan fibrotik karaciğer hücrelerinde SIRT2 ekspresyon artışı gösterilmiştir. SIRT2 miyofibroblast farklılaşması ve fibrotik süreçler üzerinde etkilidir. SIRT2 inhibisyonu insan karaciğerlerinde kolajen1A1 ve α -SMA ekspresyonu için kritik olan ERK aktivasyonunu düzenleyerek fibrojenizi azalttığı gösterilmiştir [16]. SIRT2 ekspresyonunun insan fibrotik böbrek dokularında ve UUO (tek taraflı üretral obstrüksiyon) farelerinin böbrek dokularında önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. SIRT2 inhibisyonu, UUO farelerinde kolajeni azaltıp, renal tübülointerstisyel fibrozisi iyileştirmiştir [28].

SIRT2'nin fibrozis yapıcı etkisi yanında, SIRT2 nakavt farelerde hepatosit yaşlanması ve fibrozis görüldüğüne dair çalışmalar da bulunmaktadır. SIRT2^{-/-} farelerin 6 hafta boyunca %60 kcal yağ içeren yüksek yağlı diyet (YYD) ile beslendiklerinde, SIRT2^{+/+} farelere göre, karaciğerlerinde α -SMA seviyesi, kolajen1A1 ve kolajen3A1, PDGFR- α , ALT ve AST düzeyleri artmıştır [140]. SIRT2 nakavt farelerde patolojik kardiyak hipertrofi ve fibrozisin arttığı gösterilmiştir [141].

İnsanlar ve fareler üzerinde yapılan araştırmalar, SIRT2 ekspresyonunun MDM2 ve ERK/c-MYC yollarının kontrolü ile profibrotik süreçleri indüklediği gösterilmiştir [16, 28].

SIRT2, fibrotik süreçleri esas olarak TGF β 1 ve Wnt/ β -katenin yollarının düzenlenmesi yoluyla kontrol edebilir. SIRT2 ve β -katenin ilişkisi ile ilgili çelişkili bulgular vardır. SIRT2 doğrudan β -katenin'e bağlanır. *SIRT2* nakavt fare embriyonik fibroblastlarda nükleer β -katenin proteininde artış gözlenmiştir. SIRT2'nin β -katenin ile etkileşime girerek gen aktivasyonunu baskıladığı, Wnt sinyal yolunu engellediği ortaya konmuştur [26]. Bağırsak epitel hücrelerinde SIRT2'nin β -katenin deasetilasyonu yoluyla Wnt sinyalini inhibe ettiğini gösterilmiştir [142].

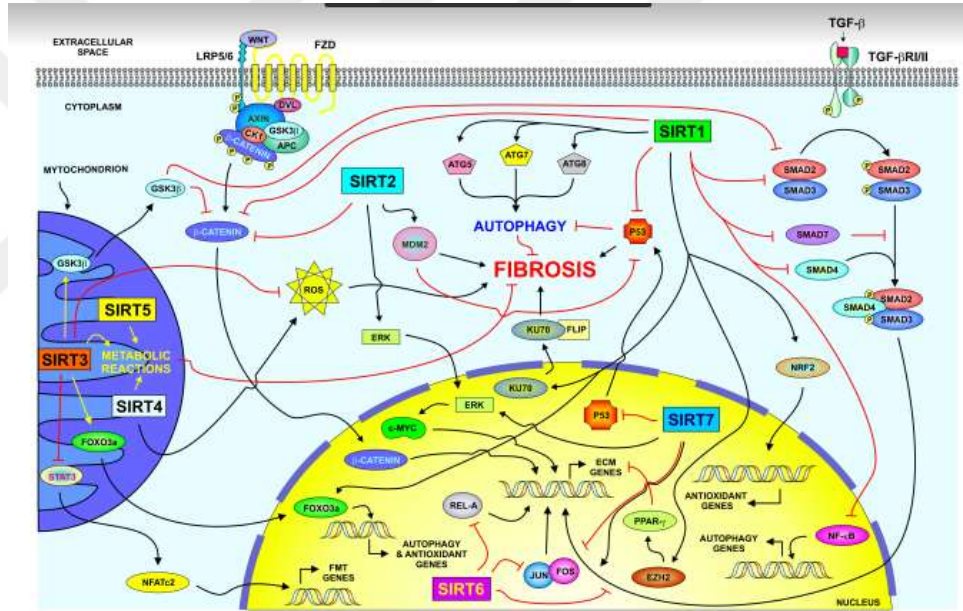
TGF- β 1 stimülasyonu, fibroblast hücre kültürünü aktive ederek fibroblastlarda SIRT2 protein seviyelerini yükseltmiştir. AGK2, TGF- β 1 ile indüklenen fibroblast aktivasyonunu azaltırken, tübüler epitel hücre dizilerinde α -SMA, kolajen III ve fibronektinin artışı önleyememiştir. Ancak fibroblast hücre dizilerinde α -SMA, kolajen III ve fibronektin seviyelerini azaltmıştır [28].

SIRT2, nükleer faktör κ B (NF- κ B) gibi fibrozisin diğer sinyal belirleyicilerinde düzenler. SIRT2'nin NF- κ B alt birimi p65'i Lys-310'da doğrudan bağlayarak ve deasetilleyerek anti-inflamatuvar etki gösterdiği, NF- κ B tarafından düzenlenen inflamatuvar gen ekspresyonunun azalttığı bildirilmiştir [143, 144].

AGK-2 uygulamasının TAA kaynaklı karaciğer hasarını (histopatolojik skoru) ve fonksiyonlarını (AST ve ALT) iyileştirdiği, pro-inflamatuvar sitokinleri (iNOS, TNF- α , IL-1 β) ve apoptozu (kaspaz 3, Bax) azalttığı bildirilmiştir [29]. Arteaga ve ark. çalışmalarında, karbon tetraklorür (CCl₄) ve tiyoasetamid (TAA) tarafından indüklenen karaciğer hasarı modelinde AGK2 uygulaması karaciğer fibrozunu azaltmıştır [16]. Farelerde, asetaminofen kaynaklı karaciğer

hasarı modelinde, AGK2 tedavisinin hepatotoksisiteyi (S6K1 sinyal yolunu inhibe edip ER stresini azaltarak) önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [24].

AGK2 ile yapılan SIRT2 inhibisyonunda, yaşlı sıçanların beyin dokusunda oksidatif strese karşı koruyucu olduğu, salermid aracılı SIRT2 inhibisyonunun, sıçan hipokampusünde oksidatif stres, apoptozu (Bax, Bim) azaltırken; GSH ve antiapoptotik olan BCL2 düzeyini artırdığı belirtilmiştir [133, 139].



Şekil 2.11. SIRT2 ve Fibrozis ile ilişkili hücre içi sinyal mekanizması [125].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

G.Ü.ET-20.011 kod numaralı ve "D-Galaktoz ile İndüklenmiş Yaşlanma Modelinde Gelişen Fibrozis Mekanizmasına SIRT2 İnhibisyonunun Etkisi" başlıklı araştırma çalışmasında deney hayvanının tüm dokularının kullanımı için izin alınmıştır. Bu çalışma için ise, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 21.02.2020 tarih ve 66332047-604.01.02-E.27799 sayılı karar ile aynı deney hayvanlarının farklı dokusu kullanılmak üzere G.Ü.ET-21.032 etik kurul onayı alınmıştır.

İzin ile 32 adet Sprague Dawley sıçanın karaciğer dokuları kullanıldı.

3.1.1. Araştırma planı ve deney grupları

Çalışmada toplam 32 adet genç erkek (3 aylık) Sprague Dawley sıçan kullanıldı. 2 tane sıçan ön çalışmada kullanılarak D-galaktoza bağlı fibrozis modeli test edildi. Literatürde 150 mg/kg D-galaktoz uygulaması ile 6 ya da 8 haftada böbrek fibrozisi olduğu belirtilmiştir [89]. Ancak 1. sıçanı 8. Haftada feda ettiğimizde, fibrozisi göstermek için Masson Trikrom ile boyanan karaciğer ve böbrek doku kesitlerinde kolajen lif dağılımında belirgin yoğunluk izlenmedi. Karaciğer dokusundaki değişimler fibrozis açısından yeterli bulunmadı. İlk sıçanın

değerleri ve histolojik bulguları fibrozis için yeterli olmadığı için 2. Sıçana 2 hafta daha 150mg/kg D-galaktoz uygulamasına devam edildi. 10 haftalık uygulama sonunda histolojik olarak karaciğer ve böbrekte fibrozis gözlemlendi. Ön çalışma yapılması sonucu modelin oluşması için gereken süre 8 hafta değil 10 hafta olarak belirlenmiştir. Ardından kontrol ve deney grupları olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Bu gruplara D-galaktoz ve spesifik SIRT2 inhibitörü olarak AGK-2 uygulandı. Çalışmada sıçanlara uygulaması yapılan maddeler ve dozları, uygulama süresi ve şekli Çizelge 3.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Kontrol ve deney grupları

Gruplar	Uygulanan Madde ve Dozu	Uygulama şekli	Denek sayısı	Süre
Kontrol	%0,9 salin 0.5 mL	Subkutan	6	70 gün
D-galaktoz (D-GAL)	D-galaktoz, 150 mg /kg/gün	Subkutan	9	70 gün
D-galaktoz + AGK-2	D-galaktoz, 150 mg/kg/gün AGK-2, 10µM/bw	Subkutan	8	70 gün
D-galaktoz+ %4DMSO+PBS	D-galaktoz, 150 mg/kg/gün DMSO, 10 µl/bw	Subkutan	8	70 gün

D-galaktoz serum fizyolojik içinde çözülerek (150 mg /kg 0.5 cc sc) hızlandırılmış yaşlanma modeli oluşturuldu. Spesifik SIRT2 inhibitörü olarak uygulanan AGK-2 (2-Cyano-3-[5-(2,5-dichlorophenyl)-2-furanyl]-N-5-quinolinyl-2-propenamide) ise önce dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülüp sonra PBS tamponu (pH 7,4) ile dilüe edilerek (%4 DMSO-PBS) hazırlandı. Kontrol grubuna

0.5 mL%0.9 salin, deney gruplarına ise D-galaktoz ve %4'lük DMSO'lu PBS ile hazırlanan AGK-2, %4'lük DMSO'lu PBS enjeksiyonları yapıldı.

Enjeksiyon uygulaması 10 hafta (70 gün) boyunca saat 10:00-12:00 arasında yapıldı. Çalışma grubunu oluşturan tüm sıçanlar laboratuvar ortamında, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslenildi. Uygulama sonrası böbrek fonksiyonunun değerlendirmek amacıyla, her hayvanın 24 saatlik idrarının toplanması için 1 gün önceden farklı günlerde bütün hayvanlar metabolik kafese yerleştirildi. 10. haftanın sonunda ketamin-ksilazin (40-5mg/kg) anestezi maddesi altında sıçanların vücut ağırlıkları tespit edilip, intrakardiyak kan alınarak feda edildi. Alınan doku örneklerinin ıslak ağırlıkları tartılıp histoloji için doku örnekleri ayrıldıktan sonra sıvı azotta dondurularak çalışılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi. Alınan kan ve idrar örnekleri ise aynı gün Gazi Üniversitesi Hastanesi Biyokimya merkez laboratuvarında Beckman AU5800 marka otomatik biyokimyasal analiz cihazı kullanılarak ölçüldü.

3.1.2. Kullanılan laboratuvar aletleri ve cihazlar

Çalışmamızda kullanılan alet ve cihazlar yer aldıkları Gazi Üniversitesi, Fizyoloji ve Histoloji Embriyoloji Araştırma Laboratuvarları ve Ankara Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarında kullanılan donanımlar Çizelge 3.2' de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Laboratuvarında kullanılan donanımlar

Kuruluştaki Bulunan Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat, vb.)	Projede Kullanım Amacı
Real time PCR cihazı (Ankara UTF Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı)	Gerçek zamanlı-PCR analizi
Görüntüleme cihazı (BİORAD) (Ankara UTF Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı)	Western blot yönteminde, bantların görüntülenmesi
Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Biyokimyasal analiz
Mikrosantrifüj (Hettich) (Ankara UTF Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı)	Biyokimyasal analiz
Hassas Terazi (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Doku tartımı ve solüsyon hazırlama
+4 °C buzdolabı (Arçelik, Türkiye) ve -20 °C derin dondurucu (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Solüsyon saklama
-80 °C derin dondurucu (Sanyo, Japonya) (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Örnek saklama
Vorteks (Nüve NM 110-020488 Türkiye) (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Biyokimyasal ölçümlerde numune homojenizasyonu
Benmari (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Çalışma öncesi inkübasyon
Sonikatör (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Doku homojenize edilmesi
Homojenizatör (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Doku homojenize edilmesi
BioTek ELx 800 Bioelisa Reader (Amerika)	Protein ölçümü
Saf su cihazı (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Deneyler için saf/deiyonize su elde etmek
Sıvı Azot tank ve depo sistemi (İnternational cryogenics Inc. IC 10 R) (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Alınan örneklerin dondurulmasında kullanılacak
Güç Kaynağı (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Dokuların önce sıvı azot daha sonra dondurucuda saklanması amacıyla
Ph metre (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Çalışmada kullanılacak olan çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanmasında
Biorad Mini-PROTEAN Tetra Cell, Mini Trans-Blot Module, and PowerPac Basic Power (Gazi UTF FİZYOLOJİ AD)	Western blot ile protein tayini. Transfer ve yürütme sistemi.
Mikrotom (Leica SM 2000, Germany) (Gazi UTF HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ AD)	Histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar için kesit alınacaktır.

Işık mikroskobu (Leica DM 4000B, Germany) (Gazi UTF HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ AD)	Mikroskopik Değerlendirme için kullanılacaktır.
Metabolik kafes (GÜDAM)	Son 24 saatlik idrarların toplanması

3.1.3. Kullanılan ticari kitler, antikorlar ve kimyasal sarf maddeler

Çalışmada kullanılan çeşitli kimyasal ve sarf maddeler (Çizelge 3.3), ticari kitler (Çizelge 3.4) ve Western blot yöntemi ve immuhistokimyasal analizler için kullanılan antikorlar imalatçı firma, katalog ve lot numaraları, uygun dilüsyon oranları (Çizelge 3.5) gibi özellikleri ile çizelgede listelenmiştir.

Çizelge 3.3. Kimyasal Sarf Maddeler

Kimyasal Sarf Maddeler	Markalar
D-GALAKTOZ	Cayman chemical company,USA
AGK-2	Cayman chemical company,USA
DMSO	Bioshop, Canada
Zinc sulfate heptahydrate (ZnSO ₄)	Carlo Erba Reagent
Sulfanilamide (SA)	Sigma-Aldrich
Vanadium(III) chloride (VaCl ₂)	MERCK, Germany
N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride (NEDD)	MERCK, Germany
Sodium Nitrate	Fisher Scientific
Sodyum Hidroksit	MERCK, Germany
Fosfat tamponu (PBS) (10x)	Echotechbiotechnology
Potasyum klorür (KCl)	MERCK, Germany
Sodyum klorür (NaCl)	Riedel-de Haen, Seelze, Germany
Protein ekstraksiyon solüsyonu (Pro-Prep TM)	İntron Biotechnology
RIPA lysis buffer	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA

Siğir serum albümini (BSA)	Pierce TM (Thermofisher Scientific), IL, USA
Protein standardı (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standart)	Thermofisher Scientific, MA, USA
Nitroselülöz membran (0,2 µm)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Tris Glisin Buffer(TG)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Gliserol	İnvitrogen, CA, USA
Tris Buffer Salin (TBS)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	MERCK, Germany
Bromofenol mavisi	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
β-merkaptotanol	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
Metanol	Sigma-Aldrich
%40 Acrylamide/Bis solüsyonu, 29:1	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Amonyum per sülfat (APS)	Thermoscientific, USA
Tetrametil- etilendiamin (TEMED)	İnvitrogen, CA, USA
Yağsız süt tozu (Blotto, non-fat dry milk)	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
Tween 20	Bioshop Canada Inc.
X-ray film solüsyonu-developer, ILFORD ILFOSOL 3	HARMAN Technology Limited, UK
X-ray film solüsyonu-fixer, ILFORD RAPID FIXER	HARMAN Technology Limited, UK
Medikal X-ray film/ MXG film (18x24)	Carestream Health, Inc., NY, USA
Q PCR mix	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Hardshell PCR plate	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
dNTP	Medgenetics, İZMİR
Microseal B Adhesive saels,100	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Primer Sentezi	Oligomer biotechnology, Ankara
Prob Sentezi	Oligomer biotechnology, Ankara
Pap Pen	Patolab, İstanbul
Teksoll	Tekkim
Ksilen	Tekkim
Parafin	Patolab, İstanbul
Cıtrate Buffer	Thermofisher Scientific, MA, USA
Entellan	MERCK, Germany

% 37'lik Formaldehit	Tekkim
----------------------	--------

Çizelge 3.4.Ticari kitler

Ticari Kitler	Marka
Rat NFkB (NFkappa B)ELISA Kit	ELK Biotechnology,Wuhan
Rat IL 1b (interlökin 1 beta) ELISA Kit	ELK Biotechnology,Wuhan
Rat IL6 (interlökin 6) ELISA Kit	ELK Biotechnology,Wuhan
Paraksonaz Enzim Test Kiti	Rel Assay Diagnostik Turkey
Pierce BCA Protein Ölçüm Kiti	Thermofisher Scientific, USA
Kemilüminesans substrat Kiti (ECL Western Blotting Substrate)	Pierce TM (Thermofisher Scientific), USA
Nücleospin RNA izolasyon Kiti	Macherey-Nagel,Germany
cDNA sentez Kiti	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
PAS Stain Kit	Beslab, Turkey
Masson Trichrome Kit	Beslab, Turkey
Polyvalent (Rabbit-Mouse) HRP Kit	Thermofisher Scientific, USA
DAB Plus Chromogen & Substrate System	Thermofisher Scientific, USA
Hydrogen Peroxide Block Kit	Thermofisher Scientific, USA

Çizelge 3.1. Antikorlar ve uygun dilüsyon oranları

Antikor	Dilüsyon oranı	Katalog numara	Lot numara	İmalatçı Firma
β-actin sekonder	1:2000	sc-47778	C1921	SantaCruz Biotechnology, TX, USA
SIRT2 (anti-rabbit monoklonal)	1:500	sc-28298	A1121	SantaCruz Biotechnology, TX, USA
Goat- anti mouse IgG(H+L) sekonder antikor	1:2000	62-6520	RF238896	İnvitrogen
Beta catenin Polyclonal Antibody	1:100	bs-1165R	A109199336	Bioss, USA
Fibronectin Polyclonal Antibody	1:100	bs-0666R	BJ01021050	Bioss, USA

α -Sma Antibody	Polyclonal	1:100	E-AB-34268	ACO283	Elabscience Biotechnology Inc, USA
Kollojen1 Antibody	Polyclonal	1:100	bs-104123R	BJ12169300	Bioss, USA
Kollojen 3 Antibody	Polyclonal	1:100	bs-0549R	BJ11098955	Bioss, USA

3.2. Yöntem

D-Galaktoz'a bağlı yaşlanma modelinde sıçanların izole karaciğer dokularında, karaciğer indeksi (Yaş karaciğer ağırlığı / vücut ağırlığı oranı) hesaplandı. Karaciğer fonksiyon analizi tespiti için alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), trombosit sayısı, açlık glukozu, Lipid panelleri (total kolestrol, HDL, LDL, trigliserit) Gazi Üniversitesi Hastanesi Biyokimya merkez laboratuvarında Beckman AU5800 markalı otomatik biyokimyasal analiz cihazı kullanılarak ölçüldü. Ölçümler sonucunda, AST- ALT Oranı, AST-Trombosit Oranı İndeksi (APRI) hesaplandı. APRI skoru (AST / Normalin üst limiti 40 IU/L) /trombosit sayısı $\times$ 100 formülü kullanılarak hesaplandı.

Karaciğer dokusunda meydana gelen fibrotik değişimleri değerlendirmek için (kolajen lif yoğunluk yüzdesi) Masson trikrom boyaması yapıldı. Ayrıca Fibronektin , kolajen tip1 ve tip3, β -katenin, α -SMA, SIRT-2 primer antikollarının uygun dilüsyonlarda kullanılmasıyla immuhistokimyasal analizleri yapıldı.

Yaşlanma modelinde karaciğer SIRT2 düzeyi western blot yöntemi ile, NF κ B düzeyi, paraksonaz, IL 1 β ve IL 6 düzeyi tayini için ELISA yöntemi kullanıldı.

TGF β , β -katenin, PDGF BB genlerinin ifade düzeyi gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile gösterildi.

3.2.1.SIRT2 protein ekspresyonunun Western-Blotting/SDS-PAGE metodu ile tayini

Western Blot Analizi; dokudaki spesifik bir proteini analiz etmemizi sağlayan bir tekniktir. Bu şekilde ilgilenilen bir proteinin örnekte bulunup bulunmadığı ve bulunuyorsa yarı kantitatif olarak farklı gruplar arasındaki miktarı hesaplanabilir. Çalışmamızda SIRT2 ve yükleme kontrolü olarak β -aktin proteinlerinin ekspresyonları Western blot yöntemi ile gösterilmiştir. Western blot yöntemi; örneklerin hazırlanması, jel dökümü, yükleme, yürütme, transfer, bloklama, primer ve sekonder antikor yükleme, görüntüleme ve analiz basamaklarından oluşur.

Western blot yöntemi sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için gerekli olan çözeltiler:

Jel dökümü için hazırlanan çözeltiler

- 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Tris baz MA:121,14 g/mol)
- ✓ 6 g tris baz 60 ml distile su ile çözdürüldü.
- ✓ HCl ile pH ayarı yapıldı. (pH 6,8)
- ✓ Son hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.

- 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Tris baz MA:121,14 g/mol)

- ✓ 18,15 g tris baz 60 ml distile su ile çözdürüldü.
- ✓ HCl ile pH ayarı yapıldı (pH 8,8)
- ✓ Son hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.

- %10 (w/v) SDS

- ✓ 10 g SDS 100 ml distile su ile çözdürüldü.

- %10 (w/v) APS

- ✓ 0,1 g APS 1 ml distile su ile çözdürüldü.
- ✓ Günlük taze hazırlanması gerekir.

- Ayırma jeli (resolving gel) % 12' lik, 10 ml (2 jel için)

- ✓ 4,25 ml distile su
- ✓ 3 ml % 40' lık Acrylamide/Bis solüsyonu
- ✓ 2,5 ml 1,5 M tris (pH 8,8)
- ✓ 100 µl % 10' luk SDS
- ✓ 100 µl % 10' luk APS
- ✓ 10 µl TEMED

- Yığınlama jeli (stacking gel) % 6' lık 5 ml (2 jel için)

- ✓ 2,9 ml distile su
- ✓ 0,75 ml % 40' lık Acrylamide/Bis solüsyonu
- ✓ 1,25 ml 0,5 M tris (pH 6,8)
- ✓ 50 µl % 10' luk SDS
- ✓ 50 µl % 10' luk APS
- ✓ 5 µl TEMED

Yükleme, yürütme, transfer ve bloklama aşamaları için hazırlanan çözeltiler

- %0,5 (w/v) Bromofenol mavisi
 - ✓ 0,025 gr bromofenol mavisi 5 ml distile su içinde çözdürüldü.
 - ✓ Steril filtreden geçirildi
- Örnek tamponu (sample buffer) (×2) stok
 - ✓ 1,25 ml tris-HCl (0,5 M pH 6,8)
 - ✓ 2,5 ml gliserol
 - ✓ 2 ml %10' luk SDS
 - ✓ 0,2 ml %0,5' lik bromofenol mavisi
 - ✓ Son hacim 9,5 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.
 - ✓ Hazırlanan bu stok çözeltiden kullanılmadan hemen önce 950 µl alındı ve 50 µl β-merkaptoetanol ilave edilerek 1 ml'ye tamamlandı.

- Yürütme tamponu (running buffer) ($\times 10$) stok, pH 8,3

✓ 30,3 g tris baz

✓ 144 g glisin

✓ 10 g SDS

✓ Son hacim 1 L olacak şekilde distile su içinde çözündürüldü.

✓ 100 ml stok yürütme tamponu distile su ile 1 L' ye tamamlandı (1X).

- Transfer tamponu (transfer buffer) ($\times 10$) stok

✓ 30,3 g tris baz

✓ 144 g glisin

✓ Son hacim 1 L olacak şekilde distile su içinde çözündürüldü.

✓ 100 ml stok transfer tamponu ve 200 ml metanol, distile su ile 1 L' ye tamamlandı (1X).

- Yıkama tamponu (TBS-T; Tris Buffered Saline with Tween 20) ($\times 10$) stok, pH 7,5

✓ 12,11 g tris baz

✓ 87,66 g NaCl

✓ 5 ml tween 20

✓ 800 ml distile suda çözündürüldü ve konsantre HCl ile pH ayarı yapıldı (pH 7,5)

✓ Son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı.

✓ 100 ml stok yıkama tamponu distile su ile 1 L' ye tamamlandı (1X).

- Membran bloklama tamponu (%5' lik)
 - ✓ %5 Süt Tozu için, 5 gr yağsız süt tozu tartıldı, son hacim 100 ml olacak şekilde yıkama tamponu ile tamamlandı.
 - ✓ Transfer işlemi sonrasında tüm membranlar, membranı kaplayacak miktarda kullanılan bu tampon içinde (yaklaşık 25 ml) + 4 °C' de gece boyunca bloklandı.
- Antikor tamponu (%5' lik)
 - ✓ Membranların primer ve sekonder antikorlar ile inkübasyonu için kullan bu tampon esasen uygun antikor dilüsyonlarının yapıldığı (Çizelge 3.) membran bloklama tamponudur. Tüm antikorlar için %2' lik süt tozunda bloklama yapıldı.

Örneklerin hazırlanması

SDS-PAGE için kullanılacak karaciğer doku örnekleri aşağıdaki işlem sırası takip edilerek hazırlandı:

- Karaciğer dokularından 20 mg tartıldı.
- Kuru buz üzerinde tartımı yapılan örnekler üzerine 500 µl lizis tamponu (pH 7,4) eklendi.
- Kullanılan lizis tamponu (RIPA Lysis Buffer System, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA); 1 ml'de 10 µl 200 mM phenylmethanesulfonyl floride (PMSF), 10 µl 100 mM sodium orthovanadate ve 10 µl proteaz inhibitör kokteyli içerir.
- Doku homojenizatörü (Sonics vibracell, %50 amplitüd, 15-20 sn) ile homojenatlar hazırlandı.
- Homojenatlar kuru buz üzerinde 15-20 dk kadar inkübe edildi.
- İnkübasyon işleminden sonra homojenatlar 10.000 g +4 °C'de 10 dk santrifüj edildi.
- Temiz ependorflara alınan süpernatantlar ikinci kez santrifüj edildi.
- Süpernatantlar için alikotlama yapıldı ve -80 °C'de saklandı.

Total protein düzeylerinin ölçümü

Hazırlanan örnek süpernatantlarında total protein düzeyini ölçmek için BCA Protein ölçüm kiti (Pierce BCA Protein Assay Kit, Ref:23225, lot#UD282967, Thermo Scientific, USA) kullanılarak, önerilen protokol referans alındı.

Çalışmamızda BCA kiti ile protein tayini için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı;

- Protein standardı olarak kit içerisinde bulunan Albumin standart ampülü (2 mg/ml) kullanılarak stok hazırlandı.
- Stok BSA'nın PBS ile uygun dilüsyonları hazırlanarak sırasıyla; 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml ve 0 mg/ml olacak şekilde 7 protein standardı hazırlandı
- Mikroplakanın kuyucuklarına ikişer tekrarlı olmak üzere önce standartların her birinden 10 µl, sonra PBS ile 30 kat dilue edilen örneklerin her birinden 10 µl yükleme yapıldı.
- Standartlar ve örneklerin üzerine 200 µl Çalıştırma Reaktifi eklendi.
- Mikroplaka, shaker=karıştırıcı ile 30 sn örnek/standart ile reaktif karıştırıldı.
- Mikroplaka üzeri seal ile kaplanarak 37 °C'de 30 dk inkübe edildi.
- 595 nm' de absorbans ölçümü yapıldı.
- 7 standardın absorbans ölçümleri kullanılarak Microsoft Office Excel' de konsantrasyon-absorbans eğrisi oluşturuldu. Elde edilen lineer eğrinin denklemi ($y_{cons} = ax_{abs} + b$) örneklerdeki protein miktarının (mg/ml) hesaplanmasında kullanıldı.

- Son olarak, örnekler 30 kat dilüe edilmiş olduğu için hesaplanan protein ölçümleri dilüsyon katsayısı ($\times 30$) ile çarpıldı.

SDS-PAGE için jel dökümü

- SDS-PAGE için 10 ml %12'lik ayırma jeli (resolving gel) ve 5 ml %6'lık yığınlama jeli (stacking gel) döküldü.
- Jel döküm işlemi için BIO-RAD, Mini protean system (Hercules, CA, USA), jel dökme standları, camları, tarakları ve diğer aparatları kullanıldı.
- %12 ve %6'lık jeller, çalışmamızda kullandığımız proteinin moleküler ağırlığı göz önüne alınarak tercih edildi.
- Jel dökümünde ilk olarak ayırma jeli çözeltisi (içerik Kullanılan çözeltiler kısmında verilmiştir) hazırlandı. Bu jele APS ve TEMED eklendikten sonra hızlıca temiz cam plakaların arasına döküldü (5 ml kadar) ve üzeri distile su ile kaplandı.
- Ayırma jelinin polimerize olması beklendikten sonra (yaklaşık 45 dk) jelin yüzeyindeki su dökülüp ayırma jelinin üzerine yığınlama jeli için hazırlanan çözelti (2 jel için 5 ml) döküldü.
- Yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak (1 mm, 15 kuyulu) yerleştirildi.
- Jelin polimerizasyonu için 45 dk beklendi.

Jel elektroforezi

Karaciğer dokusundan hazırlanan her bir örnek için, 20 µg proteini içerecek şekilde yükleme çözeltileri hazırlandı. Total protein içeriği 50 mg/ml olarak ölçülen bir doku örneğinden 20 µg protein yüklemesi yapmak (son hacim 10 µl olacak şekilde) için aşağıda örnek olarak verilen hesaplama kullanıldı:

Örnek yükleme çözeltisi:

- Örnek tamponu (sample buffer): (×2) hazırlanmış stoktan 5 µl
- Örnek: 0,4 µl [(20 µg protein yüklemek için gerekli volüm=20/protein konsantrasyonu) formülü ile hesaplandı ve $0,4 = 20 / 50$ şeklinde bulundu].
- Distile su: Örnek yükleme çözeltisinin son hacmini 10 µl' ye tamamlamak için 4,6 µl distile su

Yukarda gösterilen hesaplama şekliyle, her bir örnek 0,2 ml' lik eppendorflar içinde hazırlanarak, protein denaturasyonu için 95 °C' de 5 dk kaynatıldı (Eppendorf, Thermomixer Compact). Soğuması için buz içine alınan örnekler, tüm hacim alınarak jel kuyularına yüklendi. Her bir jelin ilk kuyusu protein standardı olacak şekilde (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 3 µl ile yüklendi. Moleküler ağırlıkların (kDa) belirlenmesinde bu protein standardı referans alındı. Örneklerin jellere yüklenmesi tamamlandıktan sonra elektroforez tankı (Mini protean system, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) cam plakaları kapatacak miktarda yürütme tamponu (running buffer, pH 8,3) ile dolduruldu. Güç kaynağı (Consort E835, Electrophoresis Power Supply) 100 V' a

ayarlanarak yaklaşık 2 saat boyunca elektroforez işlemi sürdürüldü. Elektroforez işlemi ile proteinler jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrıştı.

Proteinlerin membrana transferi

- Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrışan proteinlerin nitrosellüloz membrana transferi için ıslak transfer modülü (BIO-RAD, Mini protean system, Hercules, CA, USA) kullanıldı.
- Transfer modülüne yerleştirilecek kasetin aparatları, süngerler ve filtre kağıtları transfer tamponu içinde ıslatıldı.
- Nitrosellüloz membran (162-0112, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) da 1-2 dk distile su içinde ıslatıldı.
- Elektroforez işlemi tamamlanınca cam plakalar distile sudan geçirildi.
- Cam plakalar ayırıcı aparat ile açıldı ve jel dikkatlice çıkarılıp transfer tamponu içine alındı.
- Transfer kasedi, artı kutuptan eksi kutuba doğru sırasıyla; sünger, filtre kağıdı, membran, jel, filtre kağıdı, sünger olacak şekilde hazırlandı.
- Kasetler transfer modülüne yerleştirildi.
- Tank uygun miktarda transfer tamponu ile dolduruldu.
- Güç kaynağı sabit 350 mA ve 1 saat süreye ayarlandı.
- Transfer işlemi ile jelden membrana proteinlerin transferi sağlandı.

Bloklama ve antikor yükleme

- Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membranlar yıkama tamponu olarak kullanılan TBST içinde 5 dk yıkandı.
- Membranlar %5'lik yağsız süt tozu ile hazırlanan bloklama tamponu içine alındı.
- +4°C'de çalkalayıcı (Mini Rocker MR-1, BOECO) üzerinde gece boyunca inkübe edildi. Bu işlem ile hedef protein için membranlar üzerindeki non-spesifik bağlanma bölgeleri engellenmiş oldu.
- Bloklama işleminden sonra membranlar yıkama tamponu ile 3 kez, 5'er dk yıkandı.
- Hedef proteinler için seçilen primer antikorların (SIRT2, β -aktin) uygun dilüsyonları (Çizelge 3.) %5'lik süt tozu ile hazırlanan antikor tamponuyla yapıldı.
- Membranlar primer antikorlar ile +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edildi.
- Primer antikorlarla inkübasyon işleminden sonra membranlar yıkama tamponu ile 3 kez, 5'er dk yıkandı.
- Sekonder antikor HRP (horseradish peroxidase)-konjuge, yağsız süt tozu %5'lik süt tozu ile hazırlanan antikor tamponuyla uygun oranda dilüe edildi (Çizelge 3.) ve membranlar oda sıcaklığında, 1,5 saat boyunca sekonder antikor ile inkübe edildi.
- Sekonder antikorlarla inkübasyon işleminden sonra membranlar yıkama tamponu ile 3 kez 5'er dk yıkandı.

Görüntüleme ve analiz

- Hedef protein bantlarının görünür hale getirilmesi için kemilüminesans kit (ECL Western Blotting Substrate, Pierce™ (Thermo Sci.), IL, USA) kullanıldı.
- Kit içinde bulunan iki tampon çözelti 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.
- Bu tampon karışımıyla Membran yüzeyi kaplandı ve 1 dk inkübe edildi.
- BİORAD görüntüleme sistemi kullanılarak hedef protein bantları görüntülendi ve TIFF ve JPEG formatında kaydedildi.
- Bant yoğunluklarının hesaplanmasında Image J programı kullanıldı.
- Hedef proteinlerin bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β -aktine oranlanarak hesaplandı.

3.2.2. Dokularda TGF- β , β KATENİN ve PDGFBB ekspresyon düzeyinin Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) ile Saptanması:

RNA izolasyonu

- ✓ Doku örneklerinde RNA izolasyonu (Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA Mini Isolation Kit, 50 preps, Katalog No:740955.50) kit ile çalışıldı. Kitlerin uygulama aşamasında üreticinin önerdiği protokol referans alınarak deney basamakları tamamlandı.

Deney Öncesi Hazırlık

- Kit içindeki RA3 buffer (12 ml) içine 48 ml %96-100 Et-OH eklendi.
- rDNase içine 550 µl RNase free su eklendi.
- Örnek sayısına göre aliquotlanıp -30 o C'ye kaldırıldı. (9 PCR tüpü)

Örneklerin Hazırlanması

- -80 o C'deki sıçan karaciğer dokularından hassas tartıda yaklaşık 20 mg doku lam üzerinde bistüri yardımıyla kesilerek tartımı yapıldı ve dokular ependorflara alındı.

NucleoSpin RNA izolasyon kiti protokolü

1. Hücre Lizisi

- 20 mg karaciğer dokusunun üzerine lizis buffer olan 350 µl RA1 ile 3,5 µl β-merkaptoetanol eklendi.

2. Dokunun Homojenizasyonu

- Sonikatör (SONICS-Vibracell) cihazında %50 ayarda 8 saniye tutarak homojen hale gelene kadar (max 15 sn) homojenize edildi (buz üzerinde çalışılmalıdır.).
- Doku homojenatları 3000 RPM, +4 o C'de 5 dk santrifüj edildi süpernatantları alınacaktı fakat çökmediği görülünce bu aşamadan vazgeçildi.

3. Lizatın Filtrasyonu

- Mor renkteki NucleoSpin Filtresi 2 ml'lik collection tüp içine yerleştirildi.

- Lizat eklendi.
- 11.000 x g'de 1 dakika +4 o C'de santrifüj edildi.

4. RNA'nın kolona bağlanma şartlarının ayarlanması

- 4. adımda kullanılan filtre, collection tüpten çıkarılarak ve collection tüp üzerine 350 µl %70 Et-OH (soğuk) eklendi.
- 5 kere up and down yapılarak homojen dağıtıldı.

5. RNA'nın kolona bağlanması

- Açık mavi renkteki NucleoSpin RNA kolonu, collection tüp üzerine yerleştirildi.
- Her bir örnek 2-3 kere pipetaj yapıldıktan sonra kolona yüklendi.
- 11.000 x g'de 30 saniye +4 o C'de santrifüj edilir.
- Kolon yeni bir collection tüpe alındı.

6. Silika Membrana Desalting yapılması

- Kolon üzerine 350 µl MDB (Membran Desalting Buffer) eklendi.
- 11.000 x g'de 1 dakika +4 o C'de santrifüj edildi.

7. DNA'nın kesilmesi

- Steril 1,5 ml'lik ependorf içinde her bir örnek için 10 µl rDNase ve 90 µl Reaction Buffer for rDNase ekleyip mix hazırlandı ve karıştırıldı.
- Silica membrana 95 µl DNase reaction mixture eklemesi yapıldı.
- Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

8. Silica membranın yıkanması ve kurutulması

1. yıkama

- Kolon üzerine 200 µl RAW2 buffer eklendi.
- 11.000 x g'de 30 saniye +4 o C'de santrifüj edildi.
- Kolonu yeni bir collection tüpe alındı.

2. yıkama

- Kolon üzerine 600 µl RA3 buffer eklendi.
- 11.000 x g'de 30 saniye +4 o C'de santrifüj edildi.
- Flowthrough atıldı.

3. yıkama

- Kolon üzerine 250 µl RA3 buffer eklendi.
- 11.000 x g'de 2 dakika +4 o C'de santrifüj edildi.
- Collection tüp atılarak ve yerine elüsyon yapılacak olan 1,5 ml'lik ependorfu yerleştirildi.

9. RNA'nın elüsyonu

- Kolon üzerine 60 µl RNase-free su (kit içinde verilen) eklenir ve 2 dk inkübe edildi.
- 11.000 x g'de 1 dakika +4 o C'de santrifüj edildi.
- RNA konsantrasyonları ve 260/280 nm dalga boylarında absorbansları Nanodrop (Thermo Scientific) ile (ng/µl) olarak ölçülerek ve 500 ng çekmek için gerekli hacimler hesaplandı.

Çizelge 3.6. Kontrol ve deney grupları total RNA izolasyonu sonrası elde edilen RNA miktarları ve saflık oranları

Sıçan Karaciğer RNA Konsantrasyonları ve saflıkları (KONTROL GRUBU)									
	K1	K3	K4	K5	K6				
RNA SAFLIK	2.15	2.15	2.14	2.17	2.16				
RNA CONS. (ng/ul)	2212,6	1594,3	1549,1	2453,2	2106,6				
Sıçan Karaciğer RNA Konsantrasyonları ve saflıkları (GALAKTOZ-DMSO GRUBU)									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	
RNA SAFLIK	2.13	2.16	2.13	2.14	2.16	2.13	2.13	2.16	
RNA CONS.	2594,1	2333,1	2441,2	3168,5	1998,4	2421,1	2651,7	2491,0	
Sıçan Karaciğer RNA Konsantrasyonları ve saflıkları (GALAKTOZ GRUBU)									
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G10
RNA SAFLIK	2.14	2.15	2.13	2.13	2.14	2.16	2.15	2.12	2.13
RNA CONS.	3004,2	3988,4	3208,5	2996,1	1473,9	2217,6	2057,3	2623,6	2531,0
Sıçan Karaciğer RNA Konsantrasyonları ve saflıkları (GALAKTOZ-AGK2 GRUBU)									
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	
RNA SAFLIK	2.14	2.15	2.14	2.16	2.15	2.14	2.14	2.15	
RNA CONS.	2842,2	2078,7	2506,2	2539,8	3059,5	2409,5	3188,5	3653,3	

CDNA Sentezi

Doku örneklerinde cDNA sentez (BIO-RAD, iScript™ cDNA Synthesis Kit, 100x20 μl rxn, Katalog No: 1708891) kiti ile çalışıldı. Kitlerin uygulama aşamasında üreticinin önerdiği protokol referans alınarak deney basamakları tamamlandı. Total RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra ve daha sonra ticari kit yardımıyla mRNA dan cDNA sentezi elde edildi. Elde edilen cDNA örnekleri

ve aşağıdaki primerler kullanılarak ilgili genler GZ-PZR ile amplifiye edildi.

Primer ve Prob konsantrasyonları aşağıdaki hesaplamalar yapılarak hazırlanmıştır.

Forward ve Reverse Primerlerin konsantrasyonu;

✓ 10 μ M (pmol/ μ l) konsantrasyondan 0,6 μ l çekilir.

✓ $0,6 \mu\text{l} \times \frac{10 \text{ pmol}}{\mu\text{l}} = 6 \text{ pmol}$

✓ $\frac{6 \text{ pmol}}{20 \mu\text{l}} = 300 \text{ nM}$ Bu sonuca göre qPCR kitindeki (150-900 nM aralığında kalıyoruz)

Probe konsantrasyonu;

✓ 10 μ M (pmol/ μ l) konsantrasyondan 0,4 μ l çekilir.

✓ $0,4 \mu\text{l} \times \frac{10 \text{ pmol}}{\mu\text{l}} = 4 \text{ pmol}$

✓ $\frac{4 \text{ pmol}}{20 \mu\text{l}} = 200 \text{ nM}$ Bu sonuca göre qPCR kitindeki (150-250 nM aralığında kalıyoruz)

✓ Primer ve probalar hazırlanır. Deneylerde amplifiye edilecek

sıçan genleri için aşağıdaki primerler kullanıldı:

Çizelge 3.7.GZ-PZR amplifikasyonunda kullanılacak olan gen ve prob dizileri

Gen				Baz (bp)
Rat Beta Actin	Forward primer	RBact_F1	5' – TGTCACTCACTGGGACGAT – 3'	19
	Reverse primer	Rbact_R1	5' – GGGGTGTTGAAGGTCTCAAAC – 3'	21
	Probe	Rbact_P1	5' – FAM – CACTTCTACAATGAGCTGCGTGTGG – TAMRA – 3'	26
Rat Beta Katenin	Forward primer	Rbcat_F1	5' – TACGAGAAGCTCCTGTGGAC – 3'	20
	Reverse primer	Rbcat_R1	5' – GCTGCATCGGACAAGTTTCT – 3'	20
	Probe	Rbcat_P1	5' – FAM – CATCGTGAAGCTGGTGGGATGCAGG – TAMRA – 3'	26
Rat TGF Beta 1	Forward primer	RTGFB1_F1	5' – CGCAACAACGCAATCTATGAC – 3'	21
	Reverse primer	RTGFB1_R1	5' – TGTGCTCCACAGTTGACTTG – 3'	21
	Probe	RTGFB1_P1	5' – FAM – CAGTGCCAGAACCCCATTTGCTGTCC – TAMRA – 3'	26
Rat PDGF-BB	Forward primer	RPDGBF_F1	5' – GGTGCAGGTGAGAAAGATCG – 3'	20
	Reverse primer	RPDGBF_R1	5' – CTCGATGCTCCCTGGATGTC – 3'	20
	Probe	RPDGBF_P1	5' – FAM – GTGTGAGACAGTAGTGACCCCTCGGC – TAMRA – 3'	26

Çizelge3.8. GZ-PZR kullanılacak olan qpcr mix deney setleri

Beta Katenin qPCR için deney mix tablosu		
Component	1 Rxn	100 Rxn
iTaq Universal Probes Supermix (2X)	7,5 µl	750 µl
Forward Primer (10µM)	0,45 µl	45 µl
Reverse Primer (10µM)	0,45 µl	45 µl
Probe (10µM)	0,3 µl	30 µl
Nuclease-free water	3,3 µl	330 µl
cDNA Template	3 µl	-
Total Volume	15 µl	96 well'e 12,5 µl olarak bölünecek.

TGF Beta 1 qPCR için deney mix tablosu		
Component	1 Rxn	100 Rxn
iTaq Universal Probes Supermix (2X)	7,5 µl	750 µl
Forward Primer (10µM)	0,45 µl	45 µl
Reverse Primer (10µM)	0,45 µl	45 µl
Probe (10µM)	0,3 µl	30 µl
Nuclease-free water	3,3 µl	330 µl
cDNA Template	3 µl	-
Total Volume	15 µl	96 well'e 12,5 µl olarak bölünecek.

PDGF-BB qPCR için deney mix tablosu		
Component	1 Rxn	100 Rxn
iTaq Universal Probes Supermix (2X)	7,5 µl	750 µl
Forward Primer (10µM)	0,45 µl	45 µl
Reverse Primer (10µM)	0,45 µl	45 µl
Probe (10µM)	0,3 µl	30 µl
Nuclease-free water	3,3 µl	330 µl
cDNA Template	3 µl	-
Total Volume	15 µl	96 well'e 12,5 µl olarak bölünecek.

Hafif bir vortex ve spin ardından aşağıda tablodaki ayarlamalar yapılarak deney setleri cihaza (BIO-RAD CFX96 Real-Time PCR) yüklendi.

Çizelge 3.9. Deney setleri cihaza yüklenmeden önce yapılan ayarlamalar

Reaction	Temperature	Time	Cycle
Polymerase Activation and DNA Denaturation	95°C	30 sec	1
Denaturation	95°C	5 sec	40
Annealing/Extention	60°C	30 sec	
			Reaksiyon 53 dakika sürüyor.

Ct (Cycle threshold) değeri alınamayan PDGF-BB geni için tekrar deneme yapıldı. Fakat genin eksprese olduğu örnek belirtilen Ct değerleri arasında bulunamadı. Ct'ler geç alındı, cDNA miktarı arttırılması gerekti ve yeni cDNA sentezlendi. İlk örnek denememizde, Ct'ler geç alındı, cDNA miktarı arttırılması gerekti ve yeni cDNA sentezlendi. Bu aşamada K3 (1 µl cDNA + 2,18 µl dsu), K4 (1 µl cDNA + 2,09 µl dsu), G5 (1 µl cDNA + 1,9 µl dsu) örneklerinden tekrar 500 ng/µl hazırlandı ve 1 µg'lık RNA ile başlanılan 20 µl'lik hacimde cDNA sentezi yapıldı. Daha önce hazırlanan cDNA miktarları üzerine eklenip daha konsantre bir cDNA havuzu oluşturuldu. Bu havuzdan alınan cDNA lar sentez için kullanıldı. Bu şekilde yapıldığında Beta Aktin Ct değerleri daha önce görüldü ve kabul edildi. Deney prosedürü uygulandı.

3.2.3 NFKB, IL1 β , IL6, Paraksonaz protein ekspresyonunun Sandviç ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile tayin edilmesi

Karaciğer doku örneklerinde NFKB, IL1 β , IL6 ve Paraksonaz enzim ekspresyonunun kantitatif ölçümü için ticari ELISA kitleri (Rat IL6 (Interleukin 6) ELISA Kit 96 Testlik, ELK biotechnology, Katalog No: ELK1158, Rat IL1 β (Interleukin 1 Beta) ELISA Kit 96 Testlik, ELK biotechnology, Katalog No: ELK1272, Rat NKAP (NFKB Activating Protein) ELISA Kit 96 Testlik, ELK biotechnology, Katalog No: ELK7219, Paraaxonase-1 (PON-1) Enzim Aktivite Kiti, Rel Assay Diagnostics® ,Turkey Katalog No: RL0031) ile çalışıldı. Kitlerin uygulama aşamasında üreticinin önerdiği protokol referans alınarak deney basamakları tamamlandı.

ELISA için doku homojenatlarının hazırlanması

- 0,020 g tartılan karaciğer dokusu buz üzerine alınarak 500 μ l RIPA solüsyonu her bir örneğe eklendi.
- Doku homojenizasyonu Sonics vibracell aracılığıyla (%50 amplitüd, 15-20 sn) homojenize edildi ve bu homojenatlar 30 dk boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi biter bitmez homojenatlar, +4 °C’de ve 13.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatantlar çalışılınca kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

IL6 protein ekspresyonunun ELISA yöntemi ile saptanması:

IL6 protein miktarının ELISA ile saptanmasında Rat IL6 (Interleukin 6) 96 Testlik ELISA Kiti (Katalog No: ELK1158, ELK biotechnology) kullanıldı. Kitlerin uygulama aşamasında üreticinin önerdiği protokol referans alındı.

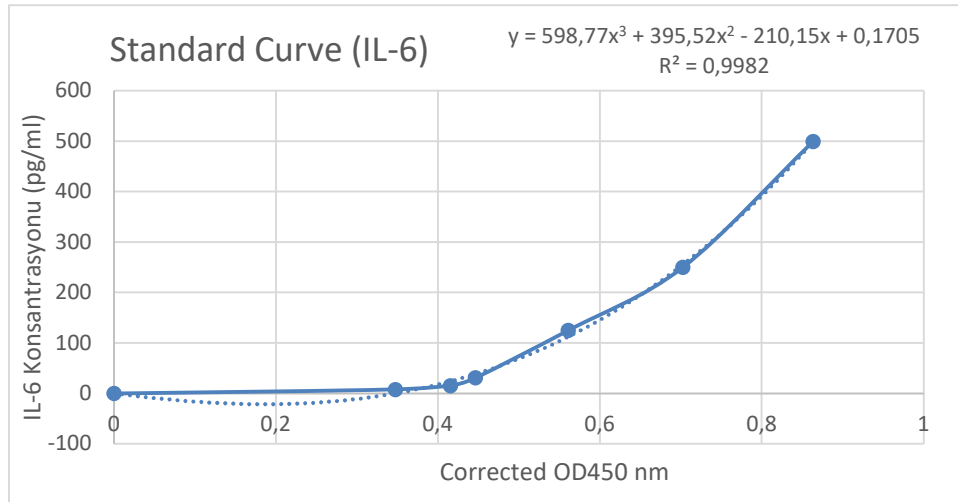
Kitin içeriği:

- Antikor ile kaplanmış mikrolaka 12 strip x 8 kuyu
- Standart (liyofilize)
- Standart Seyreltici Tampon 20 mL
- Biotinlenmiş Antikor (100×)
- Biotinlenmiş Antikor Seyreltici 12 mL
- Streptavidin-HRP Tampon (100×) 120 µL
- HRP Seyreltici 12 mL
- Yıkama Tamponu (25×) 20 mL
- TMB Substrat Solüsyonu 9 mL
- Durdurma Solüsyonu 6 mL
- Plaka Kapakları
- Kullanım klavuzu

Kitin çalışma prensibi:

Bu kitte uygulanan test prensibi Sandviç enzim immunoassay'dir. Bu kitte sağlanan mikrotitre plakası, Interleukin 6(IL6)'ya özgü bir antikorla önceden

kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler, uygun mikrotitre plaka kuyularına yüklenir ve ardından (IL6)'ya özgü biyotin-konjuge antikor eklendi. Daha sonra Horseradish Peroxidase'e (HRP) konjuge Avidin her mikropilaka kuyusuna eklenerek ve inkübe edildi. TMB substrat solüsyonu eklendikten sonra, yalnızca IL6, biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyucuklar da renkte değişiklik gözlemlendi. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sonlandırıldı ve renk değişimi 450nm $\pm$ 10nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Örneklerdeki IL6 konsantrasyonu, daha sonra standartların Optical Density (O.D.) değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi. Çıkan absorbans sonuçları total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. R² değeri aşağıdaki gibi bulundu.



Şekil 3.1. IL6'nın standart eğri R² değeri

IL1 β protein ekspresyonunun ELISA yöntemi ile saptanması:

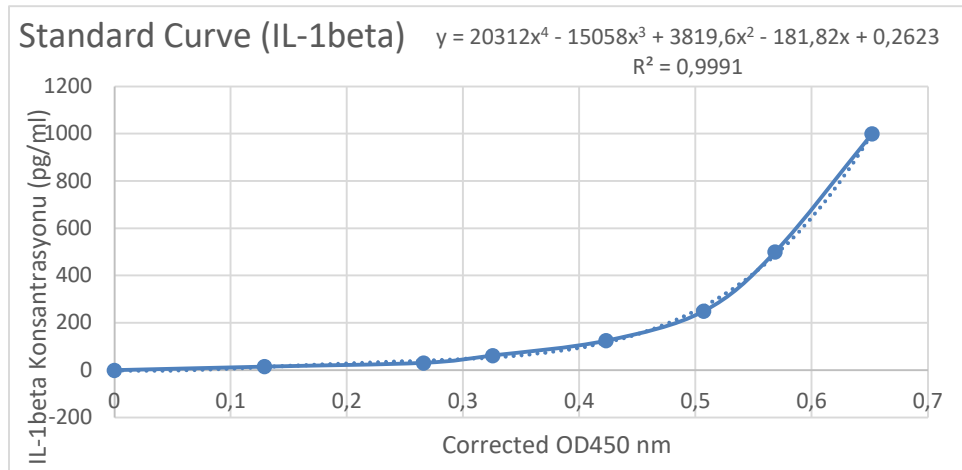
IL1 β protein miktarının ELISA ile saptanmasında Rat IL1 β (Interleukin 6) 96 Testlik ELISA Kiti (Katalog No: ELK1272, ELK biotechnology) kullanıldı. Kitlerin uygulama aşamasında üreticinin önerdiği protokol referans alındı.

Kitin içeriği:

- Antikor ile kaplanmış mikrolaka 12 strip x 8 kuyu
- Standart (liyofilize)
- Standart Seyreltici Tampon 20 mL
- Biotinlenmiş Antikor (100×)
- Biotinlenmiş Antikor Seyreltici 12 mL
- Streptavidin-HRP Tampon (100×) 120 μ L
- HRP Seyreltici 12 mL
- Yıkama Tamponu (25×) 20 mL
- TMB Substrat Solüsyonu 9 mL
- Durdurma Solüsyonu 6 mL
- Plaka Kapakları
- Kullanım klavuzu

Kitin çalışma prensibi:

Bu kitte uygulanan test prensibi Sandviç enzim immunoassay'dir. Bu kitte sağlanan mikrotitre plakası, Interleukin 1 Beta (IL1 β)'ye özgü antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler, uygun mikrotitre plaka kuyularına yüklendi ve ardından IL1 β 'ye özgü biyotin-konjuge antikor eklendi. Daha sonra Horseradish Peroxidase'e (HRP) konjuge Avidin her mikrolaka kuyusuna eklenerek inkübe edildi. TMB substrat solüsyonu eklendikten sonra, sadece IL1 β , biotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyucuklarda renkte değişiklik gözlemlendi. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sonlandırıldı ve renk değişimi 450nm $\pm$ 10nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Örneklerdeki IL1 β konsantrasyonu, daha sonra standartların O.D. değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi. Çıkan absorbans sonuçları total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. R² değeri aşağıdaki gibi bulundu:



Şekil 3.2. IL1 β 'nin standart eğri R² değeri

NFAP (NFKB Activating Protein) protein ekspresyonunun ELISA yöntemi ile saptanması:

NFAP protein miktarının ELISA ile saptanmasında Rat NFKAP 96 Testlik ELISA Kiti (Katalog No: ELK7219, ELK biotechnology) kullanıldı. Kitlerin uygulama aşamasında üreticinin önerdiği protokol referans alındı.

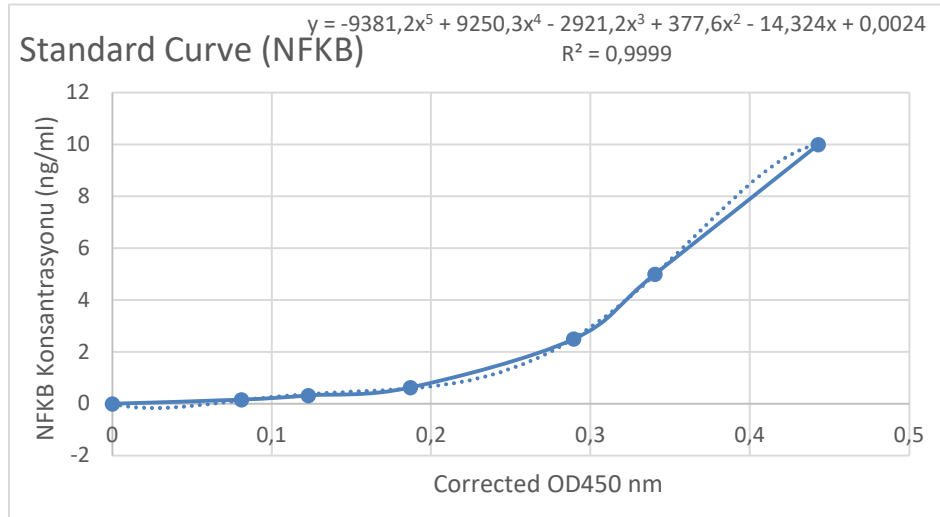
Kitin içeriği:

- Antikor ile kaplanmış mikrolaka 12 strip x 8 kuyu
- Standart (liyofilize)
- Standart Seyreltici Tampon 20 mL
- Biotinlenmiş Antikor (100×)
- Biotinlenmiş Antikor Seyreltici 12 mL
- Streptavidin-HRP Tampon (100×) 120 µL
- HRP Seyreltici 12 mL
- Yıkama Tamponu (25×) 20 mL
- TMB Substrat Solüsyonu 9 mL
- Durdurma Solüsyonu 6 mL
- Plaka Kapakları
- Kullanım klavuzu

Kitin çalışma prensibi:

Bu kitte uygulanan test prensibi Sandviç enzim immunoassay'dir. Bu kitte sağlanan mikrotitre plakası, NFKB Aktive Edici Proteine (NKAP) özgü bir

antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler, uygun mikrotitre plaka kuyularına yüklendi ve ardından NKAP özgü biyotin-konjuge antikor eklendi. Daha sonra Horseradish Peroxidase'e (HRP) konjuge Avidin her mikrotitre kuyusuna eklenerek inkübe edildi. TMB substrat solüsyonu eklendikten sonra, yalnızca NKAP, biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyucuklarda renkte değişiklik gözlemlendi. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sonlandırıldı ve renk değişimi $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Örneklerdeki NKAP, konsantrasyonu, daha sonra standartların O.D. değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi. Çıkan absorbans sonuçları total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. R^2 değeri aşağıdaki gibi bulundu:



Şekil 3.3. NFKB'nin standart eğri R^2 değeri

Paraoksonaz-1 (PON1) Aktivite Ölçümü Kiti:

Paraoksonaz-1 enzim aktivitesi ELISA ile saptanmasında, Paraoxonase-1 (PON-1) Enzim Aktivite Kiti (Rel Assay Diagnostics®, Turkey Katalog No: RL0031) kullanıldı. Kitlerin uygulama aşamasında üreticinin önerdiği protokol referans alındı.

Kitin içeriği:

- Tampon 1 (T1): Tris Buffer Solüsyonu 30ml
- Tampon 2 (T2): Substrat Solüsyonu 6ml

Doku homojenizasyonu

- Dokular 1/9 oranında (0,1 gr doku: 0,9ml 50 mmollık pH:7.40 fosfat tamponu) fosfat tamponu ile homojenize edildikten sonra 7000 rpm + 4' de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar ependorfa alındı.

Kitin çalışma prensibi ve Test prosedürü:

Bu kitte uygulanan test prensibi Sandviç enzim immunoassay'dir. Tam otomatik paraoksonaz aktivite ölçüm yöntemi, iki farklı tampon solüsyonu kullanıldı. İlk tampon Tris tamponudur ve ayrıca PON1 enziminin bir kofaktörü olan kalsiyum içerir. İkinci tampon, yeni geliştirilmiş stabil bir substrat solüsyonudur. Örneklerle, Tampon 1 ve tampon2 eklenerek karıştırıldı. Paraoksondan üretilen p-nitrofenolün absorbansının lineer artışı, kinetik ölçüm

modunda takip edildi. Paraokson hidroliz (dietilpnitrofenilfosfat oluşum) hızı, 37 °C'de 412 nm'de absorpsiyon artışı izlenerek ölçüldü. Üretilen p-nitrofenol miktarı, pH 8.5'te molar absorpsiyon katsayısından 18.290 M⁻¹ cm⁻¹ olarak hesaplandı. Paraoksonaz aktivitesi U/L serum olarak ifade edildi.

3.2.4. Histolojik Yöntem

Işık Mikroskopik Yöntem:

Deney sonunda gruplara ait karaciğer dokuları ışık mikroskopik inceleme amacıyla %10' luk formaldehit solüsyonuna alınarak tespit edildi. Histolojik takip işlemleri sonrası dokular parafine gömülerek bloklama yapıldı. Elde edilen parafin bloklardan mikrotom cihazı ile (RM 2245, Germany) 4 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eosin (HE), Masson's Trichrome (MT) boyamaları yapılarak immunohistokimyasal analizler için hazır hale getirildi.

Hematoksilen-Eosin (HE) Boyama Protokolü:

Tüm deney gruplarına ait karaciğer kesitlerinin deparafinizasyon işlemi sonrasında, kesitler azalan etil etil alkol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70) 10'ar dakika süreyle tutuldu. Akan musluk suyu altında 5 dk yıkanan kesitler yıkama sonrasında 10 dakika boyunca Harris Hematoksilen solüsyonunda boyandı. Boyanma sonrasında tekrar 10 dakika akar suda yıkama işlemi gerçekleşti. Hematoksilen ile boyanan kesitler asit- alkol solüsyonuna batırılarak akan musluk suyu altında tekrar 10 dakika yıkandı. Yıkama sonrası Eosin boya solüsyonunda 10 dk süresince boyanan kesitler, 10 dakika daha akan musluk suyu ile yıkandı. Yıkama sonrasında kesitler dehidratasyon amacıyla sırasıyla, artan (%70, %80,

%90 ve %100'lük) etil alkol serilerinden geçirildi. Ksilolde bekletilen kesitler entellan kapama mediumu kullanılarak kapatıldı. Boyanan kesitler Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda Leica LAS V 4.9 programı kullanılarak görüntülendi. Hematoksilen-Eosin boyama sonrasında karaciğer kesitlerinde randomize seçilen 6 farklı alanda histopatolojik skorlama yapıldı. Skorlama 1: Hasar yok; 2:Hafif hasar; 3: Orta hasar; 4: Şiddetli hasar derecelerinden oluştu [42].

Masson's Trichrome Boyama Protokolü:

Karaciğer kesitleri deparafinize edilerek boyamaya hazır hale getirildi. Weigert Iron Hematoxylin A ve B solüsyonlarının karışımında 15 dk bekletilen kesitler hızlıca distile sudan geçirildi. Pikrik asit alkolik solüsyonunda 4 dk tutulan kesitler tekrar distile su ile yıkandı. Ponceau asit Fuksin solüsyonu ile 15 dk muamele edilen kesitlerin tekrar distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Phosphomolybdic asit solüsyonunda 5 dk bekletilen kesitler yıkama işlemi yapılmadan Masson Anilin Blue solüsyonuna etkisine bırakıldı. Distile su ile yıkamanın ardından alkol serilerinden geçirilen kesitler kapama mediumu entellan ile kapatılarak görüntülemeye geçildi. Boyama sonrasında mavi renkte izlenen kolajen liflerin preparattaki alan yüzdeleri ImageJ (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak hesaplandı [145].

3.2.5. İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal analizler için karaciğer dokularına ait parafin bloklardan alınan kesitler deparafinizasyon işleminin ardından azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %80 ve %70) geçirildi. Dehidrate edilen dokular

alkolden uzaklaştırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi ve sitrat tamponu (HDF, Türkiye) (pH 6.0) ile yüksek ısıda antijen retrieval işlemi uygulandı. Kesitler 3 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Ardından dokuların çevresi doku sınırlayıcı kalem ile Pap pen (Patolab) ile sınırlandırıldı. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline), (Thermo, AP-9009-10, UK) (pH:7.4) ile yıkandı. Daha sonra, 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Thermo, TA-125-HP, UK) uygulandı. PBS ile yıkanan kesitler 5 dakika UltraV block (Ultra Vision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP, Thermo, TP-125-HP, UK) ile muamele edildi. Kesitler uygun dilüsyonda **SIRT-2 (Santa Cruz, 1:100), Fibronektin (Bioss, 1:100), Tip I Kolajen (Bioss, 1:100), Tip III Kolajen (Bioss, 1:100), Beta-Katenin (Bioss, 1:100) ve α -SMA (Bioss, 1:100)**, primer antikorları ile bir gece boyunca + 4' °C' de inkübe edildi. Daha sonra kesitler 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında 10 dakika biotinli sekonder antikor uygulandı ve PBS ile tekrar yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 10 dk streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakılan kesitler 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkanarak, diaminobenzedin (DAB) substratı içeren kromojen DAB (Thermo, TA-125-HD, UK) kullanılarak immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyasında Mayer'in Hematoksilen'i (Thermo, TA-125-MH, UK) kullanıldı. Yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirilerek, 20 dakika ksilolde bekletildi. Sonrasında entellan kapama mediumu ile kapatılarak Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda Leica LAS V4.9 (Germany) programı kullanılarak görüntülenmesi gerçekleştirildi. **SIRT-2, Fibronektin, Tip I Kolajen, Tip III Kolajen, Beta-katenin ve α -SMA antikorlarına ait immunopozitif alan yüzdesi**

ImageJ (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak, x200 büyültmede her kesitte randomize seçilen beş farklı alanda değerlendirildi [146].

3.2.6. Kullanılan istatistiksel yöntem

Çalışmamızda, elde edilen değerler ortalama $\pm$ S.E.M olarak ifade edilmiştir. Analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için One-Way ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanırsa her bir gruptan elde edilen ortalama değerler Tukey'in post-hoc testi kullanılarak karşılaştırma yapıldı. Histopatolojik değerleri analiz etmek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Bu analizde median değerleri kullanılmış olup $p < 0.05$ ise istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Karaciğer indeksi

Çalışma öncesi ve sonrası (10 hafta) sıçanların beden ağırlığı ve karaciğer ıslak organ ağırlığı ve karaciğer indeksi (Yaş karaciğer ağırlığı / vücut ağırlığı oranı) çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Uygulama öncesi ve sonrasında; vücut ağırlıkları , karaciğer ıslak organ ağırlığı ve karaciğer organ indeksi verileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney gruplarında farksız bulundu ($p>0,05$).

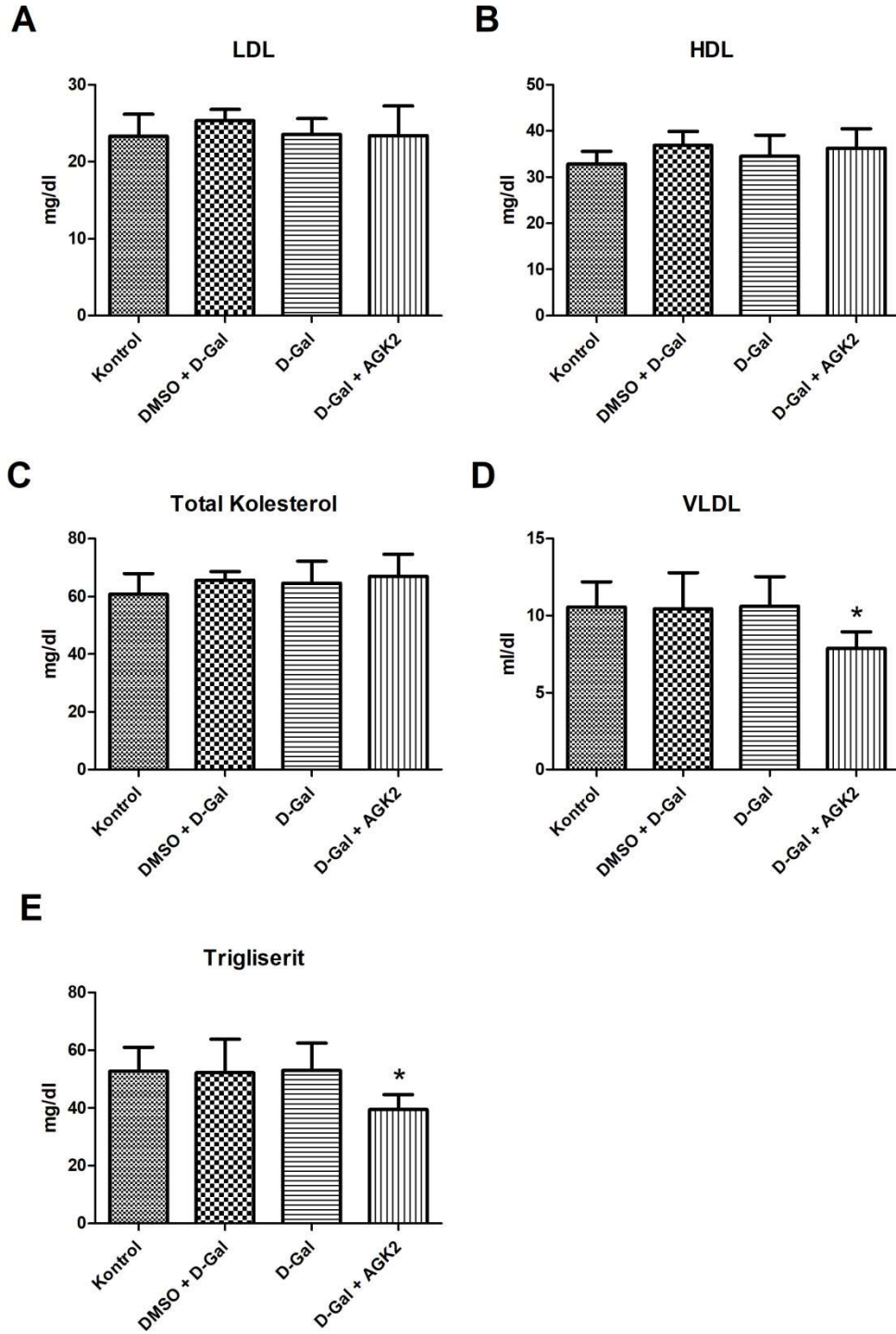
Gruplar	İlk vücut ağırlığı (gr)	Son vücut ağırlığı (gr)	KC ıslak organ ağırlığı (gr)	KC organ indeksi (mg/gr)
Kontrol	242,5±11,39	317,16±17,6	8,3610±0,08	2,61±0,08
DMSO+ D-galaktoz	244±6,75	329,25±26,3	9,0528±0,54	2,68±0,12
D-galaktoz	242,14±12	318±30,96	8,6871±0,96	2,69±0,06
D-galaktoz+AGK2	254,8±20,68	306,28±12,7	9,0850±1,07	2,72±0,08

Cizelge 4.1. Ağırlık ölçümlerinin ve karaciğer organ indeksinin ortalama değerleri ± standart hata değerleri

4.2. Karaciğer fonksiyon testleri ve diğer biyokimyasal analizleri

Lipid panelleri (total kolesterol, HDL, LDL, VLDL, trigliserit) değerlendirildiğinde HDL, LDL, Total Kolesterol değerlerinde gruplar arasında bir anlamlılık izlenmedi. Ancak VLDL ve Trigliserit düzeyinin D-GAL+AGK2 grubunda diğer 3 gruba kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0,05$).

Lipid panelleri ölçüm sonuçları şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Plazma LDL (A), HDL (B), Total kolesterol (C), VLDL (D), Triglicerit (E) düzeylerindeki değişimler. (LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein, VLDL: çok düşük yoğunluklu lipoprotein)

*Kontrol, DMSO+D-Gal ve D-Gal gruplarına kıyasla $p<0,05$

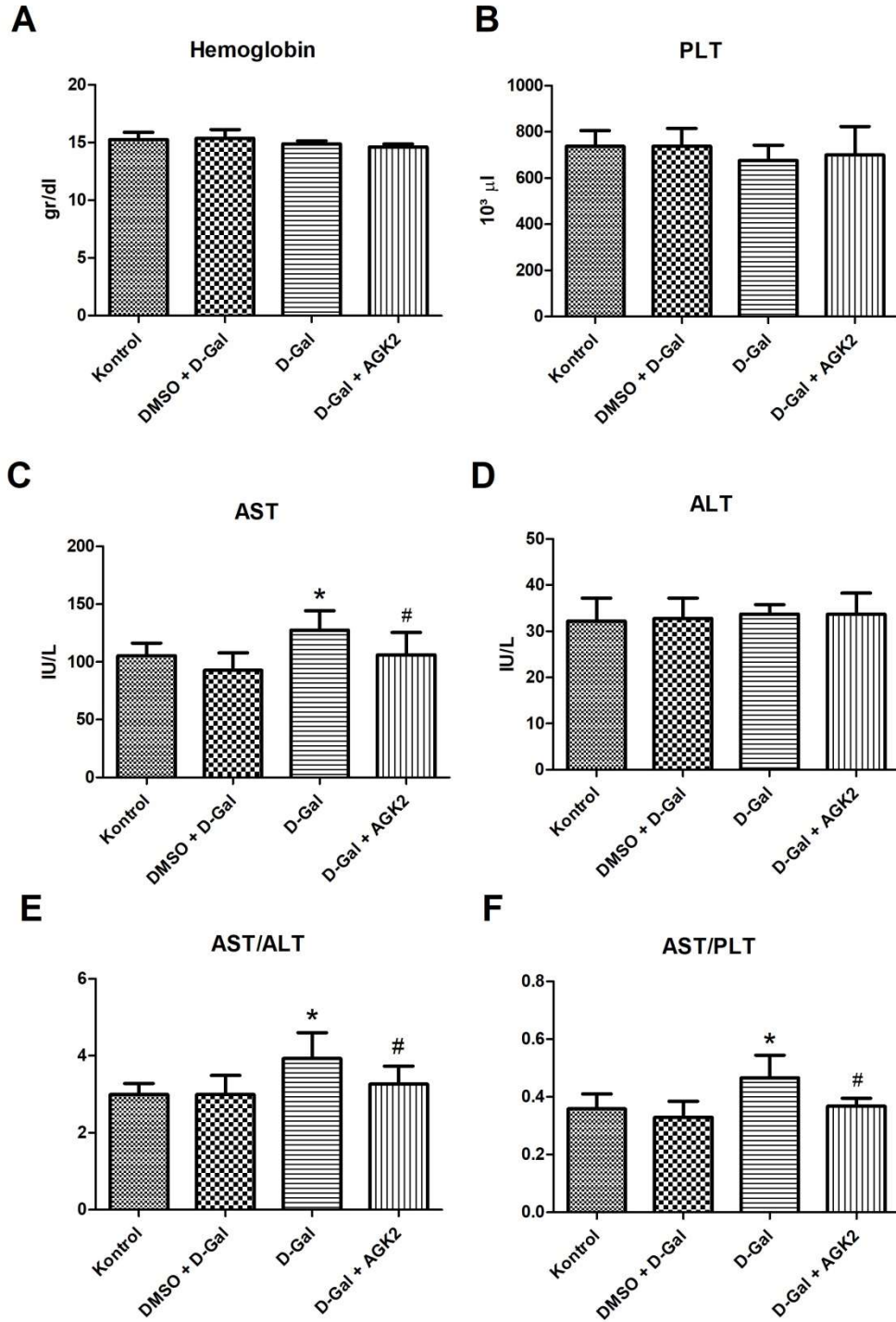
Kanda biyokimyasal ve karaciğer fonksiyon testleri değerlendirildiğinde: Hb, PLT ve ALT düzeyleri gruplar arasında farksız bulundu. D-Galaktoz uygulaması AST düzeyini, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseltirken, AGK-2 uygulaması D-GAL grubuna kıyasla AST düzeyini anlamlı olarak düşürdü ($p<0,05$).

Karaciğer fonksiyon göstergesi olarak kullanılan iki parametre AST/ALT oranı ve APRI (AST/trombosit oranı) indeksidir. Her iki parametrenin de artması karaciğer fonksiyon bozukluğunu gösterir. AST/ALT oranı gruplar arasında değerlendirildiğinde, D-GAL grubunda, kontrol ve DMSO+D-GAL grubuna kıyasla anlamlı olarak artarken, ($p<0,05$), AGK-2 uygulaması, AST/ALT oranını anlamlı olarak azalttı ($p<0,05$).

APRI (AST/trombosit oranı indeksi) gruplar arasında değerlendirildiğinde, D- GAL grubunda kontrol ve DMSO+D-GAL gruplarına kıyasla artış izlenirken ($p<0,05$), AGK2 uygulaması APRI skorunu azalttı ($p<0,05$).

Gruplar	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	AST/ALT Oranı	AST/Trombosit Oranı İndeksi (APRI)
Kontrol	105,4±10,9	32,1±5	2,9±0,2	0,35±0,05
DMSO+D-galaktoz	92,7±15,1	32,8±4,3	2,9±0,4	0,32±0,05
D-galaktoz	127,6±16,8	33,7±2	3,9±0,6	0,46±0,07
D-galaktoz +AGK2	106,2±19,3	33,6±4,5	3,2±0,4	0,36±0,02

Cizelge 4.2. Karaciğer fonksiyon analizi için ALT ve AST düzeyi, AST/ALT Oranı, APRI İndeksi ortalama ± standart hata değerleri



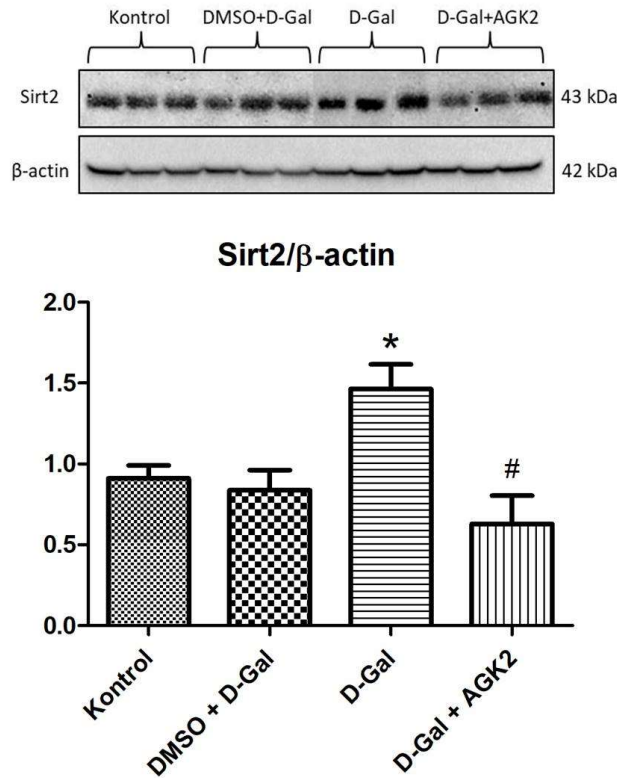
Şekil 4.2. Plazma hemoglobin (A), PLT (B), AST (C), ALT (D), AST/ALT (E), AST/PLT (F) düzeylerindeki değişimler (PLT: trombosit sayısı, AST: aspartat aminotransferaz ALT: alanin aminotransferaz)

*Kontrol ve DMSO+D-Gal gruplarına kıyasla $p<0,05$

D-Gal grubuna kıyasla $p<0,05$

4.3. SIRT2 protein ekspresyonundaki değişimler

Western blot analizi ile elde edilen sonuçlara göre karaciğer dokusunda SIRT2 protein ekspresyonu, D-GAL grubunda diğer 3 gruba kıyasla anlamlı olarak artarken ($p<0,05$), D-GAL+AGK2 grubunda ise kontrol ve D-GAL+DMSO gruplarına göre anlamlı olarak azaldı. Galaktozun SIRT2'yi artırdığı, AGK2 uygulamasının ise inhibe ettiği görüldü ($p<0,05$).

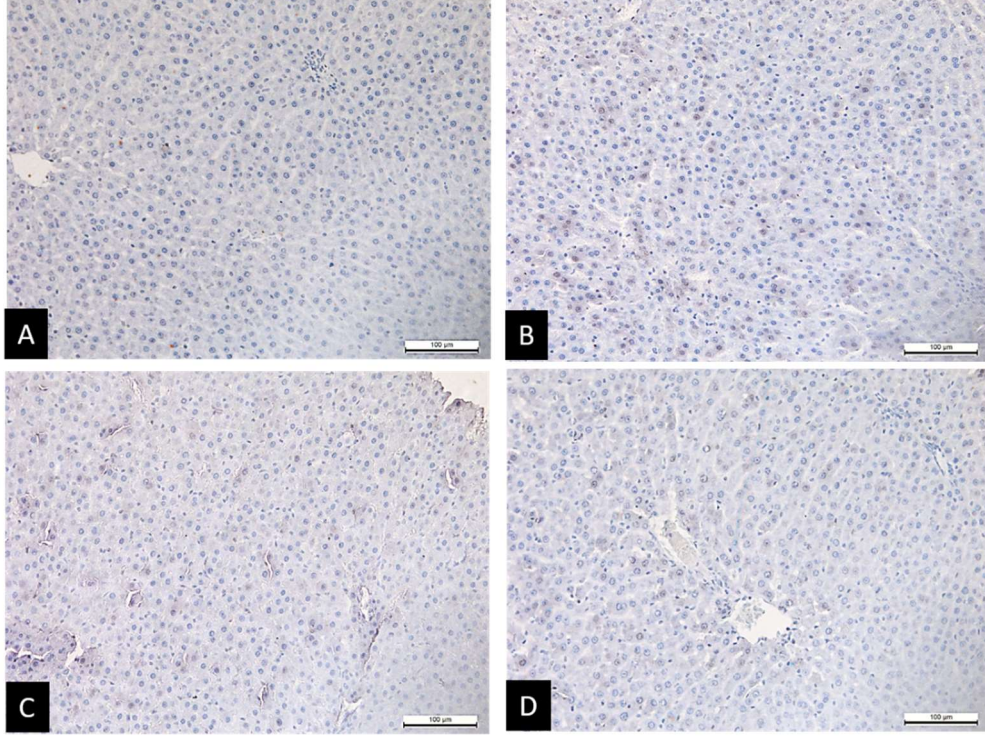


Şekil 4.3. Karaciğer dokusunda SIRT2 protein ekspresyonundaki değişimler.

Western blot yöntemi ile çalışılan SIRT2 ekspresyonu β-actin ile normalize edildi.

*Kontrol, DMSO+D-Gal, D-Gal+AGK2 gruplarına kıyasla $p<0,05$

#Kontrol, DMSO+D-Gal, D-Gal gruplarına kıyasla $p<0,05$



Resim 4.1. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri SIRT-2 immunohistokimyasal görüntüleri izlenmekte (A: Kontrol; B: DMSO+D-GAL; C :D-GAL; D: D-GAL+AGK2 grubu, DAB-Hematoksilen, X200).

SIRT-2 immunoreaktivite alanı immünohistokimyasal analiz ile gruplar arasında değerlendirildiğinde, AGK2 uygulaması DMSO+D-GAL grubuna göre anlamlı olarak SIRT2 immunoreaktivite alanını azalttı ($p=0,011$). (Resim 4.1).

4.4. NFkB, IL1 β , IL6, Paraoksonaz protein ekspresyonundaki değişimler

Antioksidan, antinflamatuvar bir enzim olan Paraoksonaz plazma düzeyi, kontrol grubunda 3 gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. D-GAL uygulaması paraksonaz enzim düzeyini kanda anlamlı olarak düşürdü ($p<0,001$). D-

GAL+AGK2 ve D-GAL gruplarının paraksonaz enzim düzeyleri karşılaştırıldığında farksız bulundu ($p=0,104$).

Paraksonaz karaciğer doku düzeyi değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir değişim olmamasına rağmen, HDL ile paraksonaz doku düzeyi arasında pozitif korelasyon görüldü ($r:1$ $p: p<0,001$).

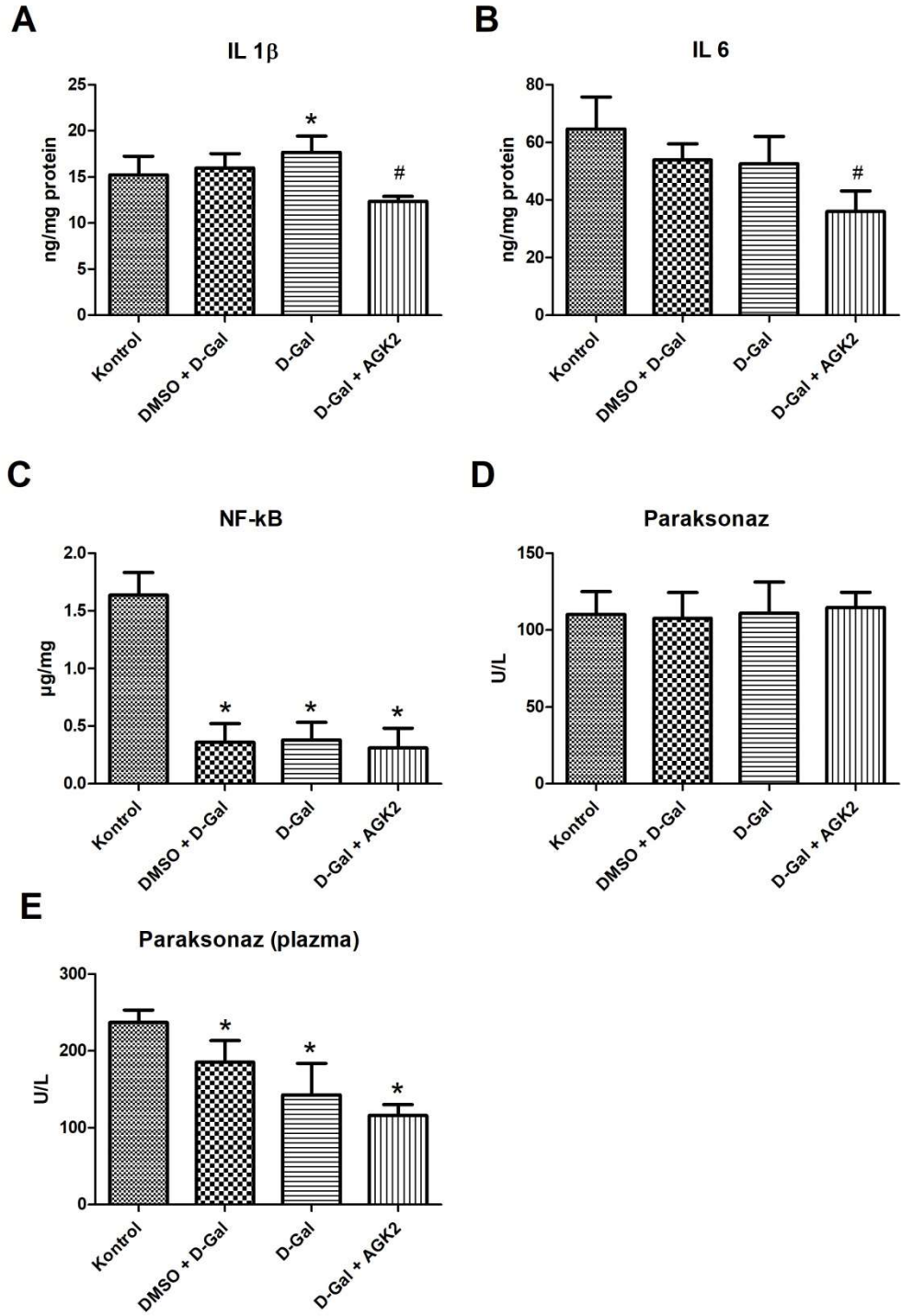
Karaciğer fibrozisinde inflamatuvar sitokin olan IL1 β ve IL-6 düzeyleri ölçüldü. D-GAL uygulaması IL1 β karaciğer doku düzeyini kontrole göre anlamlı olarak arttırdı ($p<0,05$), AGK2 uygulaması ise, IL1 β düzeyini diğer 3 gruba göre anlamlı olarak düşürdü ($p<0,05$).

AGK2 uygulaması, IL6 düzeyini diğer tüm gruplara (D-GAL, DMSO+D-GAL ve kontrol) göre anlamlı olarak düşürdü ($p<0,05$). Diğer grupların arasında fark görülmedi.

NFkB karaciğer doku düzeyi değerlendirildiğinde, D-GAL uygulanan gruplarda kontrole kıyasla anlamlı azalma görüldü ($p<0,05$).

Gruplar	IL1 β Protein düzeyi (ng/mg)	IL6 Protein düzeyi (ng/mg)	NFkB Protein düzeyi (μ g/mg)	Paraoksonaz (Doku) (U/L)	Paraoksonaz (Plazma) (U/L)
Kontrol	15,2+2	64,6+22	1,6+0,19	110,2+14,8	237,2+15,8
D-Galaktoz +DMSO	15,9+1,5	53,9+5,5	0,36+0,16	107,7+16,7	185,4+27,9
D-Galaktoz	17,6+1,7	52,6+9,4	0,38+0,15	111+20,3	142,7+41
D-Galaktoz +AGK2	12,3+0,5	35,9+7,2	0,21+0,17	114,8+9,7	116+14,1

Çizelge 4.3. Kontrol ve deney gruplarının NFkB, IL1 β , IL6 düzeyleri ortalama $\pm$ standart hata değerleri



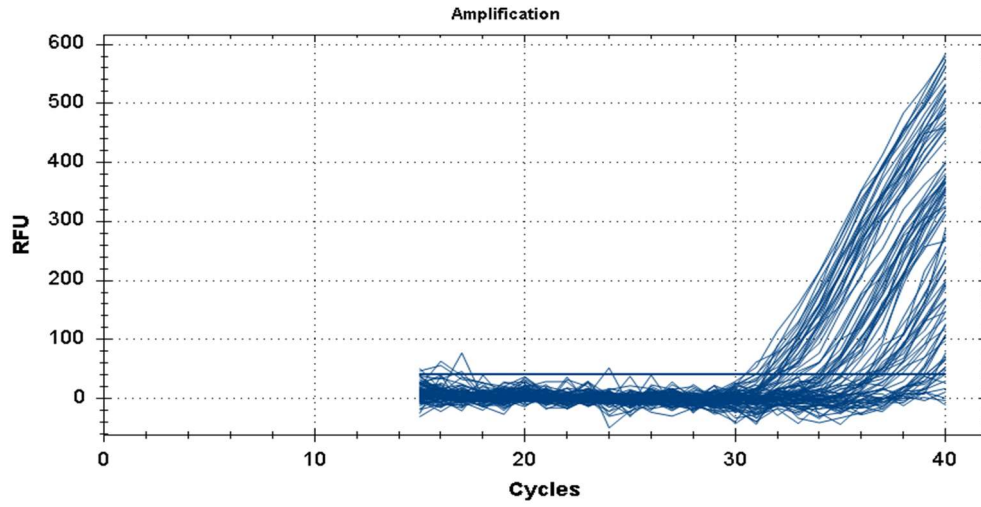
Şekil 4.4. Karaciğer dokusunda IL 1 β (A), IL 6 (B), NF- κ B (C), Paraoksonaz **doku** (D) düzeyleri ile **plazma** Paraoksonaz (E) seviyesindeki değişimler. (IL 1 β : interlökin 1 beta, IL 6: interlökin 6, NF- κ B: nükleer faktör kappa B)

*Kontrol grubuna kıyasla $p<0,05$

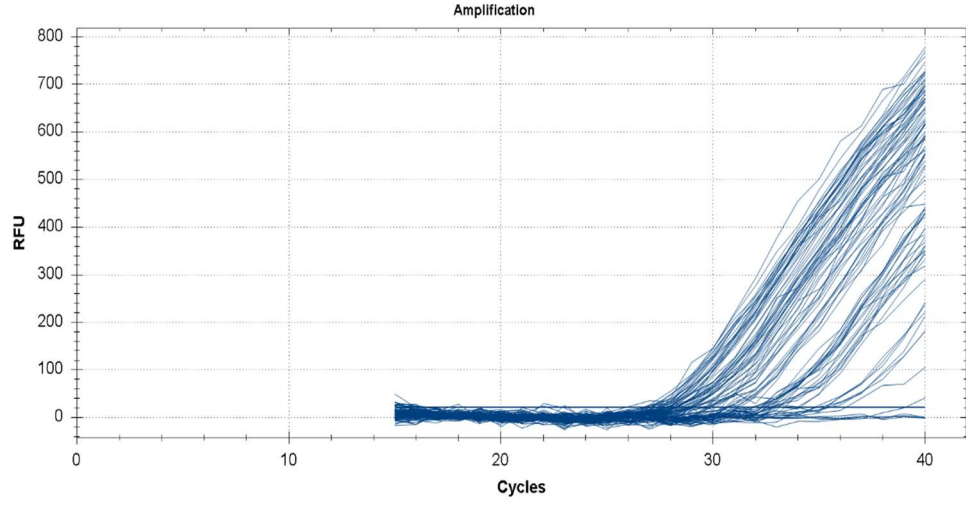
#Kontrol, DMSO+D-Gal, D-Gal gruplarına kıyasla $p<0,05$

4.5 TGF- β , β KATENİN ve PDGFBB ekspresyon düzeyi değişimleri

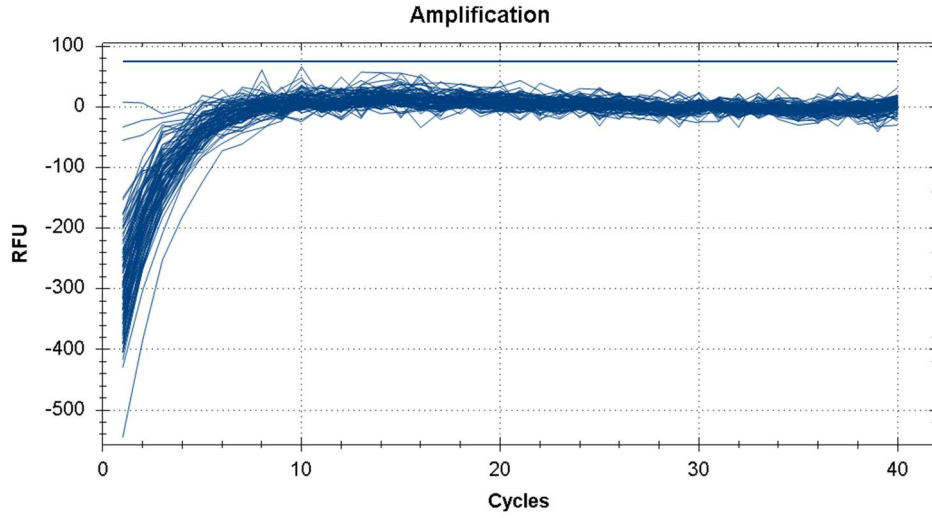
Karaciğer fibrozisinde rolü olan TGF- β , β katenin ve PDGFBB düzeyleri Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) analizi ile çalışıldı. GZ-PZR analizi sonucunda elde edilen, TGF- β , β katenin ve PDGFBB optimizasyon eğrileri aşağıda sunulmuştur.



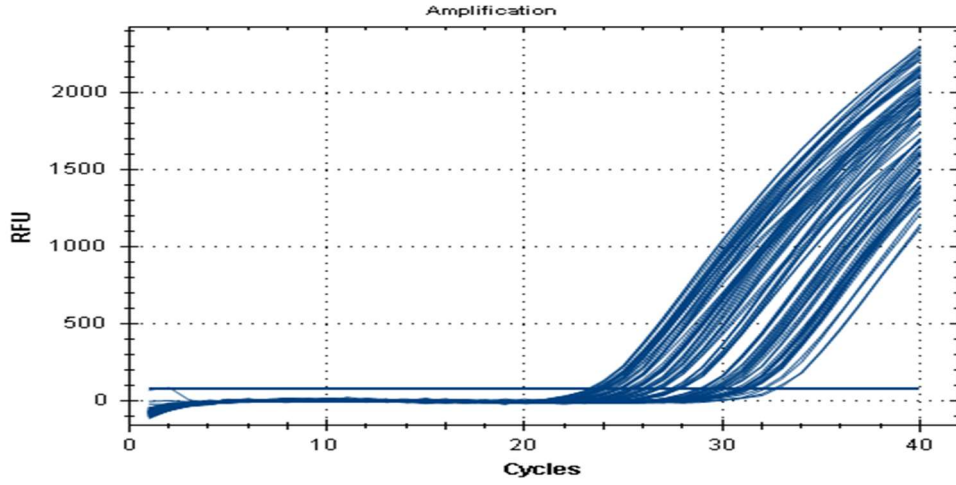
Şekil 4.5. TGF β geni için GZ-PZR de yapılan optimizasyon eğrileri örnekleri



Şekil 4.6. Beta katenin geni için GZ-PZR de yapılan optimizasyon eğrileri örnekleri



Şekil 4.7. PDGF BB geni için GZ-PZR de yapılan optimizasyon eğrileri örnekleri
Normalizasyon için kullanılan housekeeping gen (HKG) β -aktin'dir. Şekil 4.8'de β -aktin optimizasyon eğrisi gösterilmektedir.



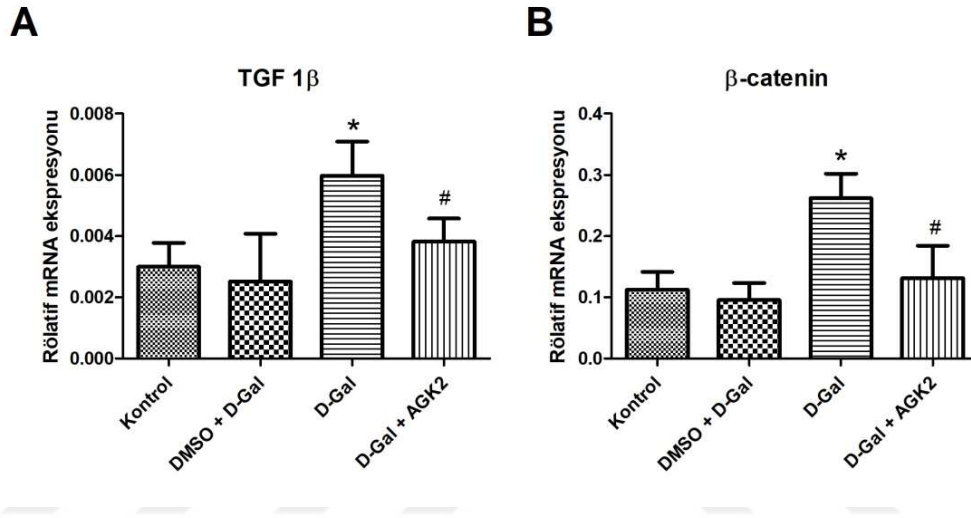
Şekil 4.8. β -aktin geni için GZ-PZR de yapılan optimizasyon eğrileri örnekleri

D-Galaktoz uygulaması, kontrol ve DMSO+D-GAL grubu ile karşılaştırıldığında TGF- β düzeyinde anlamlı artışa neden olurken, AGK2 uygulaması TGF- β düzeyinde anlamlı azalmaya yol açtı ($p<0,05$). Şekil 4.5 'de optimizasyon eğrileri, şekil 4.9.A'da kontrol ve deney gruplarının TGF- β ekspresyon değişimleri gösterilmiştir.

D-Galaktoz uygulaması, kontrol ve DMSO+D-GAL grubu ile karşılaştırıldığında β katenin düzeyinde anlamlı artış yaparken, AGK2 uygulaması β katenin düzeyinde anlamlı azalmaya yol açtı ($p<0,05$). Şekil 4.9.B'de kontrol ve deney gruplarının β katenin ekspresyon değişimleri gösterilmiştir.

GZ-PZR analizinde, optimizasyon eğrilerinin elde edilebilmesi için, Ct (döngü eşik değeri) pozitif değerde olmalıdır. Ancak Şekil 4.7 'de gösterildiği gibi PDGF-BB geni, döngü eşik değerinin altında kalmış ve optimizasyon eğrileri alınamamıştır.

PDGF-BB geni için 2 tekrar deneme yapılmasına rağmen sonuç değişmemiştir. Bu nedenle PDGFBB'nin tüm gruplarda karaciğer dokusunda ekprese olmadığı düşünüldü.

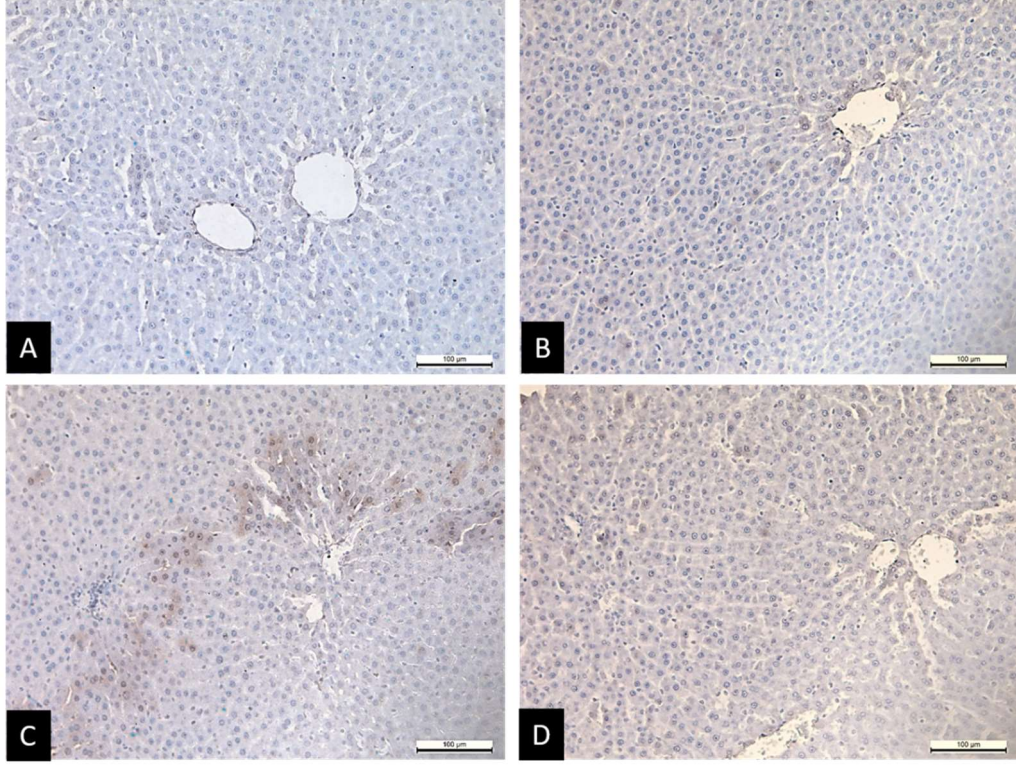


Şekil 4.9. Karaciğer dokusunda TGF β 1 (A) ve β -catenin (B) mRNA ekspresyon değişimleri

*Kontrol ve DMSO+ D-Gal gruplarına kıyasla $p < 0,05$

D-Gal grubuna kıyasla $p < 0,05$

İmmünohistokimyasal analiz ile D-GAL uygulaması tüm gruplarda (DMSO+D-GAL, D-GAL ve D-GAL +AGK2) karaciğer dokusunda β -catenin immunreaktivitesini, kontrol grubuna göre arttırdı (sırasıyla, $p=0,004$; $p=0,001$ ve $p < 0,001$). AGK-2 uygulaması D-GAL grubuna göre β -catenin immün aktivitesini azaltmakla beraber bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diğer gruplar β -catenin açısından birbirinden farksız bulundu (sırasıyla, $p=1,000$ ve $p=1,000$) (Resim 4.2).



Resim 4.2. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri Beta Katenin immunohistokimyasal görüntüleri izlenmekte (A: Kontrol; B: DMSO+D-GAL; C: D-GAL; D: D-GAL+AGK2 grubu, DAB-Hematoksilen, X200).

4.6. Histopatolojik Bulgular ve İmmunohistokimyasal Analiz Sonuçları

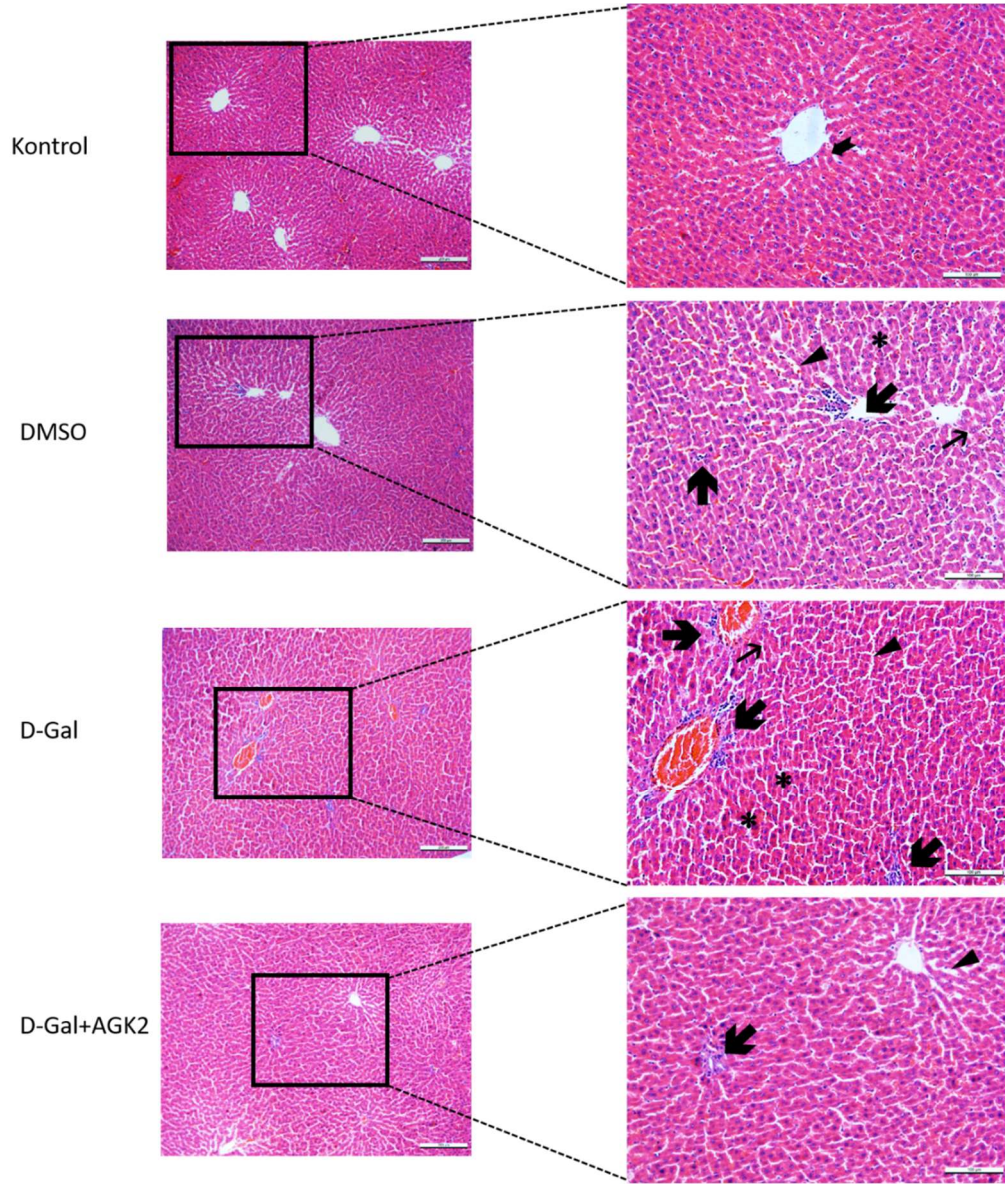
4.6.1. Karaciğer dokularının histopatolojik skorlaması

Karaciğer dokularının histopatolojik skorlaması sonrasında, kontrol grubuna ait kesitlerde vena centralis çevresinde poligonal forma sahip hepatositlerin normal ışınal düzenlenimde olduğu, bazı hepatositlerin binuklear olduğu ayırt edildi. Hepatosit dejenarasyonuna rastlanmazken, v. Centralis çevresi ve portal alanda inflamasyon izlenmedi (Resim 4.3).

D-GAL uygulaması (DMSO+D-GAL, D-GAL ve D-GAL +AGK2) kontrol grubuna göre histolojik skoru artırdı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$ ve $p<0,001$).

DMSO+D-GAL ve D- GAL gruplarında ise inflamasyonun yanı sıra hepatosit kordonlarının ışınsal dűzenleniminde bozulma, hepatosit dejenarasyonu ve karaciğer sinuzoidlerinde dilatasyon dikkat çeken bulgulardandı. Histopatolojik skorklamanın istatistiksel değerlendirmesi sonucunda ise iki grup arasında anlamlılık izlenmedi ($p=0,234$).

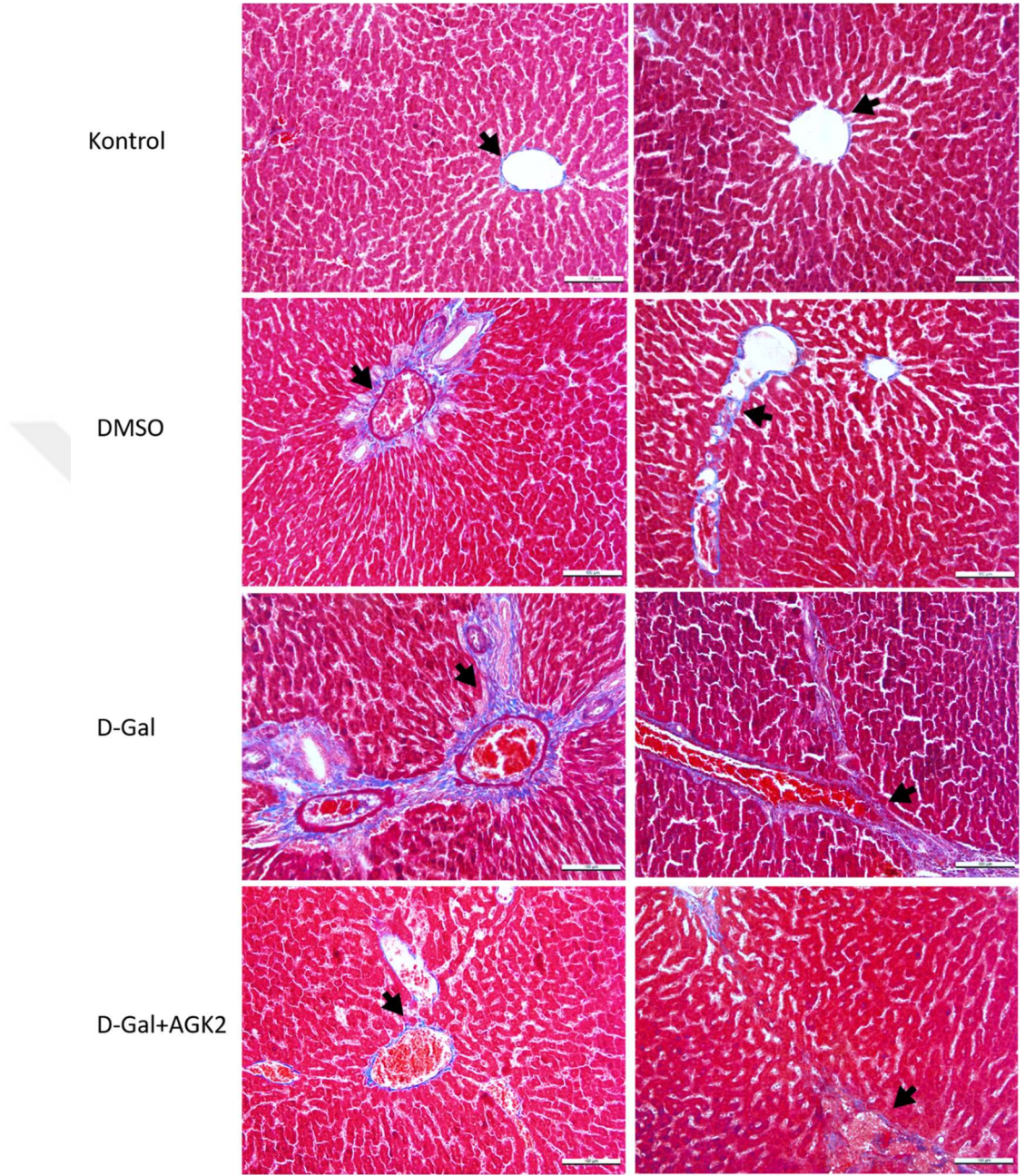
AGK2 uygulaması ise dięer iki gruba gűre (D-GAL ve DMSO+D-GAL) histolojik inceleme sonrasında lenfosit infiltrasyonu azaltıp, hepatosit yapısal bűtűnlűęűnű korudu ve histopatolojik skoru azalttı ($p=0,003$).



Resim 4.3. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer dokularının Hematoksilen-Eosin ile boyanmış görüntüleri izlenmekte. Vena centralis etrafında poligonal hepatositlerden oluşan ışınal düzenlenime sahip kordonlar (→), Hepatosit dejenerasyonu (*), Hepatosit kordonlarında düzensizlik (↔), inflamasyon (→), karaciğer sinuzoidlerinde dilatasyon (▶) görülmektedir (HE, X100 ve X200)

4.6.2.Kontrol ve deney gruplarının kolajen lif yoğunluğu değişimleri

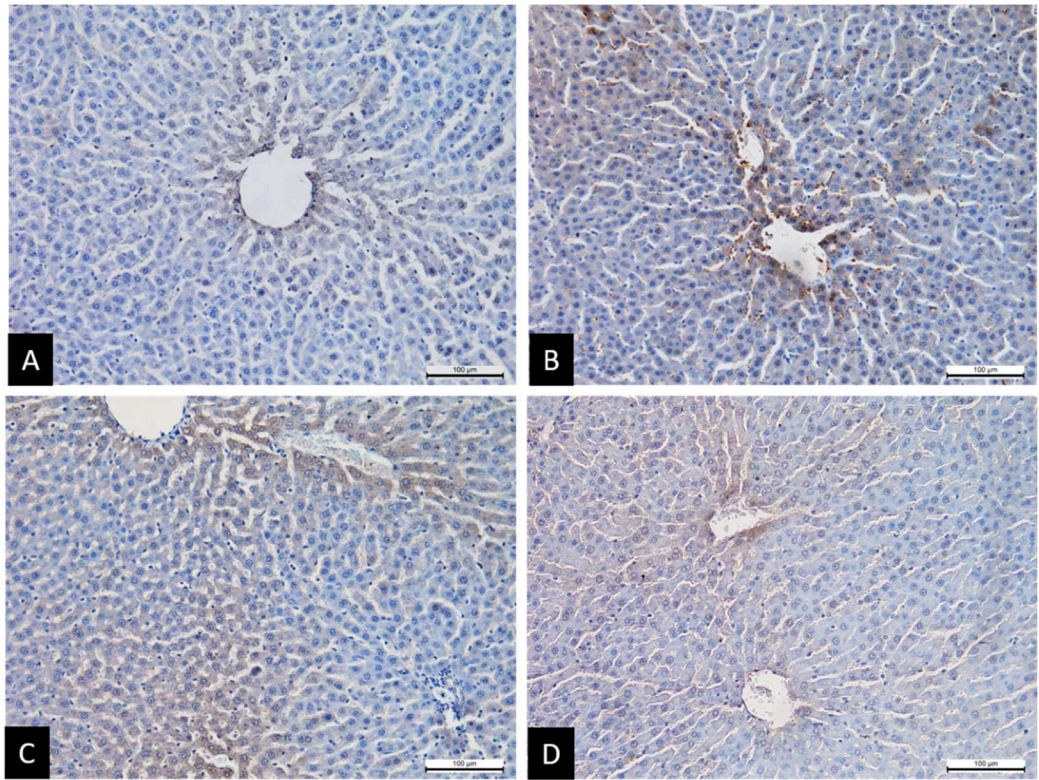
Karaciğer dokularının kolajen lif yoğunluğu ve fibrotik değişimleri incelemek amacıyla uygulanan Masson's Trichrome boyaması sonrası, mavi renkte boyanan kolajen lif alan yüzdesi ölçölerek istatistiksel olarak değerlendirildi. Kontrol grubu, D-galaktoz uygulanan gruplar (DMSO+D-GAL, D-GAL ve D-GAL +AGK2) ile karşılaştırıldığında vena centralis çevresinde ve portal alanlarda kolajen lif dağılımı normal izlendi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$ ve $p<0,001$). AGK2 uygulaması vena centralis ve portal alanlarda kolajen lif alan yüzdesini D-GAL grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdü ($p=0,027$). DMSO+D-GAL grubunda ise kolajen lif yoğunluğu azalış gösterse de bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=1,000$). DMSO+D-GAL ve D-GAL grubunda istatistiksel olarak anlamlılık izlenmedi ($p= 0,322$). (Resim 4.4).



Resim 4.4. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer dokularında kolajen lif dağılımı izlenmekte. Mavi renkte boyanan (➔) kolajen lifler görülmektedir (MT, X200)

4.6.3.Karaciğer dokularının fibronektin immunreaktivitesi

Fibronektin immunpozitif alanı kontrol grubunda DMSO+D-GAL, D-GAL ve D-GAL +AGK2 gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$ ve $p<0,001$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık izlenmedi (Resim 4.5).

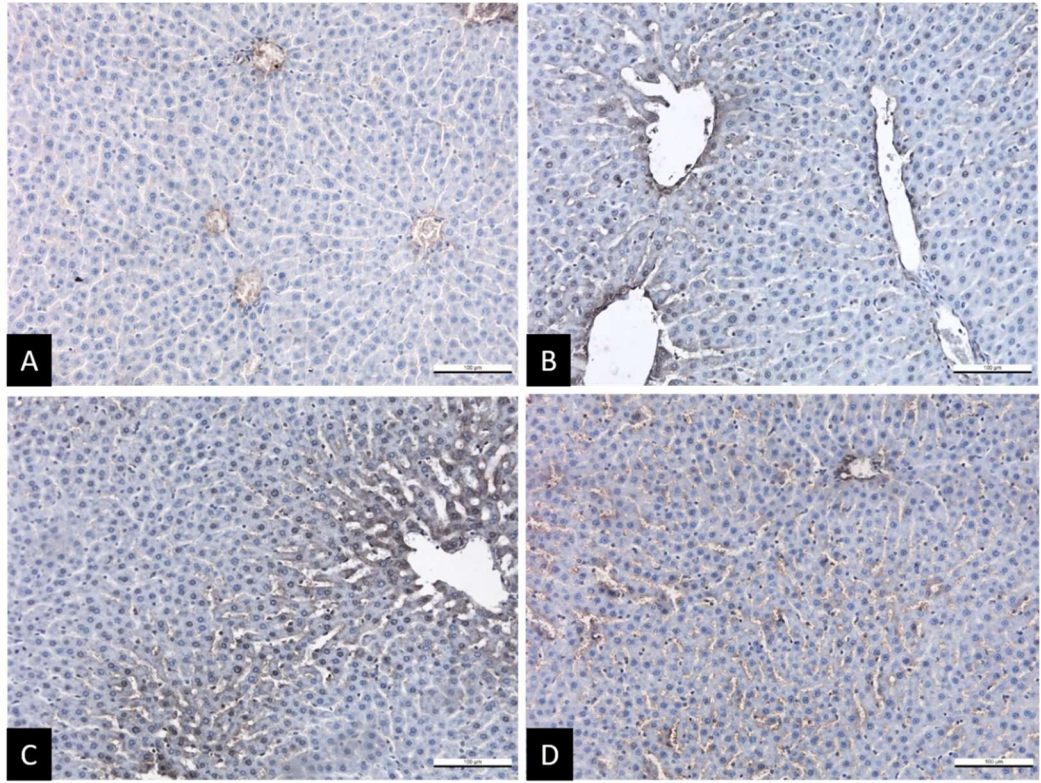


Resim 4.5. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri Fibronektin immunohistokimyasal görüntüleri izlenmekte (A: Kontrol; B: DMSO+D-GAL; C: D-GAL; D: D-GAL+AGK2 grubu, DAB-Hematoksilen, X200)

4.6.4.Karaciğer dokularının tip 1 kolajen immunreaktivitesi

Tip I kolajene ait immunreaktivite kontrol grubunda, D-GAL uygulanan gruplara göre (DMSO+D-GAL, D-GAL ve D-GAL+AGK2) istatistiksel olarak anlamlı

düşük bulundu (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$ ve $p<0,001$). D-GAL grubunda DMSO+D-GAL ve D-GAL +AGK2 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken (sırasıyla, $p=0,015$ ve $p=0,001$), DMSO+D-GAL ve D-GAL +AGK2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık izlenmedi ($p=1,000$) (Resim 4.6).

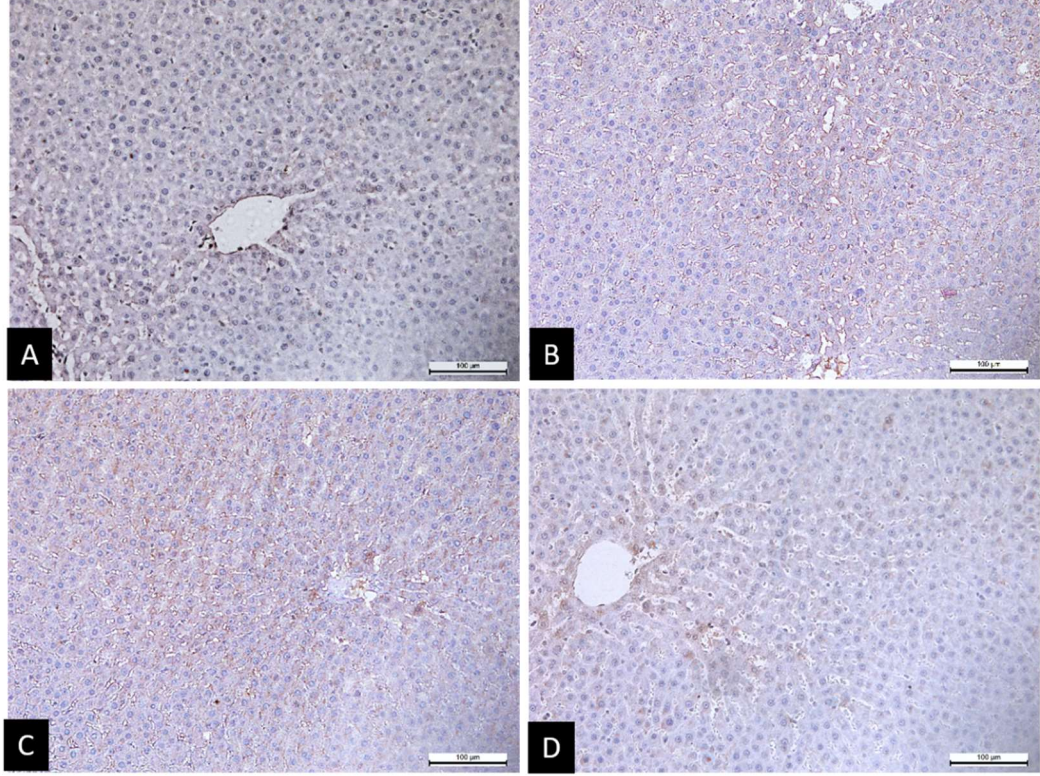


Resim 4.6. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri Tip I Kolajen immunohistokimyasal görüntüleri izlenmekte (A: Kontrol; B: DMSO+D-GAL; C :D-GAL; D: D-GAL+AGK2 grubu, DAB-Hematoksilen, X200).

4.6.5.Karaciğer dokularının tip III kolajen immunreaktivitesi

D-Galaktoz uygulaması (DMSO+D-GAL, D-GAL ve D-GAL+AGK2) Tip III kolajen immunpozitif alanını, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdı (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$ ve $p<0,001$). AGK uygulaması ise Tip

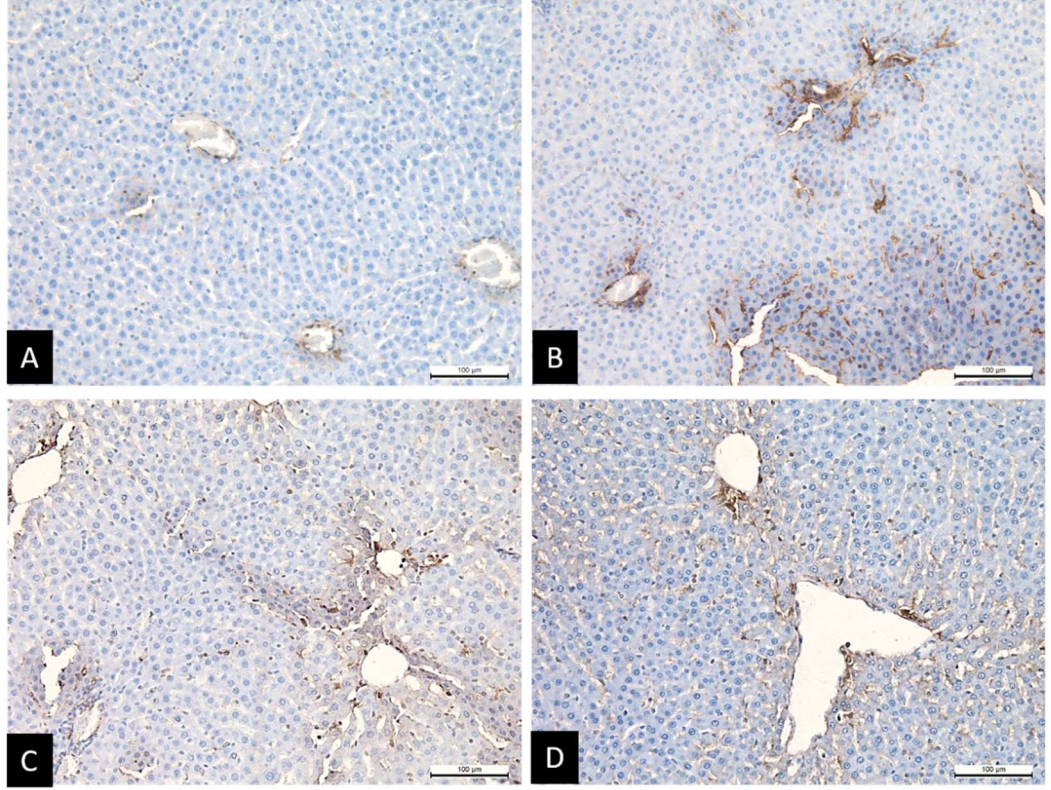
III immunreaktivite üzerinde anlamlı değişikliğe neden olmadı ($p=1,000$) (Resim 4.7).



Resim 4.7. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri Tip III Kolajen immunohistokimyasal görüntüleri izlenmekte (A: Kontrol; B: DMSO+D-GAL; C :D-GAL; D: D-GAL+AGK2 grubu, DAB-Hematoksilen, X200).

4.6.6.Karaciğer dokularının α -SMA immunreaktivitesi

α -SMA immunreaktivite alanı kontrol grubunda, tüm deney gruplarına (DMSO+D-GAL, D-GAL ve D-GAL +AGK2) göre anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$ ve $p<0,001$). AGK2 uygulaması ise α -SMA düzeyini anlamlı olarak azalttı ($p=0,020$) (Resim 4.8).



Resim 4.8. Kontrol ve Deney gruplarına ait karaciğer kesitleri α -SMA immunohistokimyasal görüntüleri izlenmekte (A: Kontrol; B: DMSO+D-GAL; C: D-GAL; D: D-GAL+AGK2 grubu, DAB-Hematoksilen, X200).

Çizelge 4.4 Kontrol ve deney gruplarının Fibronektin, Tip I kolajen, Tip III kolajen, α -SMA, Histopatolojik skor, Kolajen lif yoğunluğu, SIRT2, β -catenin ortalama $\pm$ standart hata değerleri

Gruplar	Kontrol	D-Galaktoz+ %4DMSO+PBS	D-Galaktoz	D-Galaktoz +AGK2
Fibronektin	0,44 $\pm$ 0,44	4,26 $\pm$ 2,83	4,48 $\pm$ 2,58	3,61 $\pm$ 2,33
Tip I kolajen	0,73 $\pm$ 0,95	3,10 $\pm$ 1,31	4,37 $\pm$ 1,65	2,68 $\pm$ 1,16
Tip III kolajen	0,88 $\pm$ 0,54	6,62 $\pm$ 3,18	7,24 $\pm$ 2,90	6,53 $\pm$ 2,94
α -SMA	0,26 $\pm$ 0,26	4,04 $\pm$ 1,62	4,12 $\pm$ 1,44	2,93 $\pm$ 0,97
Histopatolojik skor	1,17 $\pm$ 0,38	2,65 $\pm$ 0,67	2,96 $\pm$ 0,41	2,38 $\pm$ 0,66

Kolajen lif yoğunluğu	0,90±0,63	5,57±3,74	7,11±3,47	4,68±3,05
SIRT2	0,64±0,37	1±0,72	0,85±0,64	0,70±1
β-katenin	0,38±0,25	2,20±2,9	1,85±1,89	1,64±2

4.6.7. Korelasyon Sonuçları

Korelasyon Sonuçları aşağıdaki gibidir:

SIRT2 için western ve IHC sonuçları pozitif korelasyon gösterdi ($r=0,691$, $p<0,001$):

SIRT2 ekspresyonu (western): AST ($r=0,454$, $p=0,034$), AST/PLT ($r=0,563$, $p=0,007$), Tip I kolajen ($r=0,485$, $p=0,014$), IL 1β ($r=0,712$, $p<0,001$), TGF 1β ($r=0,490$, $p=0,028$), β-katenin mRNA ekspresyonu ($r=0,515$, $p=0,006$) ile pozitif korelasyon gösterdi.

SIRT2 IHC: ASL/ALT ($r=0,608$, $p=0,013$), AST/PLT ($r=0,502$, $p=0,024$), β-katenin mRNA ($r=0,576$, $p=0,008$), β-katenin IHC ($r=0,520$, $p=0,019$), Tip I kolajen ($r=0,502$, $p=0,017$), histopatolojik skor ($r=0,464$, $p=0,026$), kolajen lif yoğunluğu ($r=0,466$, $p=0,029$), IL 1β ($r=0,622$, $p=0,006$) ile pozitif korelasyon gösterdi.

β-katenin için mRNA ve IHC sonuçları pozitif korelasyon gösterdi ($r=0,672$, $p=0,002$):

β-katenin mRNA: AST ($r=0,461$, $p=0,047$), AST/ALT ($r=0,468$, $p=0,043$), AST/PLT ($r=0,684$, $p=0,001$), Tip I kolajen ($r=0,433$, $p=0,05$) ile pozitif korelasyon gösterdi.

β -katenin IHC: Tip I kolajen ($r=0,426$, $p=0,048$), α SMA ($r=0,453$, $p=0,03$), histopatolojik skor ($r=0,549$, $p=0,007$), kolajen lif yoğunluğu ($r=0,525$, $p=0,012$) ile pozitif yönde, NF- κ B ($r=-0,475$, $p=0,03$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

α -SMA IHC: β -katenin ($r=0,453$, $p=0,03$), Fibronektin ($r=0,692$, $p<0,001$), Tip I kolajen ($r=0,822$, $p<0,001$), Tip III kolajen ($r=0,689$, $p<0,001$), histopatolojik skor ($r=0,856$, $p<0,001$), kolajen lif yoğunluğu ($r=0,768$, $p<0,001$) ile pozitif yönde; Paraoksonaz plazma ($r=-0,573$, $p=0,007$) ve NF- κ B ($r=-0,833$, $p<0,001$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

Karaciğer organ ağırlığı: Sıçan son vücut ağırlığı ($r=0,725$, $p=0,000$), HDL düzeyi ($r=0,372$, $p=0,061$), Paraoksonaz doku düzeyi ($r=0,449$, $p=0,024$) ile pozitif yönde, SIRT2 IHC ($r=-0,421$, $p=0,046$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

Karaciğer organ indeksi: ALT ($r=0,480$, $p=0,044$), total kolesterol ($r=0,443$, $p=0,058$), kolajen lif yoğunluğu ($r=0,453$, $p=0,068$) ile pozitif korele iken, NF- κ B ($r=-0,495$, $p=0,023$) ve IL1 β ($r=-0,439$, $p=0,068$) ile negatif korelasyon gösterdi.

Hb değeri: PLT ($r=0,570$, $p=0,003$) ve paraoksonaz plazma düzeyi ($r=0,409$, $p=0,059$) ile pozitif yönde korelasyon gösterdi.

PLT değeri: AST/trombosit oranı ($r=-0,451$, $p=0,027$) ve ($r=-0,567$, $p=0,009$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

AST değeri: SIRT2 western ($r=0,454$, $p=0,034$) AST/ALT oranı ($r=0,729$, $p=0,000$), AST/trombosit oranı ($r=0,813$, $p=0,000$), β -katenin mRNA ($r=0,461$, $p=0,047$) ile pozitif korelasyon gösterdi.

HDL değeri: Total kolesterol ($r=0,860$, $p=0,000$) ile pozitif korelasyon gösterdi.

Total kolesterol değeri: Fibronektin ($r=0,519$, $p=0,027$), Tip III kolajen ($r=0,566$, $p=0,014$), histopatolojik skor ($r=0,433$, $p=0,064$), kolajen lif yoğunluğu ($r=0,514$, $p=0,029$) ile pozitif yönde, IL6 ($r=-0,522$, $p=0,032$) ve β ($r=-0,409$, $p=0,059$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

VLDL değeri: Sıçan vücut ilk ağırlığı ($r=-0,503$, $p=0,040$) ile negatif yönde vücut son ağırlığı ($r=0,621$, $p=0,002$) ve Trigliserit düzeyi ($r=1$, $p=0,000$) ile pozitif yönde korelasyon gösterdi.

Trigliserit değeri: Sıçan vücut ilk ağırlığı ($r=-0,500$, $p=0,041$) ile negatif yönde, vücut son ağırlığı ($r=0,625$, $p=0,002$) ile pozitif yönde korelasyon gösterdi.

AST/ALT oranı: AST ($r=0,729$, $p=0,000$), AST/Trombosit oranı ($r=0,721$, $p=0,000$), Tip I kolajen ($r=0,474$, $p=0,047$), SIRT2 IHC ($r=0,608$, $p=0,013$), kolajen lif yoğunluğu ($r=0,462$, $p=0,062$) ve β -katenin ($r=0,468$, $p=0,043$) ile pozitif yönde korelasyon gösterdi.

AST/Trombosit oranı: SIRT2 western ($r=0,538$, $p=0,007$), SIRT2 IHC ($r=0,502$, $p=0,024$), AST ($r=0,813$, $p=0,000$), AST/ALT oranı ($r=0,721$, $p=0,000$), β -katenin ($r=0,684$, $p=0,001$) ile pozitif yönde, PLT ($r=-0,451$, $p=0,027$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

Fibronektin IHC: Total kolesterol ($r=0,519$, $p=0,027$), Tip I kolajen ($r=0,707$, $p=0,000$), Tip III kolajen ($r=0,592$, $p=0,000$), SIRT2 IHC ($r=0,403$, $p=0,070$), α -SMA ($r=0,692$, $p=0,000$), histopatolojik skor ($r=0,611$, $p=0,002$), kolajen lif yoğunluğu ($r=0,741$, $p=0,000$) ile pozitif yönde, Paraoksonaz plazma düzeyi ($r=-0,527$, $p=0,027$), IL6 ($r=-0,539$, $p=0,017$), NF-k β ($r=-0,730$, $p=0,000$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

Tip I kolajen IHC: SIRT2 western ($r=0,485$, $p=0,014$), Total kolesterol ($r=0,518$, $p=0,028$), AST/ALT oranı ($r=0,474$, $p=0,047$), β -katenin IHC ($r=0,426$, $p=0,048$), Tip III kolajen ($r=0,648$, $p=0,000$), α -SMA ($r=0,822$, $p=0,000$), histopatolojik skor ($r=0,798$, $p=0,000$), kolajen lif yoğunluğu ($r=0,757$, $p=0,000$) ile pozitif yönde, Paraoksonaz plazma düzeyi ($r=-0,577$, $p=0,006$), NF-k β ($r=-0,708$, $p=0,000$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

Tip III kolajen IHC: Total kolesterol ($r=0,566$, $p=0,014$), β -katenin IHC ($r=0,406$, $p=0,061$), Fibronektin ($r=0,592$, $p=0,003$), α -SMA ($r=0,689$, $p=0,000$), histopatolojik skor ($r=0,773$, $p=0,000$), kolajen lif yoğunluğu ($r=0,748$, $p=0,000$) ile pozitif yönde, Paraoksonaz plazma düzeyi ($r=-0,712$, $p=0,000$), NF-k β ($r=-0,771$, $p=0,000$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

Histopatolojik skor: β -katenin IHC ($r=0,549$, $p=0,007$), Fibronektin ($r=0,611$, $p=0,002$), α -SMA ($r=0,856$, $p=0,000$), SIRT IHC ($r=0,464$, $p=0,026$), TGF β 1

mRNA ($r=0,540$, $p=0,025$) ile pozitif yönde, Paraoksonaz plazma düzeyi ($r=-0,676$, $p=0,001$), NF- κ B ($r=-0,870$, $p=0,000$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

Kolajen lif yoğunluğu: AST/ALT oranı ($r=0,462$, $p=0,062$), β -katenin IHC ($r=0,525$, $p=0,012$), α -SMA ($r=0,768$, $p=0,000$), histopatolojik skor ($r=0,784$, $p=0,000$), SIRT2 IHC ($r=0,466$, $p=0,029$), β -katenin mRNA ($r=0,402$, $p=0,064$), TGF β 1 mRNA ($r=0,463$, $p=0,071$) ile pozitif yönde, Paraoksonaz plazma düzeyi ($r=-0,635$, $p=0,003$), NF- κ B ($r=-0,785$, $p=0,000$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

Paraoksonaz plazma düzeyi: Hb değeri ($r=0,409$, $p=0,059$), IL6 ($r=0,525$, $p=0,015$), NF- κ B ($r=0,651$, $p=0,001$) ile pozitif yönde korelasyon, fibronektin ($r=-0,507$, $p=0,027$), Tip I kolajen ($r=-0,577$, $p=0,006$), Tip III kolajen ($r=-0,712$, $p=0,000$), α -SMA ($r=-0,573$, $p=0,007$), histopatolojik skor ($r=-0,676$, $p=0,001$), kolajen lif yoğunluğu ($r=-0,635$, $p=0,003$) ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

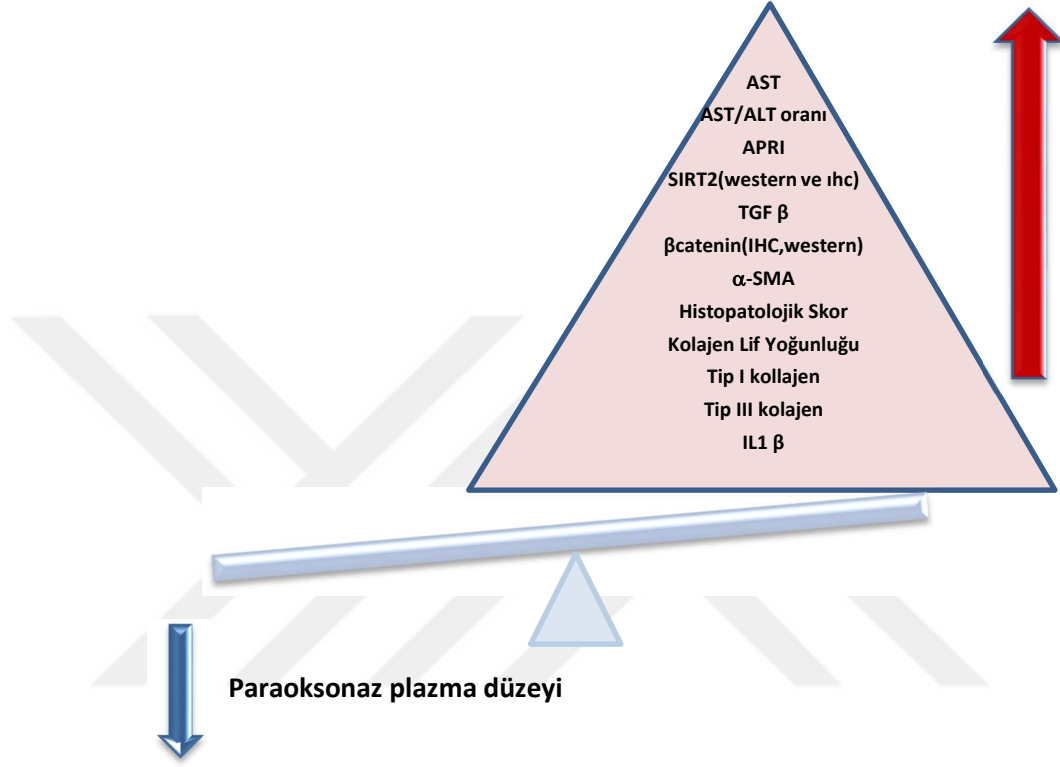
Paraoksonaz doku düzeyi: Karaciğer organ ağırlığı ($r=0,449$, $p=0,024$) ve sıçan son vücut ağırlığı ($r=0,430$, $p=0,032$) ile pozitif korelasyon bulundu.

IL1 β düzeyi: SIRT2 western ($r=0,712$, $p=0,000$), SIRT2 IHC ($r=0,622$, $p=0,006$), IL 6), ($r=0,596$, $p=0,007$) ile pozitif yönde, karaciğer organ indeksi ($r=-0,439$, $p=0,068$) ile negatif korelasyon gösterdi.

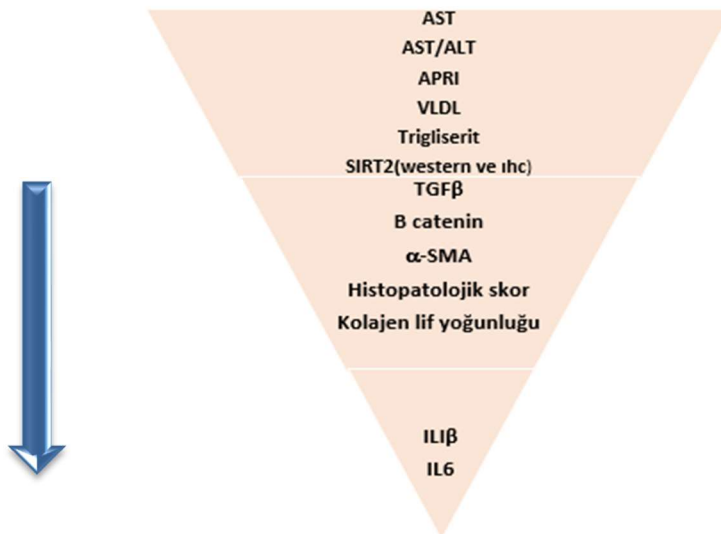
IL6 düzeyi: Paraoksonaz plazma düzeyi ($r= 0,525$ $p=0,015$), IL1 β ($r= 0,596$, $p=0,007$), NF-k β ($r=0,592$, $p=0,003$) ile pozitif yönde, Total kolesterol ($r=-0,522$, $p=0,032$) ve Fibronektin ($r=-0,539$, $p=0,017$) negatif korelasyon gösterdi.

NF-k β düzeyi: Paraoksonaz plazma düzeyi ($r= 0,651$ $p=0,001$) ve IL 6 ($r= 0,592$, $p=0,003$) ile pozitif yönde, karaciğer organ indeksi ($r= -0,495$ $p=0,023$), HDL ($r= -0,372$ $p=0,067$), Total kolesterol ($r= -0,409$, $p=0,059$), Fibronektin ($r= -0,730$ $p=0,000$), Tip I kolajen ($r= -0,708$, $p=0,000$), Tip III kolajen ($r= -0,771$, $p=0,000$), α -SMA ($r= -0,883$, $p=0,000$), histopatolojik skor ($r= -0,870$, $p=0,000$), kolajen lif yoğunluğu ($r= -0,785$, $p=0,000$) negatif korelasyon gösterdi.

Şekil 4.10. D-galaktoz uygulaması ile artan ve azalan parametreler



Şekil 4.11. AGK2 uygulaması ile azalan parametreler



5.TARTIŞMA

Karaciğer hastalıkları, dünya çapında her yıl yaklaşık 2 milyon ölümden sorumludur; bunların yarısı siroz komplikasyonlarından, diğer yarısı ise viral hepatit ve HCC'den kaynaklanmaktadır [46]. Yaşlanma ile ilişkili olarak kronik karaciğer hastalık riskini arttıran fibrozis karaciğer hasarını takiben hücre dışı matriks (ECM) birikimi ile karakterize edilen geri dönüşümlü bir yara iyileşme yanıtıdır. Karaciğer hasarı akut ve kendini sınırlar ise geri dönebilir ve iyileşme ile sonlanırken, hasar devam ederse kronik inflamasyon ve ECM birikimi sonucu parankim skar dokusu ile yer değiştirir.

D-galaktoza bağlı model, yaşlanma çalışmalarında sıklıkla kullanılır. D-galaktoz, normal konsantrasyonlarda glikoza metabolize edilir. D-galaktoz verilen 3 aylık sıçanların, 16-24 aylık yaştaki sıçanlara morfolojik ve fonksiyonel olarak benzediği ve doğal yaşlanmayı taklit ettiği gösterilmiştir [89]. D Galaktozun konsantrasyonu ideal değerlerin üzerine çıktığında, hidrojen peroksit oluşturmak üzere galaktoz oksidaz tarafından oksitlenir. Yüksek doz D-galaktoza bağlı yaşlanmadan sorumlu olan mekanizmalar, oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz olarak tanımlanmaktadır [96].

Oksidatif stres yaşlanma sürecinde hala kabul gören ve apoptoz, inflamasyon üzerinden farklı epigenetik mekanizmaları uyaran bir süreçtir. D galaktoz modelinde de farklı süre ve denek uygulamasına karşın karaciğerde oksidatif stresin [10, 12, 98] tıpkı doğal yaşlanmada olduğu gibi [147-149] arttığı gösterilmiştir. Reaktif oksijen ürünleri, stellat hücreleri aktive ederek onları

miyoblastlara dönüştürür ve fibrojenik yanıtı indükleyerek, fibrotik alanlarda artışa neden olur [11-12]. Oksidatif stres; protein, lipid ve DNA bileşenlerinin değişimleri ile karaciğer hasarına, kronik karaciğer yetmezliği, karaciğer fibrozisi ve yaşlanma gibi birçok hastalığa neden olur [34].

D-galaktozun karaciğer hasarı için önemli bir risk faktörü olduğu, karaciğerde lipid birikimi yoluyla oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir.

D-galaktoz ile indüklenen yaşlanma ile lipid metabolizmasının bozulduğu gösterilmiştir. Zhou ve ark., D-galaktoz uygulanan farelerin karaciğerlerinde belirgin lipid birikimi olduğu trigliserit seviyelerinin arttığı, HDL kolesterol ve HDL-TG oranının azaldığı, Kolesterol ve LDL-C seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirilmiştir [98]. Zhang ve ark; D-galaktoz ile indüklenen yaşlanmada, farelerin karaciğer ve serumunda TC, TG ve LDL-C önemli ölçüde arttığını; serumdaki HDL-C'nin azaldığını göstermiştir [150]. Wistar albino sıçanlara uygulanan D-Galaktozun (200mg/kg IP) TG ve TC seviyelerini ,500mg/kg dozunda 6 haftalık uygulamanın ise TG, LDL ve VLDL düzeyini arttırdığı gösterilmiştir [151, 152]. Çalışmamızda D-galaktoz uygulamasının lipid panelleri üzerinde anlamlı etkisi görülmedi.

Paraoksonaz 1 (PON1) serumda ve karaciğerde bulunan bir ester hidrolazdır. Kronik karaciğer hastalıklarında dahil olmak üzere oksidatif stresi içeren çeşitli hastalıklarda ve yaşlanmada dolaşımdaki PON1 seviyelerinin azaldığı ve değişikliğin karaciğer hasarının derecesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Kronik hepatit veya karaciğer sirozu olan hastalarda serum PON1 aktivitesinin önemli ölçüde azalmıştır. Ferre ve ark, karbon tetraklorür ile indüklenen fibrozis

modelinde, sıçanlarda hepatik PON1 aktivitesinin azaldığı bunun sonucunda artan lipid peroksidasyonunun karaciğer hasarına neden olduğunu ortaya koymuştur [107, 153]. Yaşlanma ile lipid peroksidasyonu artarken, serum paraoksonaz düzeyleri azalmaktadır [154]. Sires ve arkadaşları; PON1 aktivitesi ile yaş arasında negatif ilişki olduğunu göstermiştir [104]. Çalışmamızda, D-galaktoz uygulaması plazma Paraoksonaz düzeyini azaltmıştır. Paraoksonaz plazma düzeyi ile, histolojik parametreler ve fibrozis belirteçleri arasında önemli korelasyonlar bulunmuştur. Paraoksonaz plazma düzeyi, Fibronektin, Tip I kolajen, Tip III kolajen, α -SMA, histopatolojik skor, kolajen lif yoğunluğu ile negatif yönde korelasyon gösterdi. Bu korelasyonlar Paraoksonaz plazma düzeyinin azalmasının fibrojeniz ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Paraksonaz karaciğer doku düzeyi gruplar arasında farksız iken, HDL, karaciğer ve vücut ağırlığı ile paraksonaz doku düzeyi arasında pozitif korelasyon görülmüştür. Karaciğerin en yüksek PON1'e sahip organ olması nedeniyle, serum PON1 seviyesinin ana kaynağı olduğu düşünülmektedir [155]. Ancak, plazma düzeyinin azalması doku düzeyinin değişmemesi, hepatik PON1 gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan başka moleküler mekanizmalar olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda, sıçanların başlangıç ve uygulama sonrası ağırlık değişimi, karaciğer ağırlığı ve organ indeksi değerlendirildi. D-GAL uygulaması ağırlık değişimi ve karaciğer organ indeksinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. D-galaktoz uygulamasının (6-12 hafta 150 mg/kg) farelerde ve sıçanlarda vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı yönündeki çalışmalar bizim sonuçlarımızla uyumlu iken; [156-158] farklı iki çalışmada; 8 hafta boyunca

subkutan 150 mg/kg ve 200 mg/kg dozda intragastrik gavaj ile uygulanan D-galaktozun, farelerde vücut ağırlığı ve karaciğer organ indeksini azalttığı gösterilmiştir [12, 98]. Çalışmamızda karaciğer ağırlığında ve indeksinde azalma gözlenmediği halde bu parametreler fibroziste rol oynayan SIRT2 ve IL1 β ile negatif korele bulundu. Ayrıca, *Karaciğer organ ağırlığı*; HDL Paraoksonaz doku düzeyi ile pozitif yönde, *Karaciğer organ indeksi*, IL1 β ile negatif korele bulundu.

Farklı dozlarda D-GAL uygulamasının karaciğerde ALT ve AST seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir [151, 10-12]. Buna karşın yine D-galaktoz uygulamasını takiben (12 hafta 150 mg/kg, 300 mg/kg 8 hafta) ALT seviyesinde değişiklik olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur [157][159]. Çalışmamızda ALT, AST enzim düzeyleri, AST-Trombosit Oranı İndeksi (APRI) ve AST/ALT oranı değerlendirildi. AST düzeyi, AST-/ALT oranı ve APRI indeksi anlamlı olarak arttı. CCl₄ (2 ml/kg, 8 hafta boyunca haftada iki kez i.p) uygulaması sonucu oluşan karaciğer hasarında AST, ALT ve APRI indeksi artmıştır. Bu parametreler karaciğer inflamasyon ve fibrotik parametreleri olarak kabul edilir [160]. Çalışmamızda AST değeri, AST/ALT oranı ve APRI indeksi ile pozitif korelasyon gösterdi.

İnflamasyon karaciğer fibrojeniz mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Sıçanlarda D- Galaktoz uygulamasının (200 mg/kg/gün 8 hafta intragastrik) IL-1 β düzeyini arttırdığı gösterilmiştir [161]. Wistar albino sıçanlarda D-Galaktoz (200 mg/kg/gün 8 hafta intraperitoneal) uygulaması karaciğerde inflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve NF-kB artışına yol açmıştır [151]. Farklı bir çalışmada D-galaktozun (150 mg/kg/gün 6hafta s.c) fare karaciğerinde IL-1 β gen

ekspresyonunu belirgin şekilde artırırken, IL6 düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir [156]. Lin ve ark, D-galaktozun NF- κ B, IL-1 β ve IL-6'nın mRNA ekspresyonunu arttırdığını bildirmiş olmasına karşın [162], D-galaktozun farelerin hipokampusündeki NF- κ B ekspresyonun da anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı da gösterilmiştir [163]. Çalışmamızda ise D-Galaktoz uygulamasının IL-1 β ve IL6 düzeyini arttırdığı, NF- κ B düzeyini ise kontrol grubuna göre azalttığı görüldü. Çalışmamızda, *IL1 β düzeyi*; SIRT2 (W ve IHC), IL 6 ile pozitif yönde, karaciğer organ indeksi ile negatif korelasyon gösterdi.

TGF- β sinyalindeki artışın, hücre dejenerasyonuna, doku fibrozisine, inflamasyona, rejenerasyon kapasitesinin azalmasına ve metabolik işlev bozukluğuna katkıda bulunduğu belirtilmiştir [17]. Fibrotik hastalıkların mortalite ve morbitesi yaşlanma ile artar [164, 165]. TGF- β 1 plazma seviyesinin, genç ve yaşlı insanlarda karşılaştırıldığında yaşlanma ile arttığı gösterilmiştir [54]. TGF- β , pro-fibrotik yolun aktivasyonunda en önemli faktördür [18, 54]. D Galaktoz (300 mg/kg/gün 6hafta) uygulaması sonrası sıçanlarda TGF- β düzeyinin karaciğer dokusunda arttığı ve fibrozisi indüklediği gösterilmiştir [11]. Chang ve ark, 8 haftalık sprague dawley sıçanlara uygulanan D-galaktozun (8 hafta boyunca 150 mg/kg/gün) kalp dokusunda TGF- β 1düzeyini artırdığı ve fibrozise yol açtığını göstermiştir [166].

Fibro-proliferatif hastalıklarda ilgili diğer bir moleküler yol WNT'dir [82]. Wnt sinyal kaskadının artmış ve sürekli aktivasyonu bir miyofibroblast fenotipine doğru hücre farklılaşması ile sonuçlanır, böylece çeşitli memeli organlarında fibrozise yol açar [167]. D-Galaktoz uygulamasının, Wnt sinyalinin efektörü olan

β -katenin'in nükleer translokasyonunu tetiklediği, 19 wnt arasından 15'ini indüklendiği gösterilmiştir [48]. 8 hafta boyunca uygulanan D-galaktoz enjeksiyonu ile indüklenen yaşlanma modelinde Wnt/ β -katenin sinyalinin aktive olduğu ve β -katenin'in hem sitoplazmada hem de çekirdekte biriktiği gösterilmiştir [168]. D-galaktozun Wnt/ β -katenin/TCF-4 sinyalinin aşırı aktivasyonuna neden olduğunu bildirilmiştir [169].

PDGF-B aracılı PDGFR β sinyalinin karaciğer fibrozunda önemli bir rol oynadığı çalışmalar da gösterilmiştir. PDGF-BB'nin inhibisyonunun karaciğer fibrozunu azalttığı kanıtlanmıştır [83, 84].

Yaşlanan dokularda fibrozis sinyal yollarının (Wnt/ β -katenin ve TGF- β) aktive olduğu bilinmektedir [54]. Fibrozisde rol alan sinyal yollarının (TGF β , β katenin, PDGFBB) gerçek zamanlı PCR analizinde, karaciğer dokusunda TGF β , β katenin düzeyi D-galaktoza bağlı yaşlanma modelinde arttığı bulundu. β -katenin aktivitesi PCR yanında immünohistokimyasal olarak da çalışıldı. D-galaktoz uygulaması karaciğer dokusunda β -catenin immunreaktivitesini artırdı. *β -katenin mRNA ekspresyonu*; AST, AST/ALT oranı, APRI indeksi, Tip I ve Tip III kolajen ile pozitif korelasyon gösterdi. *β -katenin (IHC)*; Tip I kolajen, α -SMA, histopatolojik skor, kolajen lif yoğunluğu ile pozitif yönde korele bulundu ki bu parametreler fibrozis de rol oynar. Proliferasyon ile ilgili diğer bir büyüme faktörü olan PDGFBB ise çalışmamızda aktivite göstermemiştir.

Sirtuin ailesi, organizmanın ömrünü uzatan NAD bağımlı deasetilazlardır. Sirtuinler, hücrel enflamatuvar yanıt, oksidatif stres ve fibrozis dahil olmak üzere çeşitli hücrel süreçleri düzenlediği bilinmektedir [115, 116, 138]. Aileden en çok

Çalışılan SIRT1 yaşlanan dokularda azalmakta, ekspresyonunun arttırılması yaşam sũresinin uzaması ve diğerk yaşlanma karşıtı etkiler ile ilişkilendirilmiştir [170]. Diğerk bir ũye olan SIRT2 Bũbrek, karaciğerk, pankreas, testis ve farelerde yağ dokusu dahil olmak ũzere metabolik olarak aktif organlarda eksprese olur [15]. SIRT2 aktivitesi yaşlanma ile artış gũsterir. Fare beyin ve omuriliğinde [14], sıçan beyin dokuları; serebral korteks ve hipokampusde [133], santral sinir sistemi dışında ise kolonik mukozada yaşla birlikte arttığık bildirilmiştir [139].

Sirtuinlerin karaciğerk fibrozis patogenezin katılma mekanizmaları birbirinden çok farklıdır, bu da esas olarak hũcrede ki lokalizasyonu ve enzimatik aktivitelerdeki farklılıktan kaynaklanabilir [118]. Yaşlanma ile SIRT1 ekspresyonunun azalması, karaciğerk hũcreleri ve stellat hũcrelerde alkolik karaciğerk hasarını ve fibrozu şiddetlendirmektedir [120]. İnflamatuvar yanıt, miyofibroblast farklılaşması ve fibrotik sũrelerde rol alan SIRT2'in rolũ ise çelişkili çalışmalardan dolayı tartışmalıdır.

Deneyssel hayvan modellerinde ve insan çalışmalarında fibrotik dokularda SIRT2 ekspresyonunun arttığık bildirilmiştir [16, 25, 27]. Karaciğerk fibrozisinde SIRT2 ekspresyonunun arttığık ve bu artışın karaciğerkde kolajen1A1 ve α -SMA ekspresyonu için kritik olan ERK aktivasyonunu dũzenleyerek fibrogeneze yol atığık, CCl₄ ile indũklenen fibrotik fare karaciğerklerindeki stellat hũcrelerde SIRT2 ekspresyonunun arttığıkı bildirmiştir [16]. SIRT2 ekspresyonu insan fibrotik bũbrek dokularında ve UUO (tek taraflı ũretral obstrũksiyon) farelerinin bũbrek dokularında arttığık gũsterilmiřtir [28]. SIRT2 nin fibrozis ile ilişkisine karşın,

SIRT2 nakavt modellerde görülen fibrozis bu konuda çelişkili sonuçlar olduğunu göstermektedir [140].

4 aylık sıçanlara yapılan D-galaktoz uygulamasının (500mg/kg, 6 hafta *subkutan*) beyin dokusunda SIRT2 düzeyini artırdığı bildirilmiştir [171]. Çalışmamızda D-galaktoz uygulamasının (150mg/kg, 10 hafta *subkutan*) karaciğer dokusunda SIRT2 düzeyini arttırdığı gösterildi.

SIRT2 aktivitesi western blot yönteminden farklı olarak immünohistokimyasal (IHC) olarak da çalışıldı. Çalışmamızda, D-GAL uygulaması; karaciğer SIRT-2 immunoreaktivite alanında anlamlı değişikliğe neden olmadı. AGK2 uygulaması ise, DMSO+D-GAL grubuna göre anlamlı olarak SIRT2 immunoreaktivite alanını azalttı. *SIRT2 (IHC)* ; AST/ALT , APRI indeksi, β -katenin (mRNA ,IHC) Tip I kolajen, histopatolojik skor, kolajen lif yoğunluğu, IL 1 β ile pozitif korelasyon gösterdi. SIRT2 fibrozis mekanizmasını kolaylaştıran faktörlerle pozitif korele bulundu.

Fibrozis mekanizmasında TGF beta, WNT/ β katenin, SIRT2 aktivitesinin ve IL-1 β düzeyinin D- galaktoza bağlı olarak arttığı görüldü

SIRT2 inhibisyonunun koruyucu etkileri, çeşitli karaciğer hayvan modellerinde bildirilmiştir. Spesifik bir SIRT2 inhibitörü olan AGK-2 uygulamasının TAA kaynaklı karaciğer hasarını (histopatolojik skoru) ve fonksiyonlarını (AST ve ALT) iyileştirdiği, pro-inflamatuvar sitokinleri (iNOS, TNF- α , IL-1 β) ve apoptozu (kaspaz 3, Bax) azalttığı bildirilmiştir [29]. Arteaga ve ark. çalışmasında, karbon tetraklorür (CCl₄) ve tiyoasetamid (TAA) tarafından indüklenen karaciğer hasarı modelinde AGK2 uygulaması karaciğer fibrozunu

azaltmıştır [16]. Farelerde, asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarı modelinde, AGK-2 tedavisinin hepatotoksisiteyi (S6K1 sinyal yolunu inhibe edip ER stresini azaltarak) önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [24]. Karaciğer dışında; akciğer ve böbrek gibi diğer organlarda AGK-2'nin koruyucu olduğu ve fibrozisi baskıladığı bildirilmiştir [25, 28, 172]. Aksine SIRT2 nakavt deneysel hayvan modellerinde karaciğer ve kalpte fibrozise yol açtığına dair çalışmalarda yer almaktadır. Yüksek yağlı diyet (YYD) ile beslenen SIRT2^{-/-} fareler, SIRT2^{+/+} farelere göre karaciğerlerinde α -SMA seviyesi, kolajen1A1 ve kolajen3A1, PDGFR- α düzeyleri artmıştır [140]. Yaşlanmaya bağlı anjiyotensin II (Ang II) kaynaklı kardiyak hipertrofi modelinde, SIRT2 ekspresyonu, kalbi kardiyak hipertrofi ve fibrozise karşı korumuştur. SIRT2 nakavt farelerde patolojik kardiyak hipertrofi ve fibrozisin arttığı gösterilmiştir [141]. Bu farklılıklar, SIRT2'nin fibrozisdeki farklı rollerine bağlanabilir. *SIRT2 ekspresyonu (W)*; AST , APRI indeksi, Tip I kolajen ,IL 1 β , TGF β 1, β -katenin mRNA ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdi

SIRT2'nin fibrozis üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, AGK-2 ile inhibisyonunun fibrozis mekanizmaları ve karaciğer fonksiyonu üzerine etkisini araştırdık. AGK-2 uygulamasının SIRT2 ekspresyonunu inhibe ettiği Western blot yöntemi ile gösterildi (Şekil 4.3). AGK-2, SIRT2'nin immünohistokimyasal analizinde anlamlı olarak azalmaya yol açtı (Resim 4.1). SIRT2 için western ve IHC sonuçları pozitif korelasyon gösterdi.

AGK-2 uygulaması sıçanlarda, plazma AST düzeyini, AST/ALT oranını, APRI skorunu azalttı. Çalışmamızda DMSO; AST enzim düzeyi ve AST/ALT oranı ve APRI skorunu azaltarak karaciğer fonksiyonlarını iyileştirdi. DMSO'nun (0.1

ml/kg) yüksek olmayan dozlarda kullanıldığında, serbest radikal süpürücü özelliği olduğu bildirilmiştir [173]. Yapılan çalışmalarda DMSO'nun yararlı etkilerinin altında yatan fizyolojik ve farmakolojik mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, organlara kan akışını artırma, inflamatuvar hücrelerin alımını ve aktivasyonunu azaltma ve bir antioksidan ve serbest radikal süpürücü olarak hareket etme yeteneğinin bulunduğu öne sürülmüştür [174, 175]. DMSO'nun çeşitli karaciğer hasarı veya hepatotoksisite koşulları altında koruyucu etkileri belgelenmiştir [175, 176].

AGK-2 uygulaması kanda VLDL ve trigliserit düzeyini anlamlı olarak azalttı. AGK-2'nin bu koruyucu etkileri, yaşlanma ile karaciğer fonksiyonlarındaki ve lipid profilindeki bozuklukları azaltmada etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

D GAL uygulaması ile azalan plazma Paraoksonaz değeri üzerinde AGK-2'nin etkisi görülmedi.

SIRT2 yaşlanma ve inflamasyon ile ilgili gen düzenlemesinde önemli rol oynayan NF- κ B ile ilişkilidir [144]. SIRT2'nin, nükleer faktör κ B (NF- κ B) alt birimi p65'i doğrudan bağlayıp deasetilleyerek anti-inflamatuvar etki gösterdiği, NF- κ B tarafından düzenlenen pro inflamatuvar gen ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir [143, 144]. Buna karşın, SIRT2^{-/-} (nakavt farelerde), deneysel kolit modelinde NF- κ B asetilasyonunu artırarak, inflamatuvar yanıtı tetiklediği de gösterilmiştir [177]. SIRT2 nakavt farelerde, lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonunu takiben NF- κ B'nin hiperasetilasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerde artış, mikrogliyalarda morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Mikroglia da SIRT2'nin nakavt edilmesi, inflamatuvar belirteçlerin ekspresyonunu, serbest radikallerin üretimini ve nörotoksisiteyi

önemli ölçüde arttırırken, NF- κ B'yi asetilasyonunu artırarak proinflamatuvar etki sergilemiştir [178]. SIRT2'nin inflamasyondaki işlevi net değildir. İnflamasyonu önleyebileceğini destekleyen çalışmalar yanında teşvik edebileceğini öne süren çalışmalarda vardır [179]. SIRT2, NF- κ B'nin transkripsiyonunu aktive ederek inflamasyonu ve nöronal hücre ölümünü artırmıştır [180]. AGK2 (0.1–10 μ M) uygulaması NF- κ B'nin aktivasyonunu baskılayarak, proinflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-1 β , IL-4 ve IL-6) seviyelerini düşürürerek akciğerde anti-inflamatuvar etki göstermiştir [172]. AGK2, karaciğer dokusunda TAA kaynaklı NF- κ B sinyalini inhibe ederek anti-inflamatuvar etki göstermiştir [29].

AGK-2 uygulamasının CCl₄ ile indüklenen fibrotik fare karaciğerinde inflamatuvar yanıtları azaltarak koruyucu etki yaptığı da gösterilmiştir. Tıpkı SIRT2 gibi SIRT2 nin inhibisyonu konusunda birbiri ile çelişen çalışmalar mevcuttur. [16]. Çalışmamızda ise, AGK2 uygulaması NF κ B düzeyinde anlamlı bir değişikliğe yol açmazken; IL-1 β ve IL6 düzeylerinin azalttı. *IL1 β düzeyi*; SIRT2 (W ve IHC), IL 6 ile pozitif yönde, karaciğer organ indeksi ile negatif korelasyon gösterdi. Bu sonuçlar inflamasyon göstergelerinden IL1 β 'nin SIRT2 ile birlikte çalıştığını göstermektedir.

Fibroblast hücre kültüründe TGF- β 1 stimülasyonunun, fibroblastlarda SIRT2 protein seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir [28]. Farelerde bleomisin kaynaklı pulmoner fibrozis modelinde, SIRT2 inhibisyonu, *TGF- β 1* tarafından indüklenen SMAD2/3'ün fosforilasyonunu azaltarak fibrozisi azaltmıştır [25].

PCR analizi ile araştırılan TGF β 1 mRNA düzeyi AGK2 uygulaması ile karaciğerde anlamlı olarak azaldı. Bu bulgular SIRT2 inhibisyonunun fibrozis sinyal yollarının modülasyonu ile antifibrotik etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Li ve ark. normal bağırsak epitel hücrelerinde SIRT2'nin β -katenin deasetilasyonu yoluyla Wnt sinyalini inhibe ettiğini göstermişlerdir [142]. SIRT2'nin β -katenin seviyelerini arttırdığını, inhibisyonunun ise β -katenin seviyelerini düşürdüğünü bildiren çalışmalar vardır [181, 182] SIRT2 nakavt fare embriyonik fibroblastlarda doğal tip farelere kıyasla aktif olan nükleer β -katenin proteininde artış gözlenmiştir. İnaktif formda sitoplazmik β -katenin artışının ise doğal tipte daha fazladır [26]. SIRT2 ve β -katenin ilişkisi ile ilgili çelişkili bulgular, bu konunun daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda AGK-2 uygulaması ile β -katenin aktivitesinin azaldığı görüldü. β -katenin için mRNA ve IHC sonuçları pozitif korelasyon gösterdi. AGK-2 uygulaması Lenfosit infiltrasyonunu azaltıp, hepatosit yapısal bütünlüğünü korudu ve histopatolojik skoru azalttı. Fibronektin, Tip I Kolajen, Tip III Kolajen düzeylerini etkilenmezken, vena centralis ve portal alanlarda kolajen lif yoğunluğunu ve α -SMA düzeyini azalttı. Ponnusamy ve ark, AGK ile SIRT2 inhibisyonu yaptıkları çalışmalarında AGK2'nin doza ve zamana bağlı olarak böbreklerde fibroblast aktivasyonu inhibe ettiği, AGK2'nin doza bağlı olarak α -SMA, kolajen I ve fibronektin ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir. AGK2 25 μ M konsantrasyonda α -SMA ekspresyonunu önemli ölçüde azaltırken, kolajen I ve fibronektin seviyelerini etkilememiş. 50 μ M konsantrasyonda tüm bu moleküllerin

seviyesinde önemli bir azalmaya, 100 μ M AGK2 ile ise ifadelerinde 3 kat azalmaya yol açmıştır [27]. He ve ark., AGK2 uyguladıkları UUO (tek taraflı üretral obstrüksiyon) farelerinde kolajen birikimini azaldığını göstermiştir. Tübül epitel hücre kültüründe TGF- β 1 ile uyarılma sonucunda α -SMA, kolajen III ve fibronectin ekspresyon artışı gözlenirken AGK-2 uygulaması bu artışı önleyememiştir. Oysa ki böbrek intertisyel fibroblast hücre dizisinde AGK-2 uygulaması etkili olmuştur [28]. Bu sonuç SIRT2'nin hücreye bağlı işlevsellik sergilediğini göstermektedir. SIRT2'nin inhibisyonu (10 uM AGK2), TGF- β 1 ile uyarılmış kültüre edilmiş akciğer fibroblastlarında, fibronectin, kolajen I ve α -SMA ekspresyonunu azaltmıştır [172]. Literatürdeki bu bulgular, AGK2'nin doza ve zamana bağlı olarak fibrotik belirteçlerin ekspresyonunu etkilediğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda, histolojik olarak kolajen 1,3 ve α -SMA düzeyi immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Masson trikrom ve PAS boyaması yapılmış. Yaşlanma ile karaciğer dokusunda Fibronectin, Tip I Kolajen, Tip III Kolajen, α -SMA, kolajen lif yoğunluğu ve histopatolojik skor arttı. Histopatolojik skorda inflamasyonun yanı sıra hepatosit kordonlarının ışınsal düzenleniminde bozulma, hepatosit dejenarasyonu ve karaciğer sinuzoidlerinde dilatasyon dikkat çeken bulgulardandı.

Çalışmamızda *Plazma Paraksonaz Aktivitesi* ile Fibronectin, Tip I Kolajen, Tip III Kolajen düzeyleri, Histopatolojik skor ve Kolajen lif yoğunluğu negatif korelasyon gösterdi. *α -SMA IHC*; β -katenin, Fibronectin, Tip I kolajen, Tip III

kolajen, Histopatolojik skor, Kolajen lif yoğunluğu ile pozitif yönde; paraksonaz-plazma ve NF-kB ile negatif yönde korelasyon gösterdi.

Fibronektin ile SIRT2 (W) pozitif yönde; Kolajen 1, Histopatolojik skor ve Kolajen lif yoğunluğu ile SIRT2 (IHC) pozitif korelasyon gösterdi.

Çalışmamızda, D-GAL bağlı yaşlanma modelinde SIRT2'nin, karaciğer üzerinde yapısal değişiklikler, fonksiyonel kayıpları ve fibrozis mekanizmasına etkileri araştırılarak, inhibisyonunun kronik karaciğer hastalıklarında yeni bir tedavi stratejisi olacağını düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

D-galaktoz uygulaması ile oluşturulan hızlandırılmış yaşlanma modelinde, SIRT2 inhibitörü olarak AGK-2 uygulamasının, etkisini incelediğimiz çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür;

- ✓ D galaktoz uygulaması; karaciğer fonksiyon göstergelerinden **AST, AST/ALT oranı, APRI indeksini** artırırken, **Paraksonaz plazma düzeyini** azaltmış ve karaciğer fonksiyonlarında bozukluğa sebep olmuştur.
- ✓ D galaktoz uygulaması; fibrozis ile ilişkili sinyal yollarından, **TGF β , β katenin (IHC, western) mRNA** düzeyini artırdı. İmmünohistokimyasal analizde ise; **α -SMA, Tip I kolajen, Tip III kolajen, Histopatolojik Skor ve Kolajen lif yoğunluğunu** artırmıştır.
- ✓ D galaktoz uygulaması; **IL1 β ve SIRT2** düzeyini artırmıştır.
- ✓ **AGK2** uygulaması, **AST, AST/ALT oranı, APRI indeksin, VLDL ve Trigliserit** düzeyini azaltmıştır. AGK2'nin karaciğer fonksiyonlarını iyileştirdiğini düşündürmektedir.
- ✓ **AGK2** uygulaması; fibrozis ile ilişkili sinyal yollarından **TGF β , β katenin mRNA** düzeyini azaltmıştır. İmmünohistokimyasal analizde ise; **α -SMA, Histopatolojik Skor ve Kolajen Lif Yoğunluğu** azalmasına sebep olmuştur.
- ✓ **AGK2** uygulaması, **IL1 β ve IL6'yı** azalatarak anti inflamatuvar etki sergilemiştir.

- ✓ **AGK2**, immünohistokimya ve western analizinde **SIRT2** düzeyini azaltmıştır.

D-galaktoz'a bağılı yaşılanma modeli karaciğer fibrozisi oluşturmaktadır. Fibrozis mekanizmasında SIRT2, TGF- β ve β katenin artmıştır. SIRT2'nin spesifik inhibitörü olan AGK-2'nin uygulamasının, karaciğerde yaşılanmaya bağılı görülen fibrotik değişiklikleri tersine çevirmede ve fonksiyon kayıplarını iyileştirmede etkili olduğunu düşünüyöruz. Çalışmamızda SIRT2'nin fibrozis mekanizmasında yer almasına karşın, SIRT2'nin dokuya özğü işlevselliğı, ilgili hücre tipleri açısından farklılıklar sergilemesi ve literatürde birbiri ile çelişkili çalışmaların bulunması, SIRT2'nin etkilerinin ortaya konması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın kısıtlılıklarına değinecek olursak;

- Karaciğer dokusunda inflamasyon için ELİSA yöntemi ile bakılan inflamatuvar sitokinler IL-6, IL-1 β , NF-kB düzeyleri PCR veya Western Blot yöntemi ile gösterilmesi çalışmanın bulgularını destekleyecektir.
- PDGFB düzeyi, farklı yöntemlerle (Western Blot Yöntemi) ile kontrol edilmelidir.
- Yapılan ön çalışmada, 10 hafta olarak belirlenen D-galaktoz uygulaması bazı parametrelerde değişikliğe neden olmamıştır. Uygulamanın daha uzun süre devamı karaciğerdeki etkileri daha belirgin hale getirebilir.
- AGK2'nin farklı doz ve sürelerle çalışılması SIRT2'nin rolünü açıklamak için gereklidir.

7.KAYNAKLAR

- [1] C. Liu, Q.Tao, M.Sun, J.ZWu, W. Yang, P. Jian, *et al.*, “Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats,” *Lab. Investig.*, vol. 90, no. 12, pp. 1805–1816, 2010, doi: 10.1038/labinvest.2010.123.
- [2] J. Cheng, C. Ren, R. Cheng , Y. Li, P. Liu , W. Wang *et al.*, “Mangiferin ameliorates cardiac fibrosis in D-galactose-induced aging rats by inhibiting TGF- β /p38/MK2 signaling pathway,” *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 25, no. 2, pp. 131–137, 2021, doi: 10.4196/KJPP.2021.25.2.131.
- [3] K. F. Azman, A. Safdar, and R. Zakaria, “D-galactose-induced liver aging model: Its underlying mechanisms and potential therapeutic interventions,” *Exp. Gerontol.*, vol. 150, no. February, p. 111372, 2021, doi: 10.1016/j.exger.2021.111372.
- [4] F. Sheedfar, S. Di Biase, D. Koonen, and M. Vinciguerra, “Liver diseases and aging: Friends or foes?,” *Aging Cell*, vol. 12, no. 6, pp. 950–954, 2013, doi: 10.1111/accel.12128.
- [5] B. Dewidar, C. Meyer, S. Dooley, and A. N. Meindl-Beinker, “TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019,” *Cells*, vol. 8, no. 11, pp. 1–35, 2019, doi: 10.3390/cells8111419.
- [6] I. H. Kim, T. Kisseleva, and D. A. Brenner, “Aging and liver disease,” *Curr. Opin. Gastroenterol.*, vol. 31, no. 3, pp. 184–191, 2015, doi: 10.1097/MOG.0000000000000176.
- [7] E. Gäbele, D. A. Brenner, and R. A. Rippe, “Liver fibrosis: Signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell,” *Front. Biosci.*, vol. 8, no. February 2003, 2003, doi: 10.2741/887.
- [8] J. P. Iredale, “Models of liver fibrosis: Exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ,” *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 3, pp. 539–548, 2007, doi: 10.1172/JCI30542.
- [9] P. Acharya, K. Chouhan, S. Weiskirchen, and R. Weiskirchen, “Cellular Mechanisms of Liver Fibrosis,” *Front. Pharmacol.*, vol. 12, no. May, pp. 1–28, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.671640.
- [10] Y. Feng, Y. Yub, S. Wanga, J. Rena, D. Camerc, Y. Hua *et al.*, “Chlorogenic acid protects d -galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice,” *Pharm. Biol.*, vol. 54, no. 6, pp. 1027–1034, 2016, doi: 10.3109/13880209.2015.1093510.
- [11] D. O. Saleh, D. F. Mansour, I. M. Hashad, and R. M. Bakeer, “Effects of sulforaphane on D-galactose-induced liver aging in rats: Role of keap-1/nrf-2 pathway.,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 855, no. November 2018, pp. 40–49, 2019, doi: 10.1016/j.ejphar.2019.04.043.
- [12] P. Chen, F. Chen, and B. H. Zhou, “Leonurine ameliorates D-galactose-induced aging in mice through activation of the Nrf2 signalling pathway,” *Aging (Albany. NY).*, vol. 11, no. 18, pp. 7339–7356, 2019, doi:

10.18632/aging.101733.

- [13] W. Wasityastuti, N. A. Habib, D. C. R. Sari, and N. Arfian, “Effects of low and moderate treadmill exercise on liver of d-galactose-exposed aging rat model,” *Physiol. Rep.*, vol. 7, no. 21, pp. 1–8, 2019, doi: 10.14814/phy2.14279.
- [14] M. M. Maxwell, E. M. Tomkinson, J. Nobles, J. W. Wizeman, A. M. Amore, L. Quinti *et al.*, “The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 20, pp. 3986–3996, 2011, doi: 10.1093/hmg/ddr326.
- [15] P. Gomes, T. Fleming Outeiro, and C. Cavadas, “Emerging Role of Sirtuin 2 in the Regulation of Mammalian Metabolism,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 36, no. 11, pp. 756–768, 2015, doi: 10.1016/j.tips.2015.08.001.
- [16] M. Arteaga, N. Shang, X. Ding, S. Yong, S. J. Cotler, M. F. Denning *et al.*, “Inhibition of SIRT2 suppresses hepatic fibrosis,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 310, no. 11, pp. G1155–G1168, 2016, doi: 10.1152/ajpgi.00271.2015.
- [17] K. Tominaga and H. I. Suzuki, “TGF- β signaling in cellular senescence and aging-related pathology,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 20, 2019, doi: 10.3390/ijms20205002.
- [18] N. Sanderson, V. Factor, P. Nagy, J. Koppt, P. Kondalaht, L. Wakefield, *et al.*, “Hepatic expression of mature transforming growth factor β 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 7, pp. 2572–2576, 1995, doi: 10.1073/pnas.92.7.2572.
- [19] U. E. Lee and S. L. Friedman, “Mechanisms of hepatic fibrogenesis,” *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 25, no. 2, pp. 195–206, 2011, doi: 10.1016/j.bpg.2011.02.005.
- [20] S. Dooley and P. Ten Dijke, “TGF- β in progression of liver disease,” *Cell Tissue Res.*, vol. 347, no. 1, pp. 245–256, 2012, doi: 10.1007/s00441-011-1246-y.
- [21] I. Fabregat, J. Moreno-Caceres, A. Sanchez, S. Dooley, B. Dewidar, G. Giannelli *et al.*, “TGF- β signalling and liver disease,” *FEBS J.*, vol. 283, pp. 2219–2232, 2016, doi: 10.1111/febs.13665.
- [22] X. Tan *et al.*, “B-Catenin Deletion in Hepatoblasts Disrupts Hepatic Morphogenesis and Survival During Mouse Development,” *Hepatology*, vol. 47, no. 5, pp. 1667–1679, 2008, doi: 10.1002/hep.22225.
- [23] S. P. Monga, “B-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis,” *Gastroenterology*, vol. 148, no. 7, pp. 1294–1310, 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2015.02.056.
- [24] D. H. Lee, B. Lee, J. Su Park, Y. Seo Lee, J. H. Kim, Y. Cho *et al.*, “Inactivation of Sirtuin2 protects mice from acetaminophen-induced liver injury: Possible involvement of ER stress and S6K1 activation,” *BMB Rep.*, vol. 52, no. 3, pp. 190–195, 2019, doi: 10.5483/BMBRep.2019.52.3.083.

- [25] H. Gong, C. Zheng, X. Lyu, L. Dong, S. Tan, and X. Zhang, "Inhibition of Sirt2 Alleviates Fibroblasts Activation and Pulmonary Fibrosis via Smad2/3 Pathway," *Front. Pharmacol.*, vol. 12, no. December, pp. 1–10, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.756131.
- [26] P. Nguyen, S. Lee, D. Lorang-Leins, J. Trepel, and D. K. Smart, "SIRT2 Interacts with β -catenin to Inhibit Wnt Signaling Output in Response to Radiation-Induced Stress," *NIH Public Access*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0223-T.SIRT2.
- [27] M. Ponnusamy, X. Zhou, Y. Yan, J. Tang, E. Tolbert, T. C. Zhao, *et al.*, "Blocking sirtuin 1 and 2 inhibits renal interstitial fibroblast activation and attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 350, no. 2, pp. 243–256, 2014, doi: 10.1124/jpet.113.212076.
- [28] F. F. He, R. Y. You, C. Ye, C. T. Lei, H. Tang, H. Su *et al.*, "Inhibition of SIRT2 Alleviates Fibroblast Activation and Renal Tubulointerstitial Fibrosis via MDM2," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 46, no. 2, pp. 451–460, 2018, doi: 10.1159/000488613.
- [29] F. Z. Jiao, Y. Wang, W. Zhang, H. Y. Zhang, Q. Chen, C. X. Shi *et al.*, "Protective role of AGK2 on thioacetamide-induced acute liver failure in mice," *Life Sci.*, vol. 230, no. April, pp. 68–75, 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.061.
- [30] A. Denic, R. J. Glasscock, and A. D. Rule, "Structural and Functional Changes With the Aging Kidney," *Adv. Chronic Kidney Dis.*, vol. 23, no. 1, pp. 19–28, 2016, doi: 10.1053/j.ackd.2015.08.004.
- [31] H. Sobamowo and S. S. Prabhakar, *The Kidney in Aging: Physiological Changes and Pathological Implications*, 1st ed., vol. 146. Elsevier Inc., 2017.
- [32] M. Sander *et al.*, "The challenges of human population ageing," *Age Ageing*, vol. 44, no. 2, pp. 185–187, 2015, doi: 10.1093/ageing/afu189.
- [33] E. Trefts, M. Gannon, and D. H. Wasserman, "The liver," *Curr. Biol.*, vol. 27, no. 21, pp. R1147–R1151, 2017, doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- [34] G. R. Andrews, Z. Khalil, and D. G. Le Couteur, "Experimental gerontological research in Australia," *Exp. Gerontol.*, vol. 37, no. 12, pp. 1303–1310, 2002, doi: 10.1016/S0531-5565(02)00097-9.
- [35] D. G. Le Couteur *et al.*, "Old age and the hepatic sinusoid," *Anat. Rec.*, vol. 291, no. 6, pp. 672–683, 2008, doi: 10.1002/ar.20661.
- [36] D. L. Schmucker, "Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease?," *Exp. Gerontol.*, vol. 40, no. 8–9, pp. 650–659, 2005, doi: 10.1016/j.exger.2005.06.009.
- [37] H. A. Wynne, L. H. Cope, E. Mutch, M. D. Rawlins, K. W. Woodhouse, and O. F. W. James, "The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man," *Hepatology*, vol. 9, no. 2, pp. 297–301, 1989, doi: 10.1002/hep.1840090222.

- [38] M. Zoli, D. Magalotti, G. Bianchi, C. Gueli, C. Orlandini, M. Grimaldi, G. Marchesini *et al.*, “Total and functional hepatic blood flow decrease in parallel with ageing,” *Age Ageing*, vol. 28, no. 1, pp. 29–34, 1999, doi: 10.1093/ageing/28.1.29.
- [39] A. J. McLean, V. C Cogger, G. C Chong, A. Warren, A. MA Markus, J.E. Dahlstrom *et al.*, “Age-related pseudocapillarization of the human liver,” *J. Pathol.*, vol. 200, no. 1, pp. 112–117, 2003, doi: 10.1002/path.1328.
- [40] H. Senoo, “Structure and function of hepatic stellate cells,” *Med. Electron Microsc.*, vol. 37, no. 1, pp. 3–15, 2004, doi: 10.1007/s00795-003-0230-3.
- [41] D. G. Le Couteur, A. Warren, V. C. Cogger, R. Fraser, L. D. Deleve, and R. S. McCuskey, “The effects of old age on hepatic stellate cells,” *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.*, vol. 2011, pp. 1–8, 2011, doi: 10.1155/2011/439835.
- [42] D. D. Li, W.J. Lib, S.Z. Konga, S.D. Li, J.Q. Guo, M.H. Guo *et al.*, “Protective effects of collagen polypeptide from tilapia skin against injuries to the liver and kidneys of mice induced by D-galactose,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 117, no. July, p. 109204, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109204.
- [43] H. L. Chuang, R. Baskaran, C. Hsuan Day, Y.M. Lin, C.C. Ho, T.J. Ho *et al.*, “Role of potato protein hydrolysate and exercise in preventing high-fat diet-induced hepatocyte apoptosis in senescence-accelerated mouse,” *J. Food Biochem.*, vol. 44, no. 12, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1111/jfbc.13525.
- [44] M. D. Chipchase, M. O. Neill, and D. W. Melton, “Characterization of Premature Liver Polyploidy in DNA Repair (Ercc1)-Deficient Mice,” *Hepatology*, 2013.
- [45] B. Dewidar, C. Meyer, S. Dooley, and N. Meindl-beinker, “TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019,” pp. 1–35, 2019.
- [46] A. A. Mokdad, A. D Lopez, S. Shahraz, R. Lozano, A.H Mokdad, J. Stanaway, C. Murray *et al.*, “Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis,” *BMC Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–24, 2014, doi: 10.1186/s12916-014-0145-y.
- [47] S. K. Asrani, H. Devarbhavi, J. Eaton, and P. S. Kamath, “Burden of liver diseases in the world,” *J. Hepatol.*, vol. 70, no. 1, pp. 151–171, 2019, doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.014.
- [48] J. Miao, J. Liu, J. Niu, Y. Zhang, W. Shen, C. Luo *et al.*, “Wnt/ β -catenin/RAS signaling mediates age-related renal fibrosis and is associated with mitochondrial dysfunction,” *Aging Cell*, vol. 18, no. 5, pp. 1–21, 2019, doi: 10.1111/accel.13004.
- [49] K. Iwaisako, C. Jianga, M. Zhanga, M. Conga, T.J. Moore-Morris *et al.*, “Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 32, 2014, doi: 10.1073/pnas.1400062111.
- [50] C. Y. Zhang, W. G. Yuan, P. He, J. H. Lei, and C. X. Wang, “Liver fibrosis

and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 48, pp. 10512–10522, 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i48.10512.

- [51] M. M. Aydin and K. C. Akcali, “Liver fibrosis,” *Turkish J. Gastroenterol.*, vol. 29, no. 1, pp. 14–21, 2018, doi: 10.5152/tjg.2018.17330.
- [52] D. Li, L. He, H. Guo, H. Chen, and H. Shan, “Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging,” *EJNMMI Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1186/s13550-015-0151-x.
- [53] B. M. Klinkhammer, J. Floege, and P. Boor, “PDGF in organ fibrosis,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 62, pp. 44–62, 2018, doi: 10.1016/j.mam.2017.11.008.
- [54] R. J. Forsey, J.M. Thompson, J. Ernerudh, T.L. Hurst, J. Strindhall, B. Johansson *et al.*, “Plasma cytokine profiles in elderly humans,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 124, no. 4, pp. 487–493, 2003, doi: 10.1016/S0047-6374(03)00025-3.
- [55] O. A. Gressner, R. Weiskirchen, and A. M. Gressner, “Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 381, no. 2, pp. 107–113, 2007, doi: 10.1016/j.cca.2007.02.038.
- [56] R. Derynck and Y. E. Zhang, “Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-,” vol. 4, 2003.
- [57] J. Massagué, “TGF β signalling in context,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 10, pp. 616–630, 2012, doi: 10.1038/nrm3434.
- [58] K. Breitkopf, P. Godoy, L. Ciuculan, M. V. Singer, and S. Dooley, “TGF- β /Smad signaling in the injured liver,” *Z. Gastroenterol.*, vol. 44, no. 1, pp. 57–66, 2006, doi: 10.1055/s-2005-858989.
- [59] S. Kanzler, A.W. Lohse, A. Keil, J. Henninger, H.P. Dienes, P. Schirmacher *et al.*, “TGF- β 1 in liver fibrosis: An inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 276, no. 4, pp. 39–4, 1999, doi: 10.1152/ajpgi.1999.276.4.g1059.
- [60] L. Beljaars, B. Weert, A. Geerts, D. K. F. Meijer, and K. Poelstra, “The preferential homing of a platelet derived growth factor receptor-recognizing macromolecule to fibroblast-like cells in fibrotic tissue,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, no. 7, pp. 1307–1317, 2003, doi: 10.1016/S0006-2952(03)00445-3.
- [61] Q. yan Yao, B. li Xu, J. yao Wang, H. chun Liu, S. cai Zhang, and C. tao Tu, “Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor-beta1 signalling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats,” *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 12, pp. 1–11, 2012, doi: 10.1186/1472-6882-12-156.
- [62] S. Dooley *et al.*, “Hepatocyte-Specific Smad7 Expression Attenuates TGF- β -Mediated Fibrogenesis and Protects Against Liver Damage,”

Gastroenterology, vol. 135, no. 2, pp. 642–659, 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.038.

- [63] L. Yang *et al.*, “Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice,” *Hepatology*, vol. 59, no. 2, pp. 483–495, 2014, doi: 10.1002/hep.26698.
- [64] F. Xu, C. Liu, D. Zhou, and L. Zhang, “TGF- β /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 64, no. 3, pp. 157–167, 2016, doi: 10.1369/0022155415627681.
- [65] T. Reya and H. Clevers, “Wnt signalling in stem cells and cancer. 434, 843–850 (2005).,” *Nature*, vol. 434, pp. 843–850, 2005, [Online]. Available: www.nature.com/nature.
- [66] K. Nishikawa, Y. Osawa, and K. Kimura, “Wnt/ β -catenin signaling as a potential target for the treatment of liver cirrhosis using antifibrotic drugs,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 10, 2018, doi: 10.3390/ijms19103103.
- [67] C. M. Cruciat and C. Niehrs, “Secreted and transmembrane Wnt inhibitors and activators,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 3, pp. 1–26, 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a015081.
- [68] H. Aberle, A. Bauer, A. Kispert, and R. Kemler, “ β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway,” *Lunar Planet. Sci. Conf.*, vol. 16, no. 13, pp. 55–56, 2011.
- [69] J. J. Barrott, G. M. Cash, A. P. Smith, J. R. Barrow, and L. C. Murtaugh, “Deletion of mouse Porcn blocks Wnt ligand secretion and reveals an ectodermal etiology of human focal dermal hypoplasia/Goltz syndrome,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 31, pp. 12752–12757, 2011, doi: 10.1073/pnas.1006437108.
- [70] C. Bänziger, D. Soldini, C. Schütt, P. Zipperlen, G. Hausmann, and K. Basler, “Wntless, a Conserved Membrane Protein Dedicated to the Secretion of Wnt Proteins from Signaling Cells,” *Cell*, vol. 125, no. 3, pp. 509–522, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.049.
- [71] M. D. Gordon and R. Nusse, “Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 32, pp. 22429–22433, 2006, doi: 10.1074/jbc.R600015200.
- [72] L. Xu, , W.H Cui, W.C Zhou, D.L. Li , L.C. Li, P. Zhao, *et al.*, “Activation of Wnt/ β -catenin signalling is required for TGF- β /Smad2/3 signalling during myofibroblast proliferation,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 21, no. 8, pp. 1545–1554, 2017, doi: 10.1111/jcmm.13085.
- [73] F. Yousefi, Z Shabaninejad, S. Vakili, M. Derakhshan, A. Movahedpour, H. Dabiri *et al.*, “TGF- β and WNT signaling pathways in cardiac fibrosis: Non-coding RNAs come into focus,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1186/s12964-020-00555-4.
- [74] M. Nishita, M. K. Hashimoto, S. Ogata, M.N. Laurent, N.Ueno, H. Shibuya *et al.*, “Interaction between Wnt and TGF- β signalling pathways

during formation of Spemann's organizer," *Nature*, vol. 403, no. 6771, pp. 781–785, 2000, doi: 10.1038/35001602.

- [75] A. Akhmetshina, K. Palumbo, C. Dees, C. Bergmann, P. Venalis, P. Zer *et al.*, "Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis," *Nat. Commun.*, vol. 3, 2012, doi: 10.1038/ncomms1734.
- [76] Q. Du *et al.*, "Wnt/ β -catenin signaling regulates cytokine-induced human inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting nuclear factor-kb activation in cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 9, pp. 3764–3771, 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0014.
- [77] B. Saile, N. Matthes, H. El Armouche, K. Neubauer, and G. Ramadori, "The bcl, NFkB and p53/p21WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF- β or TNF- α on activated hepatic stellate cells," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 80, no. 8, pp. 554–561, 2001, doi: 10.1078/0171-9335-00182.
- [78] L. Fredriksson, H. Li, and U. Eriksson, "The PDGF family: Four gene products form five dimeric isoforms," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 15, no. 4, pp. 197–204, 2004, doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.007.
- [79] K. Breitkopf, C. Van Roeyen, I. Sawitza, L. Wickert, J. Floege, and A. M. Gressner, "Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors α and β in activated rat hepatic stellate cells (HSC)," *Cytokine*, vol. 31, no. 5, pp. 349–357, 2005, doi: 10.1016/j.cyto.2005.06.005.
- [80] J. D. Kelly, B. A. Haldemant, F. J. Grant, M. J. Murray, R. A. Seifert *et al.*, "Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 14, pp. 8987–8992, 1991, doi: 10.1016/s0021-9258(18)31541-2.
- [81] L. Claesson-Welsh, "Platelet-derived growth factor receptor signals," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 51, pp. 32023–32026, 1994, doi: 10.1016/s0021-9258(18)31591-6.
- [82] H. H. Hu, G. Cao, X. Q. Wu, N. D. Vaziri, and Y. Y. Zhao, "Wnt signaling pathway in aging-related tissue fibrosis and therapies," *Ageing Res. Rev.*, vol. 60, no. January, 2020, doi: 10.1016/j.arr.2020.101063.
- [83] Y. Ikura, H. Morimoto, M. Ogami, H. Jomura, N. Ikeoka, and M. Sakurai, "Expression of platelet-derived growth factor and its receptor in livers of patients with chronic liver disease," *J. Gastroenterol.*, vol. 32, no. 4, pp. 496–501, 1997, doi: 10.1007/BF02934089.
- [84] E. Borkham-Kamphorst, D. Stoll, A. M. Gressner, and R. Weiskirchen, "Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 321, no. 2, pp. 413–423, 2004, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.153.
- [85] F. van Dijk, P. Olinga, K. Poelstra, and L. Beljaars, "Targeted therapies in liver fibrosis: Combining the best parts of platelet-derived growth factor BB and interferon gamma," *Front. Med.*, vol. 2, no. OCT, 2015, doi: 10.3389/fmed.2015.00072.

- [86] Z. Liu, H. Liu, J. Jiang, S. Tan, Y. Yang, Y. Zhan and B. Wu “PDGF-BB and bFGF ameliorate radiation-induced intestinal progenitor/stem cell apoptosis via Akt/p53 signaling in mice,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 307, no. 11, pp. G1033–G1043, 2014, doi: 10.1152/ajpgi.00151.2014.
- [87] M. Pinzani *et al.*, “Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis,” *Am. J. Pathol.*, vol. 148, no. 3, pp. 785–800, 1996.
- [88] J. C. Bonner, “Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 15, no. 4, pp. 255–273, 2004, doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.006.
- [89] K. Yanar, S. Aydın, U. Çakatay, M. Mengi, N. Buyukpınarbasılı, P. Atukeren *et al.*, “Protein and DNA oxidation in different anatomic regions of rat brain in a mimetic ageing model,” *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 109, no. 6, pp. 423–433, 2011, doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00756.x.
- [90] H. Wei, L. Li, Q. Song, H. Ai, J. Chu, and W. Li, “Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice,” *Behav. Brain Res.*, vol. 157, no. 2, pp. 245–251, 2005, doi: 10.1016/j.bbr.2004.07.003.
- [91] G. T. Berry, “Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia,” *GeneReviews®*, pp. 1–31, 1993, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301691>.
- [92] E. Morava, “Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 112, no. 4, pp. 275–279, 2014, doi: 10.1016/j.ymgme.2014.06.002.
- [93] A. I. Coelho, G. T. Berry, and M. E. Rubio-Gozalbo, “Galactose metabolism and health,” *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 18, no. 4, pp. 422–427, 2015, doi: 10.1097/MCO.0000000000000189.
- [94] A. F. Aydı, J. Çoban, and E. Betül-kalaz, “Carnosine and taurine treatments diminished brain oxidative stress and apoptosis in D-galactose aging model,” pp. 337–345, 2016, doi: 10.1007/s11011-015-9755-0.
- [95] C. Li, F. Tan, J. Yang, Y. Yang, Y. Gou, and S. Li, “Antioxidant Effects of Apocynum venetum Tea Extracts on d -Galactose-Induced Aging Model in Mice,” *antioxidants Artic.*, pp. 1–16, 2019.
- [96] F. Ullah, T. Ali, N. Ullah, and M. O. Kim, “Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain,” *Neurochem. Int.*, vol. 90, pp. 114–124, 2015, doi: 10.1016/j.neuint.2015.07.001.
- [97] K. F. Azman and R. Zakaria, “d-Galactose-induced accelerated aging model: an overview,” *Biogerontology*, vol. 20, no. 6, pp. 763–782, 2019, doi: 10.1007/s10522-019-09837-y.
- [98] Y. Zhou, Q. Xu, Y. Dong, S. Zhu, S. Song, and N. Sun, “Supplementation

of mussel peptides reduces aging phenotype, lipid deposition and oxidative stress in D-galactose-induce aging mice,” *J. Nutr. Heal. Aging*, vol. 21, no. 10, pp. 1314–1320, 2017, doi: 10.1007/s12603-016-0862-3.

- [99] P. Kar, “Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma in India,” *J. Clin. Exp. Hepatol.*, vol. 4, no. August, pp. S34–S42, 2014, doi: 10.1016/j.jceh.2014.02.155.
- [100] S. Gheena and D. Ezhilarasan, “Syringic acid triggers reactive oxygen species-mediated cytotoxicity in HepG2 cells,” *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 38, no. 6, pp. 694–702, 2019, doi: 10.1177/0960327119839173.
- [101] L. P. Fried and J. M. Guralnik, “Disability in older adults: Evidence regarding significance, etiology, and risk,” *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 45, no. 1, pp. 92–100, 1997, doi: 10.1111/j.1532-5415.1997.tb00986.x.
- [102] C. E. Furlong, J. Marsillacha, G. P. Jarvik, and L. G. Costa, “Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their Functions? Clement,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2017, doi: 10.1016/j.cbi.2016.05.036.Paraoxonases-1.
- [103] S. Karanth and C. Pope, “Carboxylesterase and A-Esterase Activities during Maturation and Aging : Relationship to the Toxicity of Chlorpyrifos and Parathion in Rats,” vol. 289, pp. 282–289, 2000.
- [104] I. Seres, G. Paragh, E. Deschene, T. Fulop, and A. Khalil, “Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging,” vol. 39, pp. 59–66, 2004, doi: 10.1016/j.exger.2003.08.001.
- [105] J. Camps, J. Marsillach, and J. Joven, “Measurement of serum paraoxonase-1 activity in the evaluation of liver function,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 15, no. 16, pp. 1929–1933, 2009, doi: 10.3748/wjg.15.1929.
- [106] J. Marsillach, G. Aragonès, B. Mackness, M. Mackness, A. Rull, R. Beltrán-DebónM *et al.*, “Decreased paraoxonase-1 activity is associated with alterations of high-density lipoprotein particles in chronic liver impairment,” *Lipids Health Dis.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2010, doi: 10.1186/1476-511X-9-46.
- [107] N. Ferré *et al.*, “Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases,” *J. Hepatol.*, vol. 45, no. 1, pp. 51–59, 2006, doi: 10.1016/j.jhep.2005.12.018.
- [108] W. Yi, , Y. Wen, F. Tan, X. Liu, H. Lan, H. Ye, B. Liu *et al.*, “Impact of NF-κB pathway on the apoptosis-inflammation-autophagy crosstalk in human degenerative nucleus pulposus cells,” *Aging (Albany. NY).*, vol. 11, no. 17, pp. 7294–7306, 2019, doi: 10.18632/aging.102266.
- [109] C. Franceschi and J. Campisi, “Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases,” *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 69, pp. S4–S9, 2014, doi: 10.1093/gerona/glu057.
- [110] H. Liu, X. Pei, J. Wang, Y. Zhou, L. Wang, and B. Qi, “Effect of loach paste on the liver and immune organs of D-galactose-induced aging mice,”

Food Agric. Immunol., vol. 29, no. 1, pp. 316–331, 2018, doi: 10.1080/09540105.2017.1376037.

- [111] X. Zhang, J.Z. Wu, Z.X Lin, Q.J. Yuan, Y.C. Li, J.L. Liang *et al.*, “Ameliorative effect of supercritical fluid extract of *Chrysanthemum indicum* Linné against D-galactose induced brain and liver injury in senescent mice via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 234, no. January, pp. 44–56, 2019, doi: 10.1016/j.jep.2018.12.050.
- [112] L. Zeng, L. Lina, Y. Penga, D. Yuana, S. Zhang *et al.*, “L-Theanine attenuates liver aging by inhibiting advanced glycation end products in D-galactose-induced rats and reversing an imbalance of oxidative stress and inflammation,” *Exp. Gerontol.*, vol. 131, no. December 2019, p. 110823, 2020, doi: 10.1016/j.exger.2019.110823.
- [113] A. S. Adler, T. L. A. Kawahara, E. Segal, and H. Y. Chang, “Reversal of aging by NFκB blockade,” *Cell Cycle*, vol. 7, no. 5, pp. 556–559, 2008, doi: 10.4161/cc.7.5.5490.
- [114] G. A. Macdonald, K. R. Bridle, P. J. Ward, N. I. Walker, K. Houghlum, D. K. George *et al.*, “Lipid peroxidation in hepatic steatosis in humans is associated with hepatic fibrosis and occurs predominately in acinar zone 3,” *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 16, no. 6, pp. 599–606, 2001, doi: 10.1046/j.1440-1746.2001.02445.x.
- [115] M. C. Haigis and L. P. Guarente, “Mammalian sirtuins - Emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction,” *Genes Dev.*, vol. 20, no. 21, pp. 2913–2921, 2006, doi: 10.1101/gad.1467506.
- [116] N. Braidy, A. Poljak, R. Grant, T. Jayasena, H. Mansour, T. Chan-Ling *et al.*, “Differential expression of sirtuins in the aging rat brain,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, no. MAY, pp. 1–16, 2015, doi: 10.3389/fncel.2015.00167.
- [117] B. J. North, B. L. Marshall, M. T. Borra, J. M. Denu, E. Verdin, and S. Francisco, “The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase,” vol. 11, pp. 437–444, 2003.
- [118] S. Mazumder, M. Barman, U. Bandyopadhyay, and S. Bindu, “Sirtuins as endogenous regulators of lung fibrosis: A current perspective,” *Life Sci.*, vol. 258, no. July, p. 118201, 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118201.
- [119] X. Z. Bai, J. Q. Liu, L. L. Yang, L. Fan, T. He, L. L. Su *et al.*, “Identification of sirtuin 1 as a promising therapeutic target for hypertrophic scars,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 173, no. 10, pp. 1589–1601, 2016, doi: 10.1111/bph.13460.
- [120] T. Ramirez, Y. M. Li, S. Yin, M. J. Xu, D. Feng, Z. Zhou *et al.*, “Aging aggravates alcoholic liver injury and fibrosis in mice by downregulating sirtuin 1 expression,” *J. Hepatol.*, vol. 66, no. 3, pp. 601–609, 2017, doi: 10.1016/j.jhep.2016.11.004.
- [121] M. Ponnusamy, M. A. Zhuang, X. Zhou, E. Tolbert, G. Bayliss *et al.*,

“Activation of sirtuin-1 promotes renal fibroblast activation and aggravates renal fibrogenesis,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 354, no. 2, pp. 142–151, 2015, doi: 10.1124/jpet.115.224386.

- [122] Nagalingam R. Sundaresan, “SIRT3 Blocks Aging-Associated Tissue Fibrosis in Mice by,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 36, no. 5, pp. 678–692, 2016, doi: 10.1128/MCB.00586-15.Address.
- [123] Y. Quan, W. Park, J. Jin, W. Kim, S. K. Park, and K. P. Kang, “Sirtuin 3 activation by honokiol decreases unilateral ureteral obstruction-induced renal inflammation and fibrosis via regulation of mitochondrial dynamics and the renal Nf- κ B-TGF- β 1/smad signaling pathway,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 2, 2020, doi: 10.3390/ijms21020402.
- [124] A.Kundu, P.Dey, J. H. Park, I.S. Kim, S. J. Kwack and H. S. Kim *et al.*, “EX-527 Prevents the Progression of High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis and Fibrosis by Upregulating SIRT4 in Zucker Rats” *Cells* 2020, 9, 1101; doi:10.3390/cells9051101
- [125] A. Zullo, F. P. Mancini, R. Schleip, S. Wearing, and W. Klingler, “Fibrosis: Sirtuins at the checkpoints of myofibroblast differentiation and profibrotic activity,” *Wound Repair Regen.*, vol. 29, no. 4, pp. 650–666, 2021, doi: 10.1111/wrr.12943.
- [126] X. Zhong, M. Huang, H.G. Kim, Y. Zhang, K. Chowdhury, W. Cai *et al.*, “SIRT6 Protects Against Liver Fibrosis by Deacetylation and Suppression of SMAD3 in Hepatic Stellate Cells,” *Cmgh*, vol. 10, no. 2, pp. 341–364, 2020, doi: 10.1016/j.jcmgh.2020.04.005.
- [127] M. Choudhury, X.Yin, K.J. Schaeferbauer, B. Roy, T. J. Kottom *et al.*, “SIRT7-mediated modulation of glutaminase 1 regulates TGF- β -induced pulmonary fibrosis,” *FASEB J.*, vol. 34, no. 7, pp. 8920–8940, 2020, doi: 10.1096/fj.202000564R.
- [128] S. Araki, Y. Izumiya, T. Rokutanda, A. Ianni, S. Hanatani *et al.*, “Sirt7 Contributes to Myocardial Tissue Repair by Maintaining Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway,” *Circulation*, vol. 132, no. 12, pp. 1081–1093, 2015, doi: 10.1161/Circulationaha.114.014821.
- [129] F. Bartoli-Leonard, F. L. Wilkinson, A. W. W. Langford-Smith, M. Y. Alexander, and R. Weston, “The Interplay of SIRT1 and Wnt Signaling in Vascular Calcification,” *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 5, no. December, pp. 1–9, 2018, doi: 10.3389/fcvm.2018.00183.
- [130] H. Zhao, Y. Luo, L. Chen, Z. Zhang, C. Shen, Y.Li *et al.*, “Sirt3 inhibits cerebral ischemia-reperfusion injury through normalizing Wnt/ β -catenin pathway and blocking mitochondrial fission,” *Cell Stress Chaperones*, vol. 23, no. 5, pp. 1079–1092, 2018, doi: 10.1007/s12192-018-0917-y.
- [131] S. C. Dryden, F. A. Nahhas, J. E. Nowak, and A. “-S. Goustin, M.A. Tainsky, Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle, Mol,” *Cell. Biol.*, vol. 23, no. 9, pp. 3173–3185, 2003, doi: 10.1128/MCB.23.9.3173.

- [132] M. C. Haigis and D. A. Sinclair, "Mammalian sirtuins: Biological insights and disease relevance," *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 5, no. 5, pp. 253–295, 2010, doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250.
- [133] A. Keskin-Aktan, K. G. Akbulut, Ç. Yazici-Mutlu, G. Sonugur, M. Ocal, and H. Akbulut, "The effects of melatonin and curcumin on the expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats," *Brain Res. Bull.*, vol. 137, no. January, pp. 306–310, 2018, doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.01.006.
- [134] G. Donmez and L. Guarente, "Aging and disease: Connections to sirtuins," *Aging Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 285–290, 2010, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00548.x.
- [135] V. Chopra, L. Quinti, J. Kim, L. Vollor, K. L. Narayanan, C. Edgerly *et al.*, "The Sirtuin 2 Inhibitor AK-7 Is Neuroprotective in Huntington's Disease Mouse Models," *Cell Rep.*, vol. 2, no. 6, pp. 1492–1497, 2012, doi: 10.1016/j.celrep.2012.11.001.
- [136] R. M. de Oliveira, H. V. Miranda, L. Francelle, R. Pinho, E. M Szego, R. Martinho *et al.*, "The mechanism of sirtuin 2-mediated exacerbation of alpha-synuclein toxicity in models of Parkinson disease," *PLoS Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 1–27, 2017, doi: 10.1371/journal.pbio.2000374.
- [137] P. Singh, P. S. Hanson, and C. M. Morris, "Sirtuin-2 Protects Neural Cells from Oxidative Stress and Is Elevated in Neurodegeneration," *Parkinsons. Dis.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/2643587.
- [138] C. K. Singh, G. Chhabra, M. A. Ndiaye, L. M. Garcia-Peterson, N. J. MacK, and N. Ahmad, "The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling," *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 28, no. 8, pp. 643–661, 2018, doi: 10.1089/ars.2017.7290.
- [139] K. G. Akbulut, S. H. Aktas, and H. Akbulut, "The role of melatonin, sirtuin2 and FoXO1 transcription factor in the aging process of colon in male rats," *Biogerontology*, vol. 16, no. 1, pp. 99–108, 2015, doi: 10.1007/s10522-014-9540-1.
- [140] S. Y. Park, M.J. Chung, J.Y. Son, H.H. Yun, J.M. Park *et al.*, "The role of Sirtuin 2 in sustaining functional integrity of the liver," *Life Sci.*, vol. 285, no. September, p. 119997, 2021, doi: 10.1016/j.lfs.2021.119997.
- [141] X. Tang, X.F. Chen, N.Y. Wang, X.M. Wang, S.T. Liang, W. Zheng *et al.*, "SIRT2 acts as a cardioprotective deacetylase in pathological cardiac hypertrophy," *Circulation*, vol. 136, no. 21, pp. 2051–2067, 2017, doi: 10.1161/Circulationaha.117.028728.
- [142] C. Li, Y. Zhou, J.T. Kim, T. Sengoku, M. C. Alstott, H. L. Weiss *et al.*, "Regulation of SIRT2 by Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer cells," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1868, no. 4, p. 118966, 2021, doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.118966.
- [143] J. Lin, B. Sun, C. Jiang, H. Hong, and Y. Zheng, "Sirt2 suppresses inflammatory responses in collagen-induced arthritis," *Biochem. Biophys.*

Res. Commun., vol. 441, no. 4, pp. 897–903, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.153.

- [144] K. M. Rothgiesser, S. Erener, S. Waibel, B. Lüscher, and M. O. Hottiger, “Correction: SIRT2 regulates NF-κB-dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310 (Journal of Cell Science (2010) 123 (4251–4258) DOI: 10.1242/jcs.073783),” *J. Cell Sci.*, vol. 132, no. 8, 2010, doi: 10.1242/jcs.232801.
- [145] D. M. Rostom, N. Attia, H. M. Khalifa, M. W. Abou Nazel, and E. A. El Sabaawy, “The Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles Versus Mesenchymal Stem Cells in Liver Damage,” *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 17, no. 4, pp. 537–552, 2020, doi: 10.1007/s13770-020-00267-3.
- [146] I. J. Song, Y.M. Yang, S. Inokuchi-Shimizu, Y.S. Roh, L. Yang and E. Seki “The contribution of toll-like receptor signaling to the development of liver fibrosis and cancer in hepatocyte-specific TAK1-deleted mice,” *Hhs Public Access*, vol. 142, no. 1, pp. 81–91, 2018, doi: 10.1002/ijc.31029.The.
- [147] K. G. Akbulut, B. Gönül, and H. Akbulut, “Differential effects of pharmacological doses of melatonin on malondialdehyde and glutathione levels in young and old rats,” *Gerontology*, vol. 45, no. 2, pp. 67–71, 1999, doi: 10.1159/000022065.
- [148] W. Dröge, “Free radicals in the physiological control of cell function,” *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 1, pp. 47–95, 2002, doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
- [149] D. Harman, “Free radical theory of aging: An update - Increasing the functional life span,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1067, no. 1, pp. 10–21, 2006, doi: 10.1196/annals.1354.003.
- [150] Z. Zhang, X. Yu, and X. Geng, “Protective role of three differently processed corn bran on glucose and lipid concentrations in d-galactose-induced mice model,” *J. Food Biochem.*, vol. 44, no. 8, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1111/jfbc.13281.
- [151] F. K. El-Baz, R. A. Hussein, G. A. R. A. Jaleel, and D. O. Saleh, “Astaxanthin-rich Haematococcus pluvialis Algal hepatic modulation in D-galactose-induced aging in rats: Role of Nrf2,” *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 8, no. 3, pp. 523–528, 2018, doi: 10.15171/apb.2018.061.
- [152] A. Ahangarpour, A. A. Oroojan, and M. Badavi, “Exendin-4 protects mice from D-galactose-induced hepatic and pancreatic dysfunction,” *Pathobiol. Aging Age-related Dis.*, vol. 8, no. 1, p. 1418593, 2018, doi: 10.1080/20010001.2017.1418593.
- [153] N. Ferré, J. Camps, M. Cabré, A. Paul, and J. Joven, “Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis,” *Metabolism.*, vol. 50, no. 9, pp. 997–1000, 2001, doi: 10.1053/meta.2001.25589.
- [154] M. Holzer, M. Trieb, V. Konya, C. Wadsack, A. Heinemann, and G. Marsche, “Aging affects high-density lipoprotein composition and

- function,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1831, no. 9, pp. 1442–1448, 2013, doi: 10.1016/j.bbalip.2013.06.004.
- [155] M. I. Mackness, S. Arrol, and P. N. Durrington, “Michael I. Mackness*, Sharon Arrol and Paul N. Durrington,” vol. 286, no. 1, pp. 2–4, 1991.
- [156] K. Sun, P. Yang, R. Zhao, Y. Bai, and Z. Guo, “Matrine attenuates D-galactose-induced aging-related behavior in mice via inhibition of cellular senescence and oxidative stress,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/7108604.
- [157] C. C. Huang, W. D. Chiang, W. C. Huang, C. Y. Huang, M. C. Hsu, and W. T. Lin, “Hepatoprotective effects of swimming exercise against D - galactose-induced senescence rat model,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/275431.
- [158] H. Jeong, Y. Liu, and H. S. Kim, “Dried plum and chokeberry ameliorate D-galactose-induced aging in mice by regulation of PI3k/Akt-mediated Nrf2 and Nf-kB pathways,” *Exp. Gerontol.*, vol. 95, pp. 16–25, 2017, doi: 10.1016/j.exger.2017.05.004.
- [159] W. Yan, D. Li, T. Chen, G. Tian, P. Zhou, and X. Ju, “Umbilical cord MSCs reverse D-galactose-induced hepatic mitochondrial dysfunction via activation of Nrf2/HO-1 pathway,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 40, no. 8, pp. 1174–1182, 2017, doi: 10.1248/bpb.b16-00777.
- [160] S. A. El-Wakeel, R. M. Rahmo, and H. S. El-Abhar, “Anti-fibrotic impact of Carvedilol in a CCl-4 model of liver fibrosis via serum microRNA-200a/SMAD7 enhancement to bridle TGF-β1/EMT track,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32309-1.
- [161] N. Hadzi-Petrushev, V. Stojkovski, D. Mitrov, and M. Mladenov, “D-galactose induced inflammation lipid peroxidation and platelet activation in rats,” *Cytokine*, vol. 69, no. 1, pp. 150–153, 2014, doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.006.
- [162] B. Lin, D. Xu, S. Wu, S. Qi, Y. Xu, X. Liu *et al.*, “Antioxidant Effects of *Sophora davidi* (Franch.) Skeels on d-Galactose-Induced Aging Model in Mice via Activating the SIRT1/p53 Pathway,” *Front. Pharmacol.*, vol. 12, no. December, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.754554.
- [163] Q. Li, J. Zeng, M. Su, Y. He, and B. Zhu, “Acetylshikonin from *Zicao* attenuates cognitive impairment and hippocampus senescence in D-galactose-induced aging mouse model via upregulating the expression of SIRT1,” *Brain Res. Bull.*, vol. 137, no. June 2017, pp. 311–318, 2018, doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.01.007.
- [164] A. Biernacka and N. G. Frangogiannis, “Aging and cardiac fibrosis,” *Aging Dis.*, vol. 2, no. 2, pp. 158–173, 2011.
- [165] C. Brandenberger and C. Mühlfeld, “Mechanisms of lung aging,” *Cell Tissue Res.*, vol. 367, no. 3, pp. 469–480, 2017, doi: 10.1007/s00441-016-2511-x.
- [166] Y. M. Chang, S. Tamilselvi, H.J Lin, C.C Tsai, Y.m. Lin, C. H. Day *et al.*,

- “Alpinia oxyphylla Miq extract ameliorates cardiac fibrosis associated with D-galactose induced aging in rats,” *Environ. Toxicol.*, vol. 34, no. 2, pp. 172–178, 2019, doi: 10.1002/tox.22671.
- [167] H. H. Hu, G. Cao, X. Q. Wu, N. D. Vaziri, and Y. Y. Zhao, “Wnt signaling pathway in aging-related tissue fibrosis and therapies,” *Ageing Res. Rev.*, vol. 60, no. February, 2020, doi: 10.1016/j.arr.2020.101063.
- [168] J. Li, D. Cai, X. Yao, Y. Zhang, L. Chen, P. Jing *et al.*, “Protective effect of ginsenoside Rg1 on hematopoietic Stem/Progenitor cells through attenuating oxidative stress and the Wnt/ β -Catenin signaling pathway in a mouse model of D-Galactose-induced aging,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 6, 2016, doi: 10.3390/ijms17060849.
- [169] X. Mu, Y. Zhang, J. Li, J. Xia, X. Chen, P. Jing *et al.*, “Angelica Sinensis Polysaccharide Prevents Hematopoietic Stem Cells Senescence in D-Galactose-Induced Aging Mouse Model,” *Stem Cells Int.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/3508907.
- [170] S. J. Mitchell, A. Martin-Montalvo, E. M. Mercken, H. H. Palacios, T. M. Ward *et al.*, “The SIRT1 activator SRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet,” *Cell Rep.*, vol. 6, no. 5, pp. 836–843, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.031.
- [171] S. Singh, A. K. Singh, G. Garg, and S. I. Rizvi, “Fisetin as a caloric restriction mimetic protects rat brain against aging induced oxidative stress, apoptosis and neurodegeneration,” *Life Sci.*, vol. 193, no. November 2017, pp. 171–179, 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.004.
- [172] Y. Y. Kim, G. Hur, S. W. Lee, S. J. Lee, S. Lee *et al.*, “AGK2 ameliorates mast cell-mediated allergic airway inflammation and fibrosis by inhibiting Fc ϵ RI/TGF- β signaling pathway,” *Pharmacol. Res.*, vol. 159, no. June, 2020, doi: 10.1016/j.phrs.2020.105027.
- [173] H. Jaeschke, C. Cover, and M. L. Bajt, “Role of caspases in acetaminophen-induced liver injury,” *Life Sci.*, vol. 78, no. 15, pp. 1670–1676, 2006, doi: 10.1016/j.lfs.2005.07.003.
- [174] C. Iida, K. Fujii, E. Koga, Y. Washino, I. Ichi, and S. Kojo, “Inhibitory effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on necrosis and oxidative stress caused by D-galactosamine in the rat liver,” *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 53, no. 2, pp. 160–165, 2007, doi: 10.3177/jnsv.53.160.
- [175] P. Deol, J. Yang, C. Morisseau, B. D. Hammock, and F. M. Sladek, “Dimethyl sulfoxide decreases levels of oxylipin diols in mouse liver,” *Front. Pharmacol.*, vol. 10, no. MAY, pp. 1–7, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00580.
- [176] R. C. Lind and A. J. Gandolfi, “Hepatoprotection by dimethyl sulfoxide: II. Characterization of optimal dose and the latest time of administration for effective protection against chloroform and bromobenzene induced injury,” *Exp. Toxicol. Pathol.*, vol. 51, no. 6, pp. 537–543, 1999, doi: 10.1016/S0940-2993(99)80134-1.

- [177] G. Lo Sasso, K.J. Menzies, A. Mottis, A. Piersigilli, A. Perino, H. Yamamoto *et al.*, “SIRT2 deficiency modulates macrophage polarization and susceptibility to experimental colitis,” *PLoS One*, vol. 9, no. 7, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0103573.
- [178] T. F. Pais, E.M Szego, O. Marques, L. Miller-Fleming, P. Antas, P. Guerreiro *et al.*, “The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglial activation and brain inflammation,” *Embo J.*, vol. 32, no. 19, pp. 2603–2616, 2013, doi: 10.1038/emboj.2013.200.
- [179] N. Sola-Sevilla, A. Ricobaraza, R. Hernandez-Alcoceba, M. S. Aymerich, R. M. Tordera, and E. Puerta, “Understanding the potential role of sirtuin 2 on aging: Consequences of sirt2.3 overexpression in senescence,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 6, pp. 1–23, 2021, doi: 10.3390/ijms22063107.
- [180] I. Amigo and A. J. Kowaltowski, “Dietary restriction in cerebral bioenergetics and redox state,” *Redox Biol.*, vol. 2, no. 1, pp. 296–304, 2014, doi: 10.1016/j.redox.2013.12.021.
- [181] J. Chen *et al.*, “SIRT2 Overexpression in Hepatocellular Carcinoma Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition by Protein Kinase B/Glycogen Synthase Kinase-3 β / β - Catenin Signaling,” no. 2013, pp. 2287–2298, 2012, doi: 10.1002/hep.26278.
- [182] Z. Z. Piracha *et al.*, “Sirtuin 2 Isoform 1 Enhances Hepatitis B Virus RNA Transcription and DNA Synthesis through the AKT/GSK-3 β / β -Catenin Signaling Pathway,” *J. Virol.*, vol. 92, no. 21, pp. 1–21, 2018, doi: 10.1128/jvi.00955-18.

8.ÖZET

D-GALAKTOZ İLE İNDÜKLENMİŞ YAŞLANMA MODELİNDE GELİŞEN KARACİĞER FİBROZİSİNDE SIRT2 İNHİBİSYONUNUN ETKİSİ (Uzmanlık Tezi)

Aslı Nur BAHAR
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mart 2022

ÖZET

Çalışmamızda, D-galaktozun neden olduğu yaşlanma modelinde, AGK-2 ile yapılan SIRT2 inhibisyonunun karaciğer fonksiyonlarına etkisi, fibrozis ve inflamasyon gibi patolojik süreçlerdeki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada toplam 32 adet 3 aylık sprague dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlar; kontrol, %4DMSO+PBS+DMSO+D-GAL, D-GAL, D-GAL+AGK2 şeklinde 4 gruba ayrıldı. Deney ve kontrol gruplarına 10 hafta D-galaktoz (150 mg / kg / gün), spesifik SIRT2 inhibitörü olarak AGK-2 (10µM/bw), %4DMSO+PBS ve serum fizyolojik uygulaması yapıldı. Alınan karaciğer dokularında; biyokimyasal parametreler (ALT, AST, trombosit miktarı, LDH, HDL, VLDL, total kolesterol, trigliserit) çalışıldı. AST-ALT Oranı, AST-Trombosit Oranı İndeksi (APRI), karaciğer indeksi (karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı) hesaplandı. Yaşlanma modelinde karaciğer SIRT2 düzeyleri western blot ve immünohistokimyasal analiz ile belirlendi. Paraksonaz plazma ve doku düzeyleri, NFκB, IL 1β ve IL 6 düzeyi ELISA ile çalışıldı. TGF β, β katenin, PDGFBB genlerinin ifade düzeyi gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlendi. Histolojik fibrotik değişiklikler (Kolajen 1,3 ve α-SMA, Fibronektin, β katenin) immünohistokimyasal analiz ile belirlendi. Kolajen lif yoğunluğu değerlendirmesi ve histopatolojik skorlama yapıldı. Bu parametrelerin SIRT2 ile ilişkisi kuruldu. İstatiksel değerlendirme için One-Way ANOVA testi kullanıldı (p<0,05). Bulgularımız D-Galaktoz uygulaması ile AST, AST-ALT Oranı, APRI, SIRT2 protein ekspresyonu, IL1β, TGF β, β katenin, Tip I kolajen, Tip III kolajen ve α-SMA, kolajen lif yoğunluğu ve histopatolojik skorun arttığı, ALT ve lipid panelinin değişmediği, paraksonaz plazma ve NFκB düzeyinin azaldığı görüldü. AGK-2 uygulamasının ise; karaciğerde yaşlanmaya bağlı görülen fibrotik değişiklikleri tersine çevirmede ve yaşlanmaya bağlı fonksiyon kayıplarını iyileştirmede etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: D-Galaktoz, Fibrozis, SIRT2 inhibisyonu, TGFβ, β catenin, karaciğer

9.ABSTRACT

EFFECT OF SIRT2 INHIBITION ON HEPATIC FIBROSIS THAT DEVELOPS IN THE D-GALACTOSE-INDUCED AGING MODEL (Residency Thesis)

Aslı Nur BAHAR

GAZİ UNIVERSITY
FACULTY OF MEDİCİNE DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY
March 2022

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the role of SIRT2 inhibition with AGK-2 in pathological processes such as fibrosis and inflammation in the aging model caused by D-galactose. A total of 32, 3-month-old Sprague Dawley rats were used. Rats; were divided into 4 groups as control, %4DMSO+PBS +D-GAL, D-GAL, D-GAL+AGK2. D-galactose (150 mg / kg / day), AGK-2 (10 μ M/bw), %4DMSO+PBS and saline as a specific SIRT2 inhibitor were applied to the experimental and control groups for 70 days. In the liver tissues; biochemical parameters (ALT, AST, platelet, LDH, HDL, VLDL, total cholesterol, triglyceride) were studied. AST-ALT Ratio, AST-Platelet Ratio Index (APRI), liver index (liver weight/body weight) were calculated. Liver SIRT2 levels in an aging model were determined by western blot and immunohistochemical analysis. Paraoxonase plasma and tissue levels, NF κ B, IL 1 β and IL 6 levels were studied by ELISA. Expression level of TGF β , β catenin, PDGFBB genes determined by real-time-polymerase chain reaction. Histological fibrotic changes (Collagen1,3and α -SMA, Fibronectin, β -catenin) were determined by immunohistochemical analysis. Collagen fiber density assessment and histopathological scoring were performed. These parameters were associated with SIRT2. One-Way ANOVA test was used for statistical evaluation (p<0.05). Our findings showed that AST, AST-ALT Ratio, APRI, SIRT2 protein expression, IL1 β , TGF β , β catenin, Type I collagen, Type III collagen and α -SMA, collagen fiber density and histopathological score increased with D-Galactose application. It was observed that ALT and lipid panels did not change, and paraoxonase plasma and NF κ B levels decreased. As for the AGK-2 application; We think that it may be effective in reversing aging-related fibrotic changes in the liver and improving aging-related loss of function.

Key Words: D-Galactose, Fibrosis, SIRT2 inhibition, TGF β , β catenin, liver

10.EKLER

YEREL ETİK KURULU: 04.05.2021-20.04.2021



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ**
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-80295
Konu : Değerlendirme ve Onay

04.05.2021

Sayın Prof. Dr. Kazime Gonca AKBULUT
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu K.Gonca AKBULUT, Aşlı Nur BAHAR, Arzu KESKİN AKTAN, Fatma Gizem SONUGÖR ve Saadet Özgen AKARCA DİZAKAR'dan oluşan, G.Ü.ET-21.032 kod numaralı ve "D-galaktoz ile indüklenmiş yaşlanma modelinde gelişen karaciğer fibrozisinde, SIRT2 inhibisyonunun etkisi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.032 and entitled "*Effect of SIRT2 Inhibition on Hepatic Fibrosis That Develops in the D-Galactose-Induced Aging Model*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

NOT : Daha önce onay alan 20.011 kod numaralı çalışmada kullanılan 32 adet Sprague Dawley Sıçan'ın dokuları kullanılacaktır.

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Bu belge, görevli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu : B54ZK6553Y
Belge Takip Adresi : <http://belgedogrulama.gazi.edu.tr/belgedogrulama.aspx>



Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No: 6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel: 0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks: 0 (312) 202 38 76
e-Posta: badyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi: <http://badyek.gazi.edu.tr/>
Kop Adresi: gazuniversonesi@n01.kop.tr

Bilgi için: Murat Öltner
Genel Etik Sorumlusu
Telefon No: 202 20 57



11.ÖZGEÇMİŞ

Adı: ASLI NUR

Soyadı: BAHAR

Doğum Yeri ve Tarihi: ACIPAYAM 1992

Eğitimi:

Tıpta Uzmanlık Eğitimi:

2018-2022 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AbD.

Tıp Eğitimi:

2015-2017 Gülhane Üniversitesi Tıp Fakültesi

2011-2014 Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi

Lise

2006-2010 Afyon Anadolu Öğretmen Lisesi

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

-Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (TFBD)

Bilimsel Etkinlikler:

Kurs ve Eğitimler:

- Tıpta İletişim Becerileri Temel Eğitimi, 19-20 Eylül 2019
- Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, 14.01.2019- 22.01.2019
- TÜBİTAK 2237B Bilimsel Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı kapsamında düzenlenen Sağlık Bilimleri Alanlarında Araştırma Projesi Hazırlama ve Yürütme Eğitimi Kursu, 11-13 Temmuz 2020
- TÜBİTAK 2237A Bilimsel Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı kapsamında düzenlenen Deney Hayvanlarına Sterotaksik

Uygulamaları Kursu, 22-25 Ekim 2020

- TÜBİTAK 2237A Bilimsel Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı kapsamında Tıp Fakültesi Lisansüstü Öğrencilerine Yönelik Laboratuvar Hayvanlarında İleri Düzey Deneysel Araştırmalar Kursu, 31 Mayıs- 03 Haziran 2021
- Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Ar-Ge Projesi Yazma Uygulamalı Eğitimi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, 3 Eylül 2021
-

Bilimsel Etkinlikler:

- 45. Ulusal Fizyoloji Kongresi 31 Ekim-1 Kasım 2019
- 46. Ulusal Fizyoloji Kongresi 8-10 Ekim 2021

Yayınlar:

- Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:
- **Bahar, Aslı Nur;** Muratoğlu, Saide; Keskin-Aktan , Arzu; Akbulut, K.G (2019). The Effect of Salermide Administration on The Oxidative Stress in The Kidney Tissue During Aging. ACTA PHYSIOLOGICA Volume:227 Special Issue: SI Supplement:722 Pages: 120 Meeting Abstract: P138. (45. Ulusal Fizyoloji Kongresi, PS138, Palm Wings Ephesus Hotel Kongre Merkezi, 31 Ekim-3 Kasım 2019, Kuşadası, Aydın)
- **Bahar, Aslı Nur;** Keskin-Aktan , Arzu; Akbulut, K.G (2021). The Effect of Curcumin Administration on Oxidative Stress in Thymus Tissue and Plasma in Aging. ACTA PHYSIOLOGICA Volume:234 Special Issue: SI Supplement: 724 Meeting Abstract: P18. (46. Ulusal Fizyoloji Kongresi, PS18, 8-10 Ekim 2021)