T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PANKREATİT VE HİPERLİPİDEMİ MODELLERİNDE ER STRES DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Gamze ÇAKMAK

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr Nuray BOSTANCIERİ

GAZİANTEP

TEMMUZ-2024

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PANKREATİT VE HİPERLİPİDEMİ MODELLERİNDE ER STRES DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Gamze ÇAKMAK

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr Nuray BOSTANCIERİ

GAZİANTEP

TEMMUZ-2024

Bu tez Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TF.UT.22.70 proje numarası ile desteklenmiş.

TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZİN ADI : Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Pankreatit ve Hiperlipidemi Modellerinde ER Stres Düzeyinin Araştırılması

Dr.Gamze ÇAKMAK

25.07.2024

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof.Dr. Şevki Hakan EREN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr Serap S. İNALÖZ
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Doç.Dr. Nuray BOSTANCIERİ
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof.Dr. Serap S. İNALÖZ
2. Prof.Dr. Mehmet YÜNCÜ
3. Doç.Dr. Nuray BOSTANCIERİ

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji eğitim hayatımda ve tez sürecimde emeği geçen başta tez danışmanım Doç. Dr Nuray BOSTANCIERİ'ye ve bölümümüzdeki diğer tüm hocalarıma; tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen, zorlukları birlikte göğüslediğimiz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı asistan arkadaşlarıma; q RT-PCR çalışmasını birlikte yürüttüğümüz Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr Mehmet ŞAHİN ve İpek TÜRKDÖNMEZ'e; bölümümü sevmemde büyük katkısı olan ve tanışmaktan mutluluk duyduğum Uzm.Dr Miyase Erdoğan Eroğlu'na; tecrübesiyle, destekleriyle Gazi Tıp Fakültesi'nden bu yana ablalık yapmaya devam eden Doç.Dr Özen AKARCA DİZAKAR'a; tanışmamız sadece rotasyonla kalmayan, sürekli fikir alışverişi yapabildiğim Patoloji Anabilim Dalı asistan arkadaşlarım ve teknisyenlerine teşekkür ederim. Tezimi destekleyen Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederim.

Tüm süreçte yanımda olduğunu bildiğim ve benimle tüm stresimi paylaşan sevgili annem ve babama, aynı yollardan yürüdüğüm sevgili ablam Op.Dr. Gizem ASLAN'a, beni her zaman anlayışla dinleyip yol gösteren kardeşim Vet.Hek Gözde ÇAKMAK'a, varlıklarıyla tüm stresimi alan Kül'e ve artık yanımızda olmasa da hep bizimle olan Ares'e çok teşekkür ederim.

Dr.Gamze ÇAKMAK

Temmuz 2024

ÖZET

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PANKREATİT VE HİPERLİPİDEMİ MODELLERİNDE ER STRES DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Gamze ÇAKMAK
Tıpta Uzmanlık Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı, Doç.Dr. Nuray BOSTANCIERİ
Temmuz 2024

Amaç: Akut pankreatit yalnızca karın ağrısı gibi hafif semptomlarla geçirilebileceği gibi mortaliteyle de sonuçlanabilen patofizyolojisi tam olarak ortaya konamamış inflamatuar bir hastalıktır. Hipertrigliseridemi gibi birçok etyolojik faktör akut pankreatite neden olabilmektedir. Hipertrigliseridemik pankreatit kliniği pankreatitten daha ağır seyredebilmektedir. Yine hipertrigliseridemik pankreatit patofizyolojisi de tam olarak ortaya konamamıştır. Yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikimi sonucu endoplazmik retikulum stresi oluşmaktadır. Bu durumda katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan bir başa çıkma mekanizması devreye girer. UPR ile pankreatit ve hiperlipidemi bağlantısı gösterilmiştir. Çalışmamızda pankreasta akut pankreatit ile oluşan doku hasarına hiperlipideminin yaptığı etkiyi ve endoplazmik retikulum stresi ile bağlantısını ortaya koymak istedik.

Gereç ve yöntem: Çalışmamızda otuz iki adet sprague-dawley cinsi sıçanla her grupta sekiz hayvan olacak şekilde dört grup oluşturduk. Sıçanlarda poloksomer-407 ile hiperlipidemi, cerulein ile pankreatit ve her iki uygulama birden yapılarak hiperlipidemik pankreatit oluşturuldu. Sıçan pankreas dokularına hematoksilen eozin boyama uygulandı ve ışık mikroskobik skorlanarak değerlendirme yapıldı. Pankreas dokularına immünohistokimyasal olarak GRP78, IRE-1, XBP-1 antikorları uygulandı ve görsel açıdan değerlendirildi. qRT-PCR ile GRP78, IRE-1α, sXBP-1 mrna değerleri rölatif olarak değerlendirildi.

Bulgular: Hiperlipidemik pankreatit grubundaki pankreas hasarının pankreatit grubundan daha fazla olduğu bulundu. GRP78 mrna miktarı rölatif olarak hiperlipidemik pankreatit grubunda pankreatit grubundan yüksek bulunurken bu fark anlamlı değildi. IRE-1α, sXBP-1genlerinin ise tüm gruplar için net bir şekilde ekspresyonu ortaya konamadı. İmmün boyama ile elde edilen görüntüler pcr sonuçlarına paralel şekildeydi.

Sonuç: Hiperlipideminin akut pankreatitte pankreas hasarını arttıran bir durum olduğu ortaya kondu ancak akut pankreatit ve hiperlipidemik akut pankreatit gruplarında ER stres belirteçleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilemedi.

Anahtar kelimeler: Endoplazmik retikulum stresi, hiperlipidemi, pankreatit**,** rat

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ER STRESS LEVEL IN EXPERIMENTAL PANCREATITIS AND HYPERLIPIDEMIA MODELS CREATED IN RATS

Dr.Gamze ÇAKMAK
Residency Thesis in Medicine, Department of Histology and Embriyology
Supervisor, Doç. Dr Nuray BOSTANCIERİ
Temmuz 2024

Objective: Acute pancreatitis is an inflammatory disease whose pathophysiology has not been fully elucidated and may only be treated with mild symptoms such as abdominal pain or may result in mortality. Many etiological factors such as hypertriglyceridemia can cause pancreatitis. Hypertriglyceridemic pancreatitis may be more severe than pancreatitis. Again, the pathophysiology of hypertriglyceridemic pancreatitis has not been fully revealed. Endoplasmic reticulum stress occurs as a result of the accumulation of misfolded or unfolded proteins. In this case, a coping mechanism called the unfolded protein response (UPR) comes into play. A connection between UPR and pancreatitis and hyperlipidemia has been shown. In our study, we wanted to reveal the effect of hyperlipidemia on tissue damage in the pancreas with pancreatitis and its connection with endoplasmic reticulum stress.

Materials and methods: In our study, we created four groups with thirty-two Sprague-Dawley rats, with eight animals in each group. In rats, hyperlipidemia was caused by poloxomer-407, pancreatitis was caused by cerulein and hyperlipidemic pancreatitis was caused by both applications. Rat pancreatic tissues were evaluated by applying hematoxylin and eosin staining and light microscopic scoring. Pancreatic tissues were evaluated visually by immunohistochemically applying GRP78, IRE-1, XBP-1 antibodies. GRP78, IRE-1α, sXBP-1 mRNA values were evaluated relatively by qPCR.

Results: It was found that pancreatic damage in the hyperlipidemic pancreatitis group was greater than in the pancreatitis group. While the amount of GRP78 mRNA was found to be relatively higher in the hyperlipidemic pancreatitis group than in the pancreatitis group, this difference was not significant. Clear expression of IRE-1α and sXBP-1 genes could not be revealed for all groups. The images obtained by immunostaining were parallel to the PCR results.

Conclusion: It was revealed that hyperlipidemia is a condition that increases pancreatic damage in pancreatitis, but no significant difference could be detected in terms of ER stress markers between the pancreatitis and hyperlipidemic pancreatitis groups.

Keywords: Endoplasmic reticulum stress, hyperlipidemia, pancreatitis, rat

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
SİMGE VE KISALTMALAR ix
ŞEKİLLER x
TABLOLAR xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1 Pankreas 3
2.1.1 Pankreas Histolojisi 3
2.1.2 Pankreas Embriyolojisi 7
2.1.3 Pankreas Anatomisi 9
2.1.4 Sıçan Pankreas Anatomisi 11
2.2. Akut Pankreatit 12
2.2.1 Akut Pankreatit patogenezi 13
2.2.2 Akut Pankreatit Etyolojisi 15
2.2.3 Akut Pankreatit Tanısı ve Klinik Bulgular 16
2.2.4 Akut Pankreatit Tedavi ve Komplikasyonları 16
2.3 Plazma Lipoproteinleri ve Apoproteinler 17
2.4 Lipidlerin Sindirimi ve Emilimi 20
2.5 Hipertrigliseridemi 22
2.6 Hipertrigliseridemik Akut Pankreatit 23
2.7 ER Stres 24
2.7.1 ER Stres IRE1/XBP-1 Kolu 25
2.7.2 Pankreatitte ER Stres 26
2.7.3 Hiperlipidemide ER stres 27
2.8 Akut Pankreatit ve Hiperlipidemi Deney Modelleri 28
2.8.1 Cerulein ile İndüklenen Akut Pankreatit Modeli 28
2.8.2 Poloxomer-407 ile Oluşturulan Hiperlipidemi Modeli 29

3.GEREÇ VE YÖNTEM 30
3.1 Deney Grupları 31
3.2 Örneklerin Alınması 31
3.3 Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması 35
3.4 Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile Boyanması Ve Skorlanması 35
3.5 Pankreas Dokusunun İmmünohistokimyasal İncelenmesi 37
3.6 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 39
3.6.1 Dokudan RNA izolasyonu 39
3.6.2 cDNA Sentezi 40
3.6.3 qRT-PCR Analizleri 41
3.7 İstatiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi 42
4. BULGULAR 43
4.1 Biyokimyasal Bulgular 43
4.2 Histopatolojik Bulgular 46
4.2.1 Hemotoksilen Eozin Boyama ve Skorlama Bulguları 46
4.2.2 İmmünohistokimya Boyama Deney Bulguları 56
4.3 qRT-PCR Analiz Sonuçları 62
4.3.1 GRP78 qRT-PCR Analiz Sonuçları 62
4.3.2 IRE-1α ve sXBP-1 qRT-PCR Analiz Sonuçları 63
5.TARTIŞMA 64
6.SONUÇ VE ÖNERİLER 73
7.KAYNAKLAR 74

SİMGE VE KISALTMALAR

ANC: Akut nekrotik koleksiyon
AP: Akut Pankreatit
AP-1: Aktivatör protein 1
CCK: Kolesistokinin
ER: Endoplazmik retikulum
ERAD: ER ile ilgili bozunma
ERCP: Endoskopik retrograde kolanjiopankreotografi
ERS: Endoplazmik retikulum stresi
GH: Growth Hormon
GRP78: Glukoz regüle protein 78
H_2O_2: Hidrojen peroksit
HCO_3^- : Bikarbonat
HDL: Yüksek yoğunluklu lipoproteinler
H-E: Hematoksilen eozin
HTG: Hipertrigliseridemi
HTG-AP: Hipertrigliseridemik akut pankreatit
IL-1: İnterlökin 1
IL-2: İnterlökin 2
IL-6: İnterlökin 6
IRE1: İnositol gerektiren enzim 1
JAB1: Jun aktivasyon alanı bağlayıcı protein 1
JIK: c-Jun N-terminal inhibitör kinazı
LCAT: Kolesterol açiltransferaz
LDL: Düşük yoğunluklu lipoproteinler
LPL: Lipoprotein lipaz
NF-κB: Nuclear Factor kappa B
PERK: PKR benzeri ER kinaz
PI-3: Fosfotidilinositol 3
PKR: Pankreatik ER kinaz
PP: Pankreatit polipeptit
qRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RIDD: Regüle edilmiş IRE1'e bağlı mRNAların bozunması
SIRS: Sistemik inflamatuar cevap sendromu
sXBP-1: Splicinge uğramış XBP-1
TAG: Triaçilgliserol
TG: Trigliserit
TNF α: Tümör Nekroz Faktör alfa
TSH: Tiroid Stimülan Hormon
UPP: Ubikuitin proteazom yolu
UPR: Katlanmamış protein yanıtı
VIP: Vazoaktif intestinal peptid
VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler
WOPN: Duvarlı pankreatik nekroz
XBP-1: X-box bağlayıcı protein

ŞEKİLLER

Sayfa No:

Şekil 2.1: Ekzokrin pankreasın şematize edilmiş hali……..4
Şekil 2.2: Hematoksilen ezoinle boyanmış pankreas kesiti…….....5
Şekil 2.3: Langerhans adacık hücrelerinin diyagramı……...7
Şekil 2.4: Pankreasın gelişimi…….....9
Şekil 2.5: Pankreasın komşulukları…….....10
Şekil 2.6: Pankreatik kanal…….....11
Şekil 2.7: Sıçan pankreası bölümleri…….....12
Şekil 2.8: Lipoprotein yapısı…….....18
Şekil 2.9: Lipoproteinlerin elektroforez hareketleri…….....19
Şekil 2.10: Dolaşımdaki şilomikronun metabolizması…….....21
Şekil 2.11: UPR (Katlanmamış protein yanıtı)…….....26
Şekil 2.12: Hiperlipideminin ER strese Etkisi……27
Şekil 3.1: Sıçan pankreası çıkarılması…….....31
Şekil 3.2 Deney Protokolü……..32
Şekil 3.3 : Sıçan pankreasının dalak, duedonum ve mide arkasına yapışık şekilde yaygın omentum benzeri görüntüsü ……...33
Şekil 3.4: Duedonumun bir kısmı ve dalakla birlikte çıkarılmış pankreas.....33
Şekil 3.5: Hiperlipidemi grubu rattan alınan kan, santrifüj edilmiş halde……..34
Şekil 3.6: Hiperlipidemi grubundan bir rat kan serumu, ependorfa alınmış halde.....34
Şekil 4.1: Akut pankreatit ve Hiperlipidemik akut pankreatit grubu amilaz, lipaz değerleri…….....44
Şekil 4.2: Asiner dejenerasyon skoru gruplar arası karşılaştırması……47
Şekil 4.3: İnfiltrasyon skoru gruplar arası karşılaştırması …….....47
Şekil 4.4 Ödem skoru gruplar arası karşılaştırması……48
Şekil 4.5: Kanama skoru gruplar arası karşılaştırması……49
Şekil 4.6: Toplam skor gruplar arası karşılaştırması……..49
Şekil 4.7: Kontrol grubu pankreas dokusu (H-Ex20)……53
Şekil 4.8: Akut pankreatit grubu ödem ve infiltrasyon (H-Ex20)……..53
Şekil 4.9: Akut pankreatit grubu ödem,infiltrasyon ve asiner dejenerasyon (H-Ex20)…….....54
Şekil 4.10: Hiperlipidemi grubu kuvvetli hemoraji (H-Ex40)……....54
Şekil 4.11: Hiperlipidemik akut pankreatit grubu Hemoraji, infiltrasyon (H-Ex20)…….55
Şekil 4.12: Hiperlipidemik akut pankreatit infiltrasyon, asiner dejenerasyon (H-Ex20)…….....55
Şekil 4.13: Hiperlipidemik akut pankreatit infiltrasyon, asiner dejenerasyon, Hemoraji (H-Ex20)…….56
Şekil 4.14: GRP 78 rat beyin dokusu pozitif kontrol X100……57
Şekil 4.15: IRE-1 sıçan çizgili kas doku pozitif kontrol x100……...57
Şekil 4.16: Sıçan böbrek dokusu XBP-1 pozitif kontrol X100……...58
Şekil 4.17: Kontrol grubu GRP 78 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100……58

Sayfa No:

Şekil 4.18: Akut pankreatit grubu GRP 78 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100……...59
Şekil 4.19: Hiperlipidemi grubu GRP 78 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100……59
Şekil 4.20: Hiperlipidemik akut pankreatit grubu GRP 78 antikoru ile
İmmün boyama A.x40, B.x100……...59
Şekil 4.21: Kontrol grubu IRE1 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100…….....60
Şekil 4.22: Akut Pankreatit grubu IRE1 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100…….....60
Şekil 4.23: Hiperlipidemi grubu IRE1 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100……60
Şekil 4.24: Hiperlipidemik akut pankreatit grubu IRE1 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100……61
Şekil 4.25: Kontrol grubu XBP-1 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100……61
Şekil 4.26: Akut pankreatit grubu XBP-1 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100……61
Şekil 4.27: Hiperlipidemi grubu XBP-1 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100……62
Şekil 4.28: Hiperlipidemik akut pankreatit grubu XBP-1 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100……62
Şekil 4.29: GRP 78 rölatif mrna karşılaştırması……63

TABLOLAR

Sayfa No:

Tablo 2.1: Lipoproteinler ve Özellikleri……18
Tablo 2.2: Apolipoproteinler……..20
Tablo 3.1: Doku Takibi Protokolü ……35
Tablo 3.2: Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama Protokolü…….....36
Tablo 3.3: Pankreas Hasarı Skorlama…….37
Tablo 3.4: cDNA sentezi kullanılan malzeme miktarları……...40
Tablo 3.5: cDNA sentez aşamaları…….40
Tablo 3.6: Kullanılan genler ve baz dizileri…….....41
Tablo 3.7: Primerlerin stok oluşturmak için sulandırılma miktarları…….....41
Tablo 3.8: qRT-PCR için kullanılan madde ve miktarları……..42
Tablo 3.9: qRT- PCR Aşamaları…….42
Tablo 4.1: Kan Biyokimya Sonuçları…….45
Tablo 4.2: Kan lipit değerleri gruplar arası çoklu karşılaştırmalar…….46
Tablo 4.3: Pankreas enzimleri gruplar arası çoklu karşılaştırma…….....46
Tablo 4.4: Histolojik skorlama değerleri……51
Tablo 4.5: Histolojik skorlama çoklu karşılaştırmalar…….....52

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akut pankreatit dünya çapında artan insidansa sahip, potansiyel olarak yaşamı tehdit eden akut inflamatuar bir durumdur(1). Kliniği akut başlangıçlı, şiddetli karın ağrısı ve bazen de karın ağrısına eşlik eden bulantı, kusma, oral alım bozukluğu şeklindedir. Patogenezinin tam olarak kavranamaması nedeniyle kesin ve spesifik tedavisi geliştirilememiştir. Bu sebeple mortalitesi yüksek bir hastalıktır(2).Tanı bile konamadan ölümle sonuçlanabilir(3). Etyolojisinde ise safra taşları, alkol, ilaçlar, travma, iskemi, hiperglisemi, hiperkalsemi, oddi sfinkteri disfonksiyonu, tümörler, hipertrigliseridemi gibi birçok faktör etkili olabilmektedir(4).

Hipertrigliseridemik akut pankreatit tüm akut pankreatitlerin %1.3-3.8'ini oluşturur(5). Hiperlipidemik hastaların ise %12-38'inde akut pankreatit görülmektedir(6). Hipertrigliseridemik akut pankreatit kliniği genel olarak akut pankreatit kliniğine benzerken daha şiddetli seyrettiği görülmektedir(7). Buna karşılık hiperlipidemik akut pankreatit patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır(8).

Endoplazmik retikulum proteinlerin katlanması ve sentezlenmesinde görevli bir organdır. Protein sentezi ve katlanması kontrol altında tutulan hassas bir süreçtir. Katlanmamış proteinlerin birikip endoplazmik retikulum(ER) dengesinin bozulmasına endoplazmik retikulum stresi denir(9, 10). ER stresi sırasında hücre, katlanmamış proteinlerin daha fazla birikmesini önleyecek bir tepki mekanizması olarak katlanmamış protein tepkisi (UPR) oluşturur. UPR, katlanmamış protein birikimini önlemeye çalışır. ER ile ilişkili bozunma (ERAD) yoluyla yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılmasını arttırır(11). ERAD, ER lümeni ve ER zarındaki proteinlerin sitoplazmadaki ubikuitin-proteazom sistemi yoluyla parçalanmasına yönelik bir sistemdir(12). Memeli hücrelerindeki UPR üç ana ER transmembran reseptörü aracılığıyla çalışır: inositol gerektiren enzim 1 (IRE-1), pankreatik ER kinaz (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) (9, 13). Stressiz bir durumda bu üç transmembran proteini bir şaperon olan BiP/GRP78 ile bağlı olarak etkisiz halde bulunur. IRE1 aktive olduğunda GRP78'den ayrılır, X-box bağlayıcı protein 1 (XBP-1)'in mRNA'sından intronların çıkarılıp eksonların birleşmesine yol açarak splicing XBP-1(sXBP-1)i oluşturur. sXBP-1 sonunda nükleusa geçerek; ER homeostazını düzeltmek için protein katlanması, ER biyogenezisi ve ERAD'da rol alan genlerin transkripsiyonunu artırır(14). Obezite,

diyabet, ateroskleroz, hiperlipidemi, parkinson, amniyotrofik lateral skleroz (ALS), alzheimer, lösemi, multiple myeolom, prostat tümörü, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, romatoid artrit gibi birçok hastalığın ER stres ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir(15). Akut pankreatit de ER stres ile ilişkilendirilen hastalıklardan biridir(16).

Hiperlipidemik akut pankreatit kliniği ve mortalitesinin akut pankreatit tablosundan daha ağır seyretme sebebinin hiperlipideminin akut pankreatit ile pankreasta oluşan ER stresi daha da arttırması olabileceği hipotezine yönelik olarak çalışmamızda sıçanlarda deneysel hiperlipidemik akut pankreatit, akut pankreatit, hiperlipidemi grupları oluşturulması planlanmıştır. Bu gruplarda;

1. Pankreas dokularının histomorfolojik yapısını inceleyerek skorlama ile gruplar arası karşılaştırmalar yapmak
2. Aynı gruplarda pankreas dokusunda; immünohistokimyasal olarak GRP78, IRE-1,XBP-1 antikorları kullanılarak boyamalar yapılıp görsel olarak karşılaştırmalar yapmak
3. Pankreas dokusundan elde edilen rnalarla cDNA oluşturup qRT-PCR ile GRP78, IRE-1α, sXBP-1 mrna düzeylerini rölatif olarak elde edip karşılaştırmak amaçlanmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

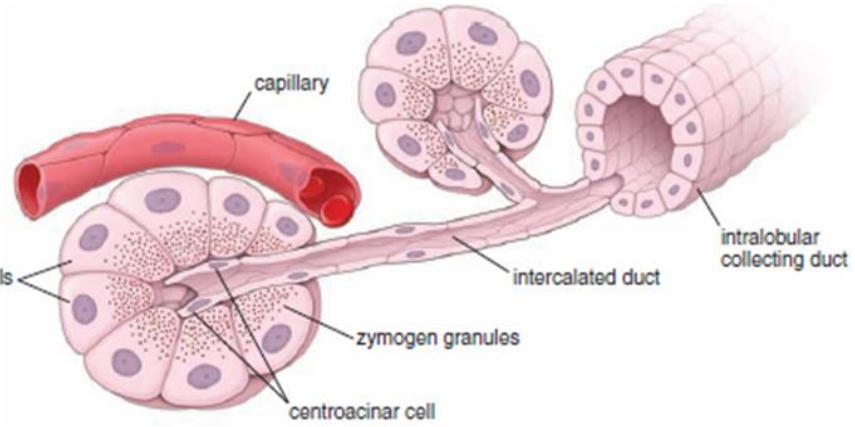
2.1 Pankreas

2.1.1 Pankreas Histolojisi

Pankreas, etrafı ince gevşek bağ dokusu yapısında bir kapsülle çevrili ekzokrin ve endokrin bir bezdir. Organ, parankimini oluşturan bez yapılarından ve bu yapıları çevreleyen stroma (gevşek bağ dokusu) kısımlarından oluşur. Gevşek bağ doku yapısındaki kapsül, bez içerisine septalar vererek organı lobüllere ayırır. Lobüller arasında gevşek bağ dokusu yapısı kan damarlarını, kanalları ve sinirleri çevreler.

Pankreasın endokrin ve ekzokrin fonksiyon gören kısımları farklıdır. Ekzokrin kısmı sindirim için gerekli enzimleri sentezleyerek kanallar aracılığıyla duedonuma iletilmesini sağlar. Endokrin kısmı, başta insülin ve glukagon olmak üzere çeşitli hormonlar salgılayıp kana verir. Endokrin pankreas kısmını oluşturan hücre grupları, tüm organ boyunca farklı yerleşimlerde bulunabilir ve Langerhans adacıkları olarak da adlandırılır(17, 18).

Pankreasın ekzokrin kısmı, sindirim enzimi prekürsörlerini üreten seröz hücrelerden oluşmaktadır ve pankreasın endokrin kısmına kıyasla genişçe bir alan kaplamaktadır(17). Piramidal şekilli seröz hücreler, tek katlı biçimde sıralanmıştır ve asiner ya da tübüloasiner yapılar oluşturacak şekilde bir arada bulunmaktadır(18). Asinüsler ekzokrin pankreasın işlevsel birimleridir(19). Pankreatik asinüslerin diğer glandlarda bulunan asinüslerden farklı bir özelliği vardır; asinüsün içinde sentroasiner hücreler bulunmaktadır(18)(Şekil 2.1). Asiner hücreler; sitoplazmalarının bazalinde çekirdekleri ve apikalinde zimojen granülleri görülen piramidal hücrelerdir(1). Sentroasiner hücreler, asinüsten çıkan ilk kanal olan interkalar kanalın başlangıcıdır. Sentroasiner hücreler salgı granüllerinden ve ergositoplazmadan yoksundur. Kesitlerde; merkezi yerleşimli yassılaşmış nükleusu ve eozin ile açık boyanma özelliği ile asiner hücrelerden ayırt edilebilir(18).



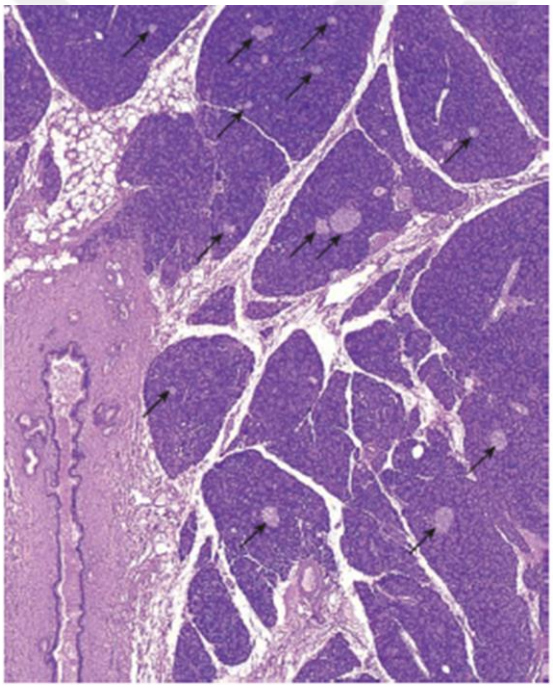
Şekil 2.1 Ekzokrin pankreasın şematize edilmiş hali (18)

Ekzokrin pankreasın kanal sistemi sentroasiner hücrelerle başlar. Asinüsün dışında interkalar kanal olarak devam eder. İnterkalar kanal, intralobüler kanallara daha sonra ise interlobüler kanallara drene olur. İnterlobüler kanallar doğrudan ana pankreatik kanala drene olur(18). İnterkalar kanallar tek katlı yassı veya alçak kübik epitele sahiptir, intralobüler kanala doğru gittikçe epitel silindirik epitele döner. İnterkalar kanal hücreleri, ana pankreatik enzimlerin aktivitesi için optimum ph'ı sağlayan ve mideden gelip duedonuma girecek kimusun asiditesini nötralize etmeye yarayan su ve bikarbonat (HCO_3^-) bakımından zengin sıvı salgılar(1).

Asiner hücrelerdeki zimojen granüllerde inaktif pankreatik enzimler ya da proenzimler bulunmaktadır. Bu pankreatik enzimler; proteolitik endopeptidazlar (tripsinojen, kimotripsinojen), preteolitik ekzopeptidazlar (prokarboksipeptidaz, proaminopeptidaz), amilolitik enzimler, lipazlar, nükleolitik enzimler olarak gruplandırabileceğimiz; proteinleri, karbonhidratları, lipidleri, nükleik asitleri sindirebilen enzimlerdir. Bu pankreatik enzimler ince bağırsak lümenine ulaşarak; burada intestinal hücre mikrovilluslarının glikokalikslerindeki enterokinazın tripsinojeni tripsine dönüştürmesi ve sonrasında tripsinin inaktif enzimlerin aktif hale dönüşümünü katalizlemesi sonucu aktifleşirler. Asiner hücreler apikal kutuplarındaki bağlantı kompleksleriyle birbirlerine bağlanarak izole lümen oluşturmuştur, ekzositozla bu lümene zimojen granüllerini salıverirler(18). Pankreatik ekzokrin sekresyon duedonumun enteroendokrin hücrelerinden salgılanan iki hormon ile düzenlenmektedir: sekretin ve kolesistokinin. Sekretin, kanal hücrelerinden HCO_3^- bakımından zengin sıvı salınımını stimüle ederken; kolesistokinin, asiner hücrelerden

proenzim salınımını stimüle eder. Mideden gelen asidik kimusun duedonuma girişi bu iki hormonun sekresyonunu stimüle eder. Ayrıca pankreas ekzokrin salgısı otonomik innervasyonla da düzenlenmektedir. Parasempatik lifler hücrelerin aktivitelerini stimüle ederken, sempatik lifler organın kan akımını düzenlemektedir(18).

Endokrin pankreas; değişken sayıda hücrelerden oluşan gruplar halinde, organın içerisinde dağınık halde bulunur, en çok pankreasın kuyruk kısmında yerleşim gösterir. Pankreas hacminin % 1-2sini oluşturur(18). İnce retiküler yapıdaki kapsül, her adacığı çevreleyerek asiner dokudan ayırır(17). Endokrin pankreas kısmına Langerhans adacıkları adı verilir. Hemotoksilen eozinle boyanan pankreas kesitlerinde daha açık renkle boyanmış hücre grupları olarak görünmektedir(18).



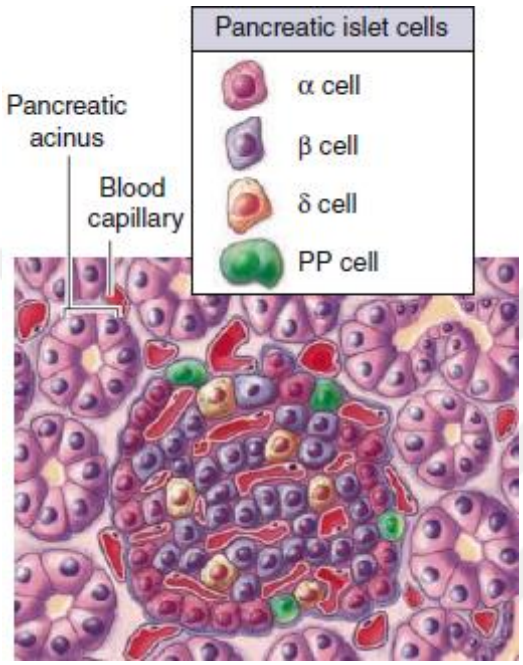
Şekil 2.2: Hematoksilen ezoinle boyanmış pankreas kesiti (18)
Ok işaretleri ile langerhans adacıkları gösterilmektedir.

Her bir langerhans adacığı hücre kordonları ve insuloasiner portal sistem adı verilen vasküler kısımdan oluşmaktadır. İnsuloasiner portal sistem, pencereli endotel hücrelerle döşenmiş kapiller ağ oluşturmuş afferent arteriyollerdir. Adacığı terkeden kapillerler asinüsleri kanlandırır, bu sayede adacıkta üretilen hormonlar ekzokrin pankreas üzerine lokal bir etki sağlamış olur. Bağımsız bir damar sistemi olan asiner damar sistemi ise doğrudan pankreas ekzokrin pankreas kanlanmasını sağlar(19). Pankreas adacıkları tüm pankreas hacmini %1-2sini oluştururken pankreasa gelen kan

akımının %10-15 ini alırlar(2). Adacık hücrelerinin temel tiplendirmesi en iyi şekilde immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak yapılmaktadır(17). İmmünohistokimyasal yöntemler ve elektron mikroskobisi kullanılarak belirlenen; Langerhans adacığında belirli konumlarda bulunup, belirli hormonlarla ilişkilendirilen 3 esas, 3 minör adacık hücre çeşidi bulunmaktadır. Adacıktaki hücre tiplerinin yoğunlukları şu şekildedir; B(beta) hücreleri %60-70, A(alfa) hücreleri %15-20, D(gama) hücreleri %5-10, minör hücreler %5.Zenker-Formol fiksasyonu ve Mallory-Azan boyama yöntemiyle A hücreleri kırmızı, B hücreleri kahverengimsi turuncu ve D hücreleri mavi boyanır. B hücreleri genelde santral yerleşim gösterirken, A ve D hücreleri periferik yerleşim göstermektedir. Hücre tiplerinden başlıca salgılanan hormonlar şu şekildedir; B hücreleri insülin, A hücreleri glukagon, D hücreleri somatostatin salgılar. Endokrin pankreastan salgılanan hormonlar sistemik, gastrointestinal sistemde bölgesel ve adacığın kendisinde lokal etkilere neden olabilir(18). Beta hücreleri, birbirine disülfit bağlarıyla bağlı iki zincirden oluşmuş bir polipeptid olan insülini salgılar. İnsülin endoplazmik retikulumda sentezlenip golgide işlem gören preproinsülin adlı tek zincir bir prekürsörden türer. Glikoz, hem insülinin beta hücrelerinden salınımını hem de sentezlenmesini uyarır(19). Beta hücrelerinden sentezlenen insülin, genel olarak kan glukozunu düşürmeye yönelik etkide bulunur. Kan glukoz seviyesinin normal olan 70 mg/100 ml (70 mg/dl) üzerinde olması; kanda yağ asitlerinin artması; dolaşımdaki gastrin, kolesistokinin, sekretin insülin salıverilmesini stimüle eder. İnsülin; kas hücreleri ve adipositlere glukoz alımını arttırır, glukojen fosforilazı inhibe edip glukojen sentazı aktifleştirerek glukojen depolanmasını sağlar, glukozun hücre içinde kullanımını ve glukolizi aktive eder, lipogenezi ve protein sentezini uyarır. Glukagon ve insülin karşılıklı etkileşim içerisindedir. İnsülin A hücreleri tarafından glukagon salınmasını inhibe eder. Kan glukozunun 70 mg/dl altında olması glukagon salınımını stimüle ederken 70 mg/dl'nin belirgin üzerine çıkması glukagonu inhibe eder. Glukagon glikozun kan dolaşımında artmasını sağlar. Bu sebeple glukoneogenezi uyarır, karaciğerde glukojenolizi indükler, glukoneogenezi teşvik etmek için lipolizi ve proteolizi de arttırır. Somatostatin ise hem insülin hem de glukagon salınımını inhibe eder.

Adacıkların hem sempatik hem de parasempatik innervasyonu vardır. Parasempatik stimülasyon hem insülinin hem de glukagonun salgılanmasını arttırırken

sempatik stimülasyon glukagon salıverilmesini arttırır, insülin salgılanmasını inhibe eder. Adacık hücrelerinin salgıları da asiner hücreler üzerinde düzenleyici rol oynar. İnsülin vazoaktif instestinal peptid (VIP) ve kolesistokinin (CCK) ekzokrin salgısını uyarır, glukagon ise pankreatit polipepetid (PP) ekzokrin sekresyonunu inhibe eder (18).

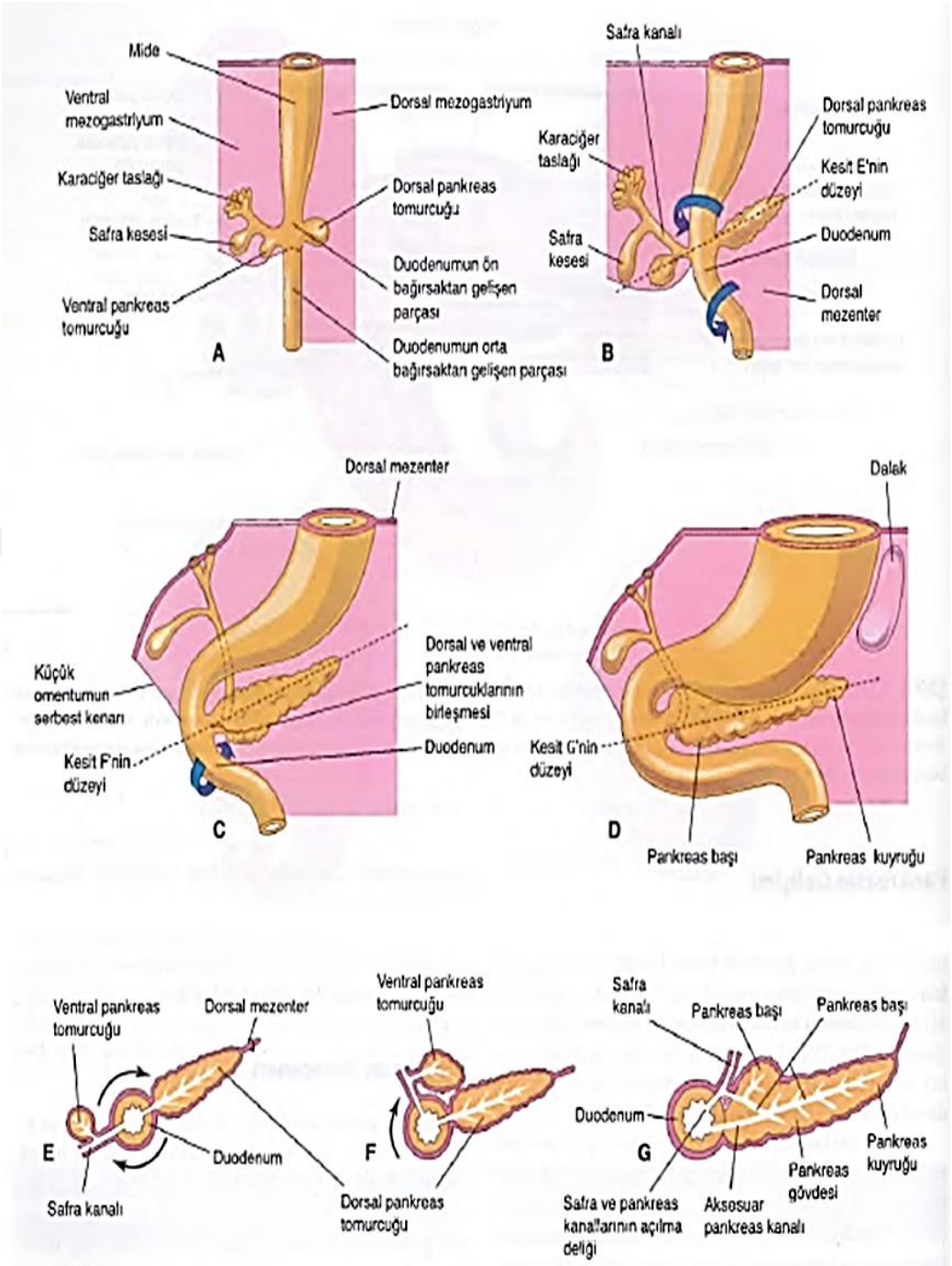


Şekil 2.3 Langerhans adacık hücrelerinin diyagramı(17).

2.1.2 Pankreas Embriyolojisi

Sindirim sistemi epitel ve bezlerinin büyük kısmı ilkel bağırsak endoderminden gelişir(20). Pankreasın endokrin ve ekzokrin bez hücreleri de endoderm kökenlidir. Bezlerin stroması, barsak duvarının kas ve bağ doku yapıları, peritoneal birleşenler ise visseral mezodermden orjin alır(21). Bağırsak taslağı üç kısımda ele alınır; ön bağırsak, orta bağırsak, son bağırsak. Pankreas ön bağırsak kısmından gelişmektedir. Yine ön bağırsaktan gelişen mide ve duedonumun başlangıç parçası yaptıkları rotasyonlarla pakreasın oluşumunda rol oynar. Pankreasa yakın komşulukta ve kanal yapıları ile bağlantılı olan karaciğer, safra kesesi ve safra kanalları ise ön bağırsak kaudalinden ventral yönde beliren hepatik divertikülden gelişmektedir(20). Duedonum iç yüzünü döşeyen endodermden köken alan iki adet pankreas tomurcuğu mezenter yaprakları arasında gelişir(20, 21). Bunlar dorsal ve ventral pankreas

tomurcuğu olarak adlandırılır. Ventral pankreas tomurcuğu safra kanalının duedonuma girdiği yere yakın bir konumda, dorsal pankreas tomurcuğu ise ventral pankreas tomurcuğunun kranialinde belirir. Mide başlangıçta orta hat yerleşimli mide taslağı şeklindeyken zamanla ventrodorsal olarak yer değiştirir ve uzun ekseni etrafında saat yönünde 90 derecelik bir dönüş yapar(20). Mide rotasyon yaptıkça duedonum da c şeklinde halka halini alarak sağa doğru döner. Bu hareketle birlikte ventral pankreas tomurcuğu da safra kanalıyla birlikte arkaya doğru hareket eder. Böylece, ventral tomurcuk dorsal tomurcuğun hemen arka alt kısmına gelmiş olur. Bir süre sonra da dorsal ve ventral pankreas tomurcuklarının parankim ve kanal sistemleri kaynaşarak birleşir(21). Ventral pankreas tomurcuğu pankreas başının bir kısmını ve unsinat prosesi oluşturur. Bezin kalan kısımları dorsal tomurcuktan gelişir. Pankreas tomurcukları kaynaşırken onlara ait kanallar da birleşir. Ana pankreas kanalı (Wirsung Kanalı) dorsal tomurcuk kanalı distali ve ventral pankreas tomurcuk kanalından oluşur. Dorsal pankreas kanalının proksimali ya tümüyle oblitere olur ya da aksesuar pankreas kanalı (Santorini kanalı) olarak küçük bir kanal halinde kalır. Bu iki kanal insanların %90 ında birleşirken %9-10 kadarında birleşmeyerek duedonuma ayrı ayrı açılır(20, 21). Bu durumda ana pankreas kanalı koledokla birlikte duedonuma majör papilladan, aksesuar pankreas kanalı ise duedonuma minör papilladan açılır(21). Pankreas başının hızla büyümesiyle duedonum başlangıçtaki orta hat pozisyonundan karın boşluğunun sağ tarafına doğru kayar. Duedonum ve pankreas başı karın arka duvarına yaslanır ve zamanla sadece ön yüzleri peritonla örtülü olacak şekilde retroperitoneal halde kalır(21). Pankreas parankimi pankreas tomurcuklarına ait endodermin oluşturduğu tübüler ağdan gelişir. Bu tübüler ağlar erken fetal dönemde pankreas kanal taslaklarıdır. Bu tübüllerin uç kısımlarının çevresindeki hücre kümelerinden pankreatik asinüsler gelişmeye başlar. Pankreas adacıkları ise bu tübüllerden ayrılan birtakım hücreler tarafından oluşturulup asinüsler ve kanallar arasında yerini alır. İnsülin salgısı erken fetal dönemde 10.haftada başlar. Fetal plazmada glukagon ise 15.haftada tespit edilmiştir(20). Pankreasın bağ dokusu yapıları pankreas tomurcuğu çevresindeki visseral mezodermden köken alır(21).

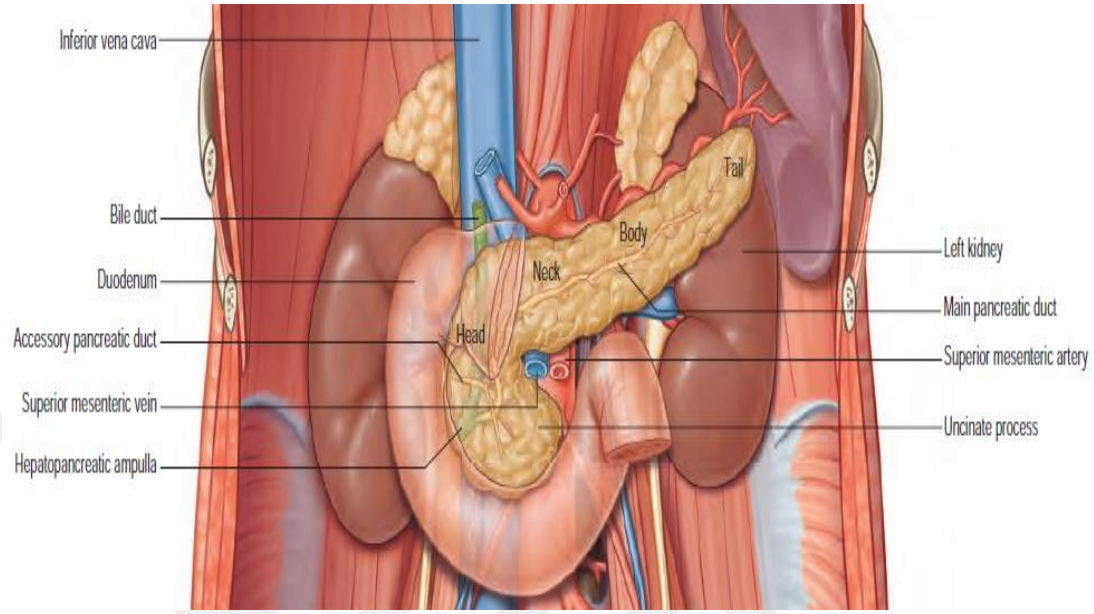


Şekil 2.4 Pankreasın Gelişimi(20).

2.1.3 Pankreas Anatomisi

Yetişkinlerde pankreas; 12-15 cm uzunluğunda, retroperitonda yer alan 'dil'e benzer şekilde baş kısmı daha kalın ve kuyruk kısmına doğru daha ince olarak gözlenen organdır. Anatomik ilişkilerine göre baş, boyun, gövde, kuyruk ve unsinat

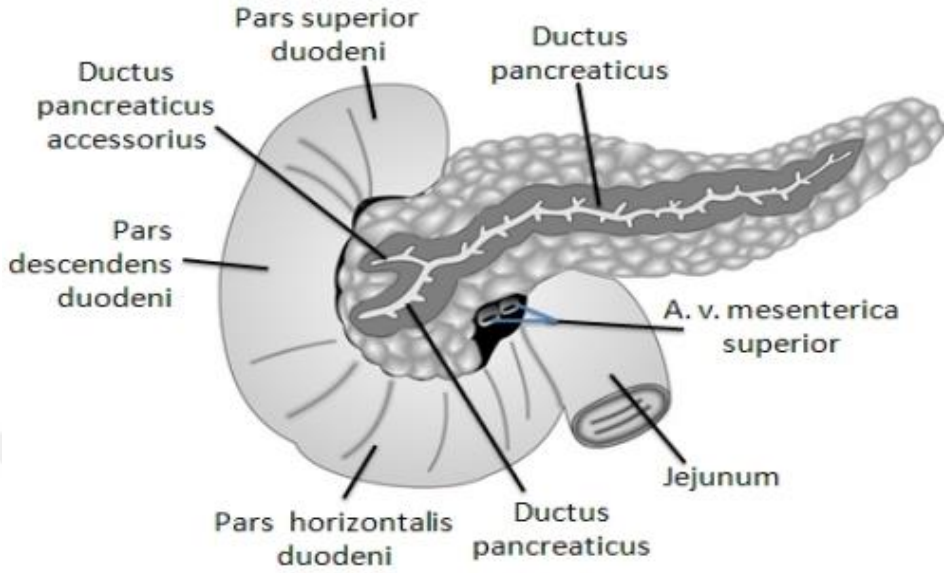
çıkıntı olarak ayrılır. Baş kısmı duodenumun 'C' halkası içinde yer alırken bezin geri kalanı retroperiton boyunca midenin arkasından dalağın hilusuna kadar uzanır(22).



Şekil 2.5 Pankreasın komşulukları(23)

L2 vertebra hizasında olacak şekilde karın arka duvarı boyunca uzanan sekonder retroperitoneal bir organdır(23, 24). Caput pancreatis denilen baş kısmı vena mesenterica superiorun ve L2 vertebranın sağında yer alır. Caput pancreatisin alt kısmında ise processus uncinatus denilen bir çıkıntısı bulunur(25). Caput pancreatisin arka yüzeyi vena cava inferior ve diyaframın sağ krusu ile komşuluk halindedir(23). Pankreasın baş kısmı koledok kanalı ve pankreatik kanal varlığı nedeniyle cerrahi açıdan önemli bir bölgedir(26). Collum pancreatis denilen boyun kısmı caput pancreatis(pankreas başı) ile corpus pancreatis(pankreas gövdesi) bölümleri arasında yer alır. Arteria mesenterica superior, vena mesenterica superior ve vena porta hepatis ile pankreasın boyun kısmının arka yüzeyi komşudur. Corpus pankreatis denilen gövde kısmı ise bezin en uzun kısmıdır ve prizmaya benzer bir şekli vardır. Ön yüzü midenin arka yüzüyle, alt yüzeyi jejenum ve ileum kıvrımları ile komşuluk yaparken arka yüzü karın arka duvarına yapışık şekildedir. Cauda pankreaticus denilen pankreasın kuyruk kısmı gövdenin devamı şeklinde sol tarafa doğru uzanır. Yetişkinlerde uzunluğu

değişkenlik göstermektedir, bu nedenle pankreasın kuyruk kısmı splenorenal ligamanın tabanında sonlanabilir veya dalak hilusuna kadar uzanabilir(23, 25).



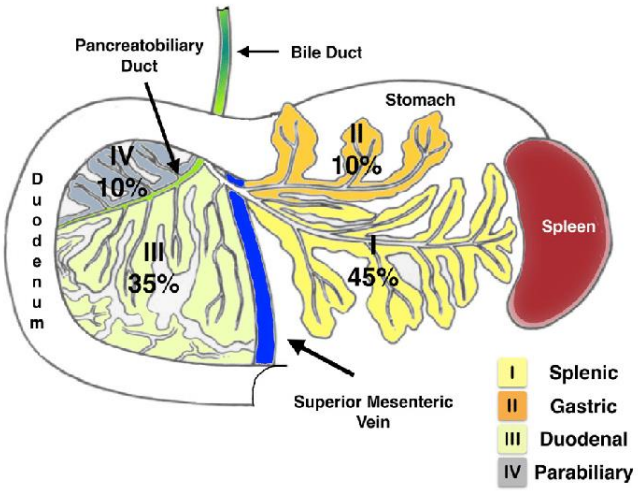
Şekil 2.6 Pankreatik kanal(27).

Pankreas kanalların düzenlenimi varyasyonlar gösterebilir ancak en yaygın düzenlenimi bir ana bir de aksesuar kanal şeklindedir. Ana pankreatik kanal (Wirsung kanalı) bez içinde boydan boya uzanır, kendisine dik açı ile dizilim gösteren lobüler kanalların varlığıyla 'balıksırtı deseni'görüntüsü oluşturur(28). Ana pankreas kanalı safra kanalı ile birlikte kısa bir ortak kanal oluşturarak duedonuma girer. Bu noktada ampulla vateri adı verilen bir genişleme de gözlenebilir (29). Aksesuar pankreas kanalı (Santorini kanalı), pankreas başı ön üst kısma salgısını boşaltır. Çapı ana kanaldan küçüktür ve bezin boyun kısmının yakınında ana pankreas kanalıyla bağlantı kurar(30). Aksesuar pankreas kanalı majör papillanın yaklaşık 2 cm proksimalindeki minör papilla ile duedonuma açılır(31).

2.1.4 Sıçan Pankreas Anatomisi

İnsan pankreası ile sıçan pankreası arasında temel farklar bulunmaktadır. İnsanlarda safra ve pankreas kanalları duodenal duvarda kısa bir ortak kanal oluşturan ayrı kanallar şeklindeyken sıçanda safra ile pankreas kanalları birlikte uzun bir ortak kanal oluşturmaktadır(32). Göze çarpan diğer farklılıklar ise sıçanlarda safra kesesinin bulunmaması ve insanda pankreas duodenum duvarına bitişik tek bir solid organken

sıçanda pankreasın omentum şeklinde birden fazla bölümden oluşmasıdır(33). Ratlarda pankreas bölümleri şu şekildedir; splenik segment parankimal kitlenin % 45'ini, duodenal segment pankreas parankiminin % 35'ini oluşturur, parabilier segment ve mide segmenti birlikte pankreas doku kütlesinin % 10'unu oluşturur(34). Bu farklılıklara rağmen sıçan pankreası insan pankreasıyla birçok benzerliğe sahiptir. Hem insanda hem sıçanda pankreas kanalı duodenuma boşalır, hücresel bileşenlerin benzerdir ve her ikisinde de hem ekzokrin hem de endokrin kısımlar mevcuttur(33)



Şekil 2.7 Sıçan Pankreası Bölümleri(34)

2.2. Akut Pankreatit

Akut pankreatit; klinik, morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerle seyreden; hastada karın ağrısı, amilaz ve lipaz yüksekliği ile kendini gösteren pankreasın inflamasyonudur(35, 36). Klinik tabloya tanı konamadan ölümle sonuçlanan ve ölüm sonrası tanı konabilen durumlar olduğu için gerçek insidansı net olmamakla beraber akut pankreatit insidansı ortalama 5-35/100.000 dir(3). Kabaca Dünya çapında yıllık akut pankreatit insidansı 1/10.000dir(37). Patogenezi ve tedavisi net olarak ortaya konamadığı için mortalitesi yüksektir(2). Ortalama % 10-15 mortaliteye sahiptir(38). Mortalite oranı prognostik faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir, kalıcı organ hasarı oluşmuşsa mortalite oranı % 60 lara kadar çıkabilir(39). Ayrıca Dünya genelinde gastrointestinal sistem ile ilgili en sık hastaneye yatış gerektiren hastalıktır(40).

2.2.1 Akut Pankreatit patogenezi

Akut pankreatit (AP), pankreasta doku ödemi, asiner nekroz, kanama ve yağ nekrozu ile birlikte inflamasyon ve perivasküler infiltrasyonla karakterize inflamatuar bir hastalıktır(41, 42). Genellikle akut pankreatitin asiner hücrelerde meydana gelen değişikliklerle başladığı düşünülmektedir(43). Asiner hücre hasarı ve zimojen granüllerinin bozulmuş sekresyonuna bağlı oluştuğu; süreçte hücre içi ve hücre dışı çeşitli mekanizmaların etkili olduğu belirtilmiştir(44, 45). Hücre dışı faktörlere örnek olarak vasküler ve sinirsel nedenler; hücre içi faktörlere örnek olarak ise sindirim enzimlerinin aktivasyonu, sekresyonun inhibisyonu, hücre içi kalsiyum artışı, ısı şok proteinleri, inflamatuar sinyal yolları ve hücre ölüm yolları gösterilebilir(46). Hücre içi artan kalsiyum, sonuçta tipsinojenin trypsine erken dönüşümünü arttırır(47). Mikrovasküler değişikliklerin sonucunda pankreatik vasküler geçirgenlik artışı, ödem, kanama ve pankreas nekrozu gözlenebilir(48).

Akut pankreatitit otosindirimsel bir hastalık olarak kabul edilmektedir(49, 50). Pankreas asiner hücrelerinde sindirim enzimlerinin erken aktivasyonunun, pankreasın kendi kendine sindirilmesine yol açan kritik bir başlatıcı olay olduğu kabul edilmektedir(51, 52). Asiner hücreler, kendi kendine sindirmeyi önlemek için aktif olmayan zimojen öncüleri olarak sentezlenen ve depolanan çok sayıda sindirim enzimi hazırlar. Tripsin inhibitörünün varlığı, optimal olmayan pH koşulları, aktive edilmiş enzimleri bozan proteazlar gibi hücre içi koruyucu mekanizmalar zimojen öncüllerinin aktifleşmesini ve bu nedenle oluşabilecek hücre hasarını önler. Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar, zimojenin asiner içi aktivasyonunun pankreatit patogenezinde anahtar bir olay olduğunu şüpheye yer bırakmayacak şekilde ortaya koymuştur(53, 54). Tripsinojenin hücre içi aktivasyonu, akut pankreatitin gelişimi için kilit bir mekanizmadır(55). Tripsin ve antitripsin arasındaki denge bozulduğunda, tripsin doğrudan pankreasa saldırarak doku hasarına ve inflamasyona neden olur(56). Zimojenlerin asiner içi aktivasyonunun mekanizması için öne sürülen hipotezlerden biri ortak lokalizasyon hipotezidir. Pankreatik zimojenler lizozomal enzimlerle aynı yerde bulunur ve katepsin B gibi lizozomal enzimler tripsinojeni aktif tripsine çevirir. Böylece sindirim zimojenlerini aktive ederek hücre hasarına neden olur(57). Bu hipotezle ilgili bazı şüpheler oluşmuştur. Katepsin B gibi lizozomal enzimlerin optimal pH'ı yaklaşık 5 iken, ortak lokalizasyon bölgelerindeki ph'ın nötr olduğu görülmüştür.

Ancak sonrasında yapılan çalışmalar katepsin B'nin nötr pH'ta bile trypsinojeni aktive etme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir(58, 59). Tripsinojenin aktivasyonu için farklı mekanizmalar da olabileceği öne sürülmüştür. Akut pankreatitte daha geç olayları modüle ettiği düşünülen nötrofillerin, tripsinojen aktivasyonunda bazı rolleri olduğu söylenmektedir. Tripsin aktivasyonunun, nötrofil infiltrasyonu için önemli olan nötrofil elastazın inhibisyonu ile azaltılması bunu desteklemektedir(60, 61).

Erken hücre içi proteaz aktivasyonuna ek olarak oksidatif stres gibi diğer mekanizmaların da AP gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir(62). Endoplazmik retikulum stresi ve apoptozun akut pankreatit patogenezine katkıda bulunan başlıca faktörler olduğu düşünülmektedir(63).

Pankreas üzerine yapılan çalışmalar, akut pankreatitte mikrovasküler dolaşımda değişiklikler olduğunu ve normal durumda pankreatik asinüsün çevresini ağ gibi saran çok sayıda küçük kılcal damarlarla çevrelendiğini göstermektedir(64). Pankreatit sırasında ödemin ve inflamatuar hücrelerin yayılmasını sağlayan bu kılcal ağ sistemidir. Deneysel pankreatit çalışmaları ile daha şiddetli pankreatit formlarında mikroperfüzyonda şiddetli azalmalar meydana geldiği ve bu durumun nekroza neden olabileceği görülmüştür(65).

Bu hastalığın patofizyolojisi üç ana aşamaya ayrılabilir: asiner, lokal ve sistemik olaylar(66). Asiner hücre hasarı lokal inflamatuar reaksiyona yol açmaktadır. Bu inflamatuar reaksiyon belirgin ise, sistemik inflamatuar cevap sendromu (SIRS) ortaya çıkmaktadır(67). Akut pankreatitin şiddetinin asiner hücre hasarından sonra meydana gelen olaylarla belirlenebileceğine inanılmaktadır. Pankreas asiner hücreleri hasarlandığında sitokinleri ve kemokinleri sentezleyip salıverir, bu da nötrofiller ve makrofajlar gibi inflamatuar hücrelerin toplanmasına neden olur. Çeşitli inflamatuar hücrelerin toplanması ve aktivasyonu, daha fazla asiner hücre hasarına yol açar ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), interlökin-1(IL-1), IL interlökin-2 (IL-2), interlökin -6 (IL-6) gibi çeşitli proinflamatuar faktörlerin artmasına neden olur(68). Akut pankreatit patogenezinde önemli noktalardan biri pankreasta nötrofillerin birikmesidir; bu olayın hem lokal değişikliklerin şiddetini hem de pankreatitin sistemik belirtilerini modüle ettiği gösterilmiştir(60, 69). Sistemik olarak çalışan hücre içi sinyalleşme yolaklarından nükleer faktör kappa B (NF-kB), aktivatör protein-1 (AP-1), MAPK modülleri, Stat3 ve fosfatidilinositol-3 kinaz (PI-3 kinaz) sinyal sistemlerinin

pankreasta inflamatuar yanıta aracılık ettiği; bu sinyallerin inhibisyonunun çoğu durumda inflamasyonu ve pankreatit şiddetini azalttığı gösterilmiştir(70, 71).

2.2.2 Akut Pankreatit Etyolojisi

Akut pankreatitin etyolojisini belirlemek, bu potansiyel olarak ölümcül durumun yönetimi için çok önemlidir(7). Akut pankreatit etyolojisinde safra taşları, alkol, ilaçlar, travma, iskemi, hipertriglisemi, hiperkalsemi, oddi sfinkteri disfonksiyonu, tümörler olmak üzere birçok farklı sebep bulunmaktadır. Farklı etyolojilerin farklı mekanizmalarla akut pankreatite neden olabildiği bilinmektedir. Kanal tıkanıklığına neden olarak akut pankreatite yol açan etyolojik faktörler arasında safra taşları, alkol, ERCP(Endoskopik retrograde kolanjiopankreotografi), tümör, pankreas divisium, oddi sfinkter disfonksiyonu sayılabilir. Alkol, travma, iskemi, virüsler asiner hücre hasarı yaparak akut pankreatite yol açarlar. Hipertrigliseridemi, hiperkalsemi, alkol intrasellüler transport mekanizmalarını hasarlayarak akut pankreatite neden olmaktadır(4). Alkolün akut pankreatit oluşturma şeklinde farklı mekanizmalar mevcuttur. Etanol asiner hücre için doğrudan toksiktir, inflamasyona ve membran hasarına yol açar. Ayrıca pankreatik kanalda tıkanıklığa neden olabilmektedir. Öte yandan asiner duktuslarda retrograd akıma yol açarak pankreas içinde enzim aktivasyonuna neden olduğu da düşünülmektedir. İlaçlardan azotioprin, kortikosteroidler ve tiazid diüretikler asiner hücre hasarı yoluyla akut pankreatite neden olabilmektedir(4, 72). Tümörlerin pankreas kanalını tıkayarak intraduktal basıncın artmasına yol açtığı ve safra taşlarının akut pankreatite neden olmasına benzer mekanizmayla akut pankreatit oluşturduğu düşünülmektedir(73-75). Bunun yanında pankreas karsinomlu hastaların yaklaşık %3'ünde tek veya çoklu akut ataklar halinde akut pankreatitin gözlendiği belirtilmiştir. Ayrıca, cerrahi sırasında patolojik olarak yağ nekrozu ve inflamatuar reaksiyon gibi akut pankreatitin patolojik belirtilerine rastlandığı belirtilmiştir(75). Ascaris, Clonorchis gibi paraziter enfeksiyonların pankreas kanalını tıkayarak akut pankreatite neden olabildiği düşünülmektedir(76). İatrojenik olarak da, pankreas çevresinde gerçekleştirilen işlemler ve cerrahiler sonrası bezin doğrudan yaralanmasından veya pankreas kanalında akışın engellenmesinden kaynaklandığı düşünülen akut pankreatit gözlenmektedir(77). Pankreas çevresinde gerçekleşmemesine rağmen sistemik etkilere neden olan bazı cerrahiler sonrası da akut pankreatit gözlemlenebilmektedir. Kardiyopulmoner bypass ve kalp transplantasyonu

bunlardandır(78, 79). Bu vakalarda sistemik hipoperfüzyon, pankreas dolaşımındaki ateramatöz emboliler ve hipoterminin neden olabileceği düşünülmektedir(80, 81).

2.2.3 Akut Pankreatit Tanısı ve Klinik Bulgular

Akut pankreatit tanısı konması için bahsedilen 3 özellikten 2 si bulunmalıdır: akut başlangıçlı, şiddetli, epigastrik bölgede, kuşak tarzında bele vuran, hareketle artan, öne eğilmekle azalan tipik karın ağrısı ; serum lipaz, amilaz değerlerinin normal üst değerden en az 3 kat artmış olması; görüntüleme yöntemlerinde(Bilgisayarlı tomografi, abdominal ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme) tipik pankreatit bulgularının gözlenmesi.Hastaların kliniğinde karın ağrısına oral alım bozukluğu, bulantı, kusma da eşlik edebilir (4). Hafif akut pankreatit kendi kendini sınırlayabilir ve herhangi bir tedavi gerektirmeyebilir, ancak hastaların %25 kadarı şiddetli bir atak geçirir ve bunların %30 ile %50'si ölür(51, 82). Vücutta inflamasyona lokal ve sistemik olarak çeşitli cevaplar oluşabilir. Bu cevaplar sonucu klinik olarak hastalık seyri kendi kendini sınırlayan hafif pankreatik ödemden pankreatik nekroz, organ yetmezliği ve ölüme neden olan sistemik inflamasyona kadar değişebilir(4). Aşırı sistemik inflamasyon uzak organlarda hasarlara ve multipl organ disfonksiyon sendromuna (MODS) yol açmaktadır. MODS, akut pankreatitte morbidite ve mortalitenin en önemli sebebidir(67).

2.2.4 Akut Pankreatit Tedavi ve Komplikasyonları

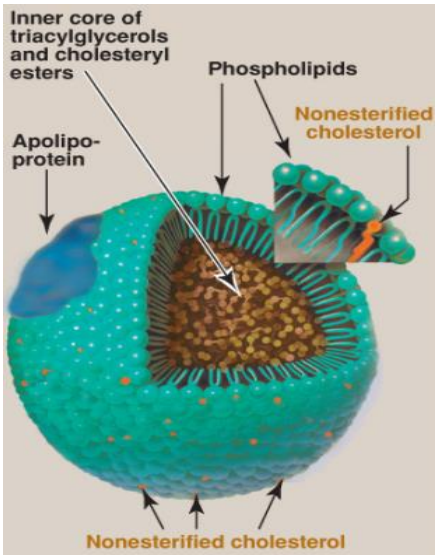
Akut pankreatitin etyolojiden bağımsız olarak öncelikli tedavisi sıvı replasmanı, ağrı kontrolü ve beslenme desteğidir(83). Komorbid herhangi bir ek hastalığı olmayan hastada 5-10 ml/kg olacak şekilde izotonik çözelti ile hidrasyon önerilmektedir. Hastanın başvuru anındaki bulgularında hipotansiyon ve taşikardi gözlenmişse daha yoğun bir sıvı replasmanı uygulanması gerektiği bildirilmektedir(83, 84). Akut pankreatit kliniğinde görülebilen şiddetli karın ağrısı için ağrı kontrolünde opioidler etkili ve güvenli ajanlardır(85). Beslenme de tedavide çok önemli bir yer tutmaktadır. Eğer hastanın kliniğine göre 1 hafta içinde oral beslenmeyi tolere edebilecek şekildeyse hidrasyonla devam edilebilir, ancak hastanın kliniği daha kötü durumda ve 5-7 gün içinde oral beslenmeye başlayamayacaksa beslenme desteği gereklidir. Hastada oral beslenmeyi tolere eder etmez az yağlı ve

yumuşak besinlerle oral beslenmeye başlamak önemlidir(86, 87). Yapılan çalışmalarda erken oral beslenmenin hastanede kalış süresini kısalttığı, paranteral beslenme ve geç oral beslenme ile kıyaslandığında organ yetmezliği, enfekte nekroz ve mortalite açısından daha düşük oranlara sahip olduğu gözlenmiştir(88, 89). Akut pankreatit tedavisinde profilaktik antifungal ve profilaktik antibiyotik tedavisi önerilmemektedir(90).

Tedaviye rağmen karın ağrısının devam etmesi veya tekrarlaması, serum pankreatik enzim aktivitesinde sekonder artışlar, artan organ fonksiyon bozukluğu, ateş ve lökositoz gibi sepsisin klinik belirtilerinin gelişmesi durumunda lokal komplikasyonlardan şüphelenilmelidir. Lokal komplikasyonların tespiti için görüntüleme gerekmektedir. Başlıca lokal komplikasyonlar akut peripankreatik sıvı toplanması, pankreatik psödokist, akut nekrotik koleksiyon ve WOPN(duvarlı pankreatik nekroz) olarak söylenebilir(91). Sistemik komplikasyonlar pulmoner, kardiyovasküler, hematolojik, gastrointestinal sistem, renal, metabolik ve santral sinir sistemi komplikasyonları olarak sınıflandırılabilir. Pulmoner komplikasyonlarda plevral efüzyon, atelektazi, pnömonitis; kardiyovasküler komplikasyonlarda hipotansiyon, hipovolemi, ani ölüm, infarkt; gastrointestinal komplikasyonlarda peptik ülser, eroziv gastrit; renal komplikasyonlarda oligüri, azotemi, akut tübüler nekroz; metabolik komplikasyonlarda hiperglisemi, hipokalsemi; santral sinir sistemi komplikasyonunda psikoz sayılabilir(92).

2.3 Plazma Lipoproteinleri ve Apoproteinler

Plazma lipoproteinleri lipitler ve proteinlerden oluşan komplekslerdir. Lipoproteinler lipitlerin dokular arası taşınmasını sağlar. İçte, çekirdek kısmında hidrofobik triaçilgliserol ve kolesterol esterleri; dışta, kabuk kısmında amfipatik apolipoproteinler, fosfolipid ve esterleşmemiş kolesterol bulunur. Lipoproteinler fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre şilomikronlar, çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL), düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL), yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) ve lipoprotein a olarak gruplandırılır(93).



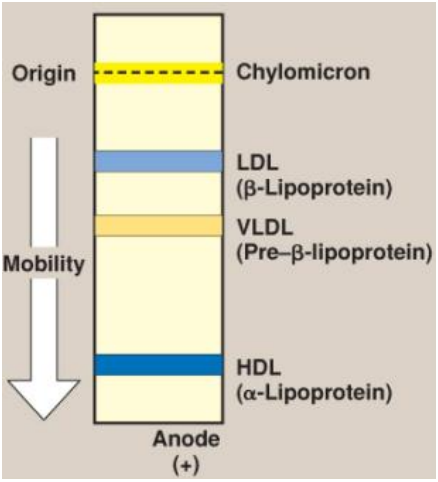
Şekil 2.8 Lipoprotein yapısı (93)**.**

Şilomikronlar; triaçilgliserol içeriği en fazla, protein içeriği en az, yoğunluğu en düşük ve boyut olarak en büyük lipoprotein çeşididir. HDL parçacıkları boyut olarak en küçük ve yoğunluğu en fazla olan lipoprotein çeşididir(94). Lipoproteinlerin elektroforezinde şilomikron başlangıç noktasında kalırken, LDL β-lipoprotein bandı, VLDL pre-β lipoprotein bandı, HDL α-lipoprotein bandı oluşturur(93).

Tablo 2.1 Lipoproteinler ve Özellikleri (94)

Lipoprotein	Density (g/dL)	Molecular Weight (daltons)	Diameter (nm)	Lipid* (%)		
				TG	CHOL	PL
Chylomicrons	0.95	400×10^6	75–1200	80–95	2–7	3–9
VLDL	0.95–1.006	$10–80\times10^6$	30–80	55–80	5–15	10–20
IDL	1.006–1.019	$5–10\times10^6$	25–35	20–50	20–40	15–25
LDL	1.019–1.063	2.3×10^6	18–25	5–15	40–50	20–25
HDL	1.063–1.21	$1.7–3.6\times10^5$	5–12	5–10	15–25	20–30

(**TG:**Trigliserit **CHOL:**Kolesterol **PL:**Fosfolipit)



Şekil 2.9 Lipoproteinlerin elektroforez hareketleri (93).

Lipoproteinlerin yüzeyinde bulunan apoproteinler, lipoprotein metabolizmasının düzenlenmesinde önemlidir. Apoproteinlerin bazıları enzim kofaktörü olarak da bu düzenlenimde görev alır. Apo AI HDL'de bulunan başlıca proteindir. Karaciğerde ve ince bağırsaklarda sentezlenir. Apo B100 VLDL, IDL ve LDL'nin ana apoproteinidir. Apo B plazma LDLsinin dokular tarafından alımında görev alan LDL reseptör alanı içerir. Diğer apoproteinler lipoproteinler arasında alınıp verilirken apo B lipoproteinler arasında değiştirilmez. Apo B48 şilomikronların üzerinde bulunur. Apo CII şilomikronlar, VLDL, IDL ve HDL üzerinde değişen derecelerde bulunur. Lipoprotein lipaz aktivatörüdür. Apo CIII, VLDL'nin önemli bir bileşenidir ve aynı zamanda şilomikron, IDL ve HDL'de de mevcuttur. Yapılan çalışmalar apo CIII'ün lipoprotein lipazı inhibe etiiğini göstermiştir. Apo E karaciğerde sentezlenir ve karaciğerdeki reseptörlerle etkileşerek plazmada kalan lipoproteinlerin uzaklaştırılmasında rol alır (94).

Lipoproteinlerde bulunan, aynı zamanda taşınması sağlanan triaçilgliserol ve kolesterol ise ya ekzojen olarak diyetle alınır ya da endojen olarak de nova sentezle oluşturulur. Yetişkinlerin diyetle aldığı lipitlerin >% 90ı trigliseridlerden oluşmaktadır. Diyetle alınan lipidlerin geri kalanı ise esas olarak kolesterol, kolesteril esterler, fosfolipidler ve serbest yağ asitlerinden oluşur (93).

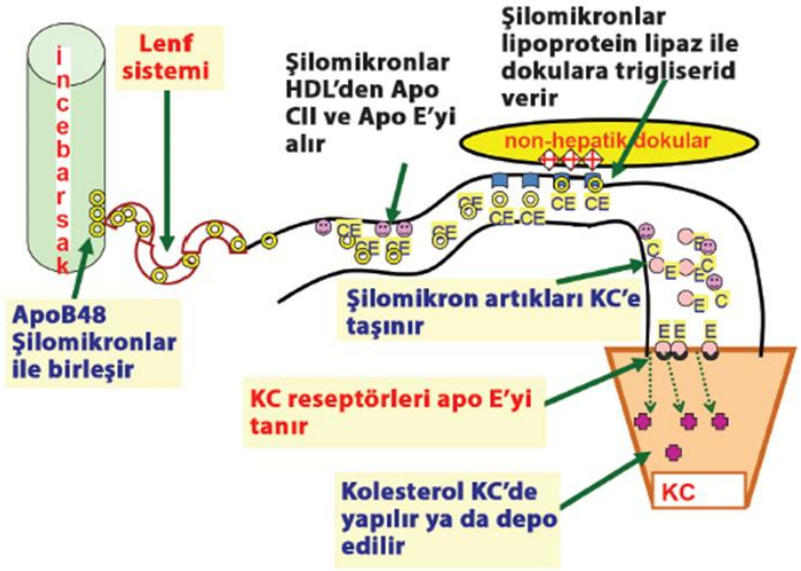
Tablo 2.2 Apolipoproteinler (94).

Apolipoprotein	Molecular Weight	Lipoproteins
apo A-I	28,016	HDL, chylomicrons
apo A-II	17,414	HDL, chylomicrons
apo A-IV	46,465	HDL, chylomicrons
apo B-48	264,000	Chylomicrons
apo B-100	540,000	VLDL, IDL, LDL
apo C-I	6630	Chylomicrons, VLDL, IDL, HDL
apo C-II	8900	Chylomicrons, VLDL, IDL, HDL
apo C-III	8800	Chylomicrons, VLDL, IDL, HDL
apo E	34,145	Chylomicrons, VLDL, IDL, HDL
apo(a)	250,000–800,000	Lp(a)

2.4 Lipidlerin Sindirimi ve Emilimi

Diyetle alınan lipitlerin sindirimi midede başlar ve ince bağırsakta tamamlanır. Dilin arka kısmındaki bezlerden salgılanan lingual lipaz ve mideden salgılanan mide lipazı tarafından katalize edilir. Diyetteki triaçilgliserol(TAG), kolesteril esterler ve fosfolipidler ince bağırsakta pankreas enzimleri tarafından enzimatik olarak parçalanır. İnce bağırsakta lipitleri parçalayan hidrolitik enzimlerin pankreastan salgılanması kolesistokinin (CCK) ve sekretin gibi çeşitli hormonlar ile kontrol edilir. Duedonumda lipidler emülsifikasyona uğrar. Emülsifikasyon safra tuzlarının deterjan etkisi ve peristaltizme bağlı karıştırma ile sağlanır. Emülsifikasyon hidrofobik lipit damlacıklarının yüzey alanını arttırır, sindirim enzimlerinin kolay etki etmelerini sağlar. Emülsiyon partiküllerine safra tuzlarının katılmasıyla miçeller oluşur. İnce bağırsaktaki lipazlar tarafından lipidlerin sindirilmesi sonucu miçellerde trigliserid, yağ asidi, gliserol, fosfolipid, serbest kolesterol ve safra tuzları bulunur. Lipid emilimi bağırsak mukoza hücrelerinin fırçamsı kenarından olmaktadır. Kısa ve orta zincirli yağ asitleri miçel oluşturmadan emilirler. Bağırsak mukoza hücrelerine alınan lipid

sindirim ürünleri burda yeniden triaçilgliserol, kolesterol esterleri ve fosfolipide dönüştürülür. Yeni sentezlenen bu lipidler hidrofobik oldukları için apolipoprotein-48 ile şilomikron yapısını oluşturur. Şilomikron bağırsak mukoza hücrelerinden ekzositozla bağırsak lenfatiklerine geçer. Bu şilomikron nascent, yeni oluşan şilomikrondur. Plazmaya ulaştığında değişikliklere uğrayarak olgun hale gelir. Bu değişiklik HDL'den Apo E ve apo CII apolipoproteinlerin alınmasıdır. Lipoprotein lipaz enzimi sayesinde triaçilgliserol parçalanarak serbest yağ asidi ve gliserole dönüşür. Gliserol karaciğer tarafından alınarak glikoliz ara ürünü olan dihidroksiaseton fosfota çevrilir, böylece lipit sentezi veya glukoneogenezde kullanılabilir. Serbest yağ asitleri ise depolanabilir ya da kasta enerji için kullanılabilir. Dolaşımdaki şilomikronlar üzerinde bulunan Apo C-II lipoprotein lipazı aktive eder. Şilomikron dolaşımda iken triaçilgliserollerin büyük kısmı parçalanır, şilomikron parçacığının boyutu küçülür.Apoprotein C, HDL'ye geri döner.Şilomikron kalıntısı ise Apo E'yi tanıyan reseptörler sayesinde karaciğer tarafından tanınarak endositozla hepatositlere alınır. Burda ise endositozla alınan vezikül lizozomla birleşip hidrolitik olarak parçalanarak amino asitler, serbest kolesterol ve serbest yağ asitleri oluşturulur (93, 95).



Şekil 2.10 Dolaşımdaki şilomikronun metabolizması. (95)
(KC:karaciğer)

VLDL karaciğerde üretilerek lipitleri karaciğerden periferik dokulara taşıma görevini yapar. VLDL'ler Apo B-100 içeren nascent, yeni oluşan parçacıklar halinde

karaciğerden kana salınır, dolaşımdaki HDL'den Apo CII ve Apo E'yi alır.Apo CII lipoprotein lipazı(LPL) aktifleştirerek triaçilgliserollerin LPL tarafından parçalanmasını sağlar.VLDL'nin boyutu küçülür ve yoğunlaşır.Apo C ve E HDL'ye geri döner.Apo B-100 ise VLDL parçacığında kalmaya devam eder. Böylece VLDL LDL'ye dönüşür. LDL VLDL'ye göre daha az trigliserit ve yüksek konsantrasyonda kolesterol ve kolesteril esteri içerir. LDL parçacıklarının da görevi kolesterolü periferik dokulara taşımak sonrasında Apo B100'ü tanıyan reseptörler sayesinde karaciğere geri dönmektir. HDL, Apo E ve Apo CII'nin dolaşımdaki deposu olarak görev alır. Ayrıca periferik dokulardan kolesterolü alıp kolesteril esterler şeklinde karaciğere taşır. HDL kolesterolü alır almaz plazmada bulunan kolesterol açiltransferaz(LCAT) tarafından kolesterol esterleştirilir. LCAT HDL'deki Apo A-I tarafından aktifleştilir. HDL başlangıçta Apo A-1e lipitlerin eklenmesiyle oluşmuş diskoidal yapıdadır. Kolesteril esterler biriktikçe önce küresel ve nispeten kolesteril esterden zayıf HDL3'e ve sonrasında kolesteril esterden zengin HDL2'ye döner. Triaçilgliserol ve fosfolipidleri parçalayan hepatik lipaz HDL2'nin yeniden HDL3'e dönüşümünü sağlar(93).

2.5 Hipertrigliseridemi

Dislipidemi; LDL>130 mg/dL, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol HDL<40 mg/dL , trigliserit (TG) >200 mg/dL parametrelerinin bir veya daha fazlasının bulunması olarak tanımlanır(96). Hipertrigliseridemi, açlık plazma trigliserit seviyesinin yaş ve cinsiyet göz önüne alındığında 95 pörsentilin üzerinde olması şeklinde tanımlanmıştır(97). National Cholesterol Education Program sınıflamasına göre; serum açlık trigliserid değeri <150 mg/dL (1,7 mmol/L) normal; 150-199 mg/dL (1,7-2,2 mmol/L) sınırda yüksek; 200-499 mg/dL (2,3-5,6 mmol/L) yüksek ve ≥500 mg/dL (5,7 mmol/L) çok yüksek olarak sınıflanmıştır(98). Dislipidemiler nedenlerine göre primer ve sekonder dislipidemiler olarak ele alınmaktadır(95). Serum trigliserid değerinin 500 mg/dl ve üzerine çıktığında primer dislipidemilerden şüphelenilmelidir(99). Sekonder hipertrigliseridemiler diyabet, alkol, obezite, tiroid hormon bozuklukları, östrojen içeren hormon replasmanları ve çeşitli ilaçlar gibi birçok sebeple oluşmaktadır. İkinci kuşak antipsikotik ilaçların obezite ve hipertrigliseridemi ile ilişkili olduğu bilinmektedir(100).

Hipertrigliseridemiler kardiyovasküler hastalıklar ve akut pankreatit açısından risk oluşturmaktadır(101).

2.6 Hipertrigliseridemik Akut Pankreatit

Nadir olmasına rağmen, hiperlipidemi pankreatit için bilinen bir nedendir. Hiperlipidemi, hipertrigliseridemi (HTG) durumlarının pankreatite yol açma mekanizması açık değildir. Genel olarak kabul gören mekanizma ise asiner hücreden dışarı sızan pankreas lipazı ile pankreas içinde ve çevresinde trigliseridin hidrolizininin başlamasıdır. Bu durum, yüksek konsantrasyonlarda serbest yağ asitlerinin birikmesine yol açar. Bağlanmamış serbest yağ asitleri toksiktir ve asiner hücre veya kılcal damar yaralanmasına neden olabilir(102). Hiperlipidemi, pankreas perfüzyonu dahil sistemik hemodinamiyi etkiler. Ek olarak hiperlipidemi, endotel hücrelerinin aktivasyonunu, lökosit adezyonunu, lipid birikimi ve metabolik bozukluklar yoluyla endotel bağımlı vazodilatör yanıt bozukluklarını teşvik eder(103, 104). Bu değişiklikler pankreas mikrodolaşım bozukluklarına katkıda bulunabilir. Azalan kan perfüzyonu pankreas endotelyal, asiner ve adacık hücre fonksiyonlarını olumsuz etkileyebilir(105). Ayrıca deneysel çalışmalarla desteklenen bir başka görüşe göre pankreas kılcal damarlarındaki şilomikron konsantrasyonunun artmasına, kılcal damarların tıkanmasına, iskemi ve asidoza yol açar. Asidotik ortamda serbest yağ asitleri, trypsinojenin aktivasyonuna neden olur olarak akut pankreatitit başlatır (106). Bu nedenlerle, lipotoksisitenin pankreas hasarının bir aracısı olduğu öne sürülmüştür(107). AP'lı bir dizi vakada, HTG %1 ile %10 arasında değişen oranda pankreatit atağına neden olarak kabul edilmiştir(6, 108). Bazı araştırmalar, tüm vakaların yarısından fazlasında altta yatan nedenin HTG olduğunu bildirmektedir(109). HTG'nin AP'ı tetikleyebileceği açık bir eşik yoktur, ancak genel kural şöyle der: “Trigliseridseviyeleri ne kadar yüksekse, AP'tan muzdarip olma olasılığı da o kadar yüksektir.”(110). TG konsantrasyonundaki her 100 mg/dL artış için AP riskinin % 4 arttığı belirtilmiştir(111). Hipertrigliseridemik akut pankreatit (HTG-AP) hastalarının kliniği genellikle başka bir nedene bağlı akut pankreatitli hastalardan farklı görünmemektedir, ancak hastalığın daha şiddetli seyri bildirilmiştir(7).

2.7 ER Stres

Endoplazmik retikulum; ökaryotik hücrelerde, çok sayıda salgı ve zar proteininin sentezinden, katlanmasından, modifikasyonundan ve kalite kontrolünden sorumlu, zarla çevrili bir organeldir(9). Proteinler uygunsuz işleme veya modifikasyona maruz kaldığında, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler ER'de tutulur. Ardından bunlar ER ile ilişkili bozunma (ERAD) olarak bilinen ubikuitin-proteazom yolu (UPP) ile temizlenerek protein katlanması sürecinin doğru ilerlemesi sağlanır (112). Yalnızca uygun şekilde katlanmış proteinler golgi aygıtına ilerleyebilirken, yanlış katlananlar ER ile ilişkili bozulmaya (ERAD) veya otofajiye yönlendirilir (9). Yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, ER'nin işlevini bozar ve ER stresini (ERS) indükler. Proteinler, yanlış katlandığında ER lümeninde birikir. Hücreler, ER stres koşullarında hayatta kalmak için UPR olarak adlandırılan kendi kendini koruyucu bir mekanizmayı aktive eder. Bu yolak hücrenin hayatta kalmasını teşvik eder (113). ER hasarı geri döndürülemez hale geldiğinde ve normal işlevler geri yüklenemediğinde apoptotik sinyal başlatılır(114).

UPR, üç ER transmembran proteini tarafından başlatılır: IRE1α, PERK ve ATF6 (115, 116). Her üç UPR sensörü de, hücre içinde protein katlama dengesini kurmayı amaçlayan etkileşimlere neden olur. Bu etkileşimler de sonuçta hücrenin hayatta kalması ve işlev görmeye devam edebilmesini amaçlar (117).

ER içinde uygun protein katlanmasını kolaylaştıran, proteinleri katlanmış durumda tutan ve katlanmamış ara maddelerinin birikmesini önleyen moleküler şaperonlar bulunur. En iyi karakterize edilmiş ER şaperon proteinlerinden biri, glikoz regüle edilmiş protein 78'dir(GRP78) (118). GRP78, ER'de yerleşik bir proteindir. Sentezi ER fonksiyonunu ve homeostazı bozan çeşitli çevresel ve fizyolojik stres koşulları tarafından uyarılabilir(119). Çok sayıda çalışma GRP78 indüksiyonunun ER stresi için bir belirteç olduğunu belirlemiştir. BiP olarak da adlandırılan GRP78, ER stresi için merkezi bir düzenleyicidir (120). GRP78, ER stresinin ve UPR'nin ayrılmaz bir parçasıdır. GRP78, ER stres sinyal düzenleyicisidir ve apoptotik süreci bloke etme yeteneğindedir (121, 122). Stressiz koşullar altında GRP78, bu ER transmembran reseptör proteinlerine bağlanır ve onları inaktif bir durumda tutar. Stresin ardından, katlanmamış/yanlış katlanmış protein birikimi, GRP78'in IRE1, PERK ve ATF6'dan ayrılmasını arttırarak bu proteinler üzerinden giden yolakların aktivasyonuna yol açar

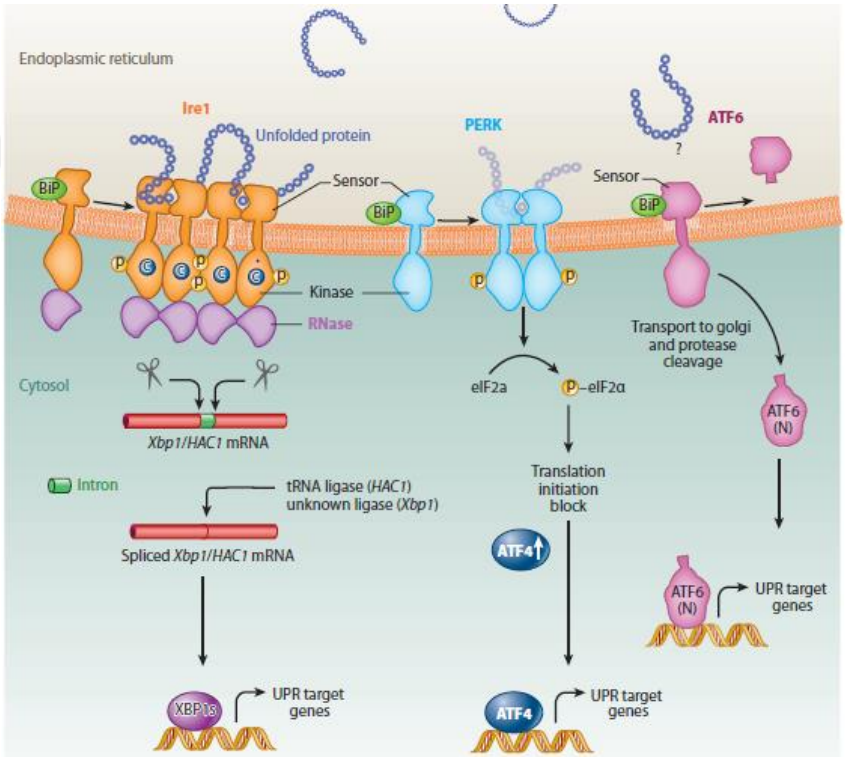
(116). Patolojik koşullar altında GRP78 indüksiyonu, hücrelerin ER stresinde hayatta kalması için büyük bir hücresel koruyucu mekanizmadır (119). Çok sayıda çalışma, GRP78'in spesifik indüksiyonunun ER stresinin göstergesi olduğunu ortaya koymuştur (119, 123). ER stresi altında hayatta kalmak için UPR, anti-apoptotik özellikler sergileyen GRP78 gibi şaperon proteinlerinin ekspresyonunu seçici olarak aktive ederken genel protein translasyonunu durdurur (122, 124).

UPR'nin üç dalı olan IRE1, PERK ve ATF6 bir sinyalleşme ağı oluşturarak birbirleriyle bağlantı halindedir. PERK translasyon başlatma faktörü eIF2a'yı fosforile ederek translasyonu engeller böylece ER'yi katlanmamış proteinlerden kurtarır. Azaltılmış translasyonun yanında seçilmiş bazı RNA'ların translasyonu devam eder, UPR hedef genlerini de yönlendiren başka bir transkripsiyon faktörü olan ATF4 bunlardan biridir(117, 125-127). Bir diğer UPR reseptörü ATF6'dır. Katlanmamış proteinlerin ATF6'yı nasıl aktive ettiği net olarak bilinmemektedir. ER stresi, ATF6'nın ER lümeninden çıkması ve ardından golgi kompleksindeki S1P ve S2P proteazları tarafından sıralı proteolitik bölünmesiyle sonuçlanır. Sitoplazmik ATF6 daha sonra çekirdeğe girer ve UPR hedef genlerini transkripsiyonel olarak düzenlenmesini sağlar (117).

2.7.1 ER Stres IRE1/XBP-1 Kolu

IRE1/ XBP-1 UPR'nin en çok korunan dalıdır. IRE1 sitozolik kısmında hem serin/treonin kinaz alanı hem de bir endoribonükleaz (RNaz) alanı olan bir tip I transmembran proteinidir. Memelilerde iki IRE1 homoloğu vardır: IRE1 α her yerde eksprese edilirken, IRE1β ekspresyonu çoğunlukla bağırsak epiteliyle sınırlıdır. IRE1α ER membran düzleminde homodimerler oluşturur. Bu durum, XBP-1'i kodlayan mRNA'dan 26 baz intronun çıkarılmasını sağlar ve bir translasyonel çerçeve kayması ile sonuçlanır(9). IRE1'in aktivasyonu, XBP1'i kodlayan mRNA'da intronların çıkarılıp eksonların birleşmesiyle(splicing) sonuçlanır. Splicinge uğramayan XBP-1 proteini hızla yok olur (128). sXBP-1, protein katlanması ve salgılanması, protein bozulması ve ER translokasyonunda yer alan genler dahil olmak üzere bir dizi UPR hedef geninin ekspresyonunu arttırmak üzere çekirdeğe girer (129, 130). UPR, ER'yi çekirdeğe bağlayan hücre içi bir reaksiyondur. IRE1α-XBP-1 dalının hedef geni, lipid sentezinde, ERAD'da, protein katlanmasında, taşınmasında rol oynar (131, 132). Acil

stres durumlarında IRE1, memeli hücrelerinde ER'de lokalize mRNA'ların bir kısmını (regüle edilmiş IRE1'e bağlı mRNA'ların bozunması (RIDD) olarak adlandırılır) bozar ve böylece protein sentezini azaltır (9). Katlanmamış peptitlerin doğrudan IRE1'e bağlanabildiğine ve onun oligomerizasyonunu ve aktivasyonunu destekleyebildiğine dair son bulgular, IRE1 peptit bağlama oluğunu ve oligomerizasyon arayüzünü hedefleyebilen bileşiklerin IRE1 aktivitesini düzenlemede etkili olabileceğini düşündürmektedir (133).



Şekil 2.11 UPR (Katlanmamış protein yanıtı) (134)

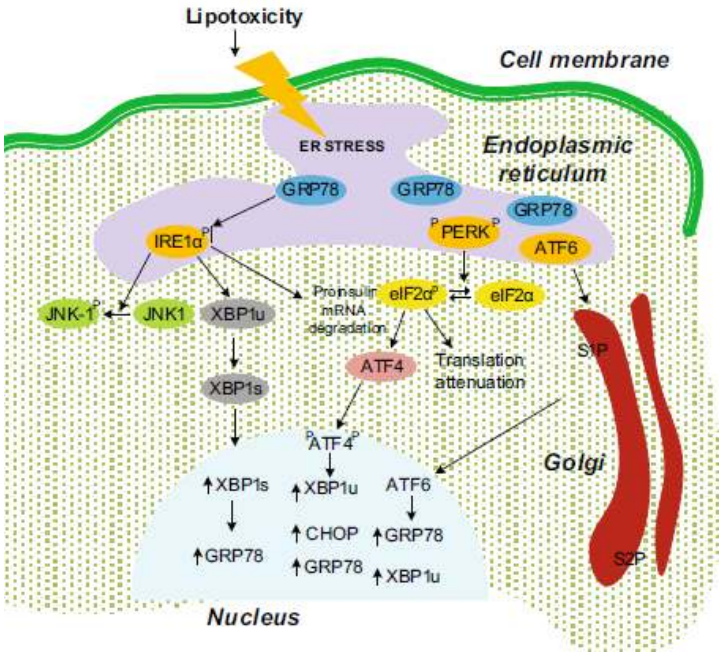
2.7.2 Pankreatitte ER Stres

Pankreas asiner hücreleri sindirim enzimi sentezi, depolanması ve salgılanması konusunda oldukça uzmanlaşmıştır(135). Vücuttaki en yüksek protein sentezi yapılan organlardandır, bu nedenle de bol miktarda endoplazmik retikulum bulundurmaktadır(136-138). ER homeostazı özellikle asiner hücrelerde önemlidir (139). Son çalışmalar, endoplazmik retikulum stresinin, AP'ın gelişiminde ve ilerlemesinde vazgeçilmez bir rol oynadığını göstermiştir (140).ER yapısı pankreatit patogenezi sırasında önemli ölçüde değişebilir (141). ER'deki ERS kaynaklı

morfolojik değişiklikler Hartley ve arkadaşları tarafından doğrulanmıştır (142). Pankreasın hem patolojik hem de fizyolojik durumları, ERS yanıtı ile ilişkilidir ve mevcut araştırmaların eğilimi, AP'da ERS'nin rolünü netleştirmektir(143). Endoplazmik retikulum stresi, akut pankreatitin erken evresinde asiner hücrelerin önemli bir yanıtıdır (143, 144). Son zamanlarda yapılan bazı araştırmalar, endoplazmik retikulum stres yolunda önemli düzenleyici bölgelerdeki değişikliklerin asiner hasarın derecesi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (145, 146). AP'ın gelişimi ve ilerlemesi, AP sırasında organ hasarına neden olan ERS ile yakından ilişkilidir(147).

2.7.3 Hiperlipidemide ER stres

ER stresi sonucu ortaya çıkan UPR'nin çeşitli bileşenlerinin lipid metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynadığı artık iyi bilinmektedir (148, 149). ER stresi ile lipid metabolizması arasındaki ilişki çift yönlüdür. ER stres yolaklarının aktivasyonu lipogenez ve değişmiş lipid homeostazıyla sonuçlanabilirken, lipidler ve anormal lipid metabolizması da ER stresine neden olabilir (150).



Şekil 2.12 Hiperlipideminin ER strese etkisi.

2.8 Akut Pankreatit ve Hiperlipidemi Deney Modelleri

HTG-AP modellerinde hiperlipidemi; diyetle besleme, emülsiyon gavaj, Triton WR1339 enjeksiyonu ve Poloksomer 407(P-407) enjeksiyonu ile oluşturulmaktadır. HTG-AP modelinde, en çok kullanılan pankreatit indükleyici ilaçlar ise cerulein (CAE), ardından safra asidi ve L-arginin (L-Arg)dir (151).

2.8.1 Cerulein ile İndüklenen Akut Pankreatit Modeli

Cerulein, pankreas enzim salgılanmasını indükleyen kolesistokinin(CCK) benzeri bir hormondur. Yüksek ve düşük afiniteli olmak üzere tanımlanan iki çeşit kolesistokinin reseptörü bulunmaktadır. Yüksek afiniteli CCK reseptörü kolesistokinin ile birleşerek asiner hücrelerden zimojen granüllerinin ekzositozunu indükler, böylece sindirim enzimlerinin salgılanmasını arttırır. Düşük afiniteli kolesistokinin reseptörü, yüksek afiniteli kolesistokinin reseptörleri doyurulduktan sonra kolesistokinine bağlanır. Kolesistokinin, düşük afiniteli kolesistokinin reseptörüne bağlandığında, asiner hücrelerden sindirim enzimlerinin salgılanmasını engeller. Kolesistokinin reseptörleri iki fazlı bir etki ortaya çıkarmış olur. Önce asiner hücrelerden sindirim enzimi salgılanmasını uyarırken sonrasında inhibe etmiş olur. Pankreas asiner hücreleri aşırı miktarda kolesistokinin ile uyarıldığında, düşük afiniteli kolesistokinin reseptörleri devreye girer. Dolayısıyla asiner hücrelerden zimojen granüllerinin ekzositozu engellenir ve sindirim enzimleri asiner hücreler içinde birikmiş olur. Zimojen granüllerinde inaktif formlarda proenzimler şeklinde depolanan sindirim enzimlerinin pankreasta aktive olup pankreatiti tetikleme mekanizması ise hala belirsizliğini korumaktadır(66, 152). Cerulein ile indüklenen akut pankreatit, pankreatitin en yaygın kullanılan deneysel hayvan modelidir. Bu model tekrarlanabilir ve ekonomiktir(152, 153). Bu modelde insanlardaki akut pankreatit ile benzer olarak hiperamilasemi ve inflamatuar hücrelerin infiltrasyonu, pankreas ödemi, asiner hücre vakuolizasyonu, pankreasta aktifleştirilmiş pankreatik enzimin varlığı gibi birçok histopatolojik bulgu gözlenir(152). Cerulein kaynaklı akut pankreatit modelinde pankreastaki histolojik değişiklikler hızlıca oluşup ardından yeniden düzelmektedir. Bu nedenle bu model, akut pankreatitin erken evrelerinde gözlenen hücresel değişiklikleri araştırmak için uygundur(66).

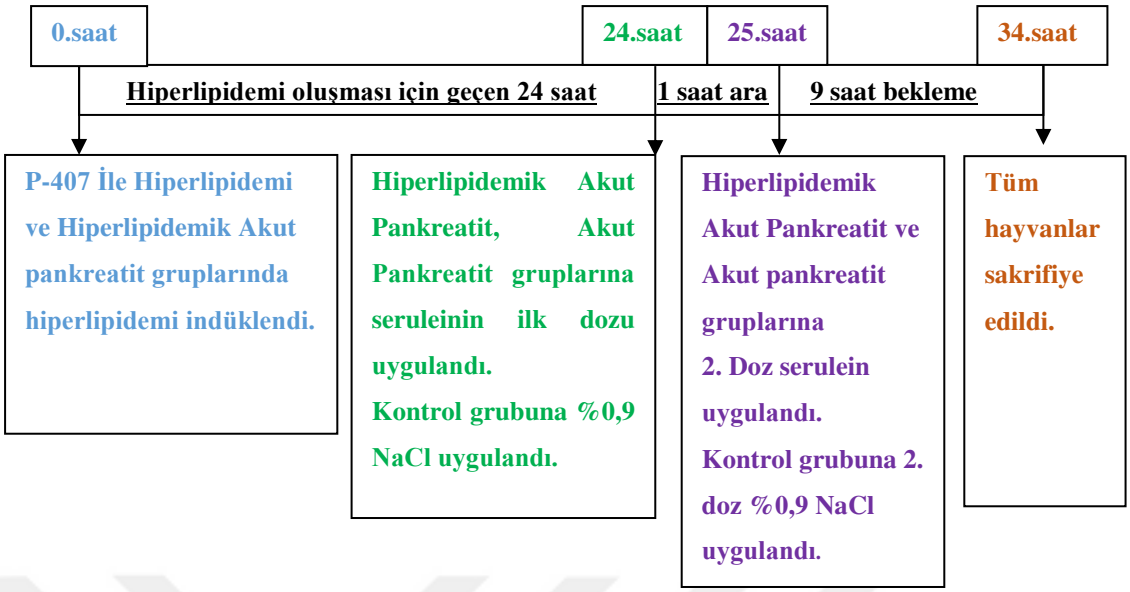
2.8.2 Poloxomer-407 ile Oluşturulan Hiperlipidemi Modeli

P-407, polioksietilen ve polioksipropilen birimlerinden oluşan hidrofilik bir üç bloklu kopolimerdir. P-407, hem lipoprotein lipaz hem de hepatik lipazın aktivitesini doğrudan inhibe ederek serum trigliserit konsantrasyonlarını artırabilir.(154) Sıçanlarda tek bir doz 300 mg intraperitoneal (i.p) Poloxomer-407 uygulamasını takiben TG konsantrasyonunun 24 saatte 84 ± 10'dan 3175 ± 322 mg/dL'ye yükseldiği gözlenmiştir(155).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için 269 protokol no ile Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvurduk ve 21.07.2022 tarihli toplantıda 2022/38 Karar no ile etik onay verildi. Kullanacağımız sıçanlar Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışmada ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan 8-10 haftalık 32 adet erkek Sprague–Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar 22-24 °C oda ısısında, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde tutuldular ve standart laboratuvar yemi ve suya serbest erişimle beslendiler.

Temin edilen 32 adet erkek Sprague–Dawley türü sıçan 8 adet sıçandan oluşacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Hiperlipidemi grubuna tek doz 300 mg intraperitoneal poloxomer-407(Sigma Pluronic® F-127) uygulandı. Poloxomer-407nin (Sigma Pluronic® F-127) % 0,9 NaCl içinde konsantrasyonu % 10 olacak şekilde çözeltisi hazırlandı, bir gece boyunca buzdolabında bekletilerek tam olarak çözünmesi sağlandı(155). Akut pankreatit grubuna 1 saat arayla 2 doz 50 μg/kg'lık % 0.9 NaCl içinde çözülmüş serulein(Cayman Chemical caerulein acetate) intraperitoneal olarak uygulandı(156). Hiperlipidemik akut pankreatit grubuna önce tek doz 300 mg intraperitoneal Poloxomer-407(Sigma Pluronic® F-127) uygulandı, 24 saat boyunca ad libitum beslenmeye bırakılan sıçanlarda hiperlipidemi sağlandı(155). 24 saat sonunda 1 saat arayla 2 doz 50 μg/kg'lık %0.9 NaCl içinde çözülmüş serulein (Cayman Chemical caerulein acetate) intraperitoneal olarak uygulanarak akut pankreatit indüklendi(151). Kontrol grubuna da 1 saat arayla 2 doz intraperitoneal %0,9 NaCl uygulandı. Pankreasta oluşan değişiklikleri optimum şekilde akut pankreatit indüklendikten 9 saat sonra gözlemlendiği görülmüştür(157). Bu nedenle 34.saatte tüm hayvanlar sakrifiye edildi.



Şekil 3.1 Deney Protokolü.

3.1 Deney Grupları

Grup 1 (Kontrol grubu): 1 saatlik ara ile 2 kez, % 0.9 NaCl intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Grup 2 (Akut pankreatit grubu): Akut pankreatiti indüklemek için 50 µg/kg'lık dozda,1 saatlik ara ile 2 kez, % 0.9 NaCl içinde çözülmüş Cerulein(Cayman Chemical caerulein acetate) intraperitoneal olarak uygulanmıştır(156).

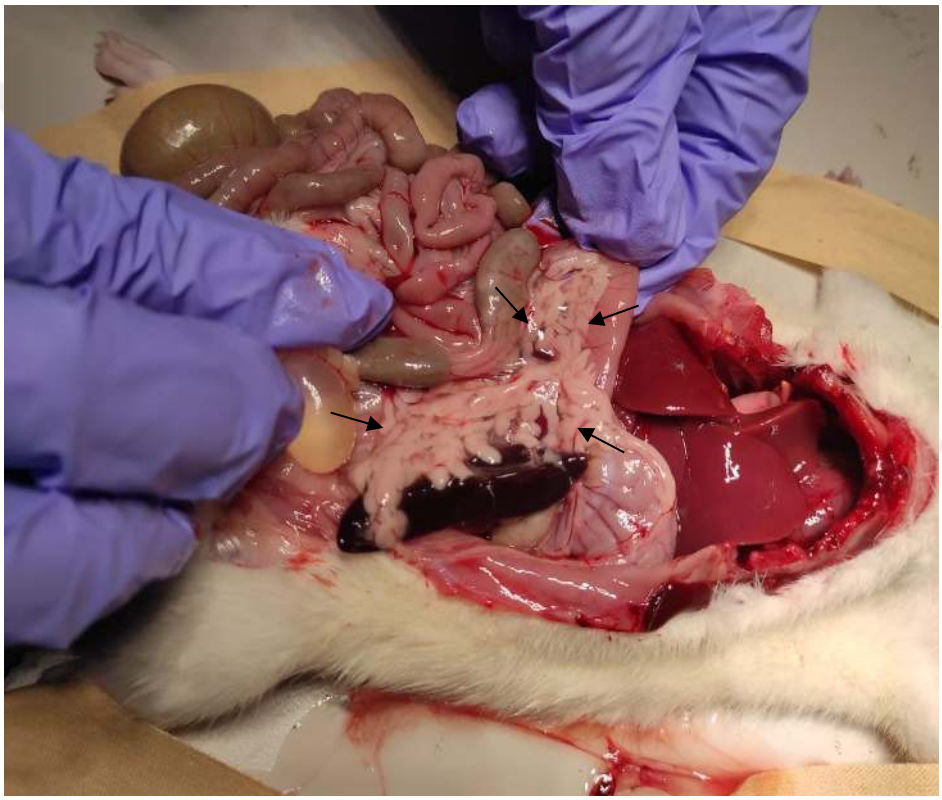
Grup 3 (Hiperlipidemi grubu):Hiperlipidemi oluşturmak için tek bir doz 300 mg i.p Poloxomer-407(Pluronic® F-127) enjeksiyonu uygulanmıştır (155).

Grup 4 (Hipertrigliseridemik akut pankreatit grubu): Hipertrigliseridemik akut pankreatit: Tek doz i.p 300 mg poloxomer 407 (Pluronic® F-127) enjeksiyonu yapılıp 24 saat ad libitum beslenmiş, 24 saat sonunda 1 saat arayla 2 doz 50 µg/kg'lık, %0.9 NaCl içinde çözülmüş serulein(Cayman Chemical caerulein acetate) intraperitoneal olarak uygulanmıştır (151).

3.2 Örneklerin Alınması

Deney toplamda 34 saat sürdü. 34 saat sonunda sıçanlar 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin intraperitoneal uygulanıp anestezi sağlandı, her hayvanın kalbinden 5 ml kan alındıktan sonra pankreasları çıkarıldı. (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3) Pankreas dokularının bir kısmı %10 formaldehit içinde fikse edildi, bir kısmı ise RNA

izolasyonu yapılana kadar -80 °C' de muhafaza edildi. Kanlar 10ml' lik sarı kapaklı jelli biyokimya tüplerine alınacaktır. Sonrasında 5000 rpmde 10 dakika santrifüj edilerek serum kısımları ependorflara aktarıldı.(Şekil 3.4, Şekil 3.5) Ölçüm yapılana kadar serumlar -80 °C' de muhafaza edildi. Ölçüm yapmak için -80 °C' den çıkarılan serumlar oda sıcaklığında erimeleri beklendikten sonra vorteks ile karıştırıldı. Serum örneklerinde amilaz, lipaz, HDL, LDL, VLDL, total kolesterol, trigliserit değerleri Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi biyokimya laboratuarında Beckman Coulter AU5800 biyokimya otoanalizatörü kullanılarak ölçüldü.

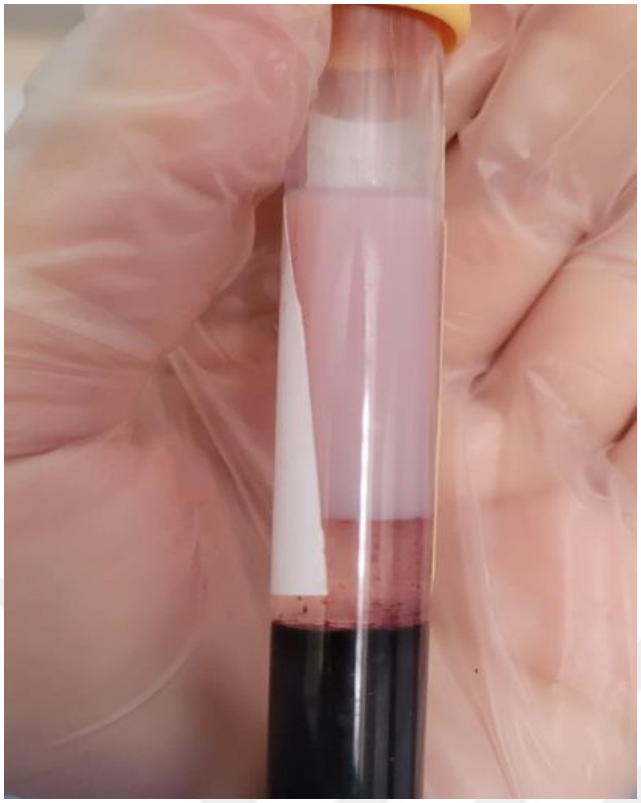


↘ :Pankreas organ sınırları

Şekil 3.2 Sıçan pankreası çıkarılması.

Şekil 3.3 Sıçan pankreasının dalak, duedonum ve mide arkasına yapışık şekilde yaygın omentum benzeri görüntüsü.

Şekil 3.4 Duedonumun bir kısmı ve dalakla birlikte çıkarılmış pankreas.



Şekil 3.5 Hiperlipidemi grubu rattan alınan kan, santrifüj edilmiş halde.

Şekil 3.6 Hiperlipidemi grubundan bir rat kan serumu, ependorfa alınmış halde.

3.3 Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması

Işık mikroskobu çalışmalarının yapılacağı zamana kadar pankreasın duedonuma komşu tarafından alınan doku parçaları %10'luk formaldehit çözeltisi içinde fikse edildi. Fikse olup sertleşen pankreas dokularından 0,5 cm kadar parçalar alınarak kasede konuldu, kaset üzerine kodları yazıldı. Doku takibi manuel olarak yapıldı.(Tablo 3.1) Takibi yapılan dokular parafin bloklara gömüldü.

Tablo 3.1. Doku Takibi Protokolü

İŞLEM VE KİMYASAL	SÜRESİ
Akar su	1 gece
%60 alkol	1 saat
%70 alkol	1 saat
%80 alkol	1 saat
%96 alkol	1 saat
%100 alkol	1 saat
Ksilen I	1 saat
Ksilen II	1 saat
Parafin I	1 saat
Parafin II	1 saat
Gömme	

3.4 Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile Boyanması Ve Skorlanması

Leica RM 2245 mikrotomunda parafin bloklardan 4-5µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 1 gece etüvde bekletildikten sonra Hematoksilen-Eozin / H-E ile boyandı.Protokol Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama Protokolü

İŞLEM VE KİMYASAL	SÜRESİ
Ksilen	10 dk
Azalan alkol serisi (%100,%90,%80,%70)	3'er dk
Akar çeşme suyu	1-2 dk
Hematoksilen	6 dk
Akar çeşme suyu	6 dk
Asit-Alkol	1-2 kere batır çıkar
Akar çeşme suyu	1-2 dk
Eozin	1 dk
Akar çeşme suyu	1-2 dk
%70 alkol	1 kere batır,çalkala
%80 alkol	1 kere batır, çalkala
%90 alkol	3 dk
%100 alkol	3 dk
Ksilen	10 dk
Kapatma	

Tüm hayvanların H-E ile boyanmış pankreas preperatlarında 10 alan tarandı, asiner hücre dejenerasyonu, interstisyel inflamasyon, ödem ve parankim kanaması derecelendirilerek pankreas hasarı skorlandı(158). Maksimum skor 12, minimum 0 olacak şekilde derecelendirmeler Tablo 3.3 te verilmiştir.

Tablo 3.3 Pankreas Hasarı Skorlama(158).

1.Ödem
0: yok veya nadir
1: interlobüler boşlukta ödem
2: intralobüler boşlukta ödem
3: pankreas asinusunun izole ada şekli
2.Enflamasyon
0: yok
1: hafif
2: orta
3: şiddetli.
3.Asiner hücre dejenerasyonu
0: yok
1: odaksal (<%5)
2: ve/veya sublobüler (<%20)
3: ve/veya lobüler (>%20)
4.Parankim kanaması
0: yok
1: hafif
2: orta
3: şiddetli

3.5 Pankreas Dokusunun İmmünohistokimyasal İncelenmesi

Endoplazmik stres koşullarında aktifleşen UPR'nin 3 dalında da ortak olan GRP 78 ve UPR'nin en çok korunan dalında olan IRE1,XBP1 proteinlerinin miktarının belirlenmesi için immünohistokimyasal boyama uygulandı.

- Bloklanmış dokulardan Leica RM 2245 (Almanya) mikrotomunda 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak pozitif şarjlı lamlara yerleştirildi ve bir gece 60 °C etüvde bekletildi.

- Lamlar 2x5 dk. ksilende bekletildikten sonra azalan alkol serilerinden (%100, %90) 5'er dk. geçirildi.
- Distile su ile durulandı, PBS ile 1x10 dk. yıkama yapıldı.
- Bu aşamada antijen kurtarma basamağı için lamlar %10 sitratlı tampon çözeltisi ile 700 watta 2x7 dk olacak şekilde mikrodalga fırında kaynatıldı.
- Tüm lamlar aynı solüsyon içerisinde 15 dk. soğutuldu.
- 4x2 dk. PBS ile yıkandı.
- Yıkama sonrası dokular Pap Pen ile çerçevelendi.

%3 H_2O_2'de (Hidrojen Peroksit) 20 dk. bekletildi.

- Ardından tekrar 4x2 dk. PBS ile yıkandı.
- UV blokta (protein blok) 20 dk. bekletildi.
- Bu sırada GRP78 ve XBP1 antikorları 1/200, IRE1 antikoru 1/150 oranında dilüe edildi.
- Yirmi dk. dolunca hazırlanan antikorlar dokulara uygulandı ve +4°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
- Ardından 4x2 dk. PBS ile yıkandı.
- 20 dk. biyotinlenmiş sekonder antikor uygulandı.
- Sonrasında yine 4x2 dk. PBS ile yıkandı
- 20 dk. 100 µl streptavidine maruz bırakıldı.
- 4x2 dk. PBS ile yıkandı.
- Yıkama sonrası lamlardaki dokular 10-15 sn 100 µl DAB kromojen (kahverengi renk görülene kadar) ile boyandı.
- Daha sonra lamlar PBS ile yıkandı.
- 1 dk. Mayers Hematoksilen ile boyandı.
- Ardından lamlar tekrar musluk suyu ile yıkanarak distile su ile durulandı.
- Artan alkol serilerinden (%70,%80,%90) batırıp çıkararak geçirildi. %100 alkolde 3 dk. bekletildi.
- Son aşama olarak ksilende 5 dk. kalan preparatlara kapama işlemi yapıldı.

3.6 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

3.6.1 Dokudan RNA izolasyonu

Hedeflenen proteinlerin gen boyutunda değişimlerini görebilmek için qRT-PCR yöntemi kullanıldı. Total RNA izolasyon kiti olarak İnvitrogen Purelink Rna Mini kit ürünü kullanıldı. RNA'lar kit protokolüne göre izole edilmiştir.

- Kitte bulunan lyzis buffer solüsyonu protokole uygun olarak kitten çıkan lyzis buffera "1 ml lyzis buffera 100 mikrolitre(µl) merkaptoetanol" olacak şekilde doku parçalama işleminden hemen önce hazırlanarak kullanılmıştır. Ependorflara önce pankreas doku parçaları, üzerine lyzis bufferdan 500 µl ve en son da bilyeler eklenerek doku homojenizatöründe 5 dakika parçalama yapıldı. Doku parçalama için Qiagen TissueLyser LT cihazı kullanıldı.
- Daha sonra +4 °C 5000 rpmde 10 dakika santrifüj işlemi uygulandı.
- Üstte kalan pelletten 150-200 mikrolitre kadar alındı.
- Aynı miktarda %70 etanol eklenerek karıştırıldı.
- Elde edilen karışım spin kolona aktarıldı.
- 700 µl Wash buffer I eklenip oda ısısında 12000 rpmde 15 saniye santrifüj edildi.
- Altta kalan sıvı atılarak 12000 rpmde yeniden 15 saniye santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı.
- 500 µl wash buffer II eklenerek yeniden 12000 rpmde 15 saniye santrifüj edilerek yeniden altta kalan sıvı atıldı.
- Yeniden 500 µl wash buffer II eklenerek 12000 rpmde 15 saniye santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı.
- Yeniden 12000 rpmde 2 dakika santrifüj edilerek alttaki tüp atıldı. Spin kolon yeni toplama tüpüne geçirildi.
- Spin kolonun tam orta kısmına gelecek şekilde 60 µl rnaz free water solüsyonu eklenip oda ısısında 1 dakika kadar beklendi.
- 12800 rpmde 2 dakika santrifüj edildi. Ve toplama tüpündeki sıvıda rna elde edilmiş oldu.

3.6.2 cDNA Sentezi

cDNA sentezi OneScript Plus cDNA Synthesis Kit kullanılarak kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. RNA'dan cDNA elde edilmesi işleminde kit içerisindeki kimyasallardan hazırlanan bir reaksiyonluk karışım için gerekli malzemeler ve kullanılan miktarlar aşağıda gösterilmiştir.(Tablo 3.4, Tablo 3.5)

- Rna miktarının her reaksiyonda 1 mikrogram(µg) olacak şekilde ayarlanabilmesi için, 1 mikrolitredeki rna miktarı Nanodrop Spektrofotometre Nd-1000 cihazı ile ölçülmüştür.

Tablo 3.4 cDNA sentezi kullanılan malzeme miktarları

Malzeme	**Miktar**
5X RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Random Primer	1 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
RNA	Değişken miktarda (Reaksiyonda 1 µg rna olacak şekilde)
Nuclease-free H_2O	Karışımı 20 µlye tamamlayacak kadar
Toplam	20 µl

- Hazırlanan 20 µllik karışıma pipetaj yapıldı ve karıştırıldı.
- Tüpler Applied Biosystems Veriti 9902 PCR 96-Well Thermal Cycler cihazında aşağıda verilen koşullarda tutularak sentezleme işlemi yapılmıştır.

Tablo 3.5 cDNA sentez aşamaları

	Adım 1	Adım 2	Adım 3
Sıcaklık (°C)	55	85	-20
Zaman	15 dk	5 dk	∞

Elde edilen cDNA'lar gen ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere -20°C dondurucuda saklanmıştır.

3.6.3 qRT-PCR Analizleri

Tüm hayvanlardan alınan pankreaslarda UPR sinyal yolağında etkin görev alan GRP 78 , IRE1α , sXBP1 genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu genlerin ifadelerinde meydana gelen değişimleri araştırmak için kullanılan primerler ve baz dizileri aşağıda verilmiştir. Kontrol primeri olarak gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (Gapdh) kullanılmıştır.

Tablo 3.6 Kullanılan genler ve baz dizileri

Genler		Baz Dizileri (5'→3')	Referans
Gapdh	Forward	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	(159)
	Reverse	GATGGTGATGGGTTTCCCGT	
Grp 78	Forward	CTGGGTACATTTGATCTGACTGG	(120)
	Reverse	GCATCCTGGTGGCTTTCCAGCCATTC	
IRE1α	Forward	TTGACTATGCAGCCTCACTTC	Genbank XM_017597474.2 (160)
	Reverse	AGTTACCACCAGTCCATCGC	
sXBP1	Forward	GCTGAGTCCGCAGCAGGT	(161)
	Reverse	CCCAAAAGGATATCAGACTCAGAATC	

Stok primeri oluşturmak için liyofilize haldeki 50 nmollük primerler tablodaki miktarlarda nükleaz içermeyen suda çözülmüştür. Çalışma primeri oluşturmak için stok primer solüsyonları 1/10 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

Tablo 3.7 Primerlerin stok oluşturmak için sulandırılma miktarları.

Gapdh	F: 433 µl
	R:461 µl
Grp78	F:405 µl
	R:362 µl
sXbp1	F:692 µl
	R:495 µl
Ire1 α	F:427 µl
	R:465 µl

"RNA izolasyonu" bölümünde açıklandığı şekilde izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar Qiagen Rotor Gene Q-Pure Detection cihazı kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu cDNA'lar qRT-PCR'da HOT FIREPol EvaGreen qPCR protokolüne uygun ve her gen için 3 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır. qRT-PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için cihazda uygulanan protokol aşağıda verilmiştir.(Tablo 3.8, Tablo 3.9)

Tablo 3.8: qRT-PCR için kullanılan madde ve miktarları.

Kullanılan Madde	Miktar
HOT FIREPol EvaGreen q PCR Mix plus (5x)	4 µl
Forward Primer	0,6 µl
Reverse Primer	0,6 µl
c DNA	1 µl
Ultra Saf Su	20 µlye tamamlayacak şekilde
Toplam	20 µl

Tablo 3.9 : qRT- PCR Aşamaları.

Adım	Sıcaklık	Zaman	siklus
İlk Etkinleştirme	95	12 dk	1
Denatürasyon	95	15 saniye	40
Hibridizasyon	60-65	20 saniye	
Uzama	72	20 saniye	

3.7 İstatiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro Wilk testi ile test edilmiştir. Normal dağılan değişkenlerin 4 grupta karşılaştırılmasında ANOVA ve LSD testleri, normal dağılmayan değişkenlerin 4 grupta karşılaştırılmasında Kruskal Wallis ve Dunn testleri kullanılmıştır. Gözlemciler arası uyum Intraclass korelasyon katsayısı ile test edilmiştir. Analizlerde SPSS 22.0 Windows versiyon paket programı kullanılmıştır. $P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan 32 adet sıçanın deney öncesi ölçülen ağırlıkları karşılaştırıldığında 4 grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. (p=0,186)

4.1 Biyokimyasal Bulgular

Çalışmamızda bakılan lipid parametrelerinden total kolesterol, LDL, HDL, trigliserit değerlerinde gruplar arasında sırasıyla anlamlı fark tespit edilmiştir. (Tablo 4.1) (p=0,001, p=0,001,p=0,001, p=0,001). Pankreas enzimlerinden amilaz ve lipazın değerlerinde de gruplar arası anlamlı fark tespit edilmiştir. (Tablo 4.1) (p=0,001, p=0,001)

Kontrol grubu lipid parametreleri; total kolesterol 50,38 ± 5,37 mg/dl, LDL 17,63 ± 2,5 mg/dl, HDL 29,5 ± 4,38 mg/dl, trigliserit 35,88 ± 11,31 mg/dl olarak ölçülmüştür. Pankreas enzimleri ise amilaz 1778,25 ± 513,84 U/L, lipaz 19,75 ± 21,59 U/L olarak ölçülmüştür. (Tablo 4.1)

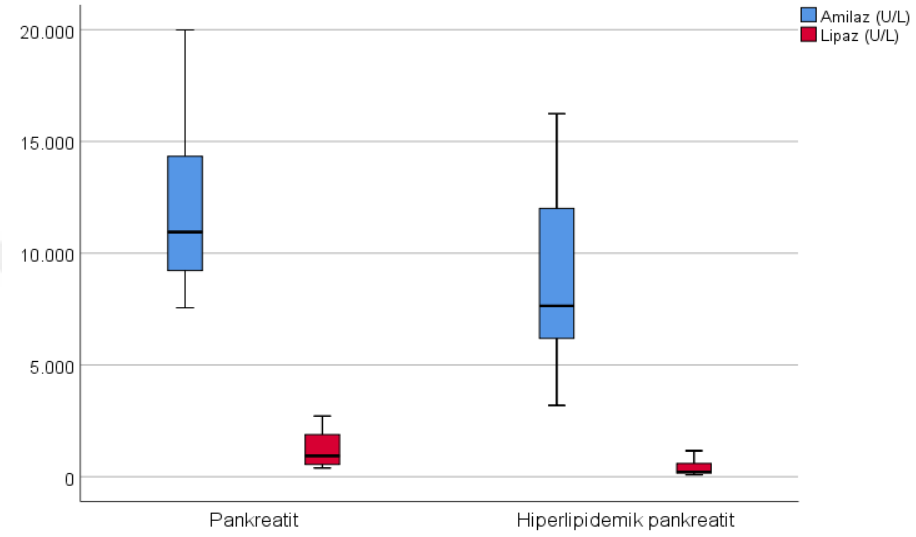
Akut pankreatit grubu lipid parametreleri; total kolesterol 45,38 ± 3,25 mg/dl, LDL 15,63 ± 2mg/dl, HDL 27,25 ± 2,31 mg/dl, trigliserit 29,38 ± 6,07 mg/dl olarak ölçülmüştür. Pankreas enzimleri ise amilaz 12070,5 ± 4189,94 U/L, lipaz 1231 ± 939,34 U/L ölçülmüştür. (Tablo 4.1)

Hiperlipidemi grubu lipid parametreleri, total kolesterol 624 ± 98,64 mg/dl, LDL 146,88 ± 55,72 mg/dl, HDL 105,88 ± 17,28 mg/dl, trigliserit 4707,5 ± 1126,6 mg/dl olarak ölçülmüştür. Pankreas enzimleri ise amilaz 1253,25 ± 198,55 U/L, lipaz 42,25 ± 9,94 U/L ölçülmüştür. (Tablo 4.1)

Hiperlipidemik akut pankreatit grubu, lipid parametreleri total kolesterol 608,88 ± 28,39 mg/dl **,** LDL 161,75 ± 14,98 mg/dl**,** HDL 105,13 ± 17,04 mg/dl, trigliserit 4986,25 ± 357,06 mg/dl olarak ölçülmüştür. Pankreas enzimleri ise amilaz 8889,13 ± 4687,08 U/L, lipaz 399,13 ± 407,9 U/L ölçülmüştür. (Tablo 4.1)

Hiperlipidemi ve hiperlipidemik akut pankreatit gruplarının total kolesterol, HDL, LDL, trigliserit değerleri akut pankreatit ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Hiperlipidemi grubu ile hiperlipidemik akut pankreatit grubu arasında ve akut pankreatit grubu ile kontrol grubu arasında lipid parametreleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. (Tablo 4.2, Tablo 4.3)

Akut pankreatit ve hiperlipidemik akut pankreatit gruplarının amilaz, lipaz değerlerinin kontrol ve hiperlipidemi grubuna göre yüksekliği anlamlı bulunmuştur. Akut pankreatit grubu ile hiperlipidemik akut pankreatit grubu arasında ve kontrol grubu ile hiperlipidemi grubu arasında amilaz, lipaz değerleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. (Tablo 4.2 , Tablo 4.3)



Şekil 4.1 Pankreatit ve Hiperlipidemik pankreatit grubu amilaz, lipaz değerleri.

Tablo 4.1: Kan Biyokimya Sonuçları.

		Ort±St.Sapma	Medyan (%25-%75)	P
Total kolesterol (mg/dl)	Kontrol	50,38 ± 5,37	49 (46 -54)	0,001*†
	AP	45,38 ± 3,25	44,5 (43,5 -47,5)	
	Hiperlipidemi	624 ± 98,64	632,5 (605,5 -654)	
	Hiperlipidemik pankreatit	608,88 ± 28,39	611,5 (587 -628,5)	
Hdl (mg/dl)	Kontrol	29,5 ± 4,38	29,5 (27,5 -31,5)	0,001* ‡
	AP	27,25 ± 2,31	28 (25 -29)	
	Hiperlipidemi	105,88 ± 17,28	101 (93 -122,5)	
	HTG-AP	105,13 ± 17,04	101,5 (98,5 -107)	

Tablo 4.1 Kan Biyokimya Sonuçları devam.

Ldl (mg/dl)	Kontrol	17,63 ± 2,5	17 (16 -18,5)	0,001* ‡
	AP	15,63 ± 2	15,5 (14 -17,5)	
	Hiperlipidemi	146,88 ± 55,72	160,5 (152 -172,5)	
	HTG-AP	161,75 ± 14,98	163 (147,5 -172)	
Trigliserit (mg/dl)	Kontrol	35,88 ± 11,31	37,5 (24,5 -44,5)	0,001* ‡
	AP	29,38 ± 6,07	30 (26 -34)	
	Hiperlipidemi	4707,5 ± 1126,6	4803,5 (4532 5521,5)	
	HTG-AP	4986,25 ± 357,06	4849,5 (4801 -4984)	
amilaz (U/L)	Kontrol	1778,25 ± 513,84	1748,5 (1658,5 - 2056)	0,001*†
	AP	12070,5 ± 4189,94	10948 (9223 - 14337,5)	
	Hiperlipidemi	1253,25 ± 198,55	1218 (1112,5 - 1367,5)	
	HTG-AP	8889,13 ± 4687,08	7646 (6190 - 12004,5)	
lipaz (U/L)	Kontrol	19,75 ± 21,59	11,5 (9 -18,5)	0,001* ‡
	AP	1231 ± 939,34	935 (547 -1887,5)	
	Hiperlipidemi	42,25 ± 9,94	43,5 (37,5 -48,5)	
	HTG-AP	399,13 ± 407,9	219 (163,5 -593,5)	

*p<0,05 düzeyinde anlamlı, †ANOVA ve LSD testleri, ‡Kruskal Wallis ve Dunn testleri

Tablo 4.2: Lipit değerleri gruplar arası çoklu karşılaştırma

	HDL	LDL	Trigliserid	Total Kolesterol
Kontrol- Pankreatit	,521	,439	,594	,847
Kontrol-Hiperlipidemi	,002*	,012*	,003*	,001*
Kontrol-Hiperlipidemik akut pankreatit	,002*	,006*	,001*	,001*
Pankreatit-Hiperlipidemi	,001*	,001*	,001*	,001*
Pankreatit-Hiperlipidemik akut pankreatit	,001*	,001*	,001*	,001*
Hiperlipidemi-Hiperlipidemik akut pankreatit	,979	,789	,749	,561

*p<0,05 düzeyinde anlamlı.

Tablo 4.3: Pankreas enzimleri gruplar arası çoklu karşılaştırma

Karşılaştırılan Gruplar	Amilaz	Lipaz
Kontrol- Akut Pankreatit	,001*	,001*
Kontrol-Hiperlipidemi	,742	201
Kontrol-Hiperlipidemik akut pankreatit	,001*	,001*
Akut Pankreatit-Hiperlipidemi	,001*	,001*
Akut Pankreatit-Hiperlipidemik akut pankreatit	,053	,241
Hiperlipidemi-Hiperlipidemik akut pankreatit	,001*	,029

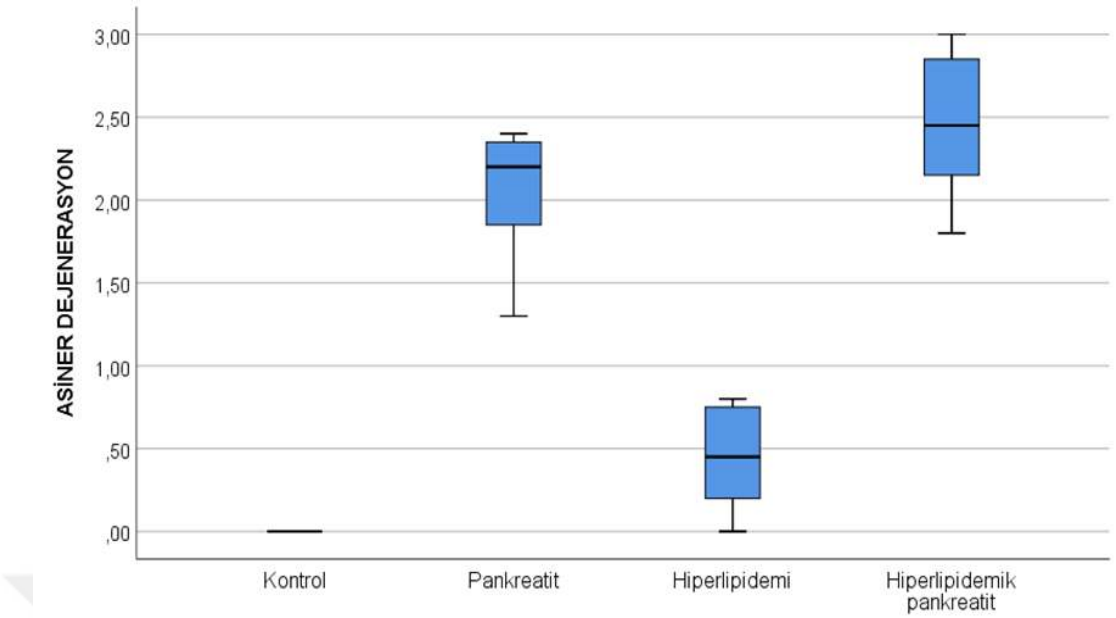
*p<0,05 düzeyinde anlamlı.

4.2 Histopatolojik Bulgular

4.2.1 Hemotoksilen Eozin Boyama ve Skorlama Bulguları

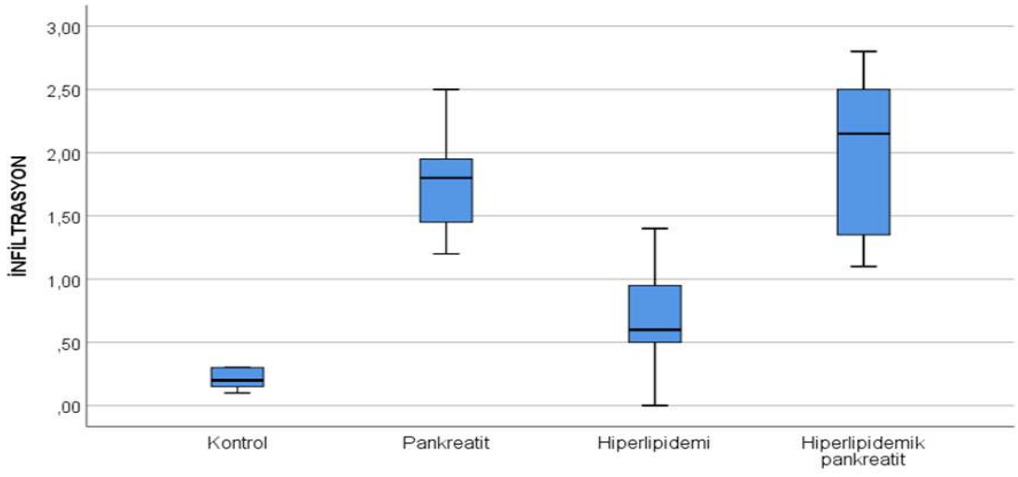
Çalışmamızda tüm kesitler hematoksilen eozin ile boyandıktan sonra çift kör olarak iki histolog tarafından ışık mikroskobu incelemesi yapılıp skorlanmıştır. Skorlamada asiner dejenerasyon, infiltrasyon, ödem, kanama açısından değerlendirilip toplam skor elde edilmiştir.

Asiner dejenerasyon, infiltrasyon, ödem, kanama ve toplam skor değerlendirildiğinde gruplar arası anlamlı fark gözlenmiştir. (Tablo 4.5)



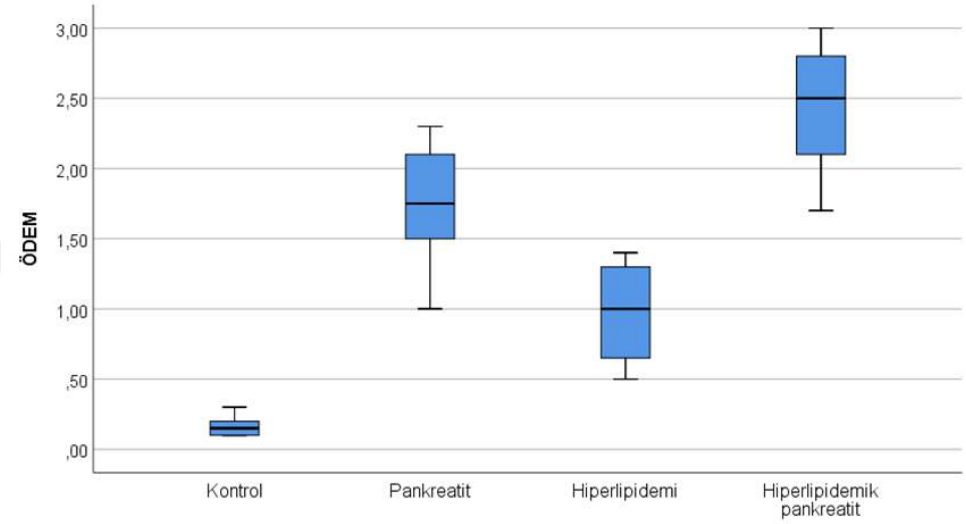
Şekil 4.2 Asiner dejenerasyon skoru gruplar arası karşılaştırması

Asiner dejenerasyon değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre akut pankreatit ve hiperlipidemik akut pankreatit gruplarında anlamlı artış tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile hiperlipidemi grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Yine akut pankreatit grubu ile hiperlipidemik akut pankreatit grubu arasında da asiner dejenerasyon açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Hiperlipidemik akut pankreatit grubunda ise asiner dejenerasyon hiperlipidemi grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. (Tablo 4.6, Şekil 4.1)



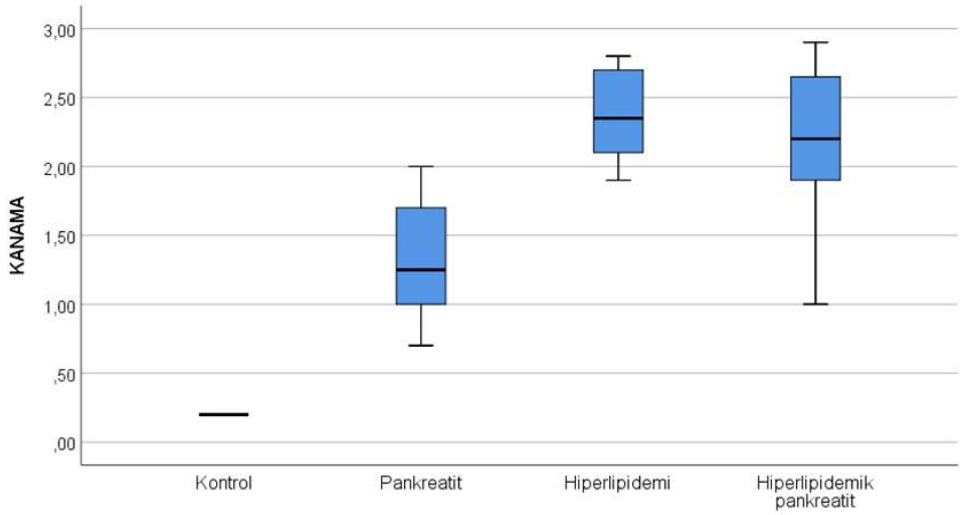
Şekil 4.3 İnfiltrasyon skoru gruplar arası karşılaştırması.

İnfiltrasyon açısından kontrol grubuna göre her üç grupta anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Hiperlipidemik akut pankreatit grubunda infiltrasyon, hiperlipidemi grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak hiperlipidemik akut pankreatit grubu ile akut pankreatit grubu arasında infiltrasyon açısından anlamlı fark bulunmamıştır.(Tablo 4.7, Şekil 4.2)



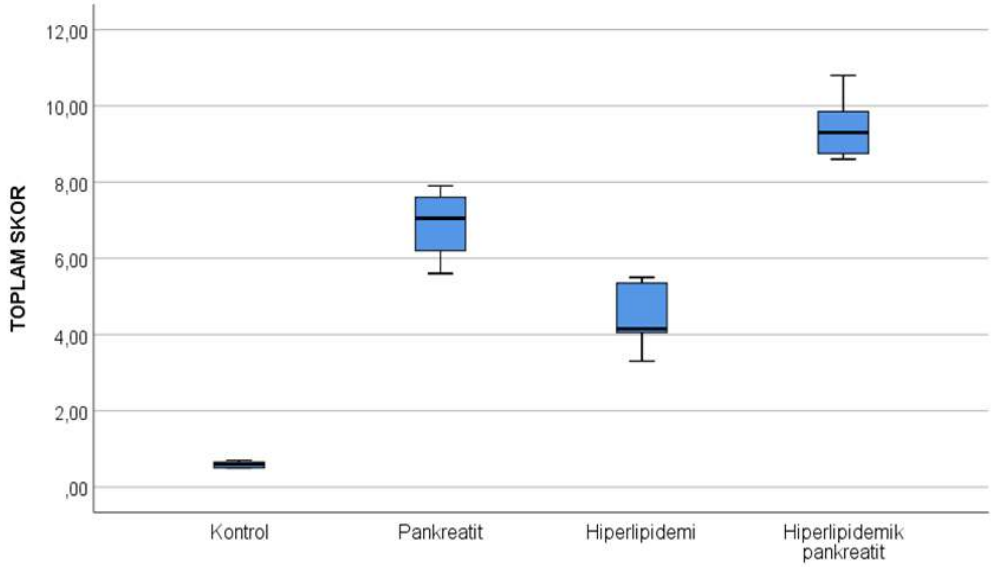
Şekil 4.4 Ödem skoru gruplar arası karşılaştırması.

Ödem açısından değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre akut pankreatit grubu ve hiperlipidemik akut pankreatit grubunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Hiperlipidemi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hiperlipidemik akut pankreatit grubunda ödem hiperlipidemi grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Akut pankreatit ve hiperlipidemik akut pankreatit grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.(Tablo 4.6, Şekil 4.3)



Şekil 4.5 Kanama skoru gruplar arası karşılaştırması.

Kanama değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre hiperlipidemi ve hiperlipidemik akut pankreatit gruplarında anlamlı bir artış bulunmuştur. Kontrol grubu ile akut pankreatit grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Hiperlipidemik akut pankreatit grubunda kanama akut pankreatit grubuna göre anlamlı düzeyde artmıştır. Hiperlipidemi grubu ile hiperlipidemik akut pankreatit grupları arasında ise anlamlı fark tespit edilmemiştir.(Tablo 4.6, Şekil 4.4)



Şekil 4.6 Toplam skor gruplar arası karşılaştırması.

Asiner dejenerasyon, infiltrasyon, ödem ve kanama her sıçan için en düşük 0, en yüksek 3 olacak şekilde skorlanarak en düşük 0, en yüksek 12 olacak şekilde toplam skor elde edilmiştir. Toplam skor açısından kontrol grubuna göre pankratit, hiperlipidemi, hiperlipidemik akut pankreatit gruplarında anlamlı bir artış gözlenmektedir. Hiperlipidemik akut pankreatit grubu en yüksek toplam skora sahip olarak değerlendirilmiştir. Toplam skor açısından hiperlipidemi grubu ve akut pankreatit grubuna göre hiperlipidemik akut pankreatit grubundaki bu artış anlamlı bulunmuştur. (Tablo 4.6 , şekil 4.5)

Tablo 4.4 Histolojik skorlama değerleri.

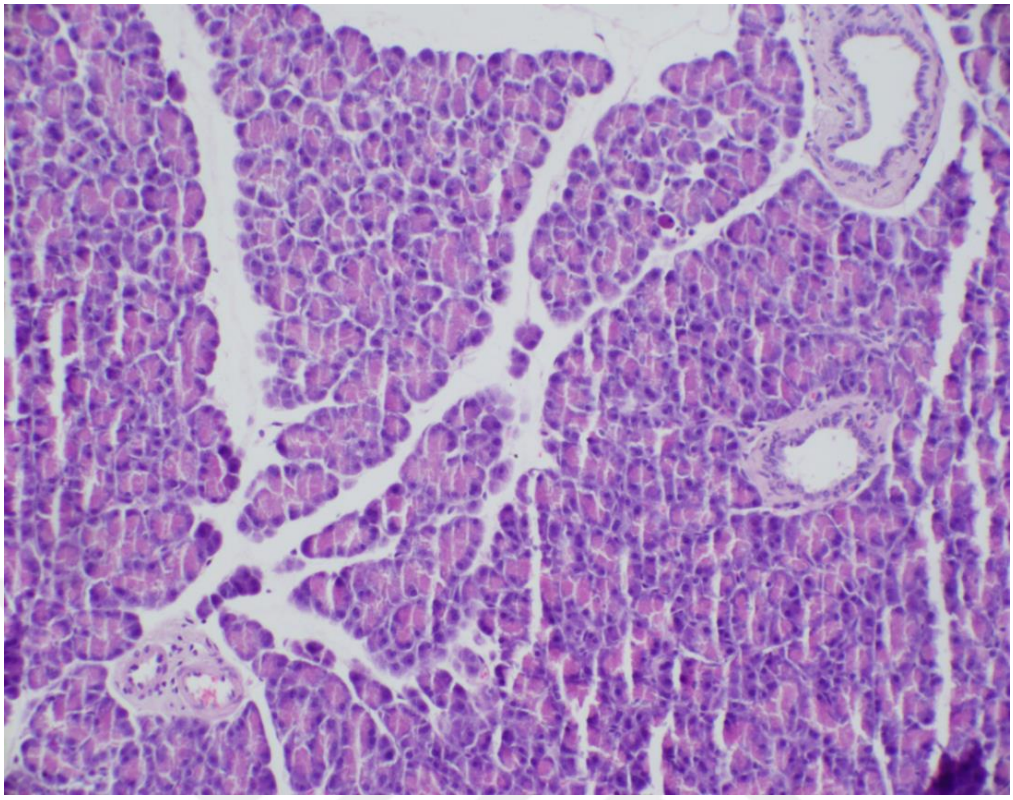
ASİNER DEJENERASYON	GRUP	Kontrol	0,01 ± 0,04	0 (0 -0)	0,001* ‡
		AP	2,06 ± 0,4	2,2 (1,85 -2,35)	
		Hiperlipidemi	0,45 ± 0,33	0,45 (0,2 -0,75)	
		HTG-AP	2,46 ± 0,43	2,45 (2,15 -2,85)	
İNFİLTRASYON	GRUP	Kontrol	0,21 ± 0,08	0,2 (0,15 -0,3)	0,001*†
		AP	1,76 ± 0,41	1,8 (1,45 -1,95)	
		Hiperlipidemi	0,69 ± 0,44	0,6 (0,5 -0,95)	
		HTG-AP	1,99 ± 0,64	2,15 (1,35 -2,5)	
ÖDEM	GRUP	Kontrol	0,16 ± 0,07	0,15 (0,1 -0,2)	0,001* ‡
		AP	1,75 ± 0,43	1,75 (1,5 -2,1)	
		Hiperlipidemi	0,98 ± 0,36	1 (0,65 -1,3)	
		HTG-AP	2,44 ± 0,47	2,5 (2,1 -2,8)	
KANAMA	GRUP	Kontrol	0,2 ± 0,05	0,2 (0,2 -0,2)	0,001* ‡
		AP	1,33 ± 0,45	1,25 (1 -1,7)	
		Hiperlipidemi	2,38 ± 0,33	2,35 (2,1 -2,7)	
		HTG-AP	2,18 ± 0,6	2,2 (1,9 -2,65)	
TOPLAM SKOR	GRUP	Kontrol	0,59 ± 0,08	0,6 (0,5 -0,65)	0,001*†
		AP	6,9 ± 0,85	7,05 (6,2 -7,6)	
		Hiperlipidemi	4,49 ± 0,81	4,15 (4,05 -5,35)	
		HTG-AP	9,06 ± 1,45	9,3 (8,75 -9,85)	

*p<0,05 düzeyinde anlamlı, †ANOVA ve LSD testleri, ‡ Kruskal Wallis ve Dunn testleri

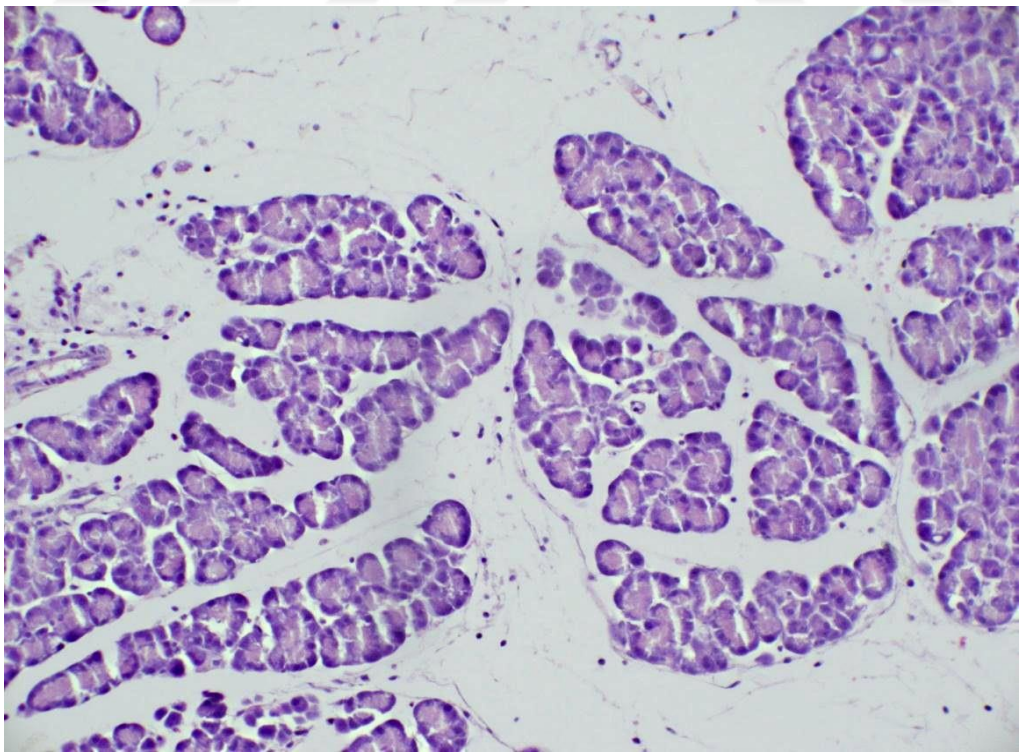
Tablo 4.5 Histolojik skorlama çoklu karşılaştırmalar.

	Asiner dejenerasyon	Ödem	Kanama	İnfiltrasyon	Toplam Skor
Kontrol-Hiperlipidemi	,139	,065	,001*	,039*	,001*
Kontrol-Akut Pankreatit	,001*	,001*	0,52	,001*	,001*
Kontrol-Hiperlipidemik akut pankreatit	,001*	,001*	,001*	,001*	,001*
Hiperlipidemi-Akut Pankreatit	,020*	,095	,013*	,001*	,001*
Hiperlipidemi-Hiperlipidemik akut pankreatit	,002*	,002*	,620	,001*	,001*
Akut Pankreatit-Hiperlipidemik akut pankreatit	,451	,165	,048*	,314	,001*

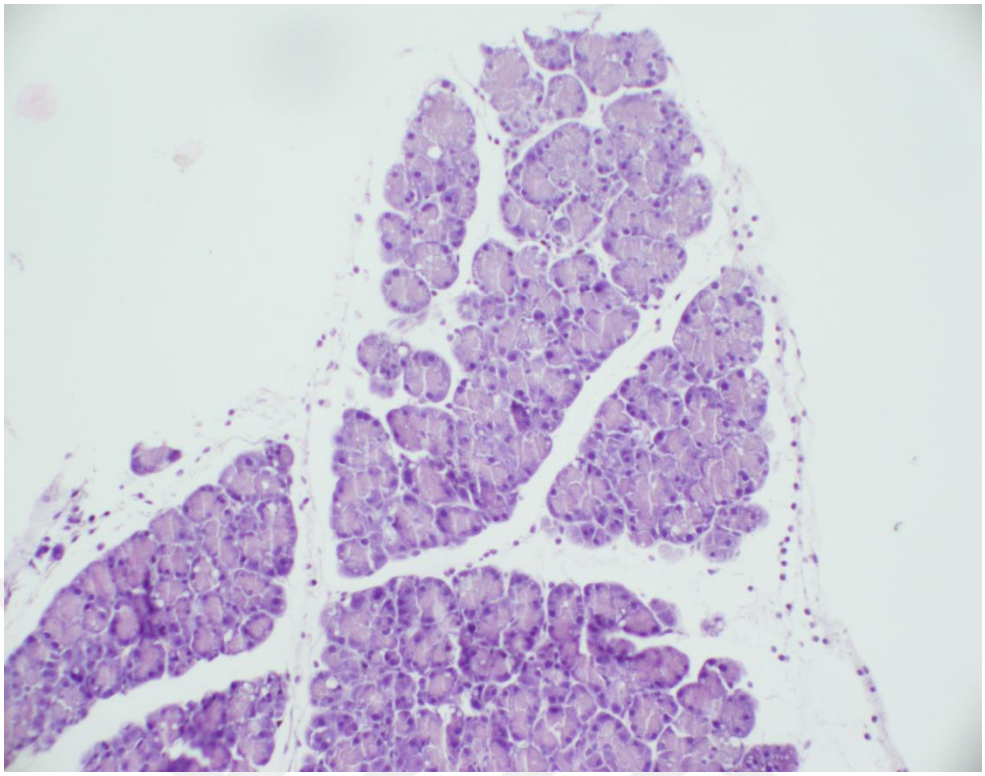
*p<0,05 düzeyinde anlamlı.



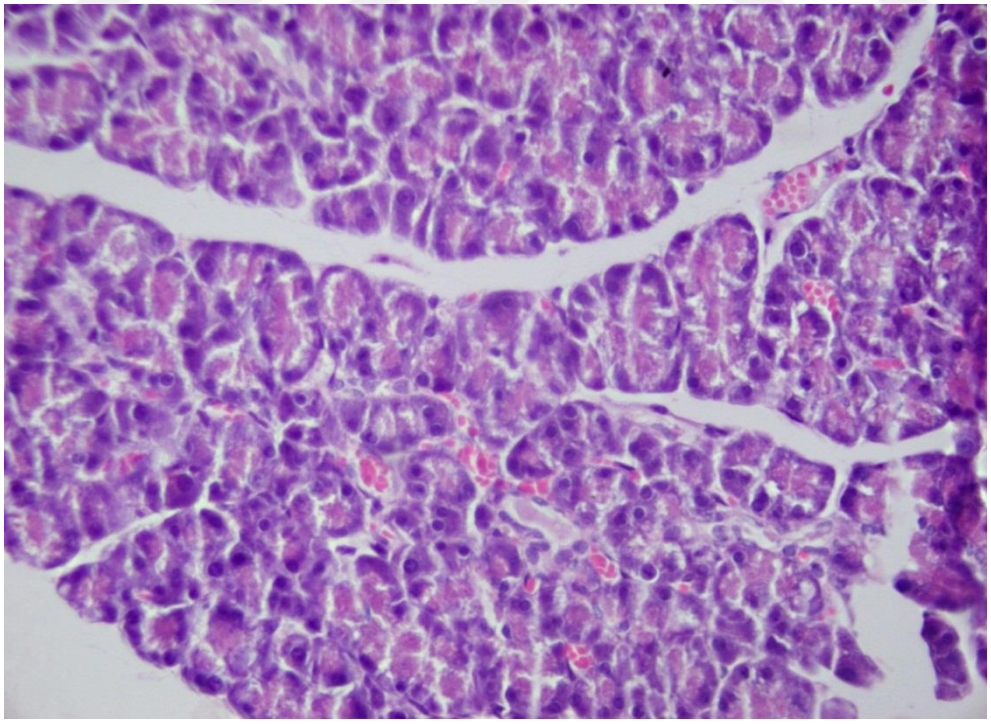
Şekil 4.7: Kontrol grubu pankreas dokusu (H-Ex20).



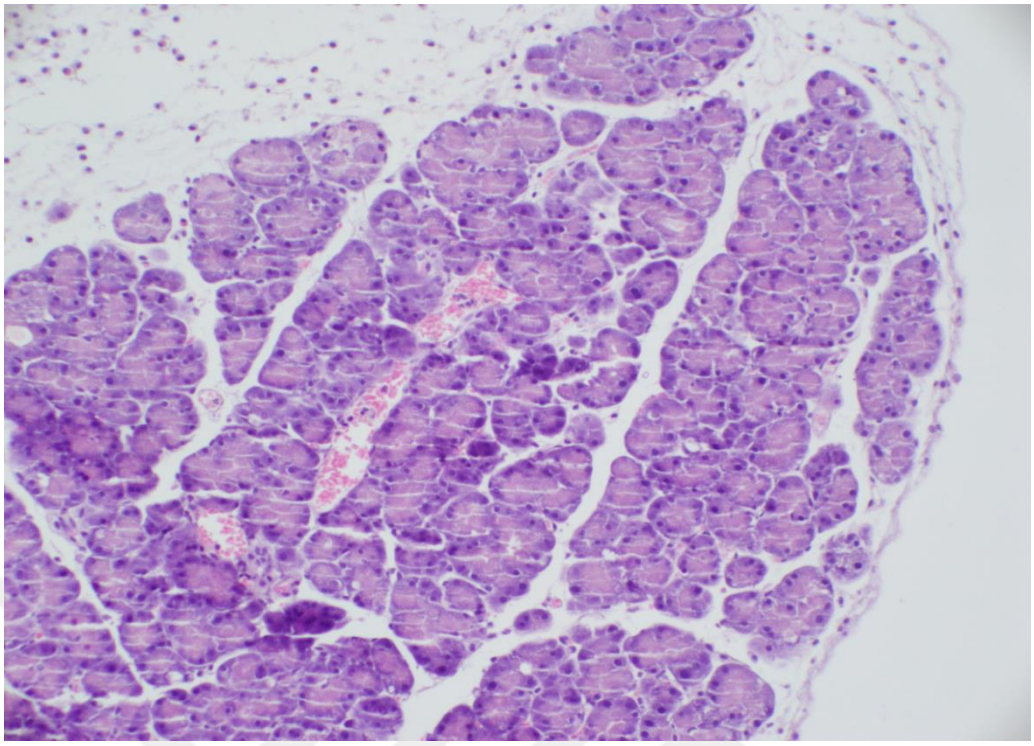
Şekil 4.8: Akut pankreatit grubu ödem ve infiltrasyon (H-Ex20).



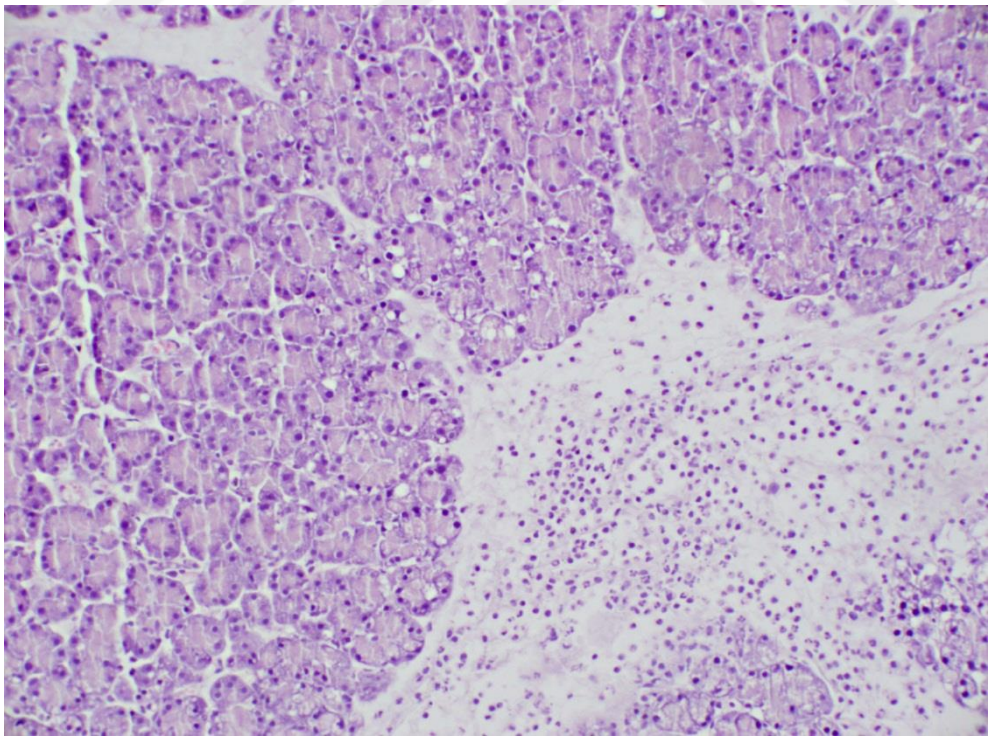
Şekil 4.9: Akut pankreatit grubu ödem, infiltrasyon ve asiner dejenerasyon (H-Ex20).



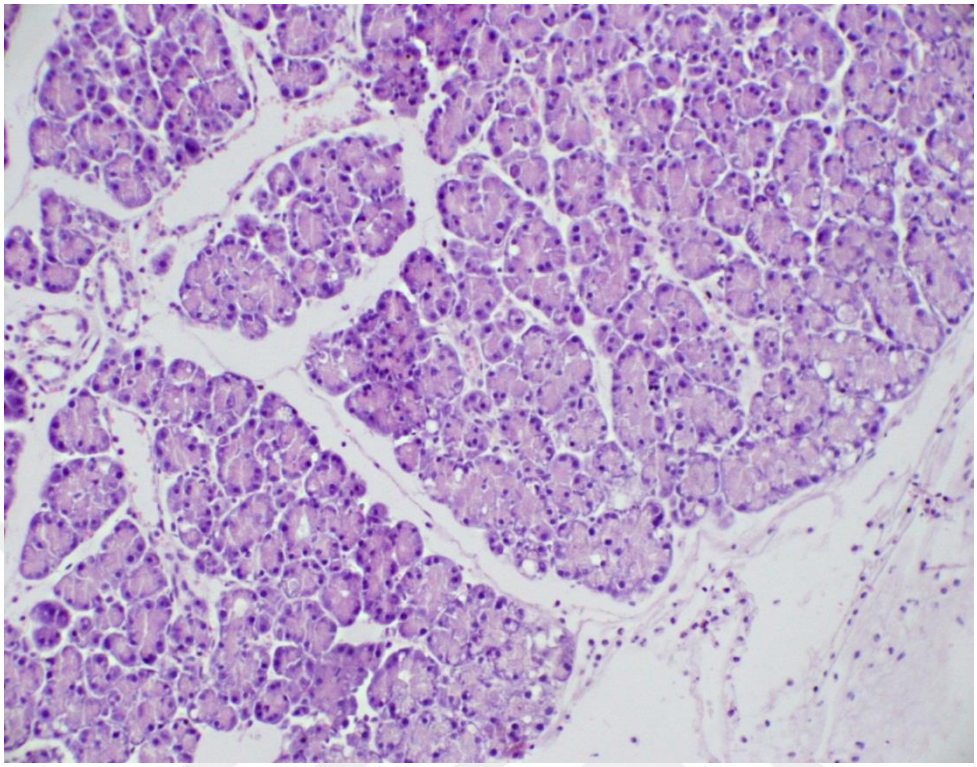
Şekil 4.10: Hiperlipidemi grubu kuvvetli hemoraji (H-Ex40).



Şekil 4.11: Hiperlipidemik Akut Pankreatit grubu hemoraji, infiltrasyon (H-Ex20).



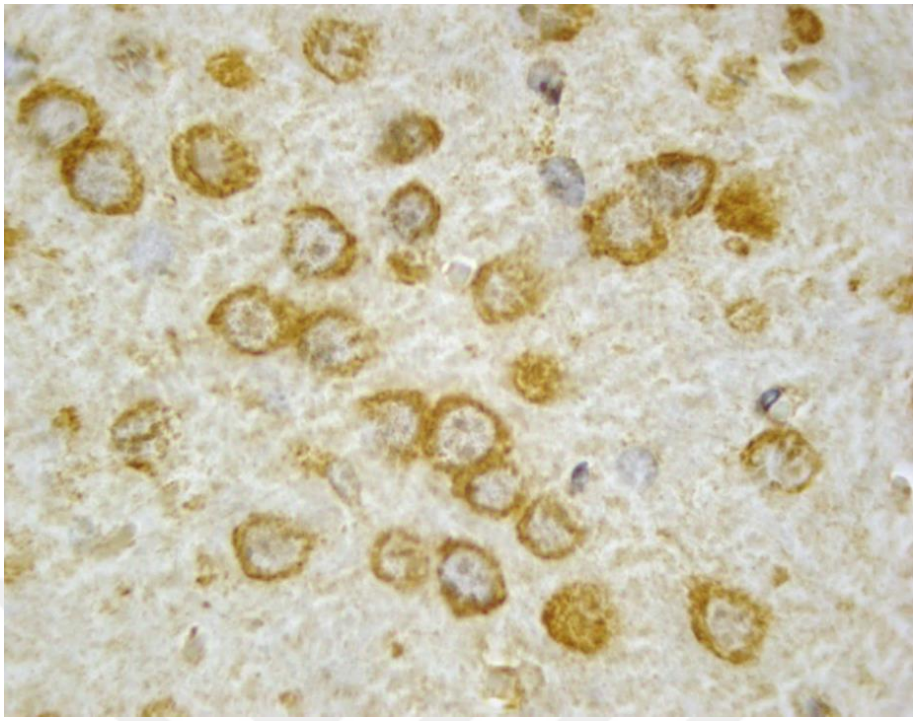
Şekil 4.12: Hiperlipidemik Akut Pankreatit infiltrasyon, asiner dejenerasyon (H-Ex20).



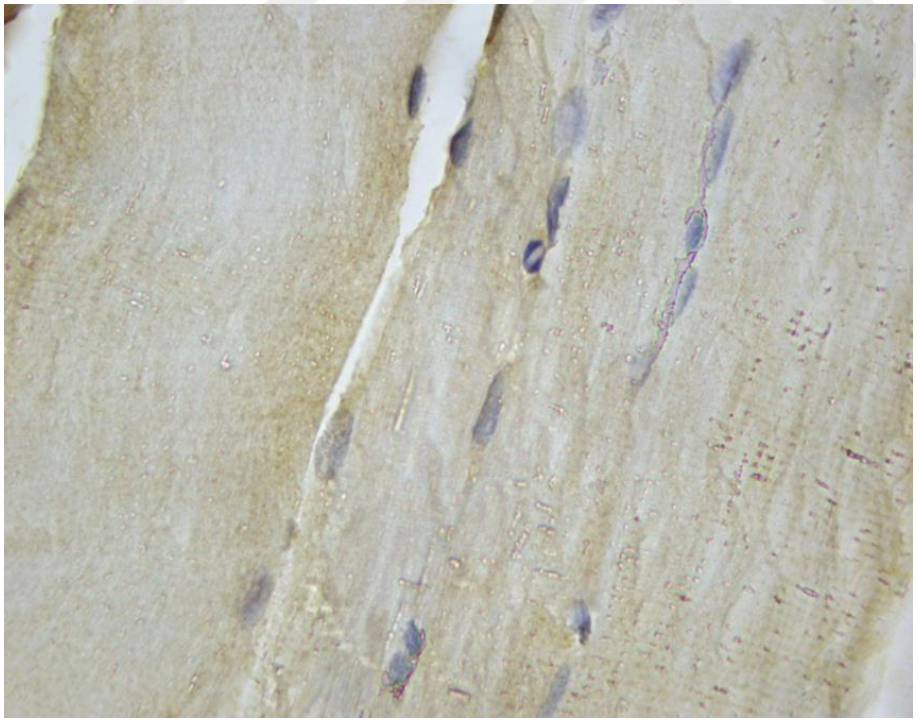
Şekil 4.13: Hiperlipidemik Akut pankreatit infiltrasyon, asiner dejenerasyon, hemoraji (H-Ex20)

4.2.2 İmmünohistokimya Boyama Deney Bulguları

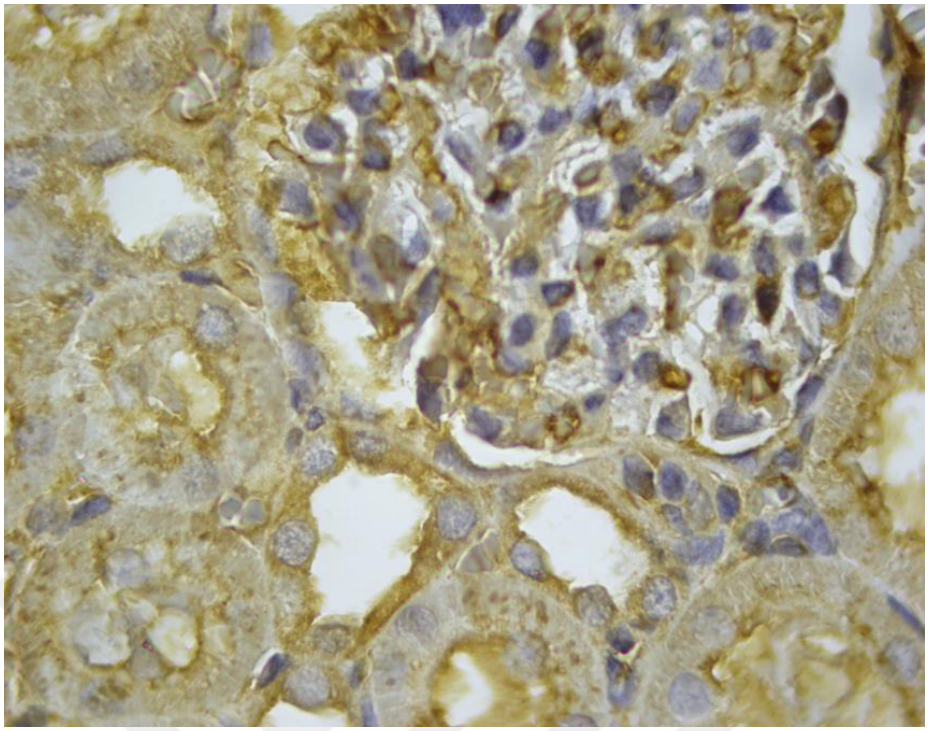
İmmün boyamada kontrol, akut pankreatit, hiperlipidemi ve hiperlipidemik akut pankreatit grupları pankreas dokularını görsel olarak değerlendirmek için ER stres belirteçlerinden GRP78, IRE1 ve XBP-1 antikorları kullanıldı. Pozitif kontrol dokuları olarak GRP78 için sıçan beyni, IRE1 için sıçan çizgili kas dokusu, XBP-1 için sıçan böbrek dokusu kullanıldı, (–) kontrol olarak primer antikor yerine PBS solusyonu uygulandı.(Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15) İmmün boyama ile elde ettiğimiz görüntülerde GRP78 açısından akut pankreatit grubunda kontrol ve hiperlipidemi grubuna göre daha az boyanma gözlenmiştir. Akut pankreatit ve hiperlipidemik akut pankreatit grupları arasında boyanma açısından fark gözlenmemiştir. (Şekil 4.16, şekil 4.17, şekil 4.18, şekil 4.19) IRE-1 ve XBP-1 ile boyamada ise sitoplazmik anlamlı bir boyanma izlenememiştir. (Şekil 4.20, şekil 4.21, şekil 4.22, şekil 4.23)



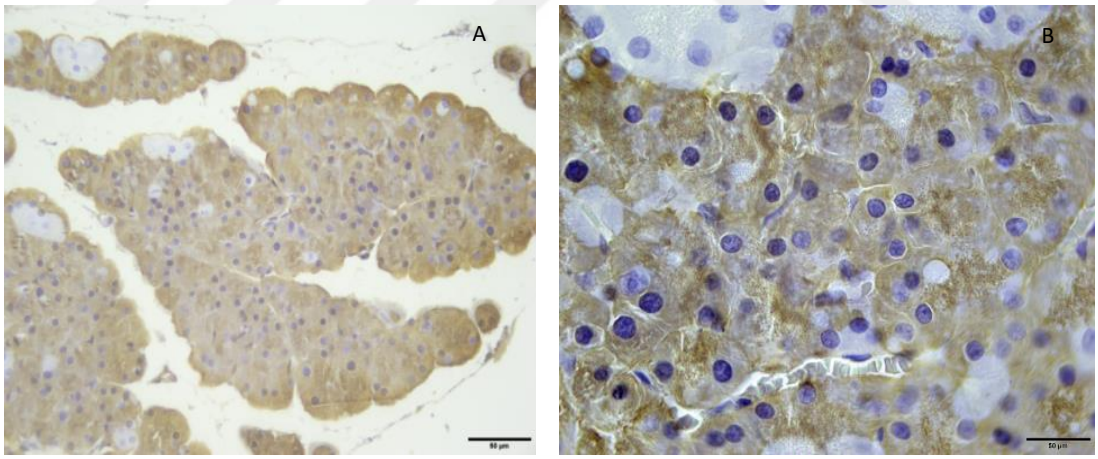
Şekil 4.14: GRP78 rat beyin dokusu pozitif kontrol X100



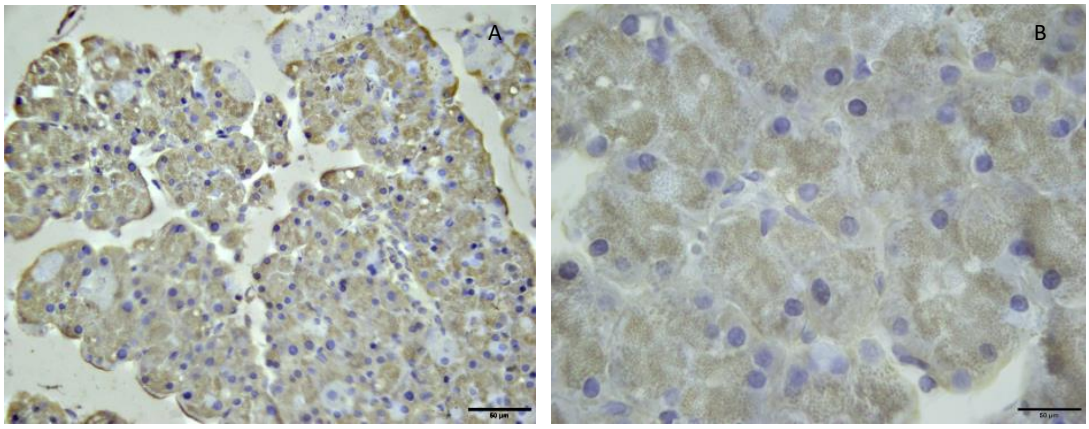
Şekil 4.15: IRE-1 sıçan çizgili kas doku pozitif kontrol x100.



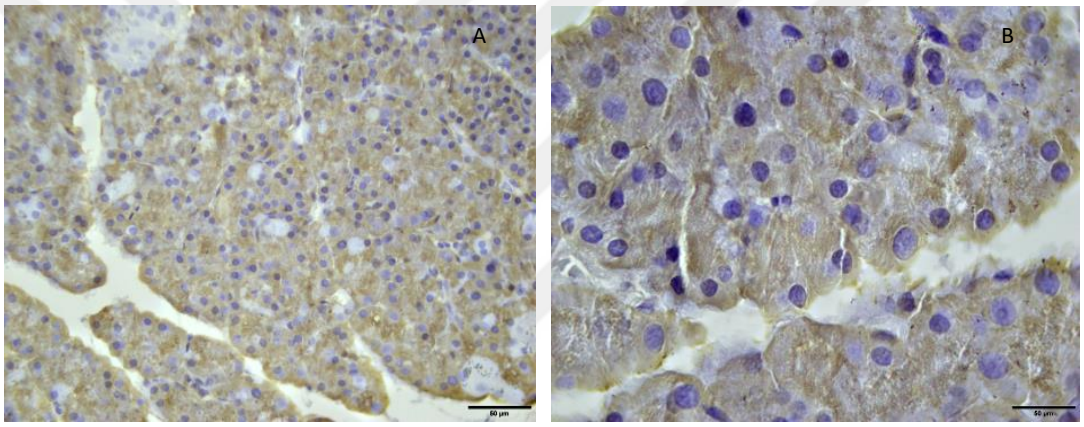
Şekil 4.16: Sıçan böbrek dokusu XBP-1 pozitif kontrol X100



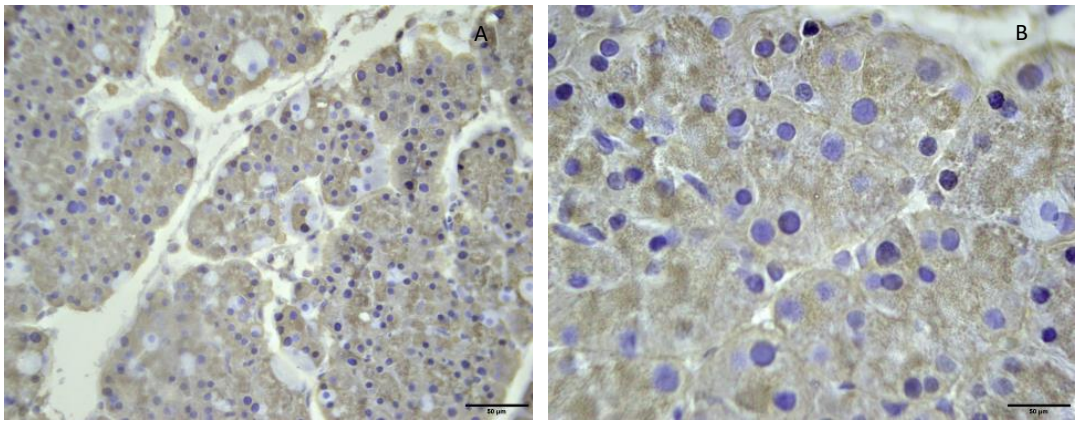
Şekil 4.17: Kontrol grubu GRP78 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100.



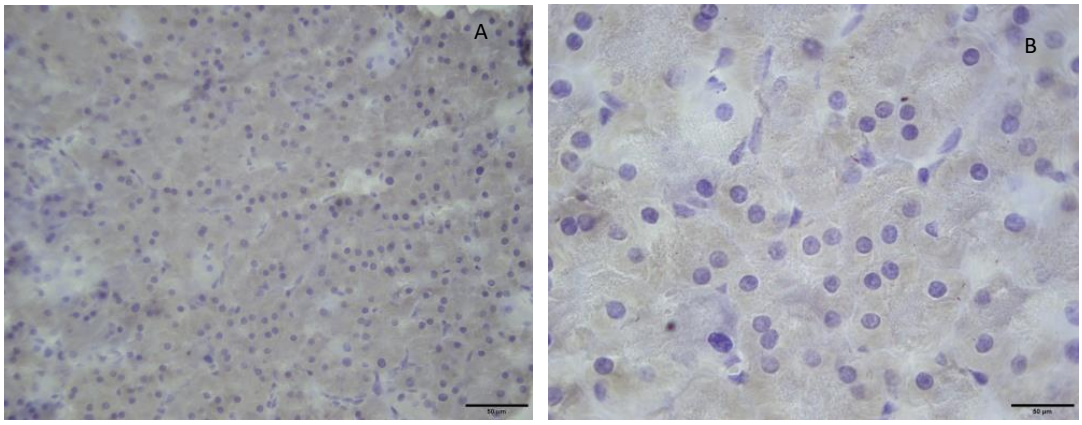
Şekil 4.18: Akut Pankreatit grubu GRP78 antikoru ile immün boyama
A.x40, B. x100.



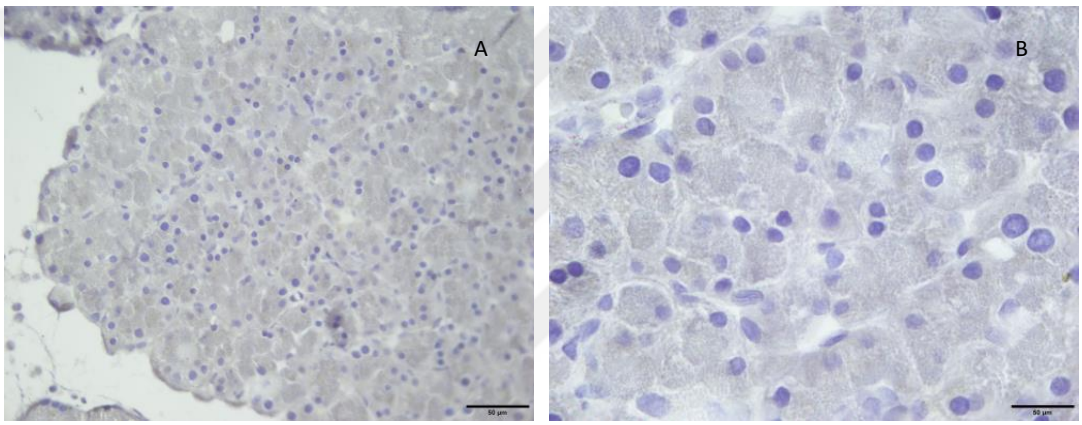
Şekil 4.19: Hiperlipidemi grubu GRP78 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100.



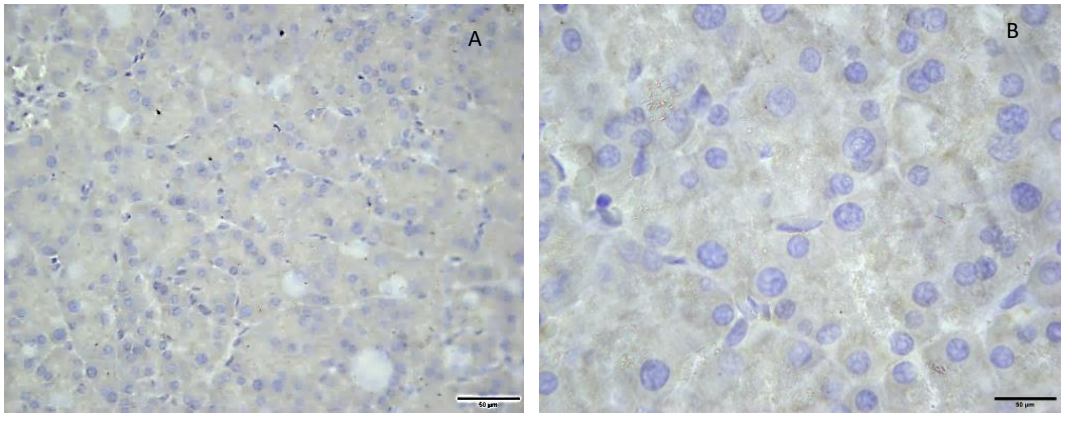
Şekil 4.20: Hiperlipidemik Akut Pankreatit grubu GRP78 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100.



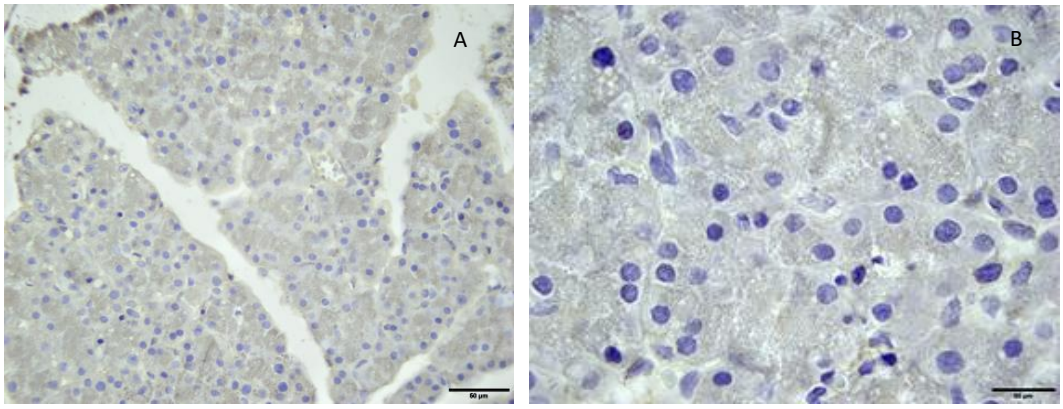
Şekil 4.21: Kontrol grubu IRE1 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100**.**



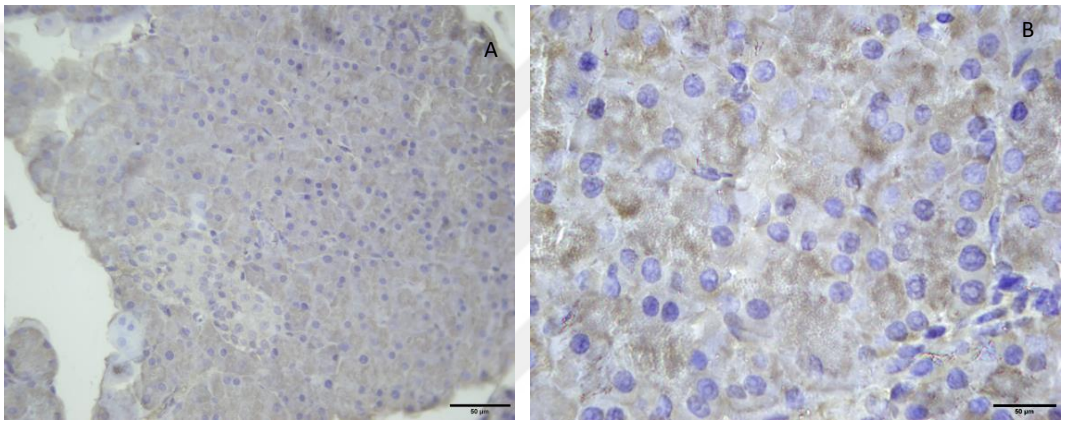
Şekil 4.22:Akut Pankreatit grubu IRE1 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100.



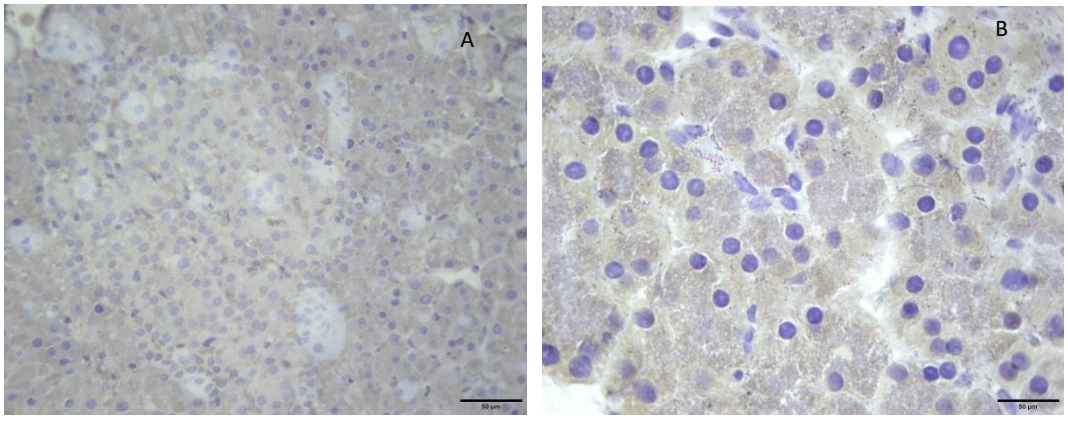
Şekil 4.23: Hiperlipidemi grubu IRE1 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100.



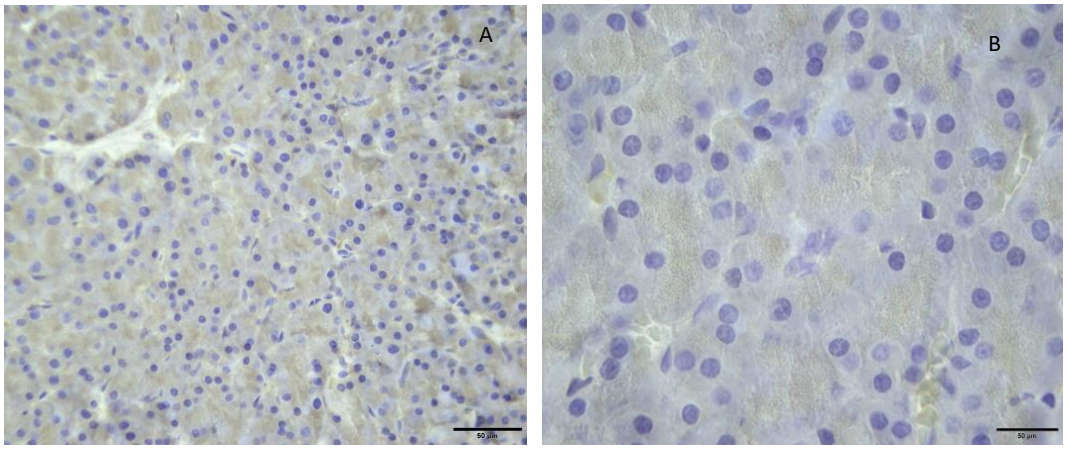
Şekil 4.24: Hiperlipidemik akut pankreatit grubu IRE1 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100



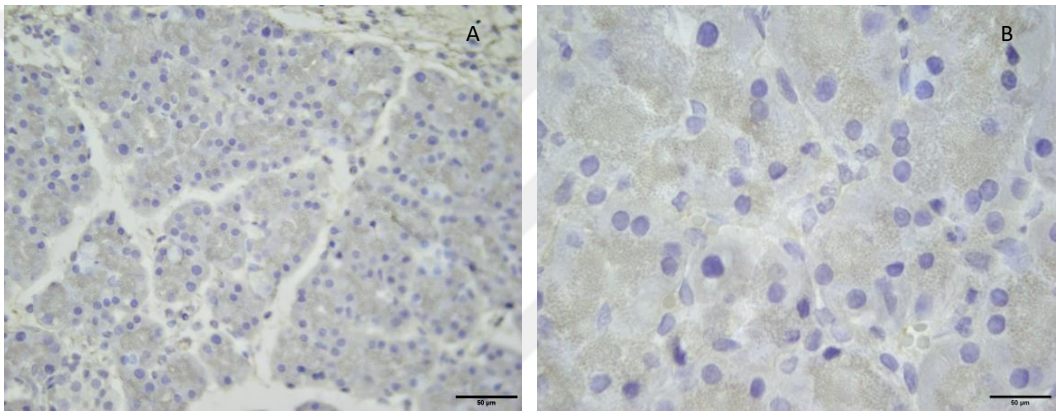
Şekil 4.25: Kontrol grubu XBP-1 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100.



Şekil 4.26: Akut pankreatit grubu XBP-1 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100.



Şekil 4.27: Hiperlipidemi grubu XBP-1 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100.

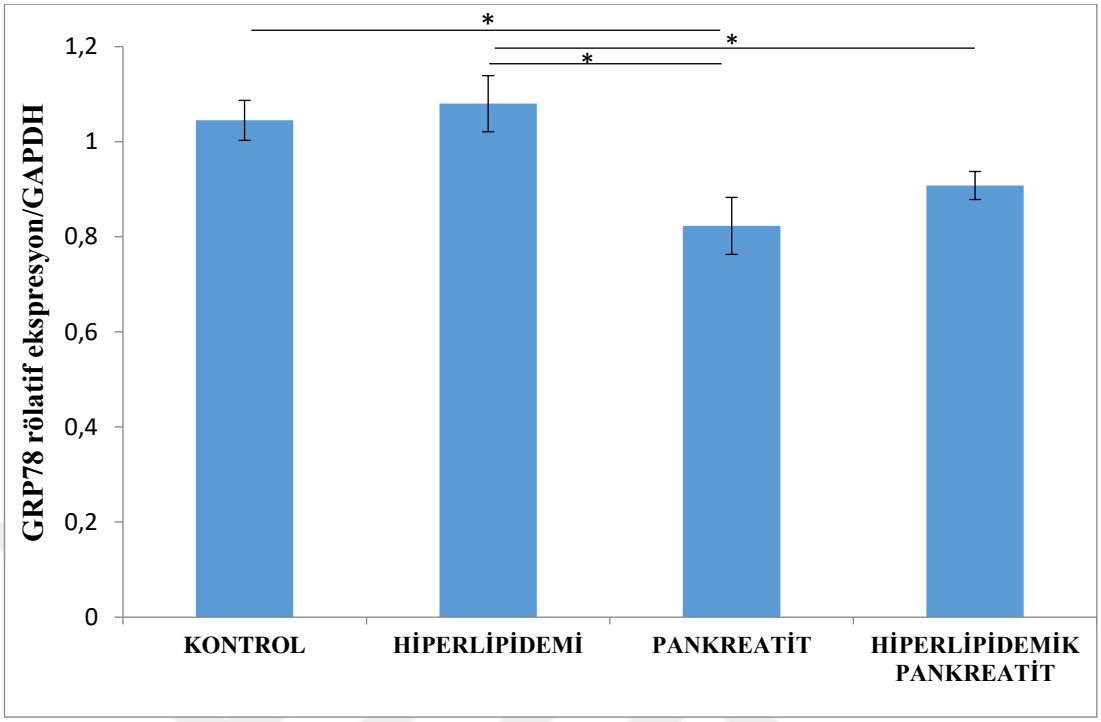


Şekil 4.28: Hiperlipidemik akut pankreatit grubu XBP-1 antikoru ile immün boyama A.x40, B. x100.

4.3 qRT-PCR Analiz Sonuçları

4.3.1 GRP78 qRT-PCR Analiz Sonuçları

RT- PCR ile yaptığımız analizler sonucu GRP78 mrna miktarları rölatif olarak karşılaştırıldığında; kontrol grubuna göre akut pankreatit grubunda GRP78 anlamlı olarak azalmıştır.(p= 0,027) Akut pankreatit grubu ile hiperlipidemik akut pankreatit grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Kontrol grubu ile hiperlipidemi ve hiperlipidemik akut pankreatit arasında da anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Hiperlipidemi grubu pankreatit grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. (p=0,0122). Yine hiperlipidemi grubu hiperlipidemik akut pankreatit grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. (p=0264)(Şekil 4.28)



Şekil 4.29 **:** GRP 78 rölatif mrna karşılaştırması.

*P<0,05 anlamlı

4.3.2 IRE-1α ve sXBP-1 qRT-PCR Analiz Sonuçları

Yaptığımız RT-PCR analizine göre IRE-1α ve sXBP-1 genleri CT değeri 36 ve üzeri olacak şekilde sonuç vermiştir. Bu durum bu genlerle ilgili net bir ekspresyon olmadığı şeklinde yorumlanmaktadır(162).

5.TARTIŞMA

Endoplazmik retikulum stresi, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin endoplazmik retikulum lümeninde birikmesi durumudur. Hücreler, ER stres koşullarında katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan bir başa çıkma mekanizmasını aktive ederler(113). UPR yoluyla hücre artan katlanmamış protein yüküyle başa çıkamazsa, JNK protein kinaz ve kaspaz 3, 7 ve 12'nin aktivasyonu meydana gelir ve apoptotik süreç başlar(163, 164). ER stresinin neden olduğu apoptozda, kaspazlar ve MAP kinaz basamaklarının sinyal molekülleri dahil olmak üzere çeşitli proteinler rol oynadığı bilinmektedir(165). ER stres çok fazla arttığında CHOP ekspresyonunun anlamlı derecede artarak apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir(166). ER stresin zamanla azalıp azalmamasına göre hücre için ölüm ya da sağ kalım kararına varılması UPR'nin birçok hastalıktaki rolünü göstermektedir. UPR, ER içinde homeostazis sağlanamadığında faydalı olabilecek hücreleri öldüren apoptotik bir süreci başlatabilir veya ER homeostazisini sağlayarak organizmanın zararına olacak şekilde sağ kalıma yol açabilir(167). İnflamasyon, hücrelerdeki ER stresini düzenleyebilir ve aktive edebilir (168)Aşırı inflamasyondan kaynaklanan zorlu ERS de apaptoza yol açmaktadır (169).

IRE1/ XBP-1 UPR'nin en çok korunan dalıdır(9). Normal pankreas asiner hücrelerinde IRE1/XBP-1 yolu bazal seviyede aktifken, akut pankreatit durumunda ise aktivitesi artar(16). Yapılan çalışmalar IRE1 veya XBP1'in inhibisyonun, asiner hücrede spontan sindirim enzimi salgılanmasını azalttığını ortaya koymuştur(170). IRE1 α 'nın, AP gelişimi sırasındaki ER stres yanıtında önemli bir işleve sahip olduğu gösterilmiştir(171, 172). IRE1α ve JNK aktivasyonunun, pankreatik asiner hücre hasarı ile ilişkili UPR'lerde ve AP gelişimi sırasındaki inflamatuar yanıtta vazgeçilmez bir rol oynadığı doğrulanmıştır(173, 174).

IRE1/XBP-1 yolu ayrıca lipid metabolizmasını kontrol eden sinyal ağlarıyla da ilişkilidir. Son çalışmalar, IRE1'in protein katlama yükünü algılamadan beklenmedik bir mekanizma yoluyla serbest yağ asitleri tarafından aktive edilebileceğini göstermiştir (175). XBP-1'ler fosfolipid biyosentezini, ER genişlemesini ve hücrelerin salgı kapasitesini kontrol eder(176, 177). Lipogenezi UPR'ye bağlayan transkripsiyon faktörü XBP-1'lerdir(178).

Akut pankreatit hayatı tehdit edebilen inflamatuar bir hastalıktır(1). Hipertrigliseridemi pankreatit etyolojilerinden biridir(5). Hipertrigliseridemik akut pankreatitin kliniğinin akut pankreatit kliniğinden daha şiddetli olduğunu (69) ve mortalitesinin daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar vardır(179).

Çalışmamızda sıçanların kan serum örneklerinde amilaz, lipaz, HDL, LDL, VLDL, total kolesterol, trigliserit değerlerine bakılmıştır. Beklediğimiz üzere; hiperlipidemi ve hiperlipidemik akut pankreatit gruplarının total kolesterol, HDL, LDL, trigliserit değerleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Yine akut pankreatit ve hiperlipidemik akut pankreatit gruplarının amilaz, lipaz değerleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Hiperlipidemik akut pankreatit grubu ile akut pankreatit grubu arasında ise, amilaz ve lipaz değerleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Bizim bulgularımızın aksine Zheng ve ark.nın (157) çalışmalarında amilaz; Mei ve ark.nın (180) çalışmasında ise, amilaz ve lipaz değerleri hiperlipidemik akut pankreatit grubunda akut pankreatit grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu her iki çalışmada da hiperlipidemi oluşturmak için ratlar iki hafta yüksek yağlı diyetle beslenmiştir. Çalışmamızda ise hiperlipidemi intraperitoneal tek doz P-407 ile sağlanmış ve toplam deney süresi 34 saat olarak uygulanmıştır. Bu da çalışmamızda hiperlipidemik akut pankreatit grubundaki pankreas hasar artışının kan parametrelerine yansıması için yeterli süre olmadığını, etkinin ancak pankreas dokusunda görülebildiğini düşündürmektedir. Hafbauer ve ark. (181) ile Wang ve ark.(182) intravenöz triton WR 1339 uygulayarak hiperlipidemi oluşturdukları hiperlipidemik akut pankreatit grubunun amilaz ve lipaz değerlerinin akut pankreatit grubundan anlamlı olarak yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Farelerde yaptıkları ve çalışmamızda olduğu gibi intraperitoneal olarak P-407 ile hiperlipidemi oluşturdukları deneylerinde Pan ve ark.(183) çalışmamızdaki sonuçları destekler şekilde akut pankreatit şiddetinin serum amilaz düzeylerinden ziyade serum trigliserit düzeyleriyle pozitif ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durumun da hipertrigliseridemik akut pankreatitin klinik karakteristiği ile uyumlu olduğunu belirtmişlerdir. Bu da kullanılan ilaç çeşidi ve kullanım yolunun amilaz ve lipaz değerlerinde farklılıklara yol açabildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda kontrol grubu ile akut pankreatit, hiperlipidemi ve hiperlipidemik akut pankreatit modelleri oluşturulan sprague dawley cinsi sıçanların

pankreas doku kesitleri hematoksilen eozin ile boyanarak incelenmiştir. İncelemede pankreas hasarı; asiner hücre dejenerasyonu, interstisyel inflamasyon, ödem ve parankimde kanama derecelendirilerek skorlanmıştır(158).

Verilerimize göre hiperlipidemi grubunda kontrol grubuna göre inflamatuar infiltrasyon, kanama ve toplam skor anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Asiner dejenerasyon ve ödem yine kontrol grubuna göre artmışken, bu artış anlamlı bulunmamıştır. Hafbour ve ark.nın yaptığı çalışmada ise hiperlipidemi grubunun total hasar skorunda kontrol grubuna göre artış varken bu artış anlamlı bulunmamış, ancak hiperlipidemi grubunda orta düzeyde ödem görüldüğü belirtilmiştir. Sıçanlarda yaptıkları bu çalışmada hiperlipidemiyi Triton WR 1339 intravenöz uygulanmasıyla sağlamış ve bu uygulamadan sonraki 90 ve 180. dakikalardaki sakrifikasyonlarla pankreas hasarını değerlendirmişlerdir(181). Çalışmamızda ise intraperitoneal uygulanan P-407 ile hiperlipidemi indüklenmiş ve 34.saate sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir. Zhang ve ark. hiperlipidemi grubu sıçanların pankreas dokularında yaygın asiner hücre atrofisi, vakuolizasyon, interlobüler aralıklarda genişleme gözlemlemiş, kanama ve inflamatuar hücre infiltrasyonunun ise belirgin olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada hiperlipidemi oluşturmak için sıçanlar 6 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle beslenmiştir(184). Bu durum çalışmamızdaki verilerle Zhang ve ark. ve Hafbour ve ark.nın ortaya koyduğu veriler arasındaki farklılıkların hiperlipidemi oluşturmak için kullanılan yöntem ve süre ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Yan ve ark. da 20 hafta gibi uzun bir süre yüksek yağlı diyetle besledikleri ratlarda ışık mikroskobu altında pankreatik asiner ve adacık hücrelerinde vakuolizasyon, yer yer asiner hücre atrofisi gözlemlediklerini belirtmiştir(105). Hiperlipideminin sistemik hemodinamiyi etkilediği, lipid birikimi yoluyla endotel hasarı oluşturduğu ve lökosit adezyonunu arttırdığı bilinmektedir(103, 104). Pankreas dokusunda mikro-dolaşımın bozulmasıyla asiner hücrelerde hasar oluşturabileceği düşünülmektedir(105). Bilindiği gibi trigliseritin pankreatik lipaz tarafından hidrolize edilmesiyle serbest yağ asitleri oluşur ve bu yağ asitleri albümin tarafından bağlanır. Yüksek trigliserit durumlarında ise bu serbest yağ asitleri albüminin bağlama kapasitesini aşar ve kılcal damar hasarı oluşturur. (102, 185, 186). Bu da çalışmamızda ortaya çıkan hiperlipidemi grubundaki kanama, infiltrasyon ve pankreas hasarı toplam skor artışını açıklar niteliktedir.

Çalışmamızda akut pankreatit grubu, asiner hücre dejenerasyonu, interstisyel inflamasyon, ödem, kanama ve toplam skor açısından kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Schmidt ve ark.ları 1992 yılında sıçanlarda yaptıkları, cerulein ile akut pankreatiti indükledikleri çalışma ile akut pankreatitin asiner nekroz, ödem, kanama ve yağ nekrozu, inflamasyon ve perivasküler infiltrasyonla karakterize bir tablo olduğunu skorlama sistemi oluşturarak ortaya koymuştur(41). Farklı yöntemlerle akut pankreatit oluşturulan birçok çalışmada pankreas hasarı için bu skorlama ve bu skorlamanın revize edilmiş halleri kullanılmıştır. Çalışmamızda da benzer bir skorlamayla pankreatitteki doku hasarı ortaya konmuştur(158). Eşrefoğlu ve ark.(158) da sıçanlarda cerulein ile oluşturdukları akut pankreatit grubunda kontrol grubuna göre çalışmamızda referans aldığımız skorlamayı kullanarak toplam pankreas hasar skorunun anlamlı olarak arttığını ortaya koymuşlardır. Hofbauer ve ark. da çalışmamızda olduğu gibi sıçanlarda caerulein ile akut pankreatit oluşturdukları çalışmalarında pankreas hasarı için ödem, inflamatuar inflamasyon, yağ nekrozu, parankimal nekroz ve hemoraji bulgularını skorlamış ve akut pankreatit grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlemişlerdir (181). Lampropoulos ve ark. bilio-pankreatik kanal ligasyonu yöntemiyle oluşturdukları akut pankreatitte; kanama, kanal genişlemesi, ödem, asiner nekroz ve inflamasyon açısından pankreas hasar skorlaması yapmış ve kontrol grubuna göre pankreas hasarını anlamlı düzeyde yüksek tespit etmişlerdir (187). Zhang ve ark. hayvan deneyi ile retrospektif klinik araştırmayı birleştirdikleri çalışmalarında pankreas hasarı ödem, kanama, inflamatuar hücre infiltrasyonu ve hücre yıkımı açısından skorlamış ve akut pankreatit grubunda kontrol grubuna göre toplam skorun anlamlı olarak yüksek olduğunu tespit etmiştir(188).

Verilerimize göre asiner hücre dejenerasyon, intertisyel inflamasyon ve ödem açısından hiperlipidemik akut pankreatit grubu akut pankreatit grubundan daha yüksekken bu yükseklik anlamlı bulunmamıştır. Ancak kanama ve toplam skor açısından hiperlipidemik akut pankreatit grubu, akut pankreatit grubundan anlamlı olarak yüksektir. Zheng ve ark. sıçanlarda yaptıkları çalışmada pankreas hasarını benzer skorlama sistemiyle ödem, nekroz, hemoraji ve inflamatuar inflamasyon açısından değerlendirmiştir. Pankreatitin indüklenmesinden sonra geçen süre ile pankreas hasarı arasındaki ilişkiyi de inceledikleri bu çalışmalarında 9. saatte yapılan sakrifikasyonla hiperlipidemik akut pankreatit grubu; ödem, kanama, inflamasyon ve

toplam skor açısından pankreatit grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (157). Bu çalışmada hiperlipidemi, ratların 2 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle beslenmesi ile sağlanmıştır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi 1 saat ara ile 2 doz 50 µg/kg ceruleinin intraperitoneal uygulanması ile pankreatit indüklenmiş ve sakrifikasyon pankreatit indüklendikten sonraki 9.saatte yapılmıştır. Bu çalışmada çalışmamızdaki verilerden farklı olarak hiperlipidemik akut pankreatit grubunda akut pankreatit grubuna göre ödem, kanama ve inflamasyon açısından anlamlı yükselişin sebebi hiperlipideminin daha uzun sürede oluşturulmuş olması olabilir. Farklı yollarla hiperlipidemi oluşturarak farklı hayvanlar kullanılarak yapılan çalışmalar literatürde mevcuttur. Hu ve ark. (189). hamsterlarda 3 hafta, Zhang ve ark. sıçanlarda (188) 4 hafta, Mei ve ark.(180) da yine sıçanlarda 2 hafta yüksek yağlı diyetle besleyerek hiperlipidemi oluşturmuş ve hiperlipidemik akut pankreatit grubu toplam pankreas hasar skorunun akut pankreatit grubundan anlamlı olarak yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Pan ve ark.(183) farelerde, çalışmamızda olduğu gibi P-407 ile hiperlipidemi oluşturdukları çalışmalarında yine hiperlipidemik akut pankreatit grubu toplam pankreas hasar skorunun akut pankreatit grubundan anlamlı olarak yüksek olduğunu bulmuştur. Wang ve ark (182). ile Hofbauer ve ark (181) sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda, Triton WR 1339 uygulayarak hiperlipidemiyi indükledikleri hiperlipidemik akut pankreatit grubunun toplam pankreas hasar skorunun akut pankreatit grubundan yine anlamlı olarak yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda ve farklı hayvan türleri kullanılarak yapılan tüm bu çalışmalarda hiperlipidemi oluşturma yöntemine bakılmaksızın, hiperlipidemik akut pankreatit gruplarında akut pankreatit grubuna göre pankreas hasarı toplam skorunun anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar klinik olarak hiperlipidemik akut pankreatit olgularının akut pankreatit olgularından daha şiddetli seyretmesini açıklar niteliktedir.

Yaptığımız qRT-PCR analizine göre IRE-1α ve sXBP-1 genleri CT değerleri yüksek bulunmuş ve bunun sonucu olarak cDNA miktarı arttırılıp primerler değiştirilerek tekrarlanmış ancak yine CT değerleri 36 ve üzeri olacak şekilde bulunmuştur. Bu durum bu genlerin net bir şekilde ekspresyonunu ortaya koyamayacağımızı göstermektedir(162). IRE-1α, XBP-1i splicinge uğratıp sXBP-1 oluşmasını sağladığı bilinmektedir(128). Sonuçlarımızda IRE-1α sonuçlarına uygun

olarak sXBP-1'in de gen ekspresyonunun çok az ya da olmadığı şeklinde bir sonuç beklenen ve tutarlı bir sonuçtur.

Çalışmamızda qRT-PCR yöntemi ile GRP 78 mrna miktarları rölatif olarak karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre GRP78 mrna miktarı akut pankreatit grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulundu. Çalışmamıza benzer şekilde Liu ve ark sıçanlarda intraperitoneal olarak cerulein enjekte ederek akut pankreatit oluşturmuşlardır(190). Bu çalışmada GRP78 mRNA seviyesinin 1. saatte hızla azaldığını, 3. saatte en düşük seviyeye ulaştığını ve 3. saatten sonra artışa geçerek 24 saatte başlangıç noktasına geri döndüğünü ortaya koymuşlardır. Yine bu çalışmada GRP78 proteininin ekspresyonu western blot analizi ile değerlendirilmiş ve GRP78 proteininin ekspresyonunda mRNA değişikliğine benzer bir eğilim göstermiştir. Yu ve arkadaşları sıçan pankreas asiner AR42J hücrelerinde 12 saat boyunca 10^{-8} M cerulein ile oluşturdukları akut pankreatit modelinde GRP78in azaldığını ortaya koymuşlardır(191). Liu ve ark (192), yine AR42J (pankreas asiner hücreleri) hücre hattında yaptıkları çalışmada GRP78 ekspresyonunun cerulein ile tedaviden sonra hafifçe azaldığını tespit etmiştir. Cerulein ve lipopolisakkarit(LPS) tedavisinden sonra ise GRP78 ekspresyonunun önemli ölçüde aktive olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmamıza benzer şekilde Seyhun ve ark. (144) sıçanlarda intraperitoneal 50 µg/kg cerulein uygulayarak akut pankreatit oluşturmuş ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 4 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilerek western blot yöntemi ile GRP78, sXBP-1 proteinleri değerlendirilmiştir. BiP(GRP78) cerulein enjeksiyonundan 30 dakika sonra artmaya başlamış, 1 saat sonra önemli ölçüde artarak zirveye ulaşmış daha sonra ise azalmaya başlamıştır. Yine 1. ve 2. saatte kontrol grubuna kıyasla sXBP-1 artmış ve sonrasında azalmaya başlamıştır. Kubisch ve ark. sıçan pankreas asinüsünde CCK analogları CCK8 ile uyararak pankreatit oluşturmuştur. Toplamda 90 dakika süren incelemede, akut pankreatit grubunda BiP(GRP78) ifadesinde 10 dakika sonra anlamlı artış gözlenmeye başlamış, en yüksek artış 60 dakika sonra bulunmuş ve daha sonra azalmaya başlamış ancak kontrol grubuna göre 90. Dakikada hala anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur. Akut pankreatit grubunda sXBP1 mRNA seviyeleri de 10 dakika sonra anlamlı artış göstermiş ve 40 dakikada maksimuma ulaşmıştır. Sonrasında azalma eğilimine geçmiş olmasına rağmen 90. Dakikada kontrol grubundan hala anlamlı yüksek bulunmuştur (143). Bizim çalışmamızda ise pankreatit indüklendikten

9 saat sonra sakrifikasyon yapılmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak pankreatit indüklendikten sonraki süreçte ER stres parametreleri olan GRP78, sXBP-1in zamana bağlı olarak değişkenlik gösterdiği; ilk zamanlarda artarken sonradan azalma eğilimine geçtiği gözlenmektedir.

Farklı yöntemlerle oluşturulan pankreatit modellerinde ise sonuçlar farklılık göstermektedir. Hong ve ark.nın , %5 sodyum taurokolatın retrograd infüzyonu ile pankreatiti indükledikleri çalışmalarında; AP grubunda GRP78 ve IRE1'in mRNA transkripsiyon seviyelerinin kontrol grubuna göre çok daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur(193). Kubish ve ark. (16) intraperitoneal arginine enjeksiyonu ile pankreatit oluşturdukları çalışmalarında sXBP-1 mRNA seviyeleri L-arginin uygulamasından sonraki 4 saat içinde arttığı ve en az 72 saat boyunca yüksek kaldığını bulmuşlardır. Yine buna paralel olarak sXBP-1 protein seviyelerinin 8 saat içinde artarak 72 saat yüksek kaldığı bulunmuştur. Yine Western blot analizi ile BiP(GRP78) seviyelerinin arginin tedavisinden sonraki 4 saat içinde yükseldiğini ve pankreatit indüksiyonundan sonraki 72 saate kadar yüksek kaldığını göstermişlerdir.

Liu ve ark.(194) AR42J hücre hattında yaptıkları çalışmada; GRP78'in ekspresyonunu spesifik olarak susturmak için lentivirüs aracılı RNA interferans yöntemi (RNAi) kullanılmıştır. GRP78'in yıkılması ile cerulein artı LPS tedavisi uygulanan hücrelerde apoptozun arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda amilaz ve lipazdaki yükselmelerin hafiflediği, IL-6 seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı ortaya konmuştur. GRP78'in spesifik olarak yıkılmasının AR42J hücrelerinde apoptozu desteklediği ve nekrozun da bu süreçte azaldığı ortaya konmuştur, pankreatik inflamasyonun ciddiyetinin de azaldığı görülmüştür. Bu verilerden yola çıkarak GRP78in inflamasyon ve apaptozun düzenlenmesinde önemli bir rol aldığı görülmektedir. Hücre belirli düzeyde ER stres altında iken UPR yolağındaki GRP78 artış göstererek hücre sağ kalımı arttırılmaya çalışılırken, ER stres düzeyi kontrol edilemeyecek şekilde arttığında ise GRP78 azaltılarak hücrenin apaptoza yönlenmesi sağlanmaktadır.

Yine yapılan birçok çalışmada UPR'nin kollarından olan IRE1/XBP-1 ekseninin apaptoz ile ilişkisi incelenmiştir. Lin ve ark.(195), sabit ER stresi altında IRE1 aktivitesinin uzatılmasının hücrenin hayatta kalmasını arttırdığını ve IRE1 aktivitesinin erken sonlandırılmasının hücre apoptozuna yol açabileceğini

bulmuşlardır. Bu sonuçla IRE1/XBP-1 hayatta kalma yanlısı etkilere sahip gibi görünse de başka bir çalışmayla aşırı ekspresyonun apoptotik hücre ölümüyle sonuçlandığı gösterilmiştir(196). IRE1in bazı koşullarda proapaptotik JNK'nin aktivasyonunu sağlayabildiği görülmüştür(164, 197). c-Jun N-terminal inhibitör kinazı (JIK) ve Jun aktivasyon alanı bağlayıcı protein 1'i (JAB1), IRE1 ile etkileşime giren moleküller olarak tanımlanmıştır (198, 199) JAB1'in dinlenme koşullarında IRE1'e bağlı olduğu görülmüştür. Hafif ER stresle bu bağlanma artarken, güçlü ER stres ile azalmıştır. Burdan yola çıkarak JAB1in , IRE1 ile birleşerek veya ondan ayrılarak UPR ve apoptoz arasındaki seçimi düzenleyebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda IRE1'in UPR'nin etkinleştirilecek son kolu olabileceği; PERK ve ATF6 aracılı yolların IRE1'in aktivasyonundan önce stresi çözmeye çalıştığı düşünülmektedir. IRE1, etkinleştirildikten sonra başlangıçta XBP-1'i etkileyerek UPR'ye yardımcı olur. Böylece hücre normal işleyişine döndürülmeye çalışılır. Stres devam ederse IRE1; ASK1 ve JNK'yı görevlendirerek apoptozu tetikleyebilir(200). Cerulein kaynaklı pankreatitin başlamasını takiben proapaptotik JNK/ SAPK yolakları gibi çeşitli sinyal yollarının aktive olduğunu göstermiştir(201, 202). Bu da cerulein nedenli oluşturulan pankreatitte GRP78 ve IRE1 azalışı ile apaptoz artışı arasındaki ilişkiyi açıklar niteliktedir.

Çalışmamızda hiperlipidemik akut pankreatit grubu GRP78 mrna miktarı akut pankreatit grubuna göre artmış ancak bu artış istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Zheng ve ark.(157) ile Mei ve ark.(180) sıçanlarda yaptıkları çalışmalarında HTG'yi indüklemek için yüksek yağlı bir diyetle 2 hafta besleme ve APı indüklemek için intraperitoneal cerulein enjeksiyonu kullanmıştır ve pankreatit indüksiyonundan 9 saat sonra sakrifikasyon yapılmıştır. Zheng ve ark.nın çalışmasında IRE1α, sXBP1 mrna değerleri ve buna paralel olarak protein miktarları hiperlipidemik akut pankreatitte akut pankreatitten daha yüksek olduğu gözlenmiştir(157). Mei ve ark.(180) ise hiperlipidemik pankreatit grubunda pankreatit grubuna göre GRP78 ,sXBP-1 protein seviyelerini yüksek olarak bulmuştur. Her iki çalışmada da karşılaştırmalar hiperlipidemik pankreatit ile pankreatit grubu arasında yapılmış kontrol grubu ile pankreatit grubu arasında karşılaştırma yapılmamıştır. Ortaya koydukları bu sonuçlarla çalışmamız arasındaki farklılığın sebebi hiperlipidemi yapma yöntemleri arasındaki farklılık olabilir. Çalışmamızda hiperlipidemi oluşturmak için P-407

intraperitoneal tek doz olarak kullanılmıştır. Literatürde P-407 ile hiperlipidemi indüklenerek ER stres araştırılan benzer çalışma bulunmamaktadır. Yüksek kalori açısından zengin diyetlerin ise UPR ve ER stresi tetiklediği bilinmektedir(203).

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda sıçanlarda cerulein ile oluşturulmuş akut pankreatit, P-407 ile oluşturulmuş hiperlipidemi ve her iki uygulamayla oluşturulan hiperlipidemik akut pankreatit ile kontrol grubu pankreas dokuları histomorfolojik, immünohistokimyasal ve qRT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Histomorfolojik bulgularda hiperlipidemik akut pankreatit grubu sıçanlarda pankreas hasarının akut pankreatit grubundan daha çok olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç hiperlipidemik akut pankreatit kliniğin akut pankreatit kliniğinden daha ağır ve mortalitesinin daha fazla olmasını açıklar niteliktedir.

qRT-PCR çalışmasında GRP78 mrna düzeyinin akut pankreatit grubunda kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür. Beklediğimizin aksine pankreatitle ER stresin artmaması ise kullandığımız yönteme bağlı olarak oluşmaktadır. Ceruleinle apaptoz artışı olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Apaptoz artışıyla da ER stres azalması beklediğimiz bir sonuçtur. Yine hiperlipidemik akut pankreatit ve hiperlipidemi gruplarında GRP78 mrna miktarlarında kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Literatürde kullandığımız P-407 ile yapılmış ER stres çalışılan bir yayın bulunmamaktadır. Bu sonuç deneysel olarak hiperlipidemi oluşturma yöntemimize bağlı ortaya çıkmış olabilir. IRE-1α ve sXBP-1 için ise qRT-PCR sonucuna göre karşılaştırılabilir bir sonuç ortaya konamamıştır. Bu genlerin çok az ya da hiç bulunmadığı anlamı taşımaktadır. İmmünohistokimyasal olarak da qRT-PCR sonuçlarını destekler niteliktedir.

Sonuçta hiperlipidemik akut pankreatitin akut pankreatite göre pankreas hasarının daha fazla olduğunu ortaya koyduk.Akut pankreatit ve hiperlipidemik akut pankreatit ER stres belirteçleri açısından anlamlı bir sonuç elde edemedik. Deneysel olarak hiperlipidemi ve akut pankreatit oluşturmak için kullanılacak birçok yöntem mevcut olup farklı yöntemlerle deneysel hiperlipidemi ve akut pankreatit oluşturularak ER stres ile bağlantısının değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Kullanılan yöntem sonrasında geçen süre de ER stresi tespit edebilmek için önem arz etmektedir. Ayrıca ER stres düzeyine bağlı olarak hücrenin apaptoza ya da yaşamın devamına yönelik bir karar verdiği göz önünde bulundurularak kullanılan deneysel yöntemlerin apaptozla da ilişkisi derinlemesine araştırılmalıdır.

7.KAYNAKLAR

1. Singla A, Csikesz NG, Simons JP, et al. National hospital volume in acute pancreatitis: analysis of the Nationwide Inpatient Sample 1998–2006. HPB. 2009;11(5):391-7.

2. Pandel JS. Acute pancreatitis, Current Opinion in Gastroenterology 2005. 533-43 p.

3. Vege SS YD, Chari ST. Pancreatitis. GI Epidemiology, Talley NJ, Locke GR, Saito YA. Blackwell Publishing, Malden, MA; 2007.

4. Goodchild G, Chouhan M, Johnson GJ. Practical guide to the management of acute pancreatitis. Frontline Gastroenterology. 2019:flgastro-2018-101102.

5. Fortson MR, Freedman SN, Webster III PD. Clinical assessment of hyperlipidemic pancreatitis. American Journal of Gastroenterology (Springer Nature). 1995;90(12).

6. Searles GE, Ooi TC. Underrecognition of chylomicronemia as a cause of acute pancreatitis. CMAJ: Canadian Medical Association Journal. 1992;147(12):1806.

7. Valdivielso P, Ramírez-Bueno A, Ewald N. Current knowledge of hypertriglyceridemic pancreatitis. European journal of internal medicine. 2014;25(8):689-94.

8. Yadav D, Pitchumoni C. Issues in hyperlipidemic pancreatitis. Journal of clinical gastroenterology. 2003;36(1):54-62.

9. Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. Current biology. 2012;22(16):R622-R6.

10. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. Biotechnology and bioengineering. 2011;108(12):2777-93.

11. Sidrauski C, Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. Cell. 1997;90(6):1031-9.

12. Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. Nature reviews Molecular cell biology. 2002;3(4):246-55.

13. Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. Nature reviews Molecular cell biology. 2002;3(6):411-21.

14. Sarvani C, Sireesh D, Ramkumar KM. Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases. Pharmacological research. 2017;119:412-21.

15. Tatar M, Tatar T. Endoplazmik retikulum stresi ve ilişkili hastalıklar. Osmangazi Tıp Dergisi. 2018;41(3):294-303.

16. Kubisch CH, Sans MD, Arumugam T, Ernst SA, Williams JA, Logsdon CD. Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced acute pancreatitis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2006;291(2):G238-G45.

17. Mescher AL . Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas. 14th ed. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2019..

18. Ross MH , Pawlina W . Histology A Text and Atlas; With Correlated Cell and Molecular Biology. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2016.

19. Kierszenbaum A.L Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.

20. Moore KL, Persaud TVN , Torchia MG. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. 10th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2016.

21. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. 13th ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2020.

22. Djuric-Stefanovic A, Masulovic D, Kostic J, Randjic K, Saranovic D. CT volumetry of normal pancreas: correlation with the pancreatic diameters measurable by the cross-sectional imaging, and relationship with the gender, age, and body constitution. Surgical and radiologic anatomy. 2012;34:811-7.

23. Standring S. Gray's Anatomy The Anatomical Basis of Clinical Practice. 41. ed. ELSEVIER; 2016.

24. Skandalakis JE, Skandalakis PN, Skandalakis LJ. Surgical anatomy and technique. Chirurg. 2000;71(8):954-71.

25. Gökmen FG. Sistematik anatomi. İzmir: Güven Kitabevi. 2003;97(8):147.

26. Songur A, Çağlar V, Gönül Y, Özen OA. Gallbladder And Biliary Tract Anatomy. Safrakesesi Ve Safra Yolları Anatomisi. Journal Of Surgical Arts/Cerrahi Sanatlar Dergisi. 2009;2(2):12-9.

27. Çağlar V, Gönül Y, Songur A. Pankreas Anatomisi ve Varyasyonları. Uluslararası Klinik Araştırmalar Dergisi. 2014;2(2):77-82.

28. Glaser J, Högemann B, Krummenerl T, et al. Sonographic imaging of the pancreatic duct: new diagnostic possibilities using secretin stimulation. Digestive diseases and sciences. 1987;32:1075-81.

29. Purvis N, Mirjalili S, Stringer M. The mucosal folds at the pancreaticobiliary junction. Surgical and Radiologic Anatomy. 2013;35:943-50.

30. Kamisawa T, Okamoto A. Pancreatographic investigation of pancreatic duct system and pancreaticobiliary malformation. Journal of anatomy. 2008;212(2):125-34.

31. Hernandez-Jover D, Pernas JC, Gonzalez-Ceballos S, Lupu I, Monill JM, Pérez C. Pancreatoduodenal junction: review of anatomy and pathologic conditions. Journal of gastrointestinal surgery. 2011;15:1269-81.

32. Lambert R. Surgery of the digestive system in the rat. Surgery of the digestive system in the rat. 1965.

33. Hyun JJ, Lee HS. Experimental models of pancreatitis. Clinical endoscopy. 2014;47(3):212.

34. Eulálio JMR, Bon-Habib ACC, Soares DdO, et al. Critical analysis and systematization of rat pancreatectomy terminology. Acta Cirúrgica Brasileira. 2016;31:698-704.

35. Singer MV,Gyr K, Sarles H. Revised classification of pancreatitis. Report of the Second Intern ational Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. Gastroenterology. 1985;89(3):683-5.

36. Sarles H. Pancreatitis symposium. Marseille. 1963. British Journal of Surgery.1966; 53(1), 80.

37. Barbara M, Tsen A, Rosenkranz L. Acute pancreatitis in chronic dialysis patients. Pancreas. 2018;47(8):946-51.

38. Beger HG, Büchler M, Bittner R, Block S, Nevalainen, T RR. Necrosectomy and postoperative local lavage in necrotising pancreatitis1988. 207-12 p.

39. Rasslan R, Novo FdCF, Bitran A, Utiyama EM, Rasslan S. Management of infected pancreatic necrosis: state of the art. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. 2017;44:521-9.

40. Akshintala VS, Kamal A, Singh VK. Uncomplicated acute pancreatitis: evidenced-based management decisions. Gastrointestinal Endoscopy Clinics. 2018;28(4):425-38.

41. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. Annals of surgery. 1992;215(1):44.

42. Ding S-P, Li J-C, Jin C. A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide. World journal of gastroenterology. 2003;9(3):584.

43. Saluja AK, Lerch MM, Phillips PA, Dudeja V. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? Annu Rev Physiol. 2007;69:249-69.

44. Binker MG, Cosen-Binker LI. Acute pancreatitis: the stress factor. World journal of gastroenterology: WJG. 2014;20(19):5801.

45. Frossard J-L, Steer ML, Pastor CM. Antibiotics in acute necrotising pancreatitis–Authors' reply. The Lancet. 2008;371(9618):1072.

46. Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. Acute pancreatitis: bench to the bedside. Gastroenterology. 2007;133(3):1056. e1-. e25.

47. Van Acker GJ, Perides G, Steer ML. Co-localization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis. World journal of gastroenterology: WJG. 2006;12(13):1985.

48. Staubli SM, Oertli D, Nebiker CA. Laboratory markers predicting severity of acute pancreatitis. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2015;52(6):273-83.

49. Steer ML. Etiology and Pathophysiology.The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease, Raven, New York, 581-592.

50. Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA. The pancreas. Biology, pathobiology, and disease 2nd ed New York: Raven. 1993.

51. Bhatia M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. Current Drug Targets-Inflammation & Allergy. 2002;1(4):343-51.

52. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. 2000;190(2):117-25.

53. Mithöfer K, Castillo CFn-D, Rattner D, Warshaw AL. Subcellular kinetics of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 1998;274(1):G71-G9.

54. Bialek R, Willemer S, Arnold R, Adler G. Evidence of intracellular activation of serine proteases in acute cerulein-induced pancreatitis in rats. Scandinavian journal of gastroenterology. 1991;26(2):190-6.

55. Awla D, Hartman H, Abdulla A, et al. Rho-kinase signalling regulates trypsinogen activation and tissue damage in severe acute pancreatitis. British journal of pharmacology. 2011;162(3):648-58.

56. Lin K, Gao F, Chen Q, Liu Q, Chen S. Framework for interpretation of trypsin–antitrypsin imbalance and genetic heterogeneity in pancreatitis. Saudi Journal

of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association. 2015;21(4):198.

57. Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, Powers RE, Meldolesi J, Steer ML. Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 1987;253(4):G508-G16.

58. Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett A. Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid. Activation of human trypsinogen 1. Biological chemistry Hoppe-Seyler. 1988;369:293-8.

59. Greenbaum LM, Hirshkowitz A, Shoichet I. The activation of trypsinogen by cathepsin B. J Biol Chem. 1959;234:2885-90.

60. Gukovskaya AS, Vaquero E, Zaninovic V, et al. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. Gastroenterology. 2002;122(4):974-84.

61. Mayerle J, Schnekenburger J, Krüger B, et al. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. Gastroenterology. 2005;129(4):1251-67.

62. Rau B, Poch B, Gansauge F, et al. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? Annals of surgery. 2000;231(3):352.

63. Sah RP, Garg P, Saluja AK. Pathogenic mechanisms of acute pancreatitis. Current opinion in gastroenterology. 2012;28(5):507-15.

64. Sunamura M, Yamauchi J-i, Shibuya K, et al. Pancreatic microcirculation in acute pancreatitis. Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery. 1998;5:62-8.

65. Uhlmann D, Ludwig S, Geissler F, Tannapfel A, Hauss J, Witzigmann H. Importance of microcirculatory disturbances in the pathogenesis of pancreatitis. Zentralblatt für Chirurgie. 2001;126(11):873-8.

66. Steer ML, Saluja AK. Experimental acute pancreatitis: studies of the early events that lead to cell injury. The pancreas: biology, pathobiology, and disease. 1993;2:489-500.

67. Bhatia M, Wong FL, Cao Y, et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. Pancreatology. 2005;5(2-3):132-44.

68. Hofbauer B, Saluja AK, Bhatia M, et al. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experimental acute pancreatitis. Gastroenterology. 1998;115(5):1238-47.

69. Frossard J-L, Saluja A, Bhagat L, et al. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. Gastroenterology. 1999;116(3):694-701.

70. Gukovsky I, Reyes CN, Vaquero EC, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2003;284(1):G85-G95.

71. Gukovsky I, Cheng JH, Nam KJ, et al. Phosphatidylinositide 3-kinase γ regulates key pathologic responses to cholecystokinin in pancreatic acinar cells. Gastroenterology. 2004;126(2):554-66.

72. Clemens DL, Schneider KJ, Arkfeld CK, Grode JR, Wells MA, Singh S. Alcoholic pancreatitis: New insights into the pathogenesis and treatment. World journal of gastrointestinal pathophysiology. 2016;7(1):48.

73. Lerch MM, Adler G. Experimental animal models of acute pancreatitis. International journal of pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology. 1994;15(3):159-70.

74. Grimley R. Acute pancreatitis and pancreatic cancer. Clinical Oncology. 1978;4(4):373-7.

75. Niccolini DG, Graham JH, Banks PA. Tumor-induced acute pancreatitis. Gastroenterology. 1976;71(1):142-5.

76. Lees R, DE W, Schonfeld G, Fleet S. The familial dyslipoproteinemias. Progr. Med. Genet.; U.S.A.; 1973.9; p. 237-290.

77. Peterson L, Collins Jr J, Wilson R. Acute pancreatitis occurring after operation. Surgery, gynecology & obstetrics. 1968;127(1):23-8.

78. Adiseshiah M, Wells F, Cory-Pearce R, Wallwork J, English T. Acute pancreatitis after cardiac transplantation. World Journal of Surgery. 1983;7:519-21.

79. Castillo CF-d, Harringer W, Warshaw AL, et al. Risk factors for pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. New England Journal of Medicine. 1991;325(6):382-7.

80. Foulis AK. Morphological study of the relation between accidental hypothermia and acute pancreatitis. Journal of Clinical Pathology. 1982;35(11):1244.

81. Parenti DM, Steinberg W, Kang P. Infectious causes of acute pancreatitis. Pancreas. 1996;13(4):356-71.

82. Mc Kay C, Buter A. Natural history of organ failure in acute pancreatitis. Pancreatology. 2003;3(2):111-4.

83. Faghih M, Fan C, Singh VK. New advances in the treatment of acute pancreatitis. Current treatment options in gastroenterology. 2019;17:146-60.

84. Huh JH, Jeon H, Park SM, et al. Diabetes mellitus is associated with mortality in acute pancreatitis. Journal of clinical gastroenterology. 2018;52(2):178-83.

85. Ona XB, Comas DR, Urrútia G. Opioids for acute pancreatitis pain. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2013(7).

86. Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. Pancreatology. 2013;13(4):e1-e15.

87. Moraes JMM, Felga GEG, Chebli LA, et al. A full solid diet as the initial meal in mild acute pancreatitis is safe and result in a shorter length of hospitalization: results from a prospective, randomized, controlled, double-blind clinical trial. Journal of clinical gastroenterology. 2010;44(7):517-22.

88. Li W, Liu J, Zhao S, Li J. Safety and efficacy of total parenteral nutrition versus total enteral nutrition for patients with severe acute pancreatitis: a meta-analysis. Journal of International Medical Research. 2018;46(9):3948-58.

89. Song J, Zhong Y, Lu X, et al. Enteral nutrition provided within 48 hours after admission in severe acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. Medicine. 2018;97(34).

90. Tenner S, Baillie J, DeWitt J, Vege SS. American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis. Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG. 2013;108(9):1400-15.

91. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. Classification of acute pancreatitis—2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. Gut. 2013;62(1):102-11.

92. İnce AT, Yıldız K, Baysal B. Akut pankreatit. Kocaeli Tıp Dergisi. 2012;1(3):50-8.

93. Abali EE, Cline SD, Franklin DS, Viselli SM. Lippincott Illustrated Reviews:Biochemistry. 8th ed: Wolters Kluwer; 2022. p. 480-675.

94. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. Endocrinology and Metabolism Clinics. 1998;27(3):503-19.

95. Kök M, Uyar S, Harmandar F, Çekin AH. Hipertrigliserideminin İndüklediği Akut Pankreatit.Güncel Gastroenteroloji.2014; 464-479.

96. Va/Dod Clinical Practice Guideline For The Management Of Dyslipidemia For Cardiovascular Risk Reduction. The Management of Dyslipidemia for Cardiovascular Risk Reduction Work Group 2020.

97. Grundy SM, Bilheimer D, Chait A, et al. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). Jama. 1993;269(23):3015-23.

98. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. 2002 p. 3143-421.

99. Thompson G. Primary hyperlipidaemia. British medical bulletin. 1990;46(4):986-1004.

100. Association AD. American Association of Clinical Endocrinologists, North American Association for the Study of Obesity: Consensus development conference on antipsychotic drugs and obesity and diabetes. Diabetes care. 2004;27:596-601.

101. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. Cmaj. 2007;176(8):1113-20.

102. Saharia P, Margolis S, Zuidema G, Cameron JL. Acute pancreatitis with hyperlipemia: studies with an isolated perfused canine pancreas. Surgery. 1977;82(1):60-7.

103. Popov D, Simionescu M, Shepherd P. Saturated-fat diet induces moderate diabetes and severe glomerulosclerosis in hamsters. Diabetologia. 2003;46:1408-18.

104. Stokes KY, Granger DN. The microcirculation: a motor for the systemic inflammatory response and large vessel disease induced by hypercholesterolaemia? The Journal of Physiology. 2005;562(3):647-53.

105. Yan M-X, Li Y-Q, Meng M, Ren H-B, Kou Y. Long-term high-fat diet induces pancreatic injuries via pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress in rats with hyperlipidemia. Biochemical and biophysical research communications. 2006;347(1):192-9.

106. Cotton P. Congenital anomaly of pancreas divisum as cause of obstructive pain and pancreatitis. Gut. 1980;21(2):105.

107. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. Current opinion in lipidology. 2003;14(3):281-7.

108. Athyros VG, Giouleme OI, Nikolaidis NL, et al. Long-term follow-up of patients with acute hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. Journal of clinical gastroenterology. 2002;34(4):472-5.

109. Chang CC, Hsieh YY, Tsai H, Yang TC, Yeh LS, Hsu TY. Acute pancreatitis in pregnancy. Zhonghua yi xue za zhi= Chinese Medical Journal; Free China ed. 1998;61(2):85-92.

110. Coca-Prieto I, Valdivielso P, Olivecrona G, et al. Lipoprotein lipase activity and mass, apolipoprotein C-II mass and polymorphisms of apolipoproteins E and A5 in subjects with prior acute hypertriglyceridaemic pancreatitis. BMC gastroenterology. 2009;9(1):1-10.

111. Murphy MJ, Sheng X, MacDonald TM, Wei L. Hypertriglyceridemia and acute pancreatitis. JAMA internal medicine. 2013;173(2):162-4.

112. Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. Cell Death & Differentiation. 2006;13(3):363-73.

113. Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. Genes. 2013;4(3):306-33.

114. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell. 2010;140(6):900-17.

115. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. Journal of Cell Biology. 2012;197(7):857-67.

116. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nature reviews Molecular cell biology. 2007;8(7):519-29.

117. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. science. 2011;334(6059):1081-6.

118. Shiu R, Pouyssegur J, Pastan I. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteinsin Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1977;74(9):3840-4.

119. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. Trends in biochemical sciences. 2001;26(8):504-10.

120. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods. 2005;35(4):373-81.

121. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes & development. 1999;13(10):1211-33.

122. Reddy RK, Dubeau L, Kleiner H, et al. Cancer-inducible transgene expression by the Grp94 promoter: spontaneous activation in tumors of various origins and cancer-associated macrophages. Cancer research. 2002;62(24):7207-12.

123. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. Trends in cell biology. 2004;14(1):20-8.

124. Rao RV, Ellerby H, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Cell Death & Differentiation. 2004;11(4):372-80.

125. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nature cell biology. 2000;2(6):326-32.

126. Cui W, Li J, Ron D, Sha B. The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2011;67(5):423-8.

127. Koumenis C. ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression. Current molecular medicine. 2006;6(1):55-69.

128. Todd DJ, Lee A-H, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. Nature reviews immunology. 2008;8(9):663-74.

129. Lee A-H, Glimcher LH. Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. Cellular and Molecular Life Sciences. 2009;66:2835-50.

130. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. Molecular and cellular biology. 2003;23(21):7448-59.

131. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Molecular cell. 2003;11(3):619-33.

132. Lange PS, Chavez JC, Pinto JT, et al. ATF4 is an oxidative stress–inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo. The Journal of experimental medicine. 2008;205(5):1227-42.

133. Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. Science. 2011;333(6051):1891-4.

134. Korennykh A, Walter P. Structural basis of the unfolded protein response. Annual review of cell and developmental biology. 2012;28:251-77.

135. Williams JA. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. Annual review of physiology. 2001;63(1):77-97.

136. Sitia R, Molteni SN. Stress, protein (mis) folding, and signaling: the redox connection. Science's STKE. 2004;2004(239):pe27-pe.

137. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Developmental cell. 2002;3(1):99-111.

138. Sutton R, Criddle D, Raraty MG, Tepikin A, Neoptolemos JP, Petersen OH. Signal transduction, calcium and acute pancreatitis. Pancreatology. 2003;3(6):497-505.

139. Ben-Dror K, Birk R. Oleic acid ameliorates palmitic acid-induced ER stress and inflammation markers in naive and cerulein-treated exocrine pancreas cells. Bioscience reports. 2019;39(5):BSR20190054.

140. Thrower EC, Gorelick FS, Husain SZ. Molecular and cellular mechanisms of pancreatic injury. Current opinion in gastroenterology. 2010;26(5):484.

141. Deng W-H, Chen C, Wang W-X, Yu J, Li J-Y, Liu L. Effects of ORP150 on appearance and function of pancreatic beta cells following acute necrotizing pancreatitis. Pathology-Research and Practice. 2011;207(6):370-6.

142. Hartley T, Siva M, Lai E, Teodoro T, Zhang L, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress response in an INS-1 pancreatic β-cell line with inducible expression of a folding-deficient proinsulin. BMC cell biology. 2010;11:1-18.

143. Kubisch CH, Logsdon CD. Secretagogues differentially activate endoplasmic reticulum stress responses in pancreatic acinar cells. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2007;292(6):G1804-G12.

144. Seyhun E, Malo A, Schäfer C, et al. Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, acinar cell damage, and systemic inflammation in acute pancreatitis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2011;301(5):G773-G82.

145. Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. The EMBO journal. 2005;24(24):4368-80.

146. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, et al. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk−/− mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. Molecular cell. 2001;7(6):1153-63.

147. Wu JS, Li WM, Chen YN, Zhao Q, Chen QF. Endoplasmic reticulum stress is activated in acute pancreatitis. Journal of Digestive Diseases. 2016;17(5):295-303.

148. Bobrovnikova-Marjon E, Hatzivassiliou G, Grigoriadou C, et al. PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105(42):16314-9.

149. Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D. Dephosphorylation of translation initiation factor 2α enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. Cell metabolism. 2008;7(6):520-32.

150. Fu S, Yang L, Li P, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. Nature. 2011;473(7348):528-31.

151. Wang L, Xu T, Wang R, Wang X, Wu D. Hypertriglyceridemia acute pancreatitis: animal experiment research. Digestive Diseases and Sciences. 2022;67(3):761-72.

152. Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. Virchows Archiv A. 1977;373(2):97-117.

153. Saluja A, Saito I, Saluja M, et al. In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 1985;249(6):G702-G10.

154. Johnston TP. The P-407–induced murine model of dose-controlled hyperlipidemia and atherosclerosis: a review of findings to date. Journal of cardiovascular pharmacology. 2004;43(4):595-606.

155. Johnston TP, Palmer WK. Mechanism of poloxamer 407-induced hypertriglyceridemia in the rat. Biochemical pharmacology. 1993;46(6):1037-42.

156. Ip SP, Tsang SW, Wong TP, Che CT, Leung PS. Saralasin, a nonspecific angiotensin II receptor antagonist, attenuates oxidative stress and tissue injury in cerulein-induced acute pancreatitis. Pancreas. 2003;26(3):224-9.

157. Zheng J, Wu J, Chen J, et al. Therapeutic effects of quercetin on early inflammation in hypertriglyceridemia-related acute pancreatitis and its mechanism. Pancreatology. 2016;16(2):200-10.

158. Eşrefoğlu M, Gül M, Ateş B, Batçıoğlu K, Selimoğlu MA. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. World journal of gastroenterology: WJG. 2006;12(2):259.

159. Küçükler S, Özdemir S, Kandemir F, Çağlayan C. Ratlarda kadmiyum kaynaklı mide toksisitesine karşı karvakrol'un etkileri. Türk Doğa ve Fen Dergisi. 2020;9(1):12-8.

160. Mansour SZ, Moustafa EM, Moawed FS. Modulation of endoplasmic reticulum stress via sulforaphane-mediated AMPK upregulation against nonalcoholic fatty liver disease in rats. Cell Stress and Chaperones. 2022;27(5):499-511.

161. Geng Y, Wu Z, Buist-Homan M, Blokzijl H, Moshage H. Hesperetin protects against palmitate-induced cellular toxicity via induction of GRP78 in hepatocytes. Toxicology and applied pharmacology. 2020;404:115183.

162. Chong G, Kuo F, Tsai S, Lin C. Validation of reference genes for cryopreservation studies with the gorgonian coral endosymbiont. Symbiodinium.

163. Shen X, Ellis RE, Lee K, et al. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for C. elegans development. Cell. 2001;107(7):893-903.

164. Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. science. 2000;287(5453):664-6.

165. Nagai H, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. BMB Reports. 2007;40(1):1-6.

166. Wang X-Z, Lawson B, Brewer JW, et al. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). Molecular and cellular biology. 1996;16(8):4273-80.

167. Lin JH, LaVail MM. Misfolded proteins and retinal dystrophies. Retinal Degenerative Diseases: Laboratory and Therapeutic Investigations. 2010:115-21.

168. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. Nature. 2008;454(7203):455-62.

169. Chen Y, Zhang J, Zhao Q, et al. Melatonin induces anti-inflammatory effects to play a protective role via endoplasmic reticulum stress in acute pancreatitis. Cellular Physiology and Biochemistry. 2016;40(5):1094-104.

170. Cross BC, Bond PJ, Sadowski PG, et al. The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(15):E869-E78.

171. Williard DE, Twait E, Yuan Z, Carter AB, Samuel I. Nuclear factor kappa B–dependent gene transcription in cholecystokinin-and tumor necrosis factor-α–stimulated isolated acinar cells is regulated by p38 mitogen-activated protein kinase. The American Journal of Surgery. 2010;200(2):283-90.

172. Twait E, Williard DE, Samuel I. Dominant Negative p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Expression Inhibits NF-κB Activation in AR42J Cells. Pancreatology. 2010;10(2-3):119-28.

173. Wu L, Cai B, Zheng S, Liu X, Cai H, Li H. Effect of emodin on endoplasmic reticulum stress in rats with severe acute pancreatitis. Inflammation. 2013;36:1020-9.

174. Liu M, Shi L, Chen M, Chen S, Zou X. Effects of c-Jun N-terminal kinase signaling pathway on severe acute pancreatitis–associated lung injury. Pancreas. 2012;41(3):358-66.

175. Volmer R, Ron D. Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. Current opinion in cell biology. 2015;33:67-73.

176. Shaffer A, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. Immunity. 2004;21(1):81-93.

177. Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. The Journal of cell biology. 2004;167(1):35-41.

178. Glimcher LH, Lee AH. From sugar to fat: How the transcription factor XBP1 regulates hepatic lipogenesis. Annals of the New York Academy of Sciences. 2009;1173:E2-E9.

179. Deng L-H, Xue P, Xia Q, Yang X-N, Wan M-H. Effect of admission hypertriglyceridemia on the episodes of severe acute pancreatitis. World Journal of Gastroenterology. 2008;14(28):4558.

180. Mei Q, Zeng Y, Huang C, et al. Rapamycin alleviates hypertriglyceridemia-related acute pancreatitis via restoring autophagy flux and inhibiting endoplasmic reticulum stress. Inflammation. 2020;43:1510-23.

181. Hofbauer B, Friess H, Weber A, et al. Hyperlipaemia intensifies the course of acute oedematous and acute necrotising pancreatitis in the rat. Gut. 1996;38(5):753-8.

182. Wang Y-J, Sun J-B, Li F, Zhang S-W. Hyperlipidemia intensifies cerulein-induced acute pancreatitis associated with activation of protein kinase C in rats. World Journal of Gastroenterology: WJG. 2006;12(18):2908.

183. Pan Y, Li Y, Gao L, et al. Development of a novel model of hypertriglyceridemic acute pancreatitis in mice. Scientific Reports. 2017;7(1):40799.

184. Zhang W, Wang XP, Yu ZW, et al. Hyperlipidemic versus healthy pancreases: a proteomic analysis using an animal model. IUBMB life. 2010;62(10):781-9.

185. Havel RJ. Pathogenesis, differentiation and management of hyperglyceridemia. Adv Int Med. 1969;15:117-54.

186. Kimura W, Mössner J. Role of hypertriglyceridemia in the pathogenesis of experimental acute pancreatitis in rats. International Journal of Gastrointestinal Cancer. 1996;20:177-84.

187. Lampropoulos P, Lambropoulou M, Papalois A, et al. The role of apigenin in an experimental model of acute pancreatitis. journal of surgical research. 2013;183(1):129-37.

188. Zhang Q, Qin M, Liang Z, et al. The relationship between serum triglyceride levels and acute pancreatitis in an animal model and a 14-year retrospective clinical study. Lipids in Health and Disease. 2019;18:1-9.

189. Hu G, Zhao Y, Tang Y, et al. Development of a novel model of hypertriglyceridemic acute pancreatitis in hamsters: protective effects of probucol. Pancreas. 2012;41(6):845-8.

190. Liu Y, Zhou Z-G, Zhou B, Wang R, Yan H, Li Y. Downregulation of GRP78 and XIAP is correlated with apoptosis during cerulein-induced acute pancreatitis in rats via regulation of caspase activation. Molecular Medicine Reports. 2013;7(3):725-30.

191. Yu JH, Seo JY, Kim KH, Kim H. Differentially expressed proteins in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells: implication for acute pancreatitis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2008;40(3):503-16.

192. Liu Y, Zhou Z-G, Chen K-L, et al. The ER chaperone GRP78 is associated with the severity of cerulein-induced pancreatic inflammation via regulating apoptosis of pancreatic acinar cells. Hepato-gastroenterology. 2012;59(118):1670-6.

193. Hong Y-p, Deng W-h, Guo W-y, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents vital organ injury in rat acute pancreatitis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2018;315(5):G838-G47.

194. Liu Y, Yang L, Chen K-L, et al. Knockdown of GRP78 promotes apoptosis in pancreatic acinar cells and attenuates the severity of cerulein and LPS induced pancreatic inflammation. PLoS One. 2014;9(3):e92389.

195. Lin JH, Li H, Yasumura D, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. science. 2007;318(5852):944-9.

196. Wang X-Z, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. The EMBO journal. 1998;17(19):5708-17.

197. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell. 2001;107(7):881-91.

198. Oono K, Yoneda T, Manabe T, et al. JAB1 participates in unfolded protein responses by association and dissociation with IRE1. Neurochemistry international. 2004;45(5):765-72.

199. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, et al. Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. Journal of Biological Chemistry. 2001;276(17):13935-40.

200. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. EMBO reports. 2006;7(9):880-5.

201. Dabrowski A, Grady T, Logsdon CD, Williams JA. Jun Kinases Are Rapidly Activated by Cholecystokinin in Rat Pancreas both in Vitro and in Vivo (∗). Journal of Biological Chemistry. 1996;271(10):5686-90.

202. Cuadrado A, Gonzalez L, Suarez Y, Martínez T, Munoz A. JNK activation is critical for Aplidin™-induced apoptosis. Oncogene. 2004;23(27):4673-80.

203. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. Trends in molecular medicine. 2012;18(1):59-68.