

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMAYA NEDEN OLAN GENLERİN GEN EKSPRESYONUNUN KANTİTATİF ÖLÇÜMÜ

Gönül Şeyda SEYDEL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Kıymet AKSOY

ADANA -2011

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMAYA NEDEN OLAN GENLERİN GEN EKSPRESYONUNUN KANTİTATİF ÖLÇÜMÜ

Gönül Şeyda SEYDEL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Kıymet AKSOY

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TF2009D4 nolu Proje Olarak Desteklenmiştir.**

Tez No:

ADANA -2011

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca kendimi geliştirmemde anlayış ve sabrını esirgemeyen, tecrübeleri ve bilgileriyle karşılaştığım tüm zorlukları aşmamda sonsuz desteğiyle daima yanımda olan sayın danışman hocam Prof.Dr. Kıymet Aksoy'a çok teşekkür ederim.

Doktora tezimin deneylerini yapabilmem için Essen Üniversitesi Gastroenteroloji ve Hepatoloji Anabilim Dalında laboratuvar olanaklarını sağlayan, tez çalışmalarım sırasında bana örnek olan, yol gösteren, destekleriyle beni motive eden değerli hocam Prof.Dr. Ali Canbay'a çok teşekkür ederim.

Ders aşamasında teorik bilgilerini aktaran, pratik alandaki uygulamalarımda yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Nurten Dikmen'e, Prof.Dr. Levent Kayrın'a, Prof.Dr. Abdullah Tuli'ye ve Prof.Dr. Akif Çürük'e teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan, yorumları ve eleştirileri ile bu teze katkıda bulunan Prof. Dr. Hikmet Akkiz'e teşekkür ederim.

Doktora eğitim sürecinde desteklerini ve tecrübelerini bana gösteren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma görevlileri ve diğer personellere teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TF2009D4 nolu proje olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi doktora çalışmalarım sırasında da bana her bakımdan destek olan sabır ve anlayış gösteren aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Hepatosellüler Karsinoma	3
2.1.1. Hepatosellüler Karsinomanın Risk Faktörleri	4
2.1.2. Hepatosellüler Karsinomanın Moleküler Mekanizması	5
2.1.2.1. Hepatokarsinogenez Süreci	5
2.1.2.2. Hepatokarsinogenez Sürecinde Yer Alan Sinyal Yolakları	7
2.1.3. Karaciğer Fibrozisi	9
2.1.3.1. Karaciğer Hasarını Başlatan Sinyaller	9
2.1.3.1.1. Oksidatif Stres	10
2.1.3.1.2. Hipoksi	10
2.1.3.1.3. İnflamatuar ve İmmun Cevap	10
2.1.3.1.4. Apoptozis	11
2.1.3.1.5. Steatoz	11
2.1.3.2. Hepatik Stellat Hücreleri	11
2.1.3.3. Karaciğer Fibrozisinin Aktivasyonu	13
2.1.3.3.1. Başlangıç Aşaması	15
2.1.3.3.2. Devam Ettirme Aşaması	17
2.1.3.3.2.1. Proliferasyon	17
2.1.3.3.2.2. Kemotaksi	17

2.1.3.3.2.3. Fibrogenenezis	17
2.1.3.3.2.4. Kasılma	18
2.1.3.3.2.5. Matriks Parçalanması	18
2.1.3.3.2.6. Retinoidlerin Kaybı	18
2.1.3.3.3. İyileşme Aşaması	18
2.1.3.4. Karaciğer Fibrozisinin Tedavisi	19
2.1.3.4.1. İnflamasyonu veya İmmun Yanıtı Azaltmak	21
2.1.3.4.2. Hepatoprotektantlar	21
2.1.3.4.3. Stelat Hücre Aktivasyonunun İnhibisyonu	22
2.1.3.4.4. Skar Matriksin Parçalanmasını Artırmak	22
2.2. Doğal Öldürücü (Naturel Killer-NK) Hücreler ve Reseptörleri	22
2.2.1. Majör Doku Uyum (MHC) Kompleksinin Genomik Yapısı	24
2.2.2. NK Hücre Cevabının Düzenlenmesi	25
2.2.3. NKG2D Reseptörleri ve Ligandları	27
2.2.4. Karaciğer Hastalıklarında NK Hücreleri ve NKG2D Ligandları	30
3. Vitamin D	32
2.3.1. Vitamin D'nin Metabolizması	32
2.3.2. Vitamin D'nin İşlevleri	35
2.3.3. Vitamin D Preparatları	36
2.3.3.1. D ₂ veya D ₃ Vitamini	36
2.3.3.2. Dihidrotakisterol	37
2.3.3.3. 25-(OH) D ₃ (Kalsidiol)	37
2.3.3.4. 1- α -(OH) D ₃	37
2.3.4. Vitamin D Eksikliği	37
2.3.5. Karaciğer Hastalıklarında Vitamin D	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Gereçler	39
3.1.1. Cihazlar	39
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	40
3.2. Yöntemler	41
3.2.1. Örnek Analizi	41
3.2.2. Hücre Kültürü	43

3.2.2.1. Prensip	44
3.2.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Hatları	45
3.2.2.2.1. Yöntem	46
3.2.2.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması	46
3.2.2.3.1. Ayıraçlar	46
3.2.2.3.2. Yöntem	47
3.2.2.4. Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması	48
3.2.2.4.1. Ayıraçlar	48
3.2.2.4.2. Vitamin D Dozunun Ayarlanması	48
3.2.2.4.3. Serbest Yağ Asidi Dozunun Ayarlanması	48
3.2.2.4.4. Yöntem	48
3.2.2.5. Nil Kırmızısı Boyama	49
3.2.2.5.1. Prensip	49
3.2.2.5.2. Yöntem	49
3.2.3. Hücre Hatlarından Profibrogenik Genlerin (Col-1 α , α -SMA, TGF- β) ve Stress Ligand Genlerin (MICA, MICB) Gen Ekspresyonlarının RNA Düzeyinde Belirlenmesi	49
3.2.3.1. Total RNA İzolasyonu	49
3.2.3.1.1. Yöntem	50
3.2.3.2. Total RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	50
3.2.3.3. Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi	51
2.3.3.1. Yöntem	51
3.2.3.4. Real Time PCR (RT-PCR) Analizi	51
3.2.3.4.1. Prensip	51
3.2.3.4.2. Primer Tasarımı	52
3.2.3.4.3. Amplifikasyon Koşulları	53
3.2.3.4.4. Yöntem	54
3.2.3.5. İstatiksel Analiz	54
4. BULGULAR	55
4.1. LX-2 Hücrelerine FFA Girişinin Nil Kırmızısı Boyama ile Gösterilmesi	56
4.2. Primer İnsan Hepatik Stellat Hücrelerine FFA Girişinin Nil Kırmızısı Boyama ile Gösterilmesi	57

4.3. LX-2 Hücre Hattında COL1 α 'nın Gen Ekspresyonu	59
4.4. LX-2 Hücre Hattında α -SMA'nın Gen Ekspresyonu	60
4.5. LX-2 Hücre Hattında TGF- β 'nin Gen Ekspresyonu	60
4.6. LX-2 Hücre Hattında MICA'nın Gen Ekspresyonu	61
4.7. LX-2 Hücre Hattında MICB'nin Gen Ekspresyonu	62
4.8. Primer İnsan Hepatik Stellat Hücre Hattında MICA'nın Gen Ekspresyonu	63
4.9. Primer İnsan Hepatik Stellat Hücre Hattında MICB 'nin Gen Ekspresyonu	64
4.10. HepG2 Hücre Hattında MICA'nın Gen Ekspresyonu	65
4.11. HepG2 Hücre Hattında MICB'nin Gen Ekspresyonu	67
4.12. Huh7 Hücre Hattında MICA'nın Gen Ekspresyonu	69
4.13. Huh7 Hücre Hattında MICB'nin Gen Ekspresyonu	69
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	85
7. KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	96

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hepatosellüler karsinoma gelişimindeki risk faktörleri ve basamakları.	5
Şekil 2. Hepatosellüler karsinomadaki epigenetik değişiklikler.	7
Şekil 3. Hepatik stellat hücreleri.	13
Şekil 4. Hepatik stellat hücrelerinin aktivasyon yolu.	14
Şekil 5. NK hücre reseptörleri.	24
Şekil 6. MHC gen bölgesi.	25
Şekil 7. NK hücre cevabının düzenlenmesi.	27
Şekil 8. MICA molekülünün yapısı.	29
Şekil 9. Vitamin D'nin kaynakları ve işlevleri.	34
Şekil 10. Kontrol grubu LX-2 hücrelerinin floresan mikroskobu görünümü.	56
Şekil 11. LX-2 hücrelerinin 0,5 mM FFA inkübasyonundan sonra floresan mikroskobu görünümü.	57
Şekil 12. Kontrol grubu primer insan hepatik stellat hücrelerinin floresan mikroskobu görünümü.	58
Şekil 13. Primer insan hepatik stellat hücrelerinin 0,25 mM FFA'nın inkübasyonundan sonra floresan mikroskobu görünümü.	58
Şekil 14. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+VD ₂ ve 1 mM FFA+VD ₂ 'lı tedaviden sonra COL1α'nın gen ekspresyon düzeyleri.	59
Şekil 15. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+VD ₂ ve 1 mM FFA+VD ₂ 'lı tedaviden sonra α-SMA'nın gen ekspresyon düzeyleri.	60
Şekil 16. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+VD ₂ ve 1 mM FFA+VD ₂ 'lı tedaviden sonra TGF-β'nın gen ekspresyon düzeyleri.	61
Şekil 17. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+VD ₂ ve 1 mM FFA+VD ₂ 'lı tedaviden sonra MICA'nın gen ekspresyon düzeyleri.	62

Şekil 18. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+VD ₂ ve 1 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICB'nin gen ekspresyon düzeyleri.	63
Şekil 19. Primer insan hepatik stellat hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,25 mM FFA ve 0,25 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICA'nın gen ekspresyon düzeyleri.	64
Şekil 20. Primer insan hepatik stellat hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,25 mM FFA ve 0,25 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICB'nin gen ekspresyon düzeyleri.	65
Şekil 21. HepG2 hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICA gen ekspresyon düzeyleri.	66
Şekil 22. HepG2 hücre hattında 48 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICA gen ekspresyon düzeyleri.	66
Şekil 23. HepG2 hücre hattında 72 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICA gen ekspresyon düzeyleri.	67
Şekil 24. HepG2 hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.	68
Şekil 25. HepG2 hücre hattında 48 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.	68
Şekil 26. HepG2 hücre hattında 72 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.	69
Şekil 27. Huh7 hücre hattında 24 saatlik VD ₂ , 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD ₂ 'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.	70

- Şekil 28.** Huh7 hücre hattında 48 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri. **70**
- Şekil 29.** Huh7 hücre hattında 72 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri. **71**

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Hepatik fibrozis için tedavi stratejileri.	20
Çizelge 2. Hücre kültürü çalışma basamakları.	42
Çizelge 3. Moleküler analiz çalışma basamakları.	43
Çizelge 4. LX-2 hücre hattı için kullanılan gelişme besiyeri.	46
Çizelge 5. HepG2, Huh 7 ve Primer hepatik stellat hücre hatları için kullanılan gelişme besiyeri.	46
Çizelge 6. Hedef genlere ait primer dizileri.	53
Çizelge 7. Real Time PCR’da kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.	53
Çizelge 8. Hücre hattından analiz edilen genler.	55

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
α -SMA	Düz Kas Aktini
β	Beta
δ	Delta
ε	Epsilon
COL 1 α	Kollajen 1 Alfa
ESM	Ekstrasellüler Matriks
FFA	Serbest Yağ Asidi
HSH	Hepatik Stellat Hücre
HSK	Hepatosellüler Karsinoma
LOH	Heterozigosite Kaybı
MICA/B	Major Histokompatibilite İlişkili Zincir I A/B
MHC	Major Doku Uyum Kompleksi
MMP	Matriks Metalloproteinaz
μ L	Mikro Litre
μ M	Mikro Molar
NAFLD	Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	Nonalkolik Steatohepatitis
NK	Doğal Öldürücü Hücre
NKG2D	Doğal Öldürücü Hücre Reseptörü G2D
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- Beta
TIMP	Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
VDR	Vitamin D Reseptörü
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

Hepatosellüler Karsinomaya Neden Olan Genlerin Gen Ekspresyonunun Kantitatif Ölçümü

Hepatosellüler karsinoma genel olarak kronik karaciğer hastalığı veya siroz zemininde gelişmekte olan ve dünya genelinde en yaygın ölüm nedeni olan karaciğerin primer bir tümörüdür. Günümüzde bu kanser tipi için etkili tedavi yöntemleri yeterli olmadığından yeni terapötik stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında hepatik stellat hücre hatlarında (LX-2, primer insan hepatik stellat hücre) ve hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında (HepG2, Huh7), Vitamin D₂ ve serbest yağ asidinin(FFA) stres ligand genleri olan MICA ile MICB ve profibrojenik genler olan COL1 α , α -SMA ve TGF- β 'nın gen ekspresyonu üzerine olan etkisi moleküler düzeyde çalışılmıştır. Çalışmada LX-2 hücre hattı, 24 saat boyunca VD₂(10⁻⁶) ve 0,5mM, 1mM FFA ile, primer hepatik stellat hücre hattı, 24 saat boyunca VD₂(10⁻⁶) ve 0,25mM FFA ile, HepG2 ve Huh7 hücre hatları ise 24, 48 ve 72 saat boyunca VD₂(10⁻⁶) ve 0,5mM FFA ile tedavi edilmiştir. Gen ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle ölçülmüştür. Çalışma sonucunda kontrol örneklerine kıyasla, 0,5 mM ve 1 mM FFA'lı tedavinin LX-2 hücrelerinde α -SMA ve TGF- β 'nın gen ekspresyonunu indüklediği, VD₂'nin FFA ile indüklenen α -SMA ve TGF- β 'nın ekspresyonunu önemli düzeyde azalttığı, hemVD₂'li hem de FFA'lı tedaviden sonra COL-1 α 'nın ekspresyonun önemli düzeyde azaldığı gözlenmiştir. LX-2 hücre hattında VD₂'nin MICA ve MICB gen ekspresyonunu etkilemediği, Primer stellat hücre hattında ise VD₂'nin MICA gen ekspresyonunu etkilediği, fakat FFA'nın MICA ve MICB gen ekspresyonunun etkilemediği gözlenmiştir. HepG2 hepatosellüler karsinoma hücre hattının VD₂ tedavisinden sonra MICA ve MICB gen ekspresyonunun etkilendiği, Huh7 hücre hattında ise VD₂'nin 72 saatlik tedaviden sonra MICB gen ekspresyonunu etkilediği gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda in vitro ortamda VD₂'nin hepatik stellat hücrelerin profibrojenik ve inflamatuvar aktivitesini etkilediği gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Hepatosellüler karsinoma, hepatik stellat hücreler, MICA/B, Vitamin D₂

ABSTRACT

Quantitative Measurement of Gene Expression of The Genes Causing Hepatocellular Carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC), the major type of primary liver cancer, is one of the most common malignancies worldwide. This malignant tumor develops on a background of chronic hepatitis or cirrhosis. Effective therapy to this cancer is currently lacking, creating an urgent need for new therapeutic strategies for HCC.

The aim of this study was therefore to investigate the effect of vitamin D₂ and free fatty acids (FFA) on stress ligands (MICA and MICB) and pro-fibrotic activity (α -SMA, COL1 α and TGF- β) in hepatic stellate cells (LX-2 cells and human primary HSC) and hepatocellular carcinoma cells (HepG2, Huh7). LX-2 cells were treated with VD₂ (10⁻⁶ M) and 1 mM FFA for 24 hours, primary human HSC were treated with VD₂ (10⁻⁶ M) and 0,25 mM FFA for 24 hours, HepG2 and Huh7 cells were treated with VD₂ (10⁻⁶ M) and 0,5 mM FFA for 24, 48 and 72 hours and expression of the genes were assessed by quantitative real time-PCR. In summary this study shows that compared to vehicle controls, treatment of cells with 0.5 mM and 1 mM FFA induced α -SMA and TGF- β expression in LX-2 cells. VD₂ treatment significantly downregulated the FFA-induced expression of TGF- β and α -SMA in LX-2 cells. COL1 α expression was reduced after addition of FFA. Moreover, VD₂ treatment significantly downregulate expression of MICA in isolated primary HSC and MICA/B expression in primary HSC was not affected by FFA treatment. Also, in HepG2 cells a significant decrease of MICA and MICB mRNA by VD₂ was detectable. Following VD₂ treatment for 72 hours of Huh 7 cells significantly downregulate expression of MICB. These results indicate that vitamin D₂ may reduce inflammatory and profibrogenic activity of stellate cells in vitro.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Hepatic stellate cells, MICA/B, Vitamin D₂

1. GİRİŞ

Hepatosellüler karsinoma (HSK), genel olarak kronik karaciğer zemininde görülen karaciğerin primer bir tümörüdür. Dünya genelinde görülen kanserler içerisinde beşinci sırada yer almaktadır ve bütün kanserlerin %5,4'lük kısmını oluşturmaktadır¹⁻³. Hepatosellüler karsinoma tümör gelişimiyle bağlantılı olarak birçok gen ekspresyonunun değişimiyle ilgili çok basamaklı bir süreçtir. Hepatokarsinogenez olarak isimlendirilen bu süreçte hepatosellüler karsinoma fenotipini oluşturan değişiklikler yavaş bir süreçte gerçekleşmektedir. Moleküler yöntemlerdeki ilerlemeler hepatokarsinogenezin moleküler mekanizmasının anlaşılmasını artırmaktadır. HSK gelişiminde altta yatan moleküler mekanizmaların tam anlamıyla çözülebilmesi HSK olgularının önlenmesi ve tedavi rejimlerinin geliştirilmesinde son derece önemlidir².

Risk faktörlerinin etkisine maruz kalan hepatositlerde uzun süreli hasar meydana gelmektedir. HBV ve HCV hepatositleri enfekte ederek yol açtıkları hasara ek olarak viral enfeksiyona bağlı immun yanıt oluşturmaları nedeniyle de karaciğer dokusunda inflamasyon oluşturmaktadır^{4,5}. Fibrozis, kronik olarak hasar gören karaciğerde, ekstrasellüler matriksin yapımı ile yıkımı arasındaki dengenin bozulmuş olması ve aşırı bağ dokusu birikimiyle sonuçlanan, sitokin salınımı ve dokunun yeniden yapılanmasındaki değişiklikleri içeren yara iyileşmesine cevap olarak adlandırılan karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Fibrotik süreçte birçok hücre tipi ve değişik faktörler rol oynamaktadır. Hepatik fibroziste ana mekanizma hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonudur. Hepatik stellat hücreler (HSH) apoptozis ve inflamasyonda kritik bir rol oynamaktadır. Bu hücreler normalde vitamin A ve yağ depolar. Aktive olduğunda retinil ester depolarını kaybederek myofibroblast benzeri hücreler haline dönüşür ve kontraksiyon yapmasının yanısıra kollajen de sentezlemeye başlar. Bu nedenle güncel çalışmaların çoğu HSH'nin kökenini araştırmaya, genetik defektleri ortaya koymaya ya da bu hücrenin aktif ve inaktif formlarında hangi moleküllerin eksprese edildiğini saptamaya yöneliktir^{6,7}.

Doğal öldürücü hücreler (NK) immün sistemin bir parçası olarak görev yaparlar ve transforme olmuş ya da viral olarak enfekte olmuş hücrelerin yok edilmesinde çok

önemli rol oynarlar. Deneysel modellerde NK hücrelerinin karaciğer yaralanmasındaki ve fibrozisindeki rolleri gösterilmiştir. NK hücre reseptörü olan NKG2D'nin ligandları olarak MICA ve MICB tanımlanmıştır. Stres ile indüklenen moleküller olan MICA ve MICB'nin, kronik karaciğer ve hepatosellüler karsinomalı olgularda serum düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir⁸. NK hücreler aktive olmuş hepatik stellat hücrelerin öldürülmesinde antifibrotik etkiye sahiptir. Fakat literatürde hepatik stellat hücrelerinde stres ligandlarının rolü hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada ise yağlı karaciğer hastalığının hücre kültürü modeli olan insan hepatik stellat hücrelerinde ve hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında vitamin D₂ tedavisinin stres ligand genleri olan MICA ile MICB ve profibrotik aktiviteye sahip olan COL1 α , α -SMA ve TGF- β genlerinin gen ekspresyonu üzerine olan etkisi moleküler düzeyde saptanmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Hepatosellüler Karsinoma

Hepatosellüler karsinoma (HSK), genel olarak kronik karaciğer zemininde görülen karaciğerin primer bir tümörüdür. Dünya genelinde görülen kanserler içerisinde beşinci sırada, ölüm oranı olarak da akciğer, mide ve kolon kanserlerinden sonra dördüncü sırada yer almaktadır ve bütün kanserlerin %5,4'lük kısmını oluşturmaktadır¹⁻³. HSK'nın görülme sıklığı her yıl artma eğiliminde olup Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Avrupa'da son 20 yılda görülme sıklığı iki kat artmıştır².

HSK, coğrafik bölgeler, etnik gruplar ve cinsiyete göre çeşitli epidemiyolojik özelliklere sahiptir. HSK'nın insidansı coğrafik koşullara bağlı olarak değişiklik göstermekte olup % 80'den fazlası Sahra Altı Afrika ve Doğu Asya gibi gelişmekte olan ülkelerde, daha az oranda ise Kuzey Avrupa ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Türkiye'de ise kronik hepatit hastalıkları sıklığı ile birlikte HSK'nın insidansının ve prevalansının hızla arttığı görülmektedir. Gelişmekte olan ülkelere HBV enfeksiyonları sorumlu iken, gelişmiş ülkelere HCV enfeksiyonları ve alkol kullanımı HSK gelişiminden daha fazla oranlarda sorumludur^{3,9,10}.

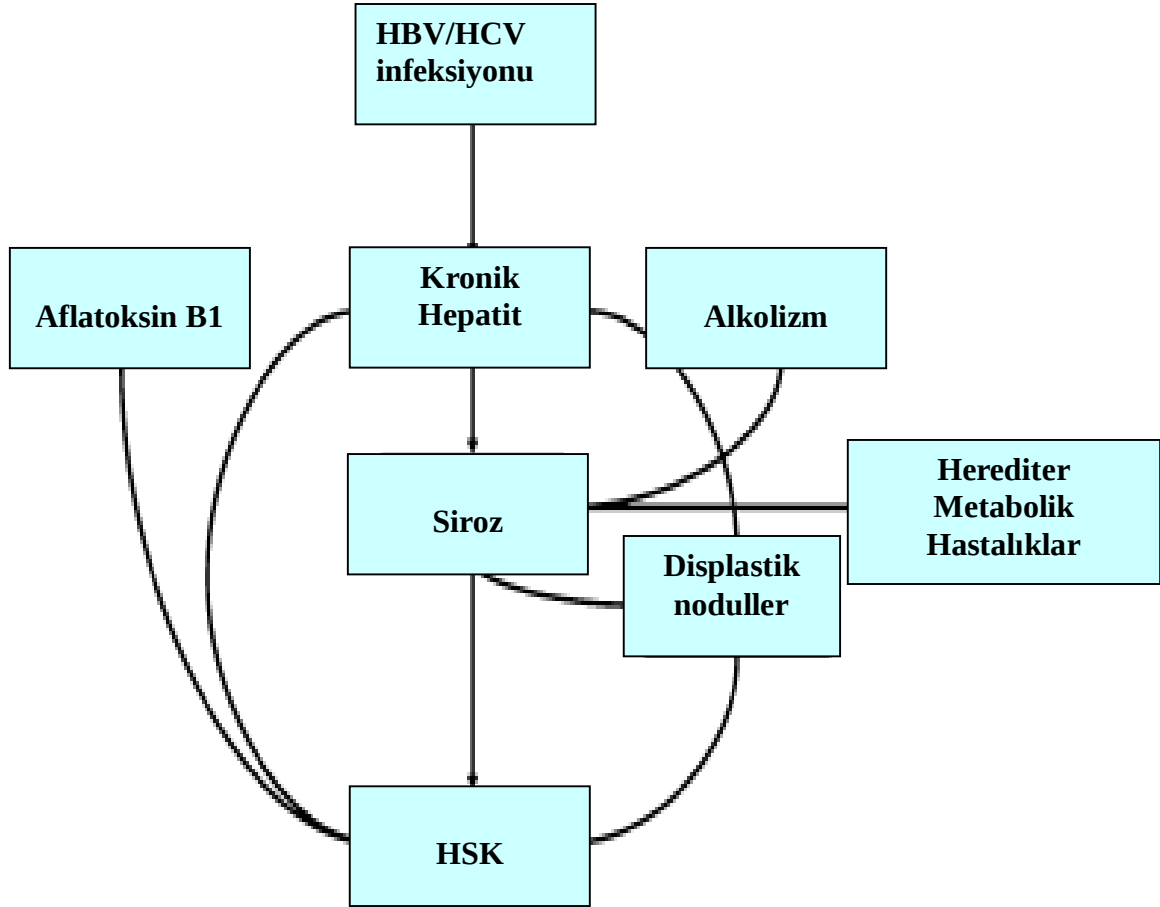
HSK insidansı aynı bölgede yaşayan farklı populasyonlar arasında da değişmektedir. Etnik gruplar arasındaki farklılığın nedeni karaciğer hastalığı ve HSK için major risk faktörlerinin prevalansı ve maruz kalma süresindeki farklılıklardır. HSK riski erkeklerde kadınlardan 2-7 kat daha yüksektir. Bu oran dünya genelinde değişmektedir. Erkeklerin karaciğer kanserinde yüksek oranlara sahip olmasının nedenleri 3 maddede açıklanabilir. 1. Erkeklerin sigara ve alkol kullanma gibi karaciğer karsinojenlerine ve hepatit virüs enfeksiyonlarına maruz kalma oranlarının daha yüksek olması 2. Kadınlarda östrojen etkisinin İnterlökin-6 aracılığıyla inflamasyonu baskılayıp, karaciğer hasarını ve proliferasyonun yayılmasını azaltabilmesi 3. Erkeklerde testosteron etkisinin androjen reseptör sinyalini artırması, karaciğer hücre proliferasyonunu teşvik edebilmesidir^{3,11,12}. Genel olarak tüm bölgelerde kadınlardaki yaş piki erkeklerden 5 yaş daha fazladır. Düşük riskli populasyonlarda (ABD, Kanada

ve İngiltere gibi) 75 yaş ve üzeri gibi daha ileri yaşlarda görülürken, yüksek riskli Asya popülasyonlarında da benzer tablo görülmektedir³.

2.1.1. Hepatosellüler Karsinomanın Risk Faktörleri

Hepatosellüler karsinoma sıklıkla kronik karaciğer hastalığı veya siroz zemininde gelişmektedir. Risk faktörlerini; kronik HBV, HCV ve Delta hepatit, toksinler (alkol, sigara, aflatoksin), otoimmün hepatit, herediter metabolik karaciğer hastalığı (hemokromatozis, alfa-1-antitripsin eksikliği) erkek cinsiyet, insülin direnci (diabetes mellitus, non-alkolik karaciğer yaralanması) gibi çeşitli faktörler oluşturmaktadır³.

Risk faktörlerinin etkisine maruz kalan hepatositlerde uzun süreli hasar meydana gelmektedir. HBV ve HCV hepatositleri enfekte ederek yol açtıkları hasara ek olarak viral enfeksiyona bağlı immun yanıt oluşturmaları nedeniyle de karaciğer dokusunda inflamasyon oluşturmaktadır^{4,5}. Hepatosit nekrozu, inflamasyon ve sağlam hepatositlerdeki rejeneratif çoğalma uzun süreler boyunca devam etmektedir. Risk faktörlerinin yol açtığı inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres karaciğerin stromasını ve mikroçevresini değiştirmekte ve sirozun gelişimine neden olmaktadır. Hepatositlerde değişen mikroçevre içinde rejenerasyon amacıyla çoğalma hızı artmaktadır. Hem etiyolojik faktörlerin hem de inflamasyonun yol açtığı çoğalma zamanla genetik değişime yol açmaktadır. Böylece sirotik karaciğer dokusu içinde fibrotik stromayla çevrilmiş, çoğalan hepatositlerden oluşan nodüller oluşmaya başlar. Bu nodüller hiperplastik nodüllere daha sonra da büyüme hızı kontrolü kaybı ve genomik instabilite gelişimiyle displastik nodüllere sonuçta hepatosellüler karsinomaya dönüşmektedir. Zamanla hücrelerin farklılaşma seviyesi azalır ve hepatosit fonksiyonları kaybolmaya başlar¹³ (Şekil 1).



Şekil 1. Hepatosellüler karsinoma gelişimindeki risk faktörleri ve basamakları.

2.1.2. Hepatosellüler Karsinomanın Moleküler Mekanizması

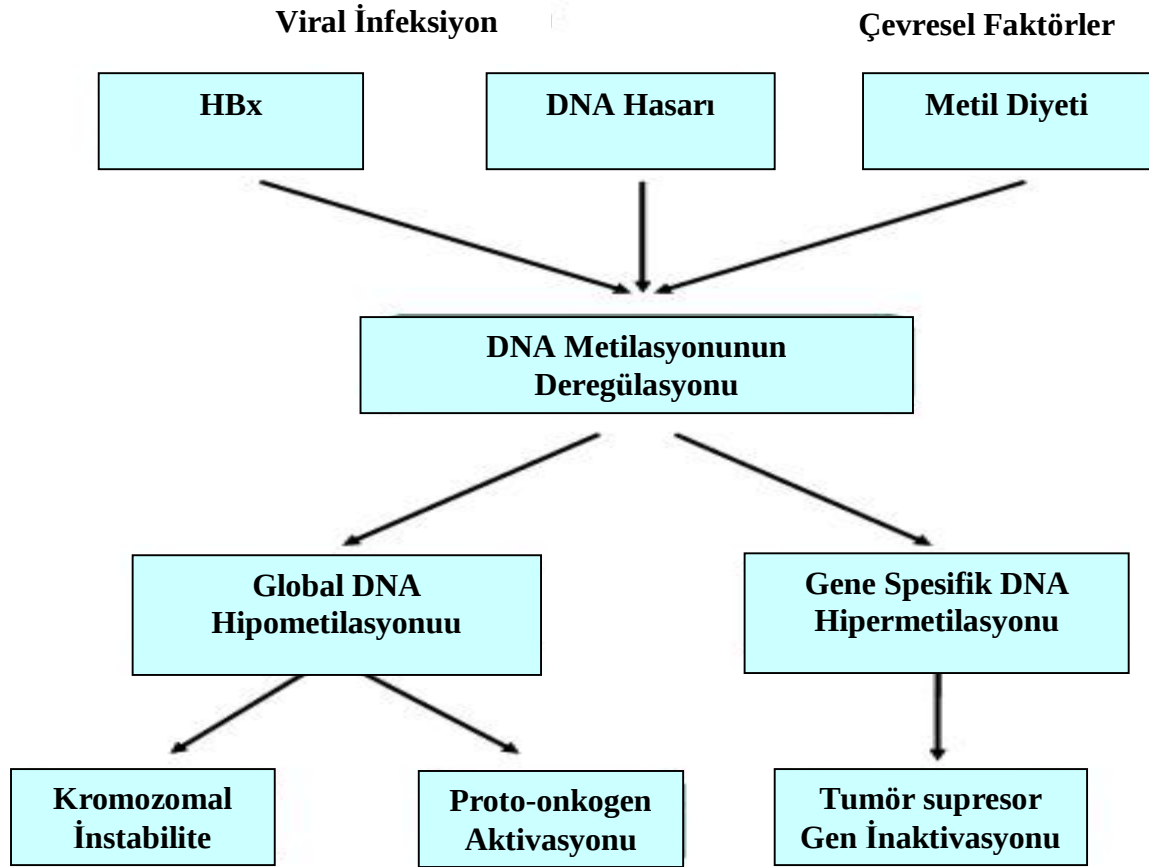
2.1.2.1. Hepatokarsinogenez Süreci

Hepatosellüler karsinoma tümör gelişimiyle bağlantılı olarak birçok gen ekspresyonunun değişimiyle ilgili çok basamaklı bir süreçtir. Hepatokarsinogenez olarak isimlendirilen bu süreçte hepatosellüler karsinoma fenotipini oluşturan değişiklikler yavaş bir süreçte gerçekleşmektedir. Moleküler yöntemlerdeki ilerlemeler hepatokarsinogenezin moleküler mekanizmasının anlaşılmasını artırmaktadır². Viral yollarla, aflatoksinle veya alkolle indüklenmiş hepatokarsinogenez sürecinde önemli olan temel basamaklar tüm karsinogenez süreçlerinde olduğu gibi hücreye yaşama avantajı kazandıran limitsiz bölünme, apoptozisten kaçma ve anjiogenez yapabilme özelliklerini kazandıran değişimlerdir. Hepatokarsinogenez allelik kayıplardaki artma,

kromozomal değişiklikler, gen mutasyonu, epigenetik ve moleküler hücresel yollardaki değişikliklerle güçlü bir şekilde bağlantılıdır^{14,15}.

Hepatokarsinogenez; kromozomal, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimini içeren çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişikliklerin bir kısmı karaciğerde kanser gelişiminin farklı basamaklarında oluşur ve hücrede önemli moleküler yolların regülasyonunun bozulması ile sonuçlanır. HSK gelişiminde altta yatan moleküler mekanizmaların tam anlamıyla çözülebilmesi HSK olgularının önlenmesi ve tedavi rejimlerinin geliştirilmesinde son derece önemlidir².

Kromozomal ve genetik değişiklikler konusunda yapılan son çalışmalar kromozomal instabilitenin (CIN) hepatokarsinogenezin erken evrelerinde görüldüğünü ve malignant fenotipin oluşumuyla sonuçlandığını göstermektedir¹⁶. Artmış DNA metilasyonu (hipermetilasyon) kronik hepatitli ve sirozlu karaciğerde gözlenmektedir. HSK olgularında farklı hücresel yolları düzenleyen p16/INK4A gibi çeşitli tümör baskılayıcı genlerde DNA hipermetilasyonu olduğu gözlenmiştir^{2,17}. Sirozlu karaciğerde görülen başka bir kromozomal anormallikte telomer kısalmasıdır. Telomer kısalması hepatokarsinogenezde önemli bir mekanizmadır. Sadece hepatositlerde gözlenmektedir ve hepatosit telomer kısalması siroz örneklerinde fibrozisin ilerlemesiyle korelasyon göstermektedir. Telomer kısalmasının telomerazın yetersiz olduğu farelerde karsinojenlere karşı karaciğer tümörlerinin başlamasını artırdığı gösterilmiştir. İnsan HSK olgularında da telomer kısalığı saptanmıştır. Siroz aşamasındaki insan hepatositlerinde kromozomal instabiliteye yol açabilen telomer disfonksiyonunun HSK gelişimini indükleyebileceği düşünülmüştür¹⁸. Yapılan pek çok çalışmada genetik değişikliklere ek olarak insan karsinogenezinde epigenetik değişikliklerin de önemli rol oynadığı gösterilmiştir¹⁹ (Şekil 2).



Şekil 2. Hepatosellüler karsinomadaki epigenetik değişiklikler.

2.1.2.2. Hepatokarsinogenez Sürecinde Yer Alan Sinyal Yolakları

İnsan kaynaklı kanser hücrelerinde proliferasyon, hücre döngüsü, apoptozis ve metastazı düzenleyen p53, BRCA1, Rb, Ras ve β -katenin gibi çok sayıdaki gende mutasyon görülmüştür. HSK'da gen mutasyonu diğer kanser tiplerine göre daha çeşitlidir. P53 ve β -katenin HSK'da en sık mutasyona uğrayan genlerdir. Yapılan çalışmalarda bu iki gende görülen mutasyonların farklı iki yolla oluştuğu gösterilmiştir. P53 mutasyonu kromozomal instabilitenin yüksek oluşuyla, β -katenin mutasyonu ise epigenetik değişikliklerle bağlantılı olduğu bulunmuştur. Hücrel onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun sonucu olarak Wnt/ β -katenin, Ras, p14Arf/p53, p16INK4A/Rb, TGF β ve PTEN/Akt yolakları gibi çeşitli sinyal yolaklarının regülasyonunun bozulduğu bildirilmiştir³.

HSK'da genetik değişikliklerin bu denli zengin olmasının 2 nedeni olabilir. İlki, klinik olarak solid tümör tanısı konulmadan önce çok sayıda genetik değişikliğin birikmesi, İkincisi ise değişik etiyolojik faktörlerin hepatosit içinde farklı genleri hedefleyerek değiştirmesidir. Etiyolojik olarak tanımlanan genetik heterojenite bu tümörlerin fenotipik heterojenitesi ile sonuçlanmaktadır²⁰.

Wnt Sinyal Yolu: Bu sinyal yolağının aktivasyonu sıklıkla HSK'nın gelişimi ile ilişkilidir. Wnt sinyallerinin eksikliğinde β -katenin; adenomatöz polipozis coli (APC), aksin ve glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)'dan oluşan komplekse çekilerek burada fosforillenir ve parçalanmaya yollarır. Bu sayede normal durumda sitoplazmik β -katenin düzeyi düşük bir düzeyde tutulur. Ancak Wnt ligandları membranda bulunan frizzled (Fz) ve düşük dansiteli lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 5/6'ya (LRP5/6)'ya bağlandığında Wnt/ β -katenin sinyal iletimini tetikleyerek sitoplazmada bulunan dishevelled (Dsh) proteinini fosforile ederek aktiveştir. Aktif Dsh, β -kateninin degradasyon kompleksinden serbestleşmesini sağlar. Sitoplazmada biriken serbest β -katenin nükleusa geçerek T-hücre faktörü (TCF) ve lenfoid enhancing faktör (LEF) gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşir. Bu etkileşim çeşitli hedef genlerin ekspresyonuna sebep olur^{5,10, 21}.

p53 Sinyal Yolu: HSK'lı hastaların %30-60'ında p53 kaybı gözlenmiştir. En fazla gözlenen p53 değişimleri, bir allelin nokta mutasyonu ve diğer allelin delesyonu şeklindedir. HSK'lerde 17p13 DNA bağlanma bölgesinde missence mutasyonu vardır. HSK tümörlerinin % 25-60'ında 17p13 de LOH (heterozigosite kaybı) görülmüştür. 17p LOH'leri ise mutasyon olmayan allelde görülür. Fakat çoğu durumda p53 değişimi hastalığın başlangıcına değil gelişiminde etkili olmaktadır. p53 mutasyonları az-diferansiye tümörlerde bulunurken, iyi diferansiye tümörlerde bulunmaz. HSK'daki p53 mutasyonu ile ilişkili spesifik çevresel bir etken aflatoksindir. Aflatoksin maruziyetinin yüksek olduğu Çin ve Afrikanın güneyindeki bölgelerde çalışılan HSK'lı olgularda p53 mutasyonlarına sıklıkla rastlanmaktadır^{5,15, 21}.

p16INK4A/Rb Sinyal Yolu: HSK hücreleri retinoblastoma yolağında yer alan siklin-D geninde amplifikasyon yolu ile veya özellikle p16INK4a, bazen de retinoblastoma genini inaktif hale getirerek hücre döngüsünü baskılayan sistemi devre dışı bırakırlar. HSK olgularının %25-48'de Retinoblastoma lokusunda LOH kaybı gözlenmiştir, Retinoblastoma ekspresyonu %30-40 oranlarında downregüle olmuştur.

Retinoblastomanın yıkılması ve metilasyon aracılıklı p16'nın susturulmasıyla retinoblastoma yolağı rahatsız edilir^{5,15, 21}.

Erb reseptör ailesi: HSK'ların %68inde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), %84'ünde ErbB ailesi reseptör tirozin kinaz 3 (ERBB3), %21'inde ERBB2(HER2) ve %61'inde ERBB4'nün aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. ERBB3 ve ERBB1'nin aşırı ekspresyonu, yüksek proliferasyon indeksi, metastaz ve tümör büyüklüğü ile karakterize agresif fenotiple birliktelik gösterir^{5,15}.

2.1.3. Karaciğer Fibrozisi

Normal karaciğerde ekstrasellüler matriks (ESM) karaciğer ağırlığının %0,6'sından azdır. Özellikle kollajen, elastin, fibronektin, laminin, entaktin, tenaskin, undulin, proteoglikanlar ve hyaluronik asitten oluşur. Fibrozis, kronik olarak hasar gören karaciğerde, ekstrasellüler matriksin yapımı ile yıkımı arasındaki dengenin bozulmuş olması ve aşırı bağ dokusu birikimiyle sonuçlanan, sitokin salınımı ve dokunun yeniden yapılanmasındaki değişiklikleri içeren “yara iyileşmesine cevap” olarak adlandırılan karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Karaciğerin hasarlanmasına toksinler, immun sistem bozuklukları, viral ve parazitik infeksiyonlar, wilson's hastalığı ve galaktozemi gibi sebepler neden olmaktadır. Hasarın sebebi ne olursa olsun, karaciğerde yara iyileşmesine yanıtta hücrelerin ve çözücü faktörlerin katkıları benzerdir. Fibrozis süreci içerisinde ESM yapımında artış, skleroza dönüşme eğilimi ve bağ dokusunun dejeneratif değişimi sonucunda karaciğer sirozuna kadar uzanan bir süreç görülmektedir. Fibrozis siroza doğru ilerledikçe normal karaciğer dokusunda 1:1 olan kollajen tip I / kollajen tip III oranının, sirozlu karaciğer dokusunda 4:1'e yükseldiği görülmektedir. Karaciğer fibrozisin oluşabilmesi için parankimal hücre hasarı, inflamasyon, hepatosellüler rejenerasyon, ekstrasellüler matriks üretimi, tüm karaciğerde psödotobül oluşumuna neden olan lobuler ve damarsal yapının bozulması gereklidir. Yapılan çalışmalarda hasarlı karaciğerde aşırı bağ dokusu üretiminin sebebi olarak perisinusoidal hepatik stellat hücreleri gösterilmektedir^{6,7,22}.

2.1.3.1. Karaciğer Hasarını Başlatan Sinyaller

Karaciğer hasarı hepatosit, inflamatuvar ve parankimal hücreler, özellikle sinuzoidal endotelial hücreler ve kupffer hücrelerinden köken alan sinyallerden dolayı

fibrojenin başlamasına yol açmaktadır. Bu fibrojenik uyarıcılar reaktif oksijen türleri (ROS), hipoksi, inflammatuar, immün yanıt, apoptozis ve steatozdur^{6,22}.

2.1.3.1.1. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türlerinin üretimi aracılığıyla oluşan oksidatif stres karaciğer hasarının oluşumunda ve hepatik fibrojenin başlamasında önemli bir rol oynamaktadır. Lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif bozulması nekrozisi, hepatositlerin apoptozisini indükler ve fibrozisin başlamasıyla sonuçlanan inflammatuar yanıtı güçlendirir. Ayrıca kupffer hücrelerinden profibrojenik mediyatorlerin üretimini stimüle eder^{23,24}.

2.1.3.1.2. Hipoksi

Hipoksi, fibrojenin merkezi bir düzenleyicisidir. Hepatik stellat hücreler tarafından HIF-1 α 'nın upregüle olmasını sağlayarak erken fibrojenik uyarıcı olarak tanımlanır. Sırasıyla vasküler endotel hücre büyüme faktörü ve reseptörleri indüklenerek hepatik stellat hücrelerde tip 1 kollajen sentezi stimüle olur. TGF- β 1 ekspresyonu potansiyalize olunca anjiogenez ve fibrojenizde otokrin ve parakrin döngülere katkıda bulunur. Fibrozis ve hipoksi kalıcı parankimal hasarın varlığında birbirlerini amplifiye ederler ve normal doku tamirinin bozulmasına yol açarak kısır döngü oluştururlar^{6,25,26}.

2.1.3.1.3. İnflammatuar ve İmmün Cevap

İnflamasyon fibrozisin başlamasında ve ilerlemesinde önemlidir. Hem doğuştan gelen bağışıklığa (naturel killer hücreler ve makrofajlar) hem de kazanılmış bağışıklığa (T ve B hücreleri) ait olan inflammatuar hücreler, karaciğer yaralanması ve fibrojenizinin gelişiminde rol oynamaktadır. Patojenlerin ortadan kaldırılmasını, hücre ölümünü (antiviral immün reaksiyon sırasında hepatositlerin hasarlanması), inflammatuar hücrelerinin düzenlenmesini, myofibroblastların aktive edilmesini, fibrozisin spontan iyileşmesini düzenlemektedir. Kupffer hücreleri, hepatik inflammatuar yanıtta önemlidir. Nükleer Faktör Kappa-B (NF- κ B) aktivasyonu, kemokinleri ve diğer inflammatuar mediyatorleri içeren çok sayıda inflammatuar genlerin ekspresyonunu kontrol eder^{27,28}.

2.1.3.1.4. Apoptozis

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü, kronik karaciğer hastalığının genel özelliklerinden birisidir. Nekrozun klasik bir inflamatuvar veya fibrojenik uyaran olduğu düşünülüyorsa da yapılan çalışmalar apoptozu hücre ölümünden sorumlu tutmaktadır. Hepatositlerden salınan apoptotik ürünler, kültürdeki stellat hücreler için fibrojeniktir ve in vivo ortamda Fas aracılıklı hepatosit apoptotik deneysel hayvanlarda da fibrojenik olarak bulunmuştur. Apoptotik cisimciklerin oluşmasıyla sonuçlanan apoptozis daha sonra fagositler tarafından temizlenmektedir. Apoptozisin genellikle inflamatuvar olmadığı düşünülürken aslında proinflamatuvar ve fibrojenik bir uyarıcıdır. Kupffer hücreleri apoptotik cisimciklerin yutulmasından sonra ölüm ligandları ve Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF- α) salgılamaktadır. Benzer şekilde HSH'ler tarafından apoptotik cisimciklerin yutulması oksidatif radikallerin üretimi ile profibrojenik yanıtın tetiklenmesini ve TGF- β ile kollajen 1'in ekspresyonunun artmasını sağlamaktadır²⁹⁻³¹.

2.1.3.1.5. Steatoz

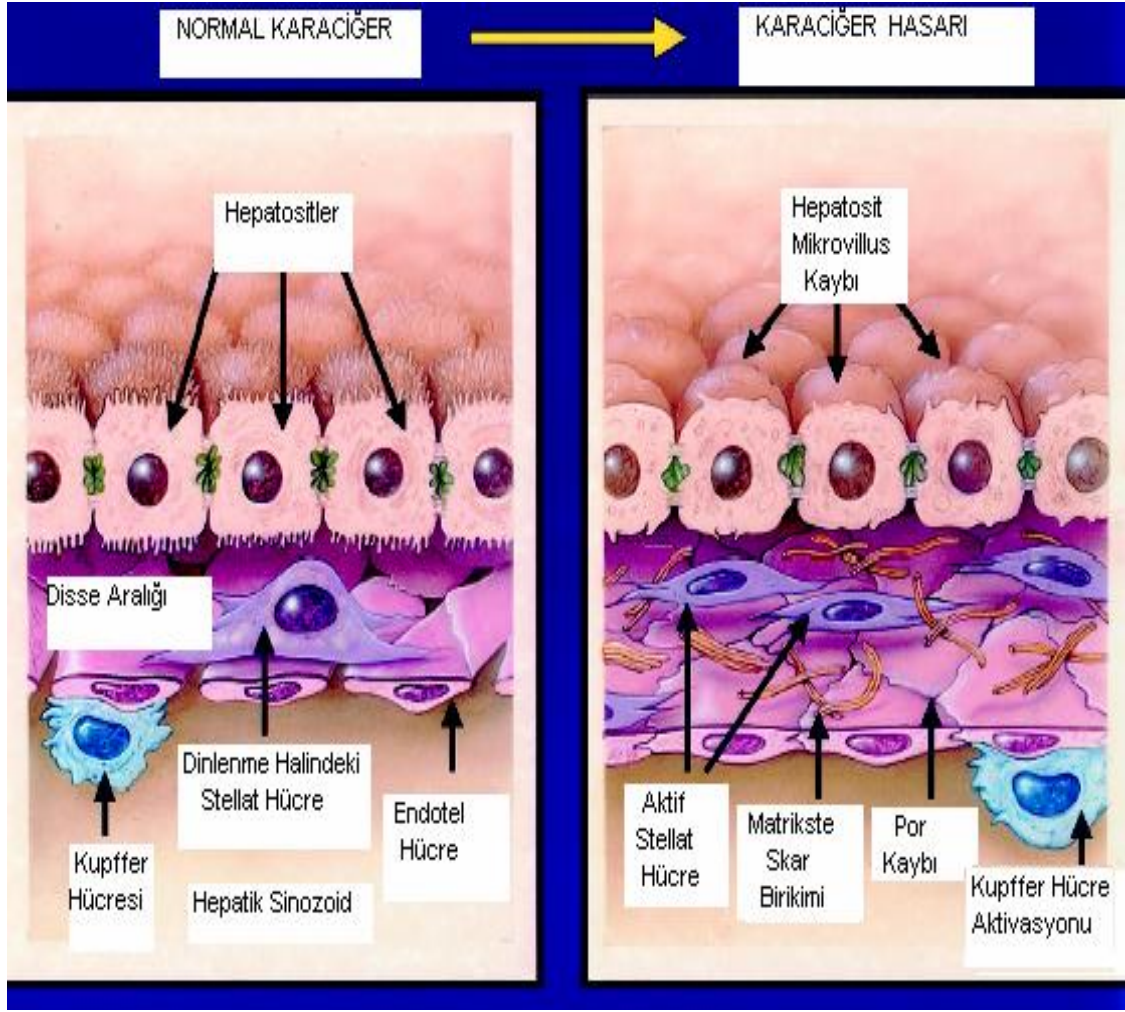
Oksidatif stresin artması, apoptozise duyarlılığının artması, hücre hasara cevapta düzensizlik, Peroksizom Proliferator-Aktive edici Reseptör (PPAR) sinyali ve aktivitesi, leptin ekspresyonundaki ve sinyalindeki bozulmalar steatoz bağlı fibrogenezise katkı yaparlar^{32,33}.

2.1.3.2. Hepatik Stellat Hücreleri

Karaciğerin hücre yapısının yaklaşık %65'ini hepatositler, %35'ini parankim dışı hücreler oluşturmaktadır. Parankim dışı hücre topluluğunun %70'ini endotelial hücreler, %20'sini kupffer hücreleri ve %10'unu da hepatik stellat hücreleri oluşturur. Karaciğer yıldız hücresi, ito hücresi olarak da bilinen hepatik stellat hücreleri, ilk kez Von Kupffer tarafından 1876 yılında tanımlanmıştır. Mezenşimal kaynaklı olan bu hücreler endotel hücre tabakası altında, disse aralığında yer almaktadır. Anatomik yerleşimi ve sitolojik özellikleri bakımından, kapiller yatakta bulunan, kasılma özelliklerine ek olarak fibroziste aktif rol oynayan perisitlere benzemektedir. Endotelin altında ve sinüzoidlerde uzun sitoplazmik uzantıları bulunan hepatositler arasında bağlantıyı sağlayan hücrelerdir. Aynı zamanda birbirleriyle ve sinir sonlanmalarıyla da

bağlantı yaparlar. Satellit hücrelerinin elektron mikroskopik görünümü; çekirdeği sıkıştırmış yağ damlacıkları, kısmen gelişmiş GER, hücre iskeletini oluşturan yapılarda azalma ve az sayıdaki mitokondri organelleri ile karakterizedir. Satellit hücrelerini rutin yöntemler ile (hemotoksilen-eozin) boyanmış kesitlerde tanımlamak kolay değildir. Özel boyama olarak toluidin mavisi, bazik fuksin gibi histolojik boyalar kullanarak gözlemek mümkündür. Satellit hücresinin gözlenmesi vitamin A'nın boyanmasına bağlıdır. Normalde ana işlevi vitamin A'yı retinil ester şeklinde depolamak olan, inaktif hücrelerdir. Satellit hücreleri ve bunlardan türeyen miyofibroblast benzeri hücrelerin değişik işlevleri vardır, bunlar retinoidleri çözüp serbestleştirirler, içlerine alırlar veya depolarlar. Özellikle miyofibroblast benzeri hücreler, ekstrasellüler matriks proteinlerini (kollajen tip 1, 3, 4, 5 ve 6, fibronektin, laminin, tenaskin, undulin, hiyaluron ve proteoglikanlar) sentezler ve salgılar³⁴⁻³⁶.

Çok sayıda yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar karaciğer hasarına cevap olarak HSH'lerin bir aktivasyon işlemine maruz kaldığını, retinil ester depolarını kaybettiğini, kontraksiyon yapmasının yanısıra kollajen sentezlemeye başladığını, hücre yüzey reseptörlerinde değişiklikler meydana geldiğini ve sonuç olarak myofibroblast benzeri hücrelere dönüştüğünü göstermiştir. Hepatik stellat hücrelerin myofibroblast benzeri hücrelere dönüşmesiyle aşırı bağ dokusunu sentezlemesinin yanı sıra yıkımı inhibe edebilme özelliği de vardır³⁴⁻³⁶ (Şekil 3).

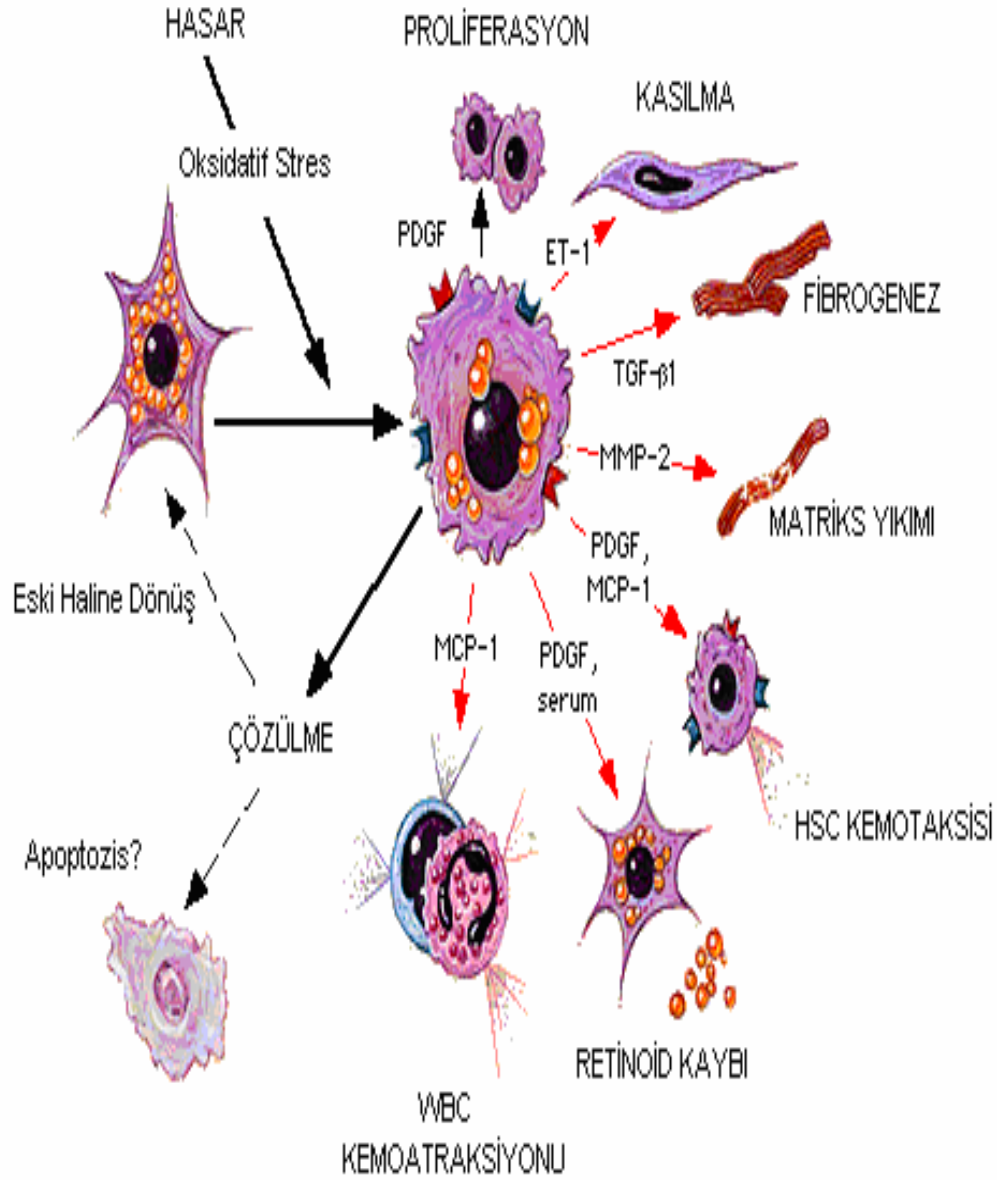


Şekil 3. Hepatik stellat hücreleri.

2.1.3.3. Karaciğer Fibrozisinin Aktivasyonu

Karaciğer fibrozisi, hepatik stellat hücrelerin aktivasyonu ile başlamaktadır. Aktivasyon işlemi genel olarak başlama (initiation) ve devam ettirme (perpetuation) aşamalarından oluşmaktadır. Eğer yaralanma geçerse 3. aşama olan fibrozisin iyileşmesiyle (resolution) devam etmektedir. Başlama aşaması preinflamasyon olarak da adlandırılır, sitokinlere ve uyarıcılara hücrenin cevabı olarak gen ekspresyonundaki ve fenotipteki değişiklikleri ifade eder. Lipid peroksidaz, lipopolisakkarite maruz kalma ve hasarlı hepatositlerin üretiminin yanı sıra ekstrasellüler matriksin etrafındaki değişiklikleri içeren parakrin etkili uyarıcılardan dolayı görülür. Devam ettirme aşaması bu uyarıcıların etkileriyle fibrozisin devam etmesidir. Parakrin etkili uyarıcılara ek olarak otokrin uyarıcılardan da etkilenmektedir ve çok sayıda işlevsel

değişikliklerle sonuçlanmaktadır. Bunlar stellat hücre proliferasyonu ve kemotaksi, lökosit kemotaksisi, matriks parçalanması, fibrogenesis, kontraktilitenin artışı, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu ve retinoidlerin kaybını içermektedir^{7,22} (Şekil 4).



Şekil 4. Hepatik stellat hücrelerinin aktivasyon yolu.

2.1.3.3.1. Başlangıç Aşaması

Parakrin uyarıcılar hasar görmüş hepatosit, endotelial hücre, kupffer hücre ve platelet gibi komşu hücrelerden elde edilmektedir. Hepatositler peptid büyüme faktörü olan TGF- β ve TGF- α 'yı, aynı zamanda karaciğer hasarının bazı formlarında önemli olabilen lipid peroksidazı salmaktadır. Endotelial hücreler stellat hücreler üzerinde aktive edici özelliğe sahip olan endotelin 1 (ET-1) ve hücrel fibronektin salgılar. Ayrıca endotelial hücreler TGF- β 'nın aktivasyonunda da rol oynamaktadır. Kupffer hücreleri matriks sentezini, hücre proliferasyonunu, özellikle TGF- β gibi sitokinlerin hareketleri doğrultusunda stellat hücrelerinden retinoidlerin salınımını ve reaktif oksijen türlerinin salınımını stimüle etmektedir. Plateletler PDGF, TGF- β ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi parakrin uyarıcılarının önemli başka bir kaynağıdır^{7,22}.

Transforme Edici Büyüme Faktörü- Beta (TGF- β); TGF- β 1, 2 ve 3 olmak üzere üç izoformdan oluşmaktadır. TGF- β 1 özellikle hücre proliferasyonunun, hücre farklılaşmasının ve fibrojenin güçlü modulatorü olarak bilinmektedir. Genellikle homodimer latent polipeptid olarak salgılanmaktadır ve ekstrasellüler matriks içindeki proteoglikanlara bağlanır. Hem normal karaciğerde hemde fibrotik karaciğerde bulunur, fakat siroz ve deneysel hepatik fibroziste artmaktadır. Karaciğerdeki TGF- β 'nın primer kaynağı olarak kupffer hücreleri düşünülmektedir. Fakat endotelial hücrelerden, hepatositlerden ve stellat hücrelerinden de küçük miktarlarda üretilmektedir. Stellat hücrelerde TGF- β , kollajen I-II ve IV, fibronektin ve lamininin ekspresyonunu artırmaktadır ve sessiz stellat hücrelerin myofibroblastlara dönüşümünü hızlandırmaktadır. Matriks sentezini hızlandırması ve stimüle etmesinin yanı sıra diğer profibrojenik etkilere de sahiptir. Fibroblastlarda kollajenaz ve stromelisin gen ekspresyonunu azaltır ve TIMP-1 ve plazminojen aktivator inhibitörü gibi proteaz inhibitörlerinin ekspresyonunu artırmaktadır^{7,22}.

Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α): Proinflamatuvar ve immün düzenleyici bir sitokindir. Yapılan çalışmalar doku yaralanmasını takiben doku tamirinde de rol oynadığını göstermiştir. TNF- α hücre proliferasyonunu ve apoptozisi düzenleme, ekstrasellüler matriks sentezini ve matriks metalloproteinaz (MMP) üretimini kontrol etme, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indüklemeye özelliğine sahiptir^{7,22}.

İnsanlarda ve hayvan modellerinde akut ve kronik karaciğer hastalığında TNF- α ve TNF- α reseptörlerinin yükselmiş seviyesi eşlik etmektedir. Kupffer hücrelerinin

karaciğerde TNF- α 'nın ana kaynağı olduğu düşünülmektedir. TNF- α stellat hücre aktivasyonunu hızlandırmaktadır ve α -SMA ile TGF- β reseptör 1'in ekspresyonunu artırmaktadır. İlginç olarak, TNF- α , TGF- β 1 gibi klasik bir fibrojenik mediator değildir. Aslında stellat hücrelerinde TNF- α fibronektin ve tenaskinin sentezini stimüle ederken, tip I ve tip III kollajenin sentezini azaltmaktadır. TNF- α hepatik stellat hücreler tarafından MMP stromelisin/transin'in ekspresyonunu da artırmayı sağlar, bu da sentezinden çok matriks parçalanmasında rolü olacağını düşündürmektedir. Böylece, hepatik fibrozisde TNF- α 'ın ana rolü aktive edilmiş hücreler tarafından ESM üretiminin stimülasyonundan çok stellat hücre aktivasyonunun başlaması olabilir^{7,22}.

Endotelin: Endotelinler çeşitli metabolik etkilere sahiptirler fakat öncelikle güçlü bir vazokonstriktör olarak kabul edilmektedir. Normal insan karaciğerinde ET-1 düşük seviyelerde eksprese olurken, sirozlu karaciğerde sinuzoidal endotelial hücreleri, safra kanalı hücreleri ve stellat hücreleri tarafından ET-1 sentezinde önemli bir artış görülmektedir. İn vitro çalışmalarda stellat hücre aktivasyonu ve fibrojenizde ET-1'in rolü olduğunu desteklemektedir^{7,22}.

Platelet Kökenli Büyüme Faktörü: PDGF güçlü bir kemotaktik olarak hareket eder ve mezankimal hücreler için mitojenik bir faktördür. Karaciğer yaralanmasında stellat hücrelerin aktivasyonunun devam ettirilmesinde ve fibrozisin gelişiminde önemli rol oynamaktadır^{7,22}.

Transforme edici faktör-alfa (TGF- α): TGF- α epidermal büyüme faktörü benzeri ligand ailesine ait bir polipeptiddir ve karaciğer de içeren çok sayıda normal dokudan sentez edilmektedir. Karaciğer yaralanmasını takiben hepatosit rejenerasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Normal karaciğerde sinuzoidal hücrelerde bulunmaz. Fakat aktive olmuş makrofaj, kupffer hücresi ve stellat hücrelerinden sentez edildiği gösterilmiştir. Stellat hücrelerinde EGF reseptörlerine bağlanır ve primer kültürde proliferasyonu stimüle eder. Proliferasyon üzerindeki etkisine ek olarak, stellat hücre aktivasyonunu hızlandırdığı da rapor edilmiştir^{7,22}.

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü: Hepatositler tarafından salgılanan IGF-1 ve IGF-2'nin stellat hücre proliferasyonunun parakrin düzenlenmesinde katkısı bulunmaktadır^{7,22}.

2.1.3.3.2. Devam Ettirme Aşaması

Hepatik stellat hücrelerinin devam aşaması; proliferasyon, kemotaksi, fibrogenesiz, kontraktilite, matriks parçalanması, retinoid kaybı ve sitokin salınımı gibi hücre davranışını etkileyen faktörleri içermektedir. Bu değişikliklerin net etkisi ise ekstrasellüler matriksin oluşumunu artırmaktır^{7,22}.

2.1.3.3.2.1. Proliferasyon

PDGF tanımlanmış en güçlü stellat hücre mitojenidir. Stellat hücre aktivasyonunun erken döneminde PDGF reseptörlerinin indüksiyonu bu güçlü mitojen için yanıtı artırmaktadır^{20,36}. PDGF sinyalinin downstream yolları stellat hücrelerde dikkatli bir şekilde karakterize edilmiş olup PI3 kinaz ve Na^+/H^+ değişimini içermektedir^{20,37,38}. Stellat hücrelerindeki diğer mitojenik uyarıcılar VEGF, trombin ve onun reseptörleri, EGF, TGF α , keratinosit büyüme faktörü ve bFGF'dir^{7,39}.

2.1.3.3.2.2. Kemotaksi

Stellat hücreler yaralanma bölgesinde kemoatraktanların birikimine yol açarak sitokin boyunca göç edebilirler. Güçlü stellat hücre kemoatraktanlar PDGF, MCP-1 ve CXCR3'yi içermektedir. Stellat hücre kemotaksisinin mekanik özellikleri son zamanlarda açıklanmıştır, PDGF uyarıcı kemotaksi hücrelerin yayılmasıyla bağlantılıdır^{7,22}.

2.1.3.3.2.3. Fibrojenesis

Stellat hücreleri sadece hücre sayısını artırarak değil aynı zamanda matriks üretimini artırarak ta fibrozise yol açar. Hepatik skarın en iyi çalışılmış komponenti kollajen tip 1'dir. Kollajen tip 1'in ekspresyonu artan sayıda uyarıcı ve sinyal yolları tarafından hepatik stellat hücrelerde hem transkripsiyonel hemde post-transkripsiyonel olarak düzenlenmektedir⁶.

Stellat hücreler tarafından kollajen 1 ve diğer matriks komponentlerinin üretimi için en güçlü uyarıcı TGF- β 'dir. TGF- β hem parakrin hem de otokrin kaynaklardan köken almaktadır. TGF- β 'in downstream sinyali SMAD olarak bilinen bifonksiyonel molekül ailesini içermektedir. SMAD'lar fibrojenesis sırasında TGF- β 'nın etkisini artırmaktadır. TGF- β aynı zamanda hücreyel fibronektin ve proteoglikanları içeren

matriks komponentlerinin üretimini uyarmaktadır⁴⁰. Konnektif doku büyüme faktörü de (CTGF/CCN2) güçlü fibrojenik sinyaldir, hiperglisemi ve hiperinsülinemi tarafından upregüle olmaktadır⁴¹. CTGF üretiminin uyarılması geleneksel olarak TGF- β bağımlı olarak öngörülürken, TGF- β bağımsız düzenlemelerde de bulunmaktadır^{7,42}.

2.1.3.3.2.4. Kasılma

Endotelin ve nitrik oksit (NO) stellat hücre kasılmasını kontrol eden major düzenleyicilerdir. Bu mediyatorlara ilaveten anjiotensinojen II, eikosanoidler, atrial natriüretik peptid, somatostatin ve karbonmonoksit (CO) eklenebilir. Stellat hücre aktivasyonu gibi sitoskeletal protein olan α -SMA'nın ekspresyonu da artmaktadır⁷.

2.1.3.3.2.5. Matriks Parçalanması

Fibrozis, matriks üretimi ve parçalanması arasındaki dengeyi tanımlamaktadır. Ekstrasellüler matriksin parçalanması hepatik fibroziste anahtar bir olaydır. Matriks metalloproteinazlar (MMP-1) fibrotik karaciğerin ana kollajeni olan kollajen tip 1'i azaltabilen bir proteazdır. Stellat hücreler MMP-1 mRNA eksprese eder fakat enzim düzeyi düşüktür. MMP aktivitesinin düzenlenmesi pek çok düzeyde oluşmaktadır. Bunlar arasında MMP'in metalloproteinaz doku inhibitörüne (TIMPs) bağlanarak inaktivasyonu yer almaktadır⁴³. Stellat hücreler fonksiyonel TIMP-1 ve TIMP-2 üretirler ve karaciğer yaralanması sırasında matriks birikiminin parçalanmasının azaltılmasına yol açarak, intestinal kollajenlerin aktivitesini inhibe ederek bu proteinlerin üretimini sağlarlar. TIMP-1 anti-apoptotiktir ve TIMP-1 antagonistleri de çok etkili antifibrotik hedef sunmaktadır⁴⁴.

2.1.3.3.2.6. Retinoidlerin Kaybı

Kültür ortamında retinoidler retinil esterleri şeklinde depo edilirler. Retinoidlerin kaybı stellat hücrelerinin aktivasyonu için gereklidir. Stellat hücrelerinin aktivasyonuna karakteristik perinükleer retinoid (vitamin A) damlalarının kaybı eşlik etmektedir⁶.

2.1.3.3.3. İyileşme Aşaması

Bugün yapılan çalışmaların çoğu karaciğer fibrozisin tedavisine yöneliktir. Stellat hücrelerin aktivasyon kaybının nasıl önleneceği önem kazanmıştır. Aktive olmuş

stellat hücrelerinin azaltılması için ya sessiz fenotip için geri dönüşüm ya da apoptoz veya yaşlanma ile temizlenme olmak üzere iki potansiyel yol düşünülmüştür. Bir çok çalışmada karaciğer fibrozisin baskılanması sırasında stellat hücre apoptozisinin önemli olduğu düşünülmüştür. Kültür ortamında, stellat hücreler CD95-L ve TRAIL aracılı apoptozise duyarlıdır ve NK hücreler TRAIL aracılı mekanizma tarafından stellat hücrelerinin apoptozisini indüklemektedir. Naturel killer hücreler, stellat hücrelerinin apoptozisi ve fibrozisin baskılanmasının önemli bir belirleyicisidir. Yapılan bir çalışmada fibrozisin baskılanması sırasında yaşlanmaya maruz kalan stellat hücrelerinin, NK hücreler tarafından saldırıya daha duyarlı oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular malignant olmayan hastalıklarda yaşlanmanın rolünü anlamak ve yeni tedaviler bulmak için hücresel yaşlanmanın bilinen yollarından yararlanmak için yeni fırsatlar sunmaktadır^{6,45}.

2.1.3.4. Karaciğer Fibrozisinin Tedavisi

Antifibrotik tedavinin hedefleri çeşitli kategorilere ayrılmıştır. Bunlar; hasarı önlemek için hastalığın primer tedavisi, stellat hücre aktivasyonunu önlemek için inflamasyonu ya da immun yanıtı azaltmak, hepatosit hasarını azaltmak için ‘hepatoprotection’, stellat hücre aktivasyonunu downregüle etmek, stellat hücrenin proliferatif, fibrojenik, kontraktıl veya proinflamatuvar yanıtını nötralize etmek, stellat hücrelerinin apoptozini uyarmak, skar matriksin parçalanmasını artırmak ya da matriks proteaz üreten hücreleri uyarak, onların inhibitörlerini downregüle etmektedir^{7,22} (Çizelge 1).

Çizelge 1. Hepatik fibrozis için tedavi stratejileri.

Yaralanmanın ve İnflamasyonun Azaltılması	Viral Hepatitler için antiviral tedavi Şelaton Anjiotensin II tip I reseptör antagonistleri, ACE inhibitörleri Ursodeoksikolik asid (antiinflamatuvar) Hepatoprotektantlar
Stellat Hücre Aktivasyonunu hafifletmek	Alfa İnterferon Antioksidanlar: Vitamin E Anjiotensin II tip I reseptör antagonistleri Sitokin tedavisi TGF-β antagonisti Endotelin reseptör antagonisti HGF TNFα antagonisti IFN-γ PPAR- γ agonisti FXR agonisti Kannabinoid Reseptörleri CB1 antagonisti CB2 agonisti Aldosteron antagonisti Opioid antagonisti
Aktive Olmuş Stellat Hücrelerinin İnhibisyonu	Anti-proliferatif: • PDGF reseptör antagonisti • Sodyum değişim inhibitörleri • HMG CoA reduktaz inhibitörleri • Plasmin/trombin reseptör antagonisti Anti-kontraktilite: • Endotelin/endotelin reseptör antagonisti • Nitrik oksit donörleri Anti-fibrojenik: • Kollajen sentez inhibitörleri • TGFβ inhibitörleri • HGF/HGF mimetikleri • AT reseptör antagonistleri • ACE inhibitörleri • Integrin • CTGF/CCN antagonistleri • SMAD 7 agonisti • Relaksin
Hepatik Stellat Hücrelerinin Apoptozise Spesifik Ajanları	Gliotoksin NGF agonisti TIMP antagonisti TRAIL ligandları
Skar Matriksi Parçalayıcılar	Transglutaminaz ya da çapraz bağlı kollajen inhibitörleri

2.1.3.4.1. İnflamasyonu veya İmmun Yanıtı Azaltmak

Azaltılmış fibrozis HCV'li hastalarda pegile α -interferon ve ribavirinli tedavinin başarılı olduğu rapor edilmiştir. Bu etki karaciğer hasarı ve viral replikasyon üzerinden oluşmaktadır. Sürdürülebilir viral klirens fibrozisin belirgin olarak gerilemesiyle bağlantılıdır. Böylece hastaların uzun dönemli takibi HCV'nün başarılı şekilde temizlenmesi erken zamanlarda hastalığın daha dramatik geri dönüşünü gösterebilir. Daha da önemlisi viral klirensin yokluğunda bile bazı antifibrotik etkiler gözlenmektedir^{7,22}.

Çok sayıda ajan hepatik stellat hücre aktivasyonunu stimule etmeyi azaltan anti-inflamatuar etkiye sahiptir. Kortikosteroidler, karaciğer hastalığının çeşitli tiplerinde özellikle otoimmün hepatitiste yıllarca kullanılmaktadır. Pentoxiphylline TNF- α 'yı downregüle ederek onun antifibrotik aktivitesini etkiler. Renin-anjiotensin sistemi de oksidatif stresin oluşumu sayesinde inflamasyonu artırabilir ve bu yüzden Anjiotensin dönüştürücü enzim antagonistleri veya anjiotensinojen II tip I reseptör antagonisti antifibrojenik aktivitenin yanı sıra antiinflamatuvar etkiye de sahip olabilir. Ursodeoksikolik asit de antiinflamatuvar aktivite nedeniyle fibrozis ve primer biliyer siroz üzerinde yararlı bir etkiye sahiptir^{7,22}.

2.1.3.4.2. Hepatoprotektantlar

Preklinik ve klinik çalışmalarda genel olarak 'hepatoprotektant' olarak adlandırılan yeni bir sınıf bulunmaktadır. Bu sınıf HGF, HGF delesyon varyantlarını, HGF sentetik mimetiklerini ve bunlara ilaveten küçük molekül kaspaz inhibitörü ve insülin benzeri büyüme faktörlerini içermektedir^{7,22}.

HGF; Fibrozisin hayvan modellerinde HGF'in antifibrotik etkisi için güçlü kanıtlar vardır. Antifibrotik aktivitesinin mekanizması TGF- β ekspresyonunun baskılanmasını ve kollajenaz ekspresyonunu içermektedir. Yapılan ileri düzeydeki çalışmalar büyümenin inhibe edildiğini ve hepatik stellat hücrelerin apoptozise uğradıklarını göstermiştir^{7,22}.

Kaspaz inhibitörleri; Hepatositlerin apoptozisi profibrojenik inflamatuvar uyarıcı olarak tanımlanmaktadır. Sonuç olarak, spesifik olarak kaspazları bloke eden apoptotik sinyallerin intrasellüler efektörleri olan küçük moleküllerdir^{7,22}.

FXR ligandları; Farnesoid X reseptör, FXR, nükleer reseptör transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir ve safra asitlerinin bağlanmasıyla aktif hale getirilir^{7,22}.

2.1.3.4.3. Stellat Hücre Aktivasyonunun İnhibisyonu

Sessiz stellat hücrelerin, aktive olmuş myofibroblastlara dönüşümünü azaltmak önemlidir. En çok uygulanan pratik yol aktivasyon için önemli bir uyarıcı olan oksidatif stresi azaltmaktır. Vitamin E'yi içeren antioksidanlar fibrojenezi baskılamaktadır. Diğer antioksidanlar stellat hücrelerin aktivasyonunu da azaltmaktadır. Kannabinoidlerin, hepatik fibrosis için çok etkileyici rolleri vardır. Kannabinoidler gibi endojen opioidler de profibrojenik aktiviteye sahiptir. γ interferon sitokinide stellat hücre aktivasyonu üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. PPAR γ nükleer reseptörler stellat hücrelerden eksprese olurlar ve sentetik PPAR γ ligandları stellat hücre aktivasyonunu downregüle etmektedir. Leptin aktive olmuş stellat hücreleri tarafından üretilir. Sadece lipid metabolizmasını etkilemez aynı zamanda doğrudan yara iyileşmesini de etkiler^{7,22}.

2.1.3.4.4. Skar Matriksin Parçalanmasını Artırmak

Tedavinin bu bileşeni çok önemlidir. Çünkü insan karaciğer hastalığında antifibrotik tedavi yeni skar birikimini önlemeye ek olarak mevcut matriksin rezorpsiyonunu da kışkırtmaya ihtiyaç duymaktadır^{7,22}.

2.2. Doğal Öldürücü (Naturel Killer-NK) Hücreler ve Reseptörleri

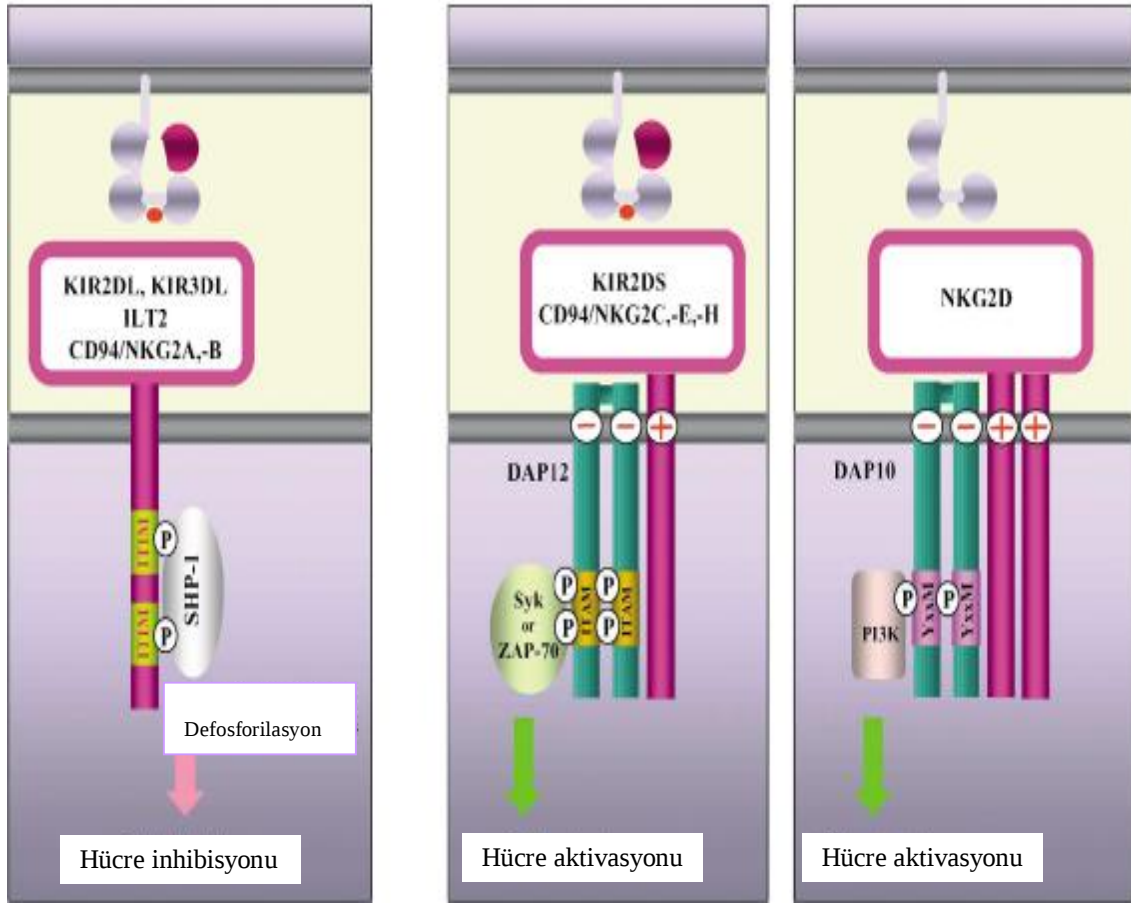
NK hücreleri transforme olmuş ya da viral olarak infekte olmuş hücrelerin yok edilmesinde çok önemli rol oynamaktadır⁸. NK hücreleri hem hücre sel sitotoksite göstererek hem de sitokin ve kemokin salgılayarak doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi arasında köprü görevi görmektedirler. NK hücreleri büyük granüllü lenfositler olup periferik kan hücrelerinin %5-15'ini oluşturmaktadırlar⁴⁶. NK hücre fonksiyonları MHC sınıf I moleküller aracılığı ile kontrol edilmektedir. MHC, normal hücreleri NK aracılı lizisten koruyan moleküllerdir. NK hücrelerinin etkin işlevleri hücre yüzey reseptörleri arasındaki denge ile sıkı denetim altındadır. Böyle bir amaç için NK hücreleri hem aktivatör hem de inhibitör yüzey reseptörleri tarafından kontrol edilir. Aktivatör ve inhibitör reseptörlerin farklı düzeylerde uyarılması hücrenin vereceği yanıtı direkt olarak etkilemektedir. Aktivatör reseptörlerin

uyarılması sonucu NK hücreleri proinflamatuvar sitokin ve kemokinler salgılayıp, sitotoksitelerini artırırken, inhibitör reseptörlerin uyarılması ise hücresel yanıtı baskılayıcı yönde etkilemektedir⁴⁷.

İnsanlarda, MHC sınıf I moleküllerinin reseptörleri için kodlanan 3 farklı gen ailesi tanımlanmıştır. İlk gen ailesi; immunglobulin süper ailesine (Ig) ait olan tip I transmembran moleküllerini içermektedir ve öldürücü hücre Ig-benzeri reseptör (KIR) olarak adlandırılmaktadır. İkinci grup immunglobulin benzeri transkript (ILT) olarak adlandırılan, Ig süper ailesine ait reseptör grubudur. Aynı zamanda lökosit Ig-benzeri reseptör (LIRs) ve makrofaj benzeri reseptör (MIRs) olarak da isimlendirilirler. Başlıca B,T ve myeloid hücreler üzerinden eksprese olurlar fakat bu grubun bazı üyeleri NK hücreler üzerinden de eksprese olurlar. Üçüncü grup ise C-tipi lektin ailesinin üyeleridir. Bu aile üyelerinin çoğu NKG2 ailesinin bir üyesiyle bağlantılı olarak CD94 ile heterodimer olarak eksprese edilir⁴⁷(Şekil 5).

İNHİBİTÖR RESEPTÖRLER

AKTİVE EDİCİ RESEPTÖRLER



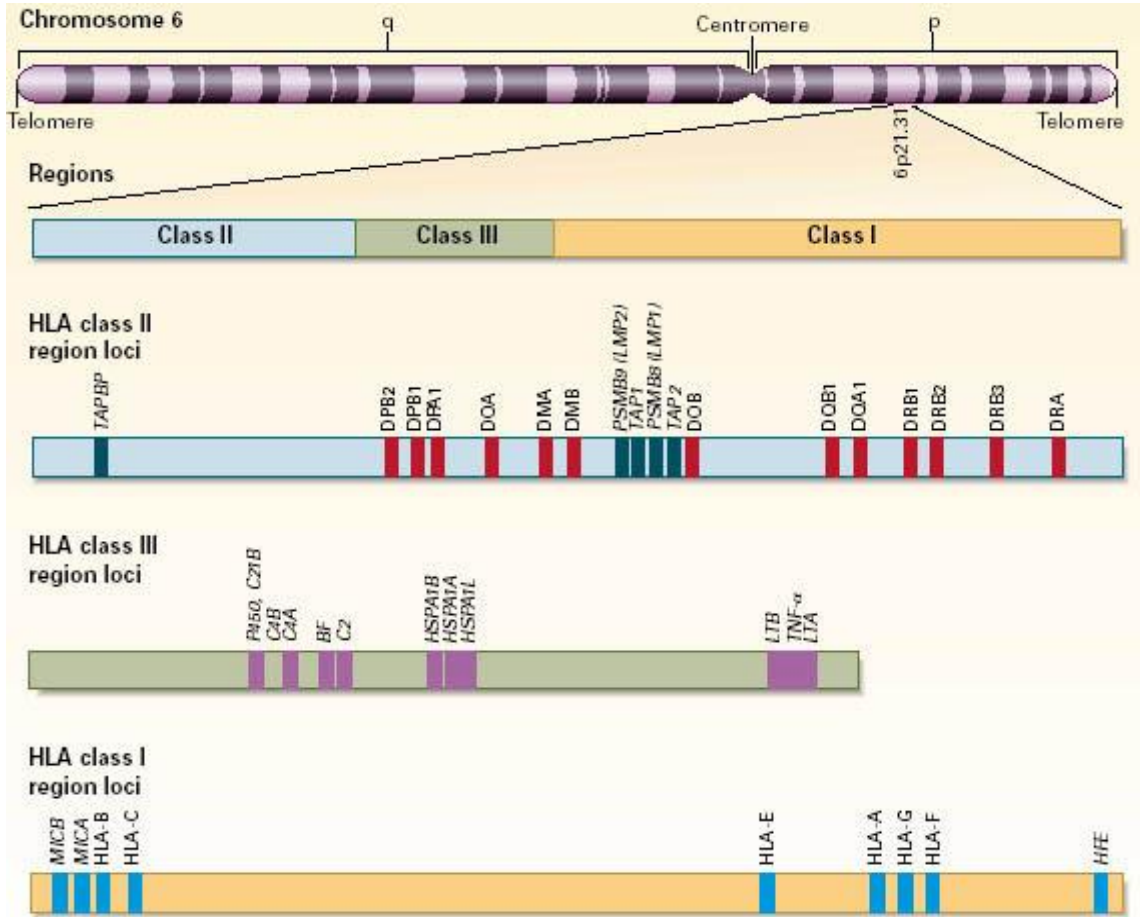
Şekil 5. NK hücre reseptörleri.

2.2.1. Majör Doku Uyum (MHC) Kompleksinin Genomik Yapısı

Majör doku uyum kompleksi (Major Histocompatibility Complex-MHC) tüm omurgalıların genomunda yer alan, bağışıklıkta ve doku uygunluğunda rol oynayan bir gen bölgesidir⁴⁸. İnsanda MHC, insan lökosit antijenleri (Human Leucocyte Antigen-HLA) olarak da adlandırılır. HLA antijenlerinin oluşumundan sorumlu olan MHC genleri 6. kromozomun kısa kolu üzerinde, 6p21.31 bölgesinde yer alır ve yaklaşık olarak 4000 kilobaz uzunluğundadır⁴⁹. Bu bölgede bulunan genlerin çoğu oldukça polimorfiktir ve yaklaşık 300 gen içermekte olup bu genlerin % 20'si immun sistemin işleyişi ile ilgili ürünleri kodlamaktadır⁵⁰.

MHC kompleksi kendi içinde 3 sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf-I bölgesi, MHC'nin telomerik ucunda yer alıp HLA -A, -B, -C olarak da tanınan klasik transplantasyon

antijenlerini, HLA -E, -F, -G gibi klasik olmayan sınıf I antijenleri kodlayan gen lokuslarını, HLA-H, -J, -K, -L gibi psödogenleri, ayrıca MICA, MICB ve işlevleri iyi anlaşılamamış olan daha bir çok geni kodlamaktadır. Sınıf II bölgesi, sentromere yakın yerleşmiştir, HLA-DR, HLA-DQ ve HLA-DP molekülleri ile HLA-DM ve HLA-DO moleküllerinin gen lokuslarını bulundurmaktadır. Sınıf III gen bölgesi ise sınıf I ile sınıf II bölgeleri arasında bulunan doku grubu antijenlerini kodlamayan bir bölgedir⁵¹(Şekil 6).



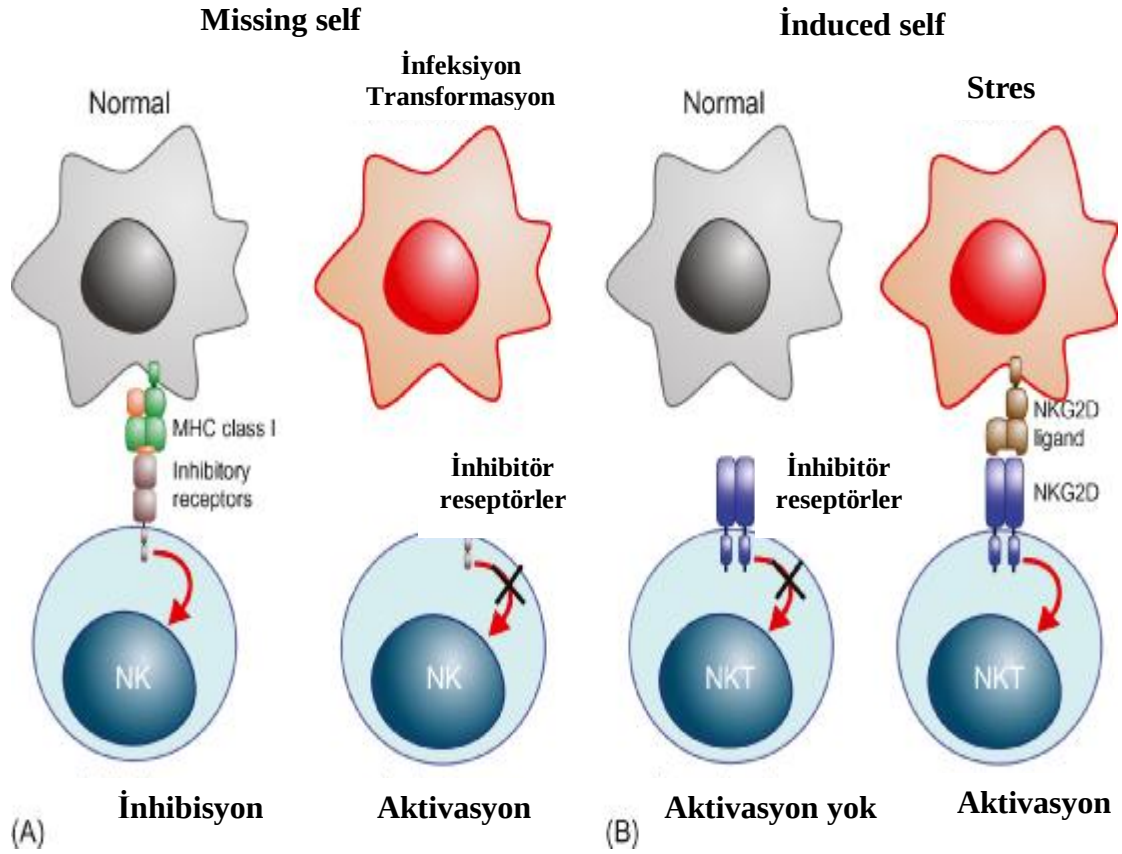
Şekil 6. MHC gen bölgesi.

2.2.2. NK Hücre Cevabının Düzenlenmesi

İnsanlarda ve farelerde çok sayıda aktivatör reseptör tanımlanmış olmasına rağmen, bu reseptörlerin birbirleriyle nasıl işbirliği yaptığı ve farklı NK hücreler üzerinde nasıl klonal düzeyde dağılım gösterdikleri tam olarak bilinmemektedir.

Yapılan deneysel çalışmalar bazı aktivatör reseptörlerin hedef hücreyi tanıması için primer reseptör olarak hareket ettiğini gstermektedir^{52,53}.

İnhibitör reseptörler MHC sınıf I moleküllerine bağlanarak, otolog hücrelerin yok etmesinden kaçarlar. Fakat transformasyonla ya da viral infeksiyonla MHC sınıf I ekspresyon kaybına uğrayan hedef hücreler, NK hücreleri tarafından lizize uğratılır^{54,55}. Sonuç olarak NK hücreleri, MHC sınıf I molekülünü etkin olmayan miktarda eksprese eden ya da bu molekülü olmayan hedef hücreleri öldürür. Bu konsepte göre Ljunggren ve Kere tarafından “missing self” (kendine ait olanı görmemezlikten gelme) hipotezi oluşturulmuştur. Böylece NK hücreleri inhibitör reseptörlerini ‘self’ ve ‘missing self’ komponentleri ayırt etmek için kullanmaktadır. Ayrıca NK hücre fonksiyonları, doğal sitotoksisite reseptörleri olarak da bilinen NKG2D, LIR ailesi ve Nkp30, Nkp44, Nkp46 proteinlerini içeren aktive edici reseptörler tarafından da düzenlenmektedir. NKG2D ligandları normal hücrelerden eksprese olmazken, çeşitli tümör hücresinden ve virüsle infekte hücreler üzerinden, hücresel cevapta upregüle olmaktadır. Bu olay ‘induced’ ya da ‘stressed self’ hipotezinden köken almaktadır. Böylece, NKG2D ligandları malignant hücre transformasyonu ya da mikrobiyal infeksiyonların neden olduğu hücresel strese indklenebilir^{56,57} (şekil 7).



Şekil 7. NK hücre cevabının düzenlenmesi. A. NK inhibitör reseptörleri otolog hücrelerinin yok etmesinden kaçmak için (self) her yerde MHC sınıf I moleküllerine bağlanırlar. Transformasyon ya da viral infeksiyon tarafından (missing self) MHC sınıf I ekspresyon kaybı NK hücreler tarafından bu hücrelerin yok edilmesine yol açmaktadır. B. NKG2D indüklenerek eksprese olan (induced ya da stressed-self) çeşitli ligandları tanımaktadır. NKG2D ligandları çoğu benign hücreler üzerinde bulunmamaktadır, fakat çeşitli tümörlerde ve virüsle infekte hücreler üzerinden upregüle olmaktadır.

NK hücrelerinin farklılaşması ve stimülasyonu, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23 ve IFN- α/β gibi makrofajların ve dentritik hücreler tarafından salgılanan farklı sitokinlerin kontrolü altındadır. Bu proinflatuar sitokinler NK hücreler üzerindeki belirteçlerin aktivasyonunu, IFN- γ ve NK hücre aracılı sitotoksitenin tetiklenmesini düzenlemektedir. IL-12, IL-15 ve IL-18 gibi bazı proinflatuar sitokinler NKG2D'nin ve onun ligandlarının bazılarının ekspresyonunu artırmaktadır^{58,59}.

2.2.3. NKG2D Reseptörü ve Ligandları

NK hücreleri çok sayıda farklı hücre yüzey reseptörleri eksprese etmektedirler (NKG2A-F). NKG2A,B,C ve E %94-95 düzeyinde aminoasit homolojisi gösterirken

NKG2D sadece %21 oranında homoloji göstermektedir. NKG2C, NKG2D ve NKG2E aktive edici özelliğe sahiptir. Bunlardan en önemlisi NK aktivasyonuna katılan önemli bir hücre yüzey reseptörü olan NKG2D (Doğal öldürücü grup 2, D üyesi-CD314)'dir. İnsan NKG2D, ilk defa 1991 yılında, NK ve birçok T hücreleri tarafından eksprese edilen bir yetim (orphan) reseptör olarak tanımlanmıştır^{47, 60}.

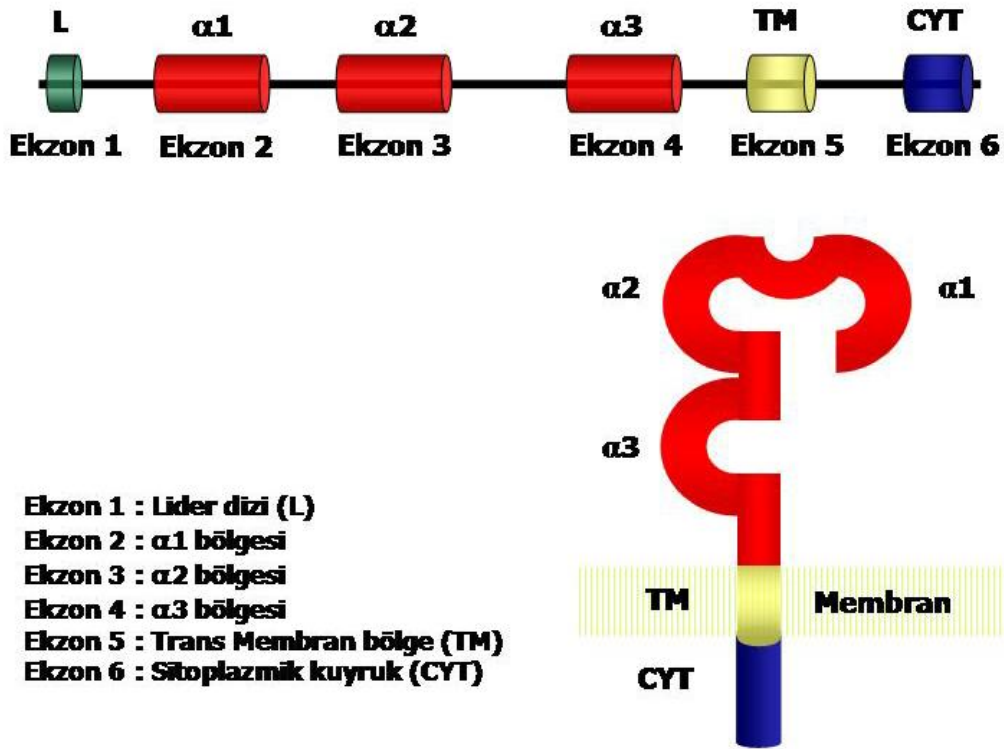
Bu reseptörün fonksiyonları ilk defa 1999 yılında, MICA/MICB ligandları ve DAP10 adaptör protein yoluyla oluşan sinyal transdüksiyonunu araştıran farklı iki grup tarafından tanımlanmıştır. Dinlenen ya da aktive olan bütün insan ve fare NK hücreleri ve $\gamma\delta$ T lenfositlerinden, dinlenen ya da aktive olan insan $\alpha\beta$ CD8⁺T lenfositlerinden, aktifleşmiş fare $\alpha\beta$ CD8⁺T lenfositlerinden homodimer olarak eksprese olmaktadır. Bu reseptör C- tipi (Ca^{+2} bağlayıcı) lektin benzeri reseptör ailesindendir ve tip II yüzey glikoproteinidir. Bu domain'in orijinal prototipi olan mannoz-bağlayan protein, aslında karbohidrat ligandı bağlamasına rağmen daha çok protein ligandlarını tanır. NKG2D hem primer reseptör hem de koreseptör olarak rol oynayabilir. Böylece hem sitotoksisiteyi, hem de IFN - γ sekresyonunu tetikler. Diğer NKG2 reseptörleriyle direk ilişkisi yoktur ve CD94 ile bağlantısı bulunmamaktadır. İnsanlarda NKG2D, spesifik sinyal kaskadının aktivasyonunu sağlayan DAP 10 adaptörüyle bağlantılıdır⁶⁰⁻⁶².

İnsanlarda, NKG2D ligandları MHC sınıf I ilgili gen A, B (MICA, MICB) ve glikozilfosfatidilinozitol (GPI)-bağlayıcı yüzey molekülü UL-16 bağlayıcı protein olarak adlandırılan ULBP'dir. Yapılan çalışmalarda 7 tane MIC geni (MICA- MICG) tanımlanmıştır. Bunlardan MICA ve MICB fonksiyonel olarak eksprese edilen genlerdir, fakat MIC C,D,E ve F pseudogenlerdir. MICA ve MICB terimi ilk olarak 1994 yılında Bahram ve arkadaşları tarafından MHC sınıf I bölgesinde kodlanan bir grup gen olarak tanımlanmıştır. MHC sınıf I genleriyle sekans olarak %28-35 oranında benzerlik göstermektedirler. MHC sınıf I proteinlerine benzer olarak $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ ekstrasellüler domain ve transmembran kuyruğa sahiptirler. Fakat $\beta 2$ - mikroglobulin ya da peptidlerle bağlantısı yoktur. MICA ve MICB ısı şok promotör dizileri taşıdıkları için stres ile indüklenirler⁶³⁻⁶⁵.

Yüksek derecede polimorfiktir. Şimdiye kadar tanımlanmış 60'a yakın MICA, 25 'e yakında MICB alleli bulunmuştur. Bu değişkenliğin önemi bilinmemektedir, fakat MICA allelleri NKG2D bağlanması için onların afinitesini değiştirebilir ve bu değişiklik NK hücreleri ve T lenfositler tarafından tanımlanmanın eşiklerini

etkileyebilir. Ayrıca, MICA onun transmembran bölgesinde üçlü tekrar kısa tandem polimorfizme sahiptir ve 6 farklı alleli rapor edilmiştir⁶⁵.

MICA zincirleri üçboyutlu yapı ve aminoasit dizileri bakımından MHC Sınıf-I proteinine benzemektedir. Bu proteinlerden farkı β 2- mikroglobulin bağlantısının olmamasıdır. İnsanlarda 11,722 nükleotid uzunluğundaki MICA geni 6. ekzon tarafından kodlanmaktadır. 1. ekzon lider peptidi, 2.3. ve 4. ekzonlar sırasıyla α 1-3 ekstrasellüler immünoglobulin (Ig) benzeri bölgeleri, 5. ekzon transmembran (TM) bölgesini, 6. ekzon hücre içi kısmı kodlamaktadır⁶⁶ (Şekil 8).



Şekil 8. MICA molekülünün yapısı.

MICA'nın ekspresyonu insan epitelial ve fibroblast hücre hattında, endotelial hücrelerin ve fibroblastların primer kültürlerinde, farklı histotiplerin tümörlerinde, timik medullada ve gastrointestinal epiteliumda gözlenmektedir. Kültüre edilmiş insan keratositlerinde de gözlenmiştir. Fakat bu ekspresyon hücre yüzeyi üzerinde gözlenmemiştir. Genel olarak malignan neotransformasyonun sonucu olarak

pek çok tümörde de gözlenmiştir. Fakat son çalışmalar neotransformasyon sırasında kritik bir basamak olan genotoksik harekete cevap olarak DNA hasar yolu tarafından MICA ve diğer NKG2D'nin ekspresyonunun indüklendiğini göstermiştir⁶⁷.

Aktivatör reseptörlerin yaygın özellikleri ITIM domain eksikliği ve adaptör proteinleriyle ilişkisi için önemli olan transmembran domainlerinde yüklü aminoasidlere sahip olmalarıdır. Bu adaptör proteinler, hücre yüzeyinde spesifik ligandlar tarafından NK hücre reseptörlerinin birleşmesiyle sinyali tetikleyen sinyal molekülleridir. Genel olarak, aktivasyon sinyalleri NK hücre içerisinde spesifik kinazların fosforilasyonunu indüklemektedir⁴⁷.

2.2.4. Karaciğer Hastalıklarında NK Hücreleri ve NKG2D Ligandları

Karaciğerde NK ve NK hücre fonksiyonu için antijen sunan hücreler önem taşımaktadır. Periferik kana kıyasla karaciğerde NK ve NKT hücreler artmaktadır⁶⁸. NK ve NKT hücreleri karaciğer yaralanması ve fibrozisin deneysel modellerin aktivitesini düzenlemektedir ve muhtemelen insan karaciğer hastalıklarında da benzer rollere sahiptir. Karaciğer hastalıklarında bu hücrelerin rolünün tanımlanması için yeni çalışmalara devam edilmesine rağmen, şimdiye kadar en iyi tanımlanmış sonuç hepatik stellat hücrelerdeki apoptozisi indükleyerek ve IFN - γ gibi antifibrotik faktörleri salgılayarak karaciğer fibrozisini inhibe etmesidir. Yani NK hücreleri fibrozisin indüksiyonu sırasında koruyucu rol oynamaktadır. Jeong ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada HSH'ler üzerinde NK hücrelerin inhibitör etkisinin STAT1 aracılığıyla olduğu gözlenmiştir. Bu etkinin TGF- β /Smad 3 sinyal yolunun aktivasyonu ve Smad7'nin inhibisyonuyla sağlandığı bulunmuştur^{68,69}.

Tümör büyümesinin kontrolünde çok sayıda faktör rol oynamasına karşın en etkili rol immün sisteminin kritik rolüdür. Sitotoksik hücrelerin, özellikle NK hücrelerin ve proinflamatuvar sitokinlerin tümöre karşı immunitede katkısı büyüktür. Son on yılda NK hücrelerin sitotoksik özellik sergilediği ve duyarlı hedef tümör hücreleriyle temas halinde IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-13, IL-10 ve GM-CSF gibi proinflamatuvar sitokinleri salgıladığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bunlara ek olarak son zamanlarda NK hücrelerinin farelerde ve insanlarda kazanılmış immün cevapta da rolü olduğu gösterilmiştir. Birçok tümörün NK hücre saldırısından korunabilmek için NKG2D aracılıklı sinyal iletim yolunu etkisiz bıraktığı gösterilmiştir. MHC molekülleri, hücre

yüzey belirteçleri olarak aktivasyon göstererek infekte hücrelerin sitotoksik ve yardımcı T hücrelerine sinyal iletimini sağlarlar. NK hücrelerinin MICA eksprese eden tümörler ile uzun süre maruz kalmaları sonucu NKG2D reseptör kompleksinin işlevsel olarak bozulduğu ve sinyal iletemeyecek duruma gelerek tümörlere yanıt geliştiremedikleri de gösterilmiştir^{67,70}. Hepatosellüler karsinomada NK hücre aktivitesinin azaldığı, sirotik hastalarda azalan NK hücre aktivitesinin hepatosellüler karsinomasının artan insidansı ve invazyonuyla bağlantılı olduğu rapor edilmiştir⁷¹.

NK hücreleri tümörün hücre büyümesini kontrol etmek için çeşitli mekanizmalar sunmaktadır. MICA ve MICB'nin ısı şok, viral ve bakteriyel enfeksiyonlarla indüklenmesi netlik kazandığı halde MICA ve MICB ekspresyonunu düzenleyen farmakolojik ajanlar hala yeterli değildir. Retinoik asidin hepatosellüler karsinomada MICA ve MICB ekspresyonunun bir modülatörü olarak fonksiyon gördüğü ve bu davranışından dolayı NK hücrelerini aktive ettiği, tümöre karşı ajan olarak hareket edebileceği gösterilmiştir. İnsan endometriyal hücrelerinde MICA'nın ekspresyonunun estradiolle düzenlendiği ve hormonal olarak da kontrol edilebileceği rapor edilmiştir⁷².

Kanserli hücrelerde MICA ve MICB'nin ekspresyonunun upregüle olmasını düzenleyen mekanizmalar hala iyi tanımlanmış değildir. Bazı onkogenler MICA ve MICB'nin ekspresyonunu upregüle edebilir. Böylece NKG2D ligandlarının düzenlenmesinde ilk kavram ısı şokun MICA ekspresyonunu indüklemesidir. MICA ve MICB moleküllerinin hücresel stresin bir sensörü olarak fonksiyon gösterdiği bilinmektedir. Doku kültürü sırasında indüklenen hücresel stres MICA ve MICB moleküllerinin ekspresyonunun artmasına yol açmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MICA ve MICB'nin soluble (çözünen) formlarının otoimmün hastalıklarda, akciğer, karaciğer, over ve kolon gibi çeşitli kanserlerde arttığı rapor edilmiştir^{67,70}. Kahraman ve arkadaşlarının nonalkolik steatohepatitis (NASH)'li hastalarda karaciğer yaralanması, apoptozis ve fibrozis üzerine MICA ve MICB moleküllerinin rolünü araştırdıkları bir çalışmada, NASH'lı hastalarda hepatik NK hücrelerinin NKG2D ve MICA/B transkriptlerinin arttığını ve NASH'lı hastalarda hastalığın gidişatıyla MICA/B proteinleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir⁷³. MICA ve MICB'nin serum düzeylerinin değiştiği Kohga ve arkadaşları tarafından transkateter arteriyel embolizasyon sırasında hepatosellüler karsinomalı hastalarda gösterilmiştir. Bu araştırmacılar kronik karaciğer hastalığının yanı sıra

hepatosellüler karsinomanın ilerlemesiyle de sMICA /sMICB düzeyinin arttığını, transkateter arteriyal embolizasyon tedavisinden sonrada sMICA /sMICB düzeyinin önemli oranda azaldığını ve NKG2D ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir ⁷⁴.

Holdenrieder ve arkadaşları çeşitli organlardan köken alan kötü huylu (malignant) hastaların yanı sıra iyi huylu (benign) hastalarda da sMICA/sMICB düzeyini incelemişlerdir. Gastrointestinal adenoma ve pulmonar infeksiyon hastalığı gibi iyi huylu hastalarda sMICA/sMICB düzeyinin orta derecede arttığını bildirmişlerdir ⁷⁵. Stresle indüklenen MICA/MICB ekspresyonu, hasarlanmış (örneğin NASH sırasında yağ infiltrasyonu tarafından), infekte olmuş ya da malignant transforme hücrelerin tanınması için iyi bir kriter olduğu düşünülmektedir ⁷³.

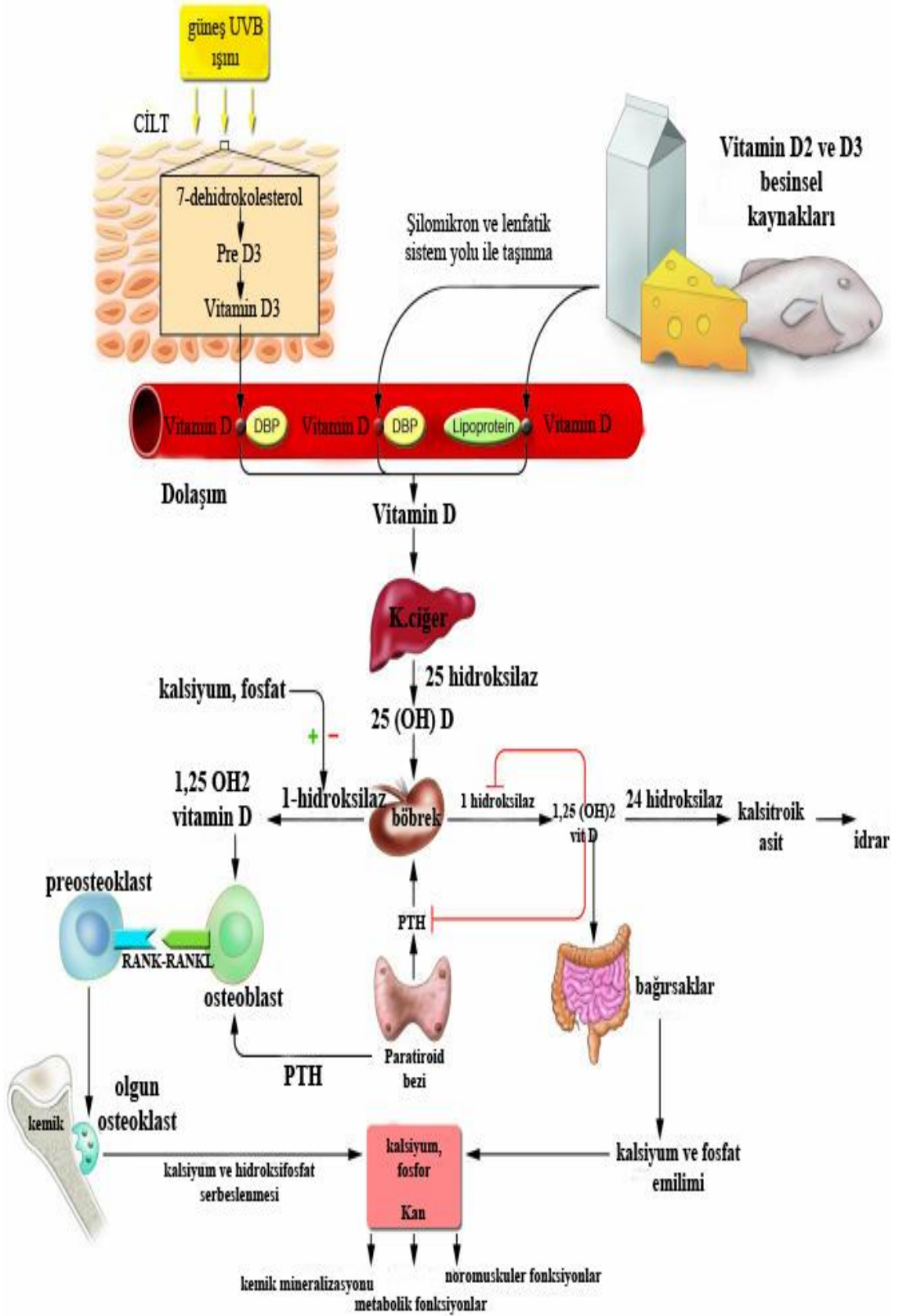
2.3. Vitamin D

Vitamin D, steroid yapısında 27 C'lu bir hormondur. İntra ve ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor regülasyonunda en etkili hormon olarak tanımlanmaktadır ve 37 metaboliti bulunmaktadır⁷⁶. Bunlardan en iyi bilinen iki formu Vitamin D₃ (kolekalsiferol-C₂₇H₄₄O) ve Vitamin D₂ (ergokalsiferol-C₂₈H₄₄O)'dir. VD₃ hayvansal, VD₂ bitkisel kaynaklıdır. VD₂ dört adet çift bağa sahip olup kaynama noktası 121°Cdir. UV absorpsiyon ve çözünübilirlik özellikleri VD₃ ile aynıdır. Isıya, ışığa ve saklama koşullarına karşı duyarlıdır ^{77,78}. VD₂ ve VD₃ vitaminleri besinlerin vitamin içeriğinin zenginleştirilmesinde kullanılan aktif vitamin D'nin öncül metabolitleridir, ayrıca VD₂ ve VD₃ arasında metabolik olarak fark yoktur. Her iki formunun da insanlarda etki potansiyeli eşittir^{79, 80}.

2.3.1. Vitamin D'nin Metabolizması

Yeterli ultraviyole ışınına (290-320nm) maruz kalan deride vitamin D'nin endojen üretimi için hormon aktive edilir. Deride bulunan provitamin D₃ (7-dehidrokolesterol)'den ultraviyole ışınları tarafından katalize edilen bir reaksiyonla previtamin D₃ (prekolekalsiferol) sentez edilir. Alternatif olarak diyetdeki vitamin D (kolekalsiferol,) proksimal ince barsaktan kana geçer⁷⁶. Vitamin D metabolizmasında daha sonra karaciğer rol oynamaktadır. 25.karbon atomunun hidroksilasyonu ile 25-hidroksikolekalsiferol (25(OH)D) oluşturulmaktadır. Bu basamak (25.C atomunun hidroksilasyonu) çok sıkı bir metabolik kontrolle gerçekleştiği için dolaşımdaki en

önemli vitamin D formudur ve vitamin D deposunun en güvenilir göstergesidir. Dolaşımdaki yarı ömrü 2-3 haftadır^{76,81}. Vitamin D metabolizmasında ikinci önemli organ böbrektir. 25(OH)D böbreklerde hidroksilasyonla (1,25 alfa hidroksilaz) vitamin D'nin en aktif şekli olan 1,25(OH)₂D'e dönüştürülür. Bu metabolit 25(OH)D' den 100-500 kez daha aktiftir. Ayrıca böbrekte 25(OH)D'den ikinci hidroksilasyonla 24,25 (OH)₂ D hidroksilaz enzimi tarafından, 24,25(OH)₂D 'de üretilmektedir. 24,25 (OH)₂ D'ün biyolojik aktiviteye sahip olmadığı tartışılmaktadır. 25(OH)D nin aktif hormon olan 1,25 (OH)₂ D'e dönüşümü düzenli olarak kontrol altındadır. 1,25(OH)₂D'nin böbrekte yapılması vücudun kalsiyum ihtiyacı ile ilişkilidir. 1,25(OH)₂D üretimi ayrıca paratiroid hormon (PTH) tarafından da kontrol edilmektedir^{76,81} (Şekil9).



Şekil 9. Vitamin D'nin kaynakları ve işlevleri.

Kanda vitamin D metabolitleri alfa globulin yapısındaki "Vitamin D-Bağlayıcı Protein" ile taşınır. Bu protein albumine benzerdir ve 25(OH)D, 1,25 (OH)₂D ile 24,25 (OH)₂D₃'ye yüksek oranda afinite gösterir. Aktif metabolit 1,25 (OH)₂D hücreye girer ve nükleer vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanır. Bu kompleks retinoid reseptörüyle bir heterodimer oluşturur ve ilgili gen üzerindeki vitamin D duyarlı elemente bağlanır. Bu olayı transkripsiyon, translasyon takip eder ve kalsiyum bağlayıcı protein veya osteokalsin gibi proteinler meydana gelir. Vücuttaki Vitamin D-Bağlayıcı Protein normalde alınan miktarın beş katını bağlayacak kadardır. Bu da vitamin D intoksikasyonuna karşı önemli bir koruyucu mekanizmadır ^{78,82}.

2.3.2. Vitamin D'nin İşlevleri

Vitaminin D biyolojik etkisini aktif metaboliti olan 1,25(OH)₂D aracılığıyla gösterir. 1,25(OH)₂D vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanır. Böbrek, ince bağırsak, paratiroid bezler, kemikte osteoblastlar, pankreasta adacık hücreleri, beyin hücreleri ve epitelde vitamin D reseptörleri bulunmaktadır ^{82,83}.

Parathormon ve kalsitoninle birlikte kalsiyum ve fosfor metabolizmasında önemli rol oynar. İnce bağırsaktan kalsiyumun aktif transportunu artırır. İnce bağırsak ve böbrekte fosfor reabsorpsiyonunu uyarır. Kemik metabolizmasında olduğu kadar kalsiyum hemostazının sağlanmasında da kritik öneme sahiptir. Yapılan çalışmalar vitamin D'nin sadece kemik mineral metabolizmasında görev almadığını ayrıca birçok metabolik süreçte görev alarak insan sağlığında önemli olduğu gösterilmiştir⁸⁴. Vitamin D'nin makrofajlar, beyin, kolon, prostat, göğüs ve diğer bazı bölgelerde de görevi vardır. Bu bölgelerdeki 200 kadar geni (Osteokalsin, osteopontin, kalbindin, 24-hidroksilaz gibi) düzenleyerek hücre büyümesini ve hücre farklılaşmasını kontrol eder. Lösemi, meme, kolon ve prostat kanser hücre hatlarının büyüme sürecini engeller, böylece bu hücrelerde malign transformasyonu azalttığı düşünülmektedir⁸⁵. Promyelositik lösemi HL60 hücre hatlarında VD₃'ün, monosit ve makrofajların diferansiyasyonunu indüklediği gösterilmiştir ^{86,87}.

Vitamin D güçlü antiproliferatif, prodiferansiyatif, proapoptotik ve immunomodülatör etki göstermektedir. Hücre siklusu, apoptoz ve farklılaşmayı içeren pek çok kompleks genlerin transkripsiyonunu düzenler. Kanda, insülin seviyesini düzenleyerek şeker metabolizmasına katkıda bulunur^{78,88}.

Yapılan çalışmalar, vitamin D'nin immun cevabın düzenlenmesinde de etkisi olduğunu göstermiştir. İmmun sistemin özellikle doğal bağışıklıktan kazanılmış bağışıklığa geçiş aşamasında rol oynamaktadır. Vitamin D₃ reseptörlerinin immun hücrelerin nerdeyse tamamında olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu hormon; fagositoz, bakteri öldürme ve kemotaksi gibi makrofaj aktivitelerini de artırır ve monosit benzeri diğer hücrelerden TGF- β üretimini arttırmaktadır. TGF- β 'nın immun hücrelerde hücre tipine, çevreye, diferansiyasyon ve aktivasyon durumuna göre inhibitör veya stimülatör etki gösterir^{89,90}. Vitamin D eksikliğinde immun sistem etkilenebilir. Vitamin D eksikliği otoimmun hastalıkların ortaya çıkma sıklıklarını artırmaktadır. Hücresel seviyede etkisi makrofaj hücreleri üzerinde görülmektedir ve makrofajlar fonksiyonlarını yerine getirememektedir. Dolayısıyla kemotaksi, fagositoz, proinflamatuvar sitokin üretimi yapılamamaktadır. Yapılan çalışmalar da vitamin D metabolitlerinin dendritik ve Th1 hücrelerinin downregülasyonuna etki etmek suretiyle makrofaj hücrelerinin antijen sunma kapasitesini artırarak diabetes mellitus (Tip1)'a karşı koruyucu özellik kazandıkları gösterilmiştir⁷⁸.

Vitamin D ve analoglarının, tek çekirdekli ve T lenfosit hücre kültürlerinde TNF- α 'nın üretimini inhibe ettiği de gösterilmiştir. Hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunu ve bu durumlarla ilişkili birçok hastalıkla (osteoartirit, diyabet, kanser, kardiovasküler hastalıklar, tuberküloz) doğrudan ilişkilidir. Ayrıca vitamin D analogları doku transplantasyonu sonrasında kullanıldığında dokunun vücut tarafından reddini engellemeye yardımcı olduğu, infeksiyonlara olan yatkınlığı azalttığı ve vücut direncini artırdığı gözlenmiştir. Bu vitaminin ileride potansiyel bir tedavi aracı olabileceği fikri yaygınlaşmıştır⁸⁷.

2.3.3. Vitamin D Preparatları

2.3.3.1. D₂ veya D₃-vitamini

Doğal vitamin D preparatları uzun süre aktivite gösterirler. Karaciğer ve böbrekte metabolize olan bu preparatların en önemli dezavantajları ise zor kontrol edilmesi, masif doz gerektirmesi, yağ dokusunda birikmesi, barbitürat veya antikonvülzanlar ile etkileşmeleridir. Ticari olarak piyasada pek çok D₂ veya D₃ vitamin preparatları bulunmaktadır⁷⁶.

2.3.3.2. Dihidrotakisterol

Karaciğerde metabolize edilir, orta dereceli aktiviteye sahiptir. En önemli dezavantajları ise zor kontrol edilmesi, yüksek doz gerektirmesi, barbitürat veya antikonvülzanlarla etkileşimleridir. Metabolizması tam olarak bilinmemektedir⁷⁶.

2.3.3.3. 25-(OH) D₃ (Kalsidiol)

Prekürsör olup uzun süre aktivite gösteren bu metabolitin en önemli dezavantajı hiperkalsemi oluşturması ve yüksek doz gerektirmesidir⁷⁶.

2.3.3.4. 1- α -(OH) D₃

Karaciğerde metabolize edilir. Kısa yarı ömrü ve tampon etkisi nedeniyle hiperkalsemi gelişince kolay kontrol edilir. En önemli dezavantajları barbitüratlar ve antikonvülzanlarla etkileşimidir⁷⁶.

2.3.4. Vitamin D Eksikliği

Vitamin D eksikliği kanser, otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, insülin direnci ve diyabet gibi çok yaygın ve ciddi patolojik durumlarla bağlantılıdır. Vitamin D eksikliğinde, infeksiyonlara ve otoimmün hastalıklara karşı yatkınlığın artmasının yanı sıra malignite insidansında da artış bulunmuştur. Vitamin D eksikliğinde, erginlerde omurga, pelvis ve alt ekstremitelerde iskelet yapısında demineralizasyon (Osteomalasi) meydana gelmektedir. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmaların sonuçlarına göre, vitamin D'nin ileride otoimmün hastalıkların tedavisinde ve transplantasyon uygulamalarında, organ reddinin önlenmesi ve graft ömrünün uzatılmasında kullanılabileceği umudu vermesidir⁹¹. Vitamin D ve demir eksikliği birlikteliği sık olarak görülmektedir⁹². Vitamin D eksikliği ile birlikte görülebilen diğer durumlar ise immün fonksiyon bozukluğu, sellüler farklılaşma ve çoğalmada gecikme ve Tip 1 diyabettir⁸². Bu durumlarda vitamin D'nin yağlı dokuda toplanarak dolaşımdaki miktarının azaldığı düşünülmektedir⁹³.

2.3.5. Karaciğer Hastalıklarında Vitamin D

Deriden ve diyetten alınan vitamin D'nin karaciğerde hidroksillenerek 25(OH)D'ye dönüşmesinden dolayı karaciğerin vitamin D metabolizmasında önemli rolü vardır⁹⁴. Vitamin D yetersizliği primer biliyer siroz gibi kolestatik karaciğer hastalıklarıyla direk ilişkilidir. Vitamin D yetersizliği kronik karaciğer hastalığında yaygındır (%92) ve bu hastaların en az üçte birinde şiddetli vitamin D yetersizliği görülür⁹⁵. Bazı çalışmalarda karaciğer hastalığının ilerlemesiyle 25(OH)D düzeyinin azaldığı da saptanmıştır. Fakat nonkolestatik kronik hepatitis ve sirozlu hastalarda normal 25(OH)D düzeyi rapor edilmiştir⁹⁶. Sirozlu hastalarda gözlenen düşük 25(OH)D düzeyi karaciğer fonksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Petta ve arkadaşları vitamin D düzeyinin azalmasının fibrozisle bağlantılı olduğunu göstermişlerdir⁹⁷⁻⁹⁹.

Vitamin D, inflamatuvar süreçlerde rol oynayan, ekstrasellüler matriksin yıkımını sağlayan, ekstrasellüler proteinazların önemli bir üyesi olan matriks metalloproteinazların (MMP) belirli tiplerini inhibe etmektedir. Vitamin D yetersizliğinde dolaşımdaki MMP'ların arttığını gösteren çalışmalar vardır¹⁰⁰.

Vitamin D'nin diğer etkisi ise fibroblastların proliferasyonunu baskılar. Bu bulgular kronik karaciğer hastalığıyla doğrudan ilişkilidir. Hepatositler MMP ve doku inhibitörlerinin major kaynağıdır ve bunların üretimi sirozun varlığından etkilenmezler. Bu yüzden, kronik karaciğer hastalığında vitamin D yetersizliği hepatik fibrozisin ilerlemesine neden olur. Ayrıca MMP'ların inhibisyonunun hepatik yaralanmalardan korumayı sağladığı da gösterilmiştir^{101,102}. 1,25(OH)₂D kanserlerde önemli bir rol oynamaktadır. 1,25(OH)₂D'nin azalan serum düzeyi göğüs, prostat ve kolon kanser riskiyle bağlantılı olduğu ve çeşitli kanser hücre hatlarında proliferasyonu düzenlediği de gözlenmiştir. Akhter ve arkadaşları 1,25(OH)₂D'nin hepatoblastoma hücre hattı HepG2'nin proliferasyonunu inhibe ettiğini, Brelvi ve arkadaşları hepatoma hücre hatlarının büyümesini baskıladığını göstermişlerdir^{102,103}. Pourgholari ve arkadaşları da 1,25(OH)₂D'nin çok sayıda sıçan ve insan karaciğer hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir¹⁰⁴.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

Spektrofotometre	Eppendorf
Spektrofotometre küvetleri	Eppendorf
Santrifüj	Eppendorf
Buzdolabı	Bosch
İnkübatör	CO2-Auto-Zero Heraeus
Su ısıtıcı	GFL
Vorteks	RS2
Kabin	Nuaire-Biological Safety Cabinets-Class II
Doku kültür flaskları	Greiner Bio-one
Pipet ucu	Eppendorf
Şırınga	Terumo
Şırınga ucu	BO Microlance TM3
Real Time PCR cihazı	iCycler
96'lık PCR plakları	Nerbeplus
Mikroskop	Nikon TMS

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

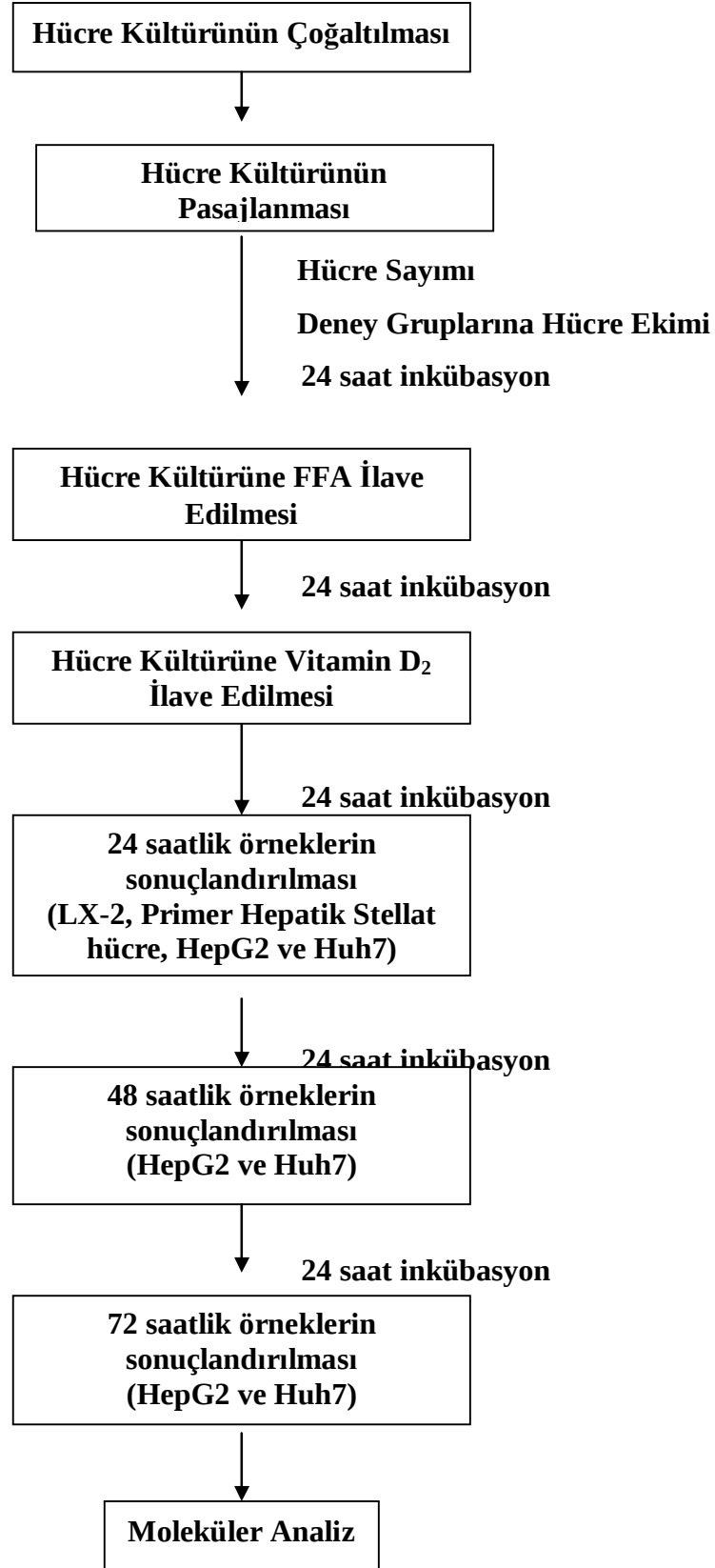
Penisilin	PAA
Streptomisin	PAA
L-Glutamin	PAA
RNA izolasyon kiti	Qiagen
SYBR Green master mix	Qiagen
Saf etanol	Sigma
Tripan Mavisi (%4)	Sigma
RNase-free water(50ml)	Qiagen
RLT Lysis buffer (220ml)	Qiagen
RW1 Washbuffer (220ml)	Qiagen
RPE Washbuffer (55ml)	Qiagen
Vitamin D ₂	Biomol
Oleat	Sigma
Palmitat	Sigma
Nil kırmızısı	Sigma

3.2. Yöntemler

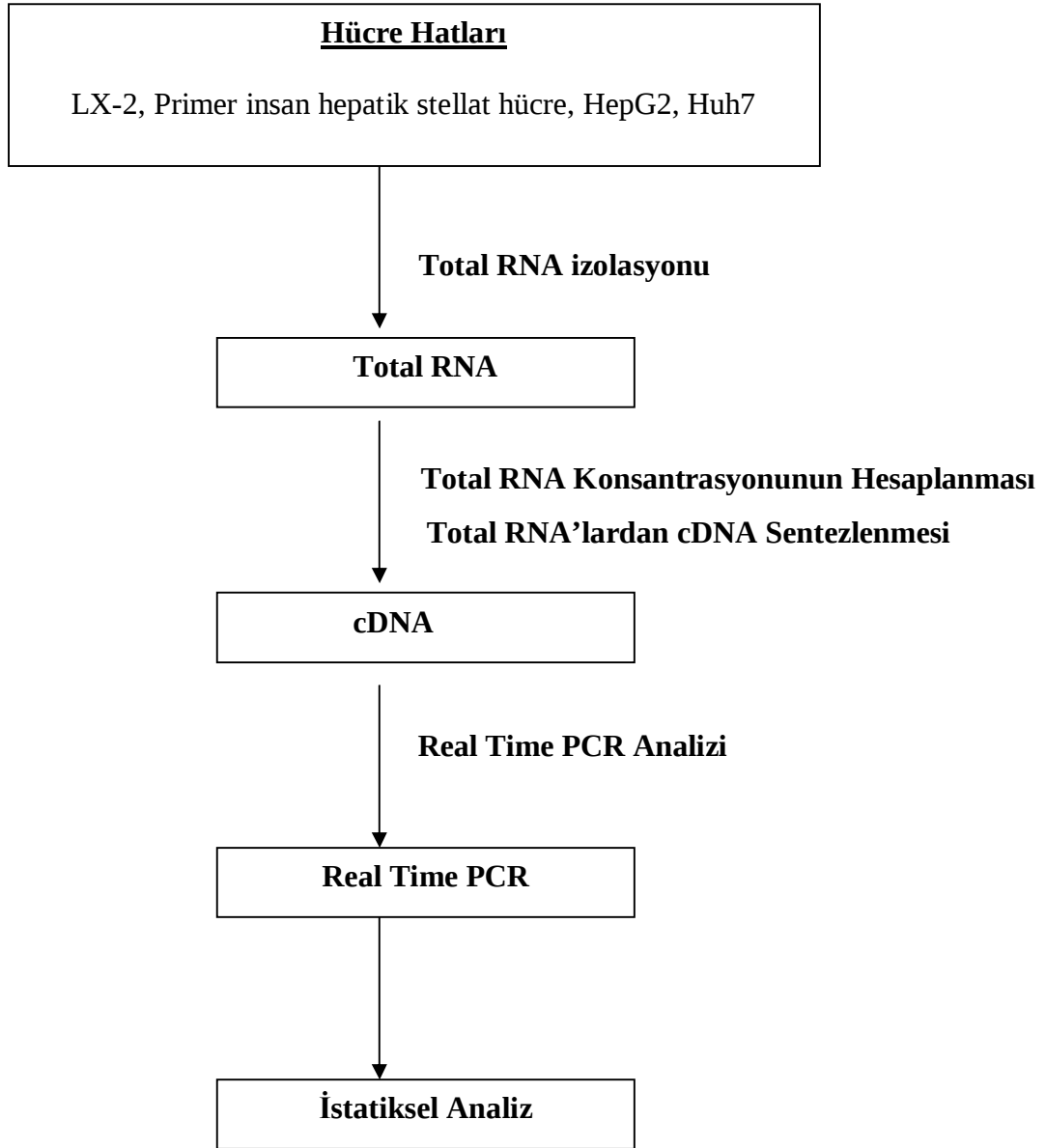
3.2.1. Örnek Analizi

Bu tez çalışmasının deneyleri Almanya Essen Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji ve Hepatoloji Anabilim Dalı Moleküler Hepatoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında hepatosellüler karsinomaya neden olan genlerin kantitatif ölçülmesi amaçlanmıştır. Kronik karaciğer hastalığında vitamin D eksikliği hepatik fibrozisin ilerlemesine yol açmaktadır. Bundan yola çıkarak bu tez çalışmasında hepatik stellat hücre hatlarında ve hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında vitamin D₂ tedavisinin stres ligand genleri olan MICA ile MICB ve profibrotik aktiviteye sahip olan α -SMA, COL1 α ve TGF- β genlerinin gen ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda karaciğer fibrozisinde rol oynayan profibrojenik ve stres ligand genlerinin gen ekspresyonları ölçülmüştür. Çalışmamız hücre kültürü ve moleküler analizler olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Deneyin hücre kültürü aşamasını, hücre hatlarının pasajlanması ve hücrelerin testler için hazırlanması (çizelge 2) moleküler analiz aşamasını da, total RNA izolasyonu, total RNA konsantrasyonunun hesaplanması, total RNA'lerden cDNA sentezlenmesi, Real Time PCR (RT-PCR) analizi ve istatistiksel analiz (çizelge 3) oluşturmaktadır.

Çizelge 2. Hücre kültürü çalışma basamakları.



Çizelge 3. Moleküler analiz çalışma basamakları.



3.2.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda hepatik stellat hücre hattı olarak LX-2 ile primer insan hepatik stellat hücre hattı ve insan karaciğer hepatosellüler karsinoma hücre hatları olarak da HepG2 ile Huh7 hücre hattı kullanılmıştır. Tez sırasında kullanılan farklı özelliklerdeki hücre hatları The Mount Sinai Üniversitesinden Prof.Dr. Scott Friedman tarafından

hediye edilmiştir. RT-PCR gen ekspresyon analizi için hücreler en az beş kez, üçlü olarak pasajlanmıştır.

3.2.2.1. Prensip

Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla alınarak proteolitik enzimlerle muamele edilip küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına ve bunların bir besiyeri ortamında cam veya plastik şişelerde doku ile bağlantısı olmadan in vitro olarak çoğaltılmasına hücre kültürü adı verilmektedir. Besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini devam ettirebilmeleri için gerekli şartları sağlayan besleyici solüsyonlardır. Hücre kültürü besiyerleri içerdikleri aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH, sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Dulbecco's Modified Eagle Solusyonu (DMEM); Hücrelerin beslenebilmeleri için glukoz, canlılıklarını devam ettirebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a işlevlerini yapabilmeleri için de aminoasitlere ve vitaminlere ihtiyaçları vardır¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Fetal Bovin Serum (FBS); Hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan zengin bir protein çözeltisidir. Bu protein karışımında hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücreler arası matriks proteinleri bulunur. Hücre türüne ve uygulamalara göre besiyerindeki serum oranı değişebilmektedir¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

L-Glutamin-Penisilin-Streptomisin Solüsyonu; Kontaminasyonları önlemek için antibiyotikler kullanılır¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (fosfat tamponlu tuz-DPBS); Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solusyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su hücre metabolizmasını destekler. Kültür ortamındaki hücresel atıkların ve serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla, divalent katyonları ($\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$) içermeyen fosfat tampon solüsyonu-PBS (pH=7.0) kullanılır^{105,106,107}.

Tripsin-EDTA Solüsyonu; Tripsin, hücre pasajlamalarında kullanılan serin proteaz tipi bir enzimdir. Lizin ve arjinin aminoasitlerinin yaptığı bağları yıkar. Sıcaklık arttıkça etkisi de artmaktadır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre konulduklarında yüzeyden daha hızlı ayrışır. Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi de önemlidir. Tripsin, hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre

membranlarına zarar vermeye başlar. Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar %10 FBS'lu besiyeri uygulanır. Daha sonra hücreler pipetlenerek birbirlerinden ayrılırlar¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Hücre Pasajlama; Hücreler pasajlanabilmeleri için hücre kültür petrilerinin yüzeyini tamamen kaplamış olmalıdır. Böyle petrilere 'konfluent petrilere' denir. Konfluent petrilerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreleri temizlemek için FBS ile yıkanır daha sonra aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılır. Hücre pasajlama işlemi, flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücrelere zarar verilmeden yüzeyden tripsin yardımıyla kaldırılıp sıvı içinde süspanse edilerek başka ortamlara aktarma prensibine dayanır. Aktarılan ortam %5 CO₂'li etüvde 37⁰ C'de hücre tabakası olana kadar inkübe edilir. Standardizasyon açısından her pasajlama işleminde hücre sayımı ve hücre canlılığı kontrol edilir. En kolay yöntem boya alma ölçümüdür. Hücreler tripan mavisi ile muamele edilerek, bir hemositometrede mikroskop altında incelenir. Mekanik olarak tahrip olmuş veya metabolik olarak inaktif hücreler mavi görünmektedir. Hücreler, çoğalıp mevcut yüzeyi doldurduklarında replikasyon durmakta ve hücreler istirahat fazına girmektedir. Eğer böyle hücreler yeniden süspanse edilip (tripsinizasyon ile) dilüe edilirlse, yeniden büyümeye başlar ve bir günlük yavaşlama periyodunu takiben, yaklaşık 24 saatlik bir sürede hücre sayısı iki katına çıkar¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

3.2.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Hatları

LX-2 hücre hattı için besiyeri hazırlanırken kullanılan solusyonlar ve miktarları çizelge 4'de, HepG2, Huh 7 ve primer hepatik stellat hücre hatlarının besiyeri hazırlanırken de kullanılan solusyonlar ve miktarları çizelge 5'de gösterilmiştir. Hücre hatları % 5 CO₂'li gaz ortamında, 37⁰C'de 75 cm²'lik flasklarda hücre kültürü inkübatöründe kültüre edilmiştir¹⁰⁸.

Çizelge 4. LX-2 hücre hattı için kullanılan gelişme besiyeri.

Solusyonlar	%	
DMEM besiyeri		500 ml
Fetal bovin serum (FBS) 56°C’de 30 dakika ısıyla inaktive edilmiş	% 1	5 ml
L-Glutamin	%1	5 ml
Penisilin / Streptomisin	Son konsantrasyon 100 U/ml	5 ml

Çizelge 5. HepG2, Huh 7 ve Primer hepatik stellat hücre hatları için kullanılan gelişme besiyeri.

Solusyonlar	%	
DMEM besiyeri		500 ml
Fetal Bovin Serum (FBS) 56°C’de 30 dakika ısıyla inaktive edilmiş	% 10	50 ml
L-Glutamin	%1	5 ml
Penisilin/ Streptomisin	Son konsantrasyon 100 U/ml	5 ml

3.2.2.2.1. Yöntem

1. DMEM solüsyonu içerisine çizelge 4 ve 5’de gösterilen miktarda FBS, L-Glutamin ve penisilin/streptomisin eklenir.
2. Pipetle birkaç kez çekilip bırakılarak ortamın homojen olması sağlanır.
3. Şişe +4⁰ C’de saklanır.

3.2.2.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması

3.2.2.3.1. Ayıraçlar

1. % 70’lik etanol
2. DPBS
3. Tripsin- EDTA
4. Tripan mavisi

3.2.2.3.2. Yöntem

1. Deney sırasında kullanılacak olan ayraçlar 30 dakika öncesinden 37 C⁰'ye ayarlanmış olan su banyosuna konulup 37 C⁰'ye gelmeleri sağlanmıştır.
2. Laminer kabinet çalıştırıldıktan sonra % 70'lik etanolle temizlenmiştir.
3. Mikroskopta hücrelerin %70 yoğunluğa ulaştığı zaman kontrol edilerek kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
4. Kültür kaplarına 5 ml DPBS eklenip hafifçe karıştırıldıktan sonra besiyeri yeniden aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
5. Kültür kaplarına 2 ml Tripsin-EDTA solusyonundan eklenip,2 dakika bekletilmiştir.
6. Süre bitiminde hücrelerin tutundukları kültür kabının yüzeyinden ayrılması mikroskop altında gerçekleştirilmiştir.
7. Tripsinle hidroliz edilen hücre ortamına 8 ml besiyeri eklenerek, 4-5 defa pipetlenerek hücreler ayrıştırılmıştır.
8. Kültür kabındaki hücreler falkon tüplerine aktarılıp 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrası süpernatant kısım dökülüp içerisine 2 ml besiyeri eklenerek mikroskopta hücreler sayılmıştır.
10. Hücrelerin sayılması için 10 µl besiyeri ortamı 90 µl Tripan boyasıyla karıştırılarak mikroskop altında sayım yapılmıştır.
11. Hemositometredeki dört karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra çıkan sayı Dilüsyon katsayısı x 10⁴ ile çarpılıp 1 ml deki hücre sayısı (hücre/ml) 1x10⁵ hücre/1ml olacak şekilde ayarlanmıştır.
12. Bu işlemin sonucunda çoğaltılma işlemi için hücre yeni kültür kaplarına alınmıştır.
13. Deney sırasında 6 kuyucuklu hücre kültür kabının herbir kuyucuğuna 1x10⁵ sayıda hücre olacak şekilde süspansiyon karışımından 1,5 ml aktarılmıştır.
14. Hücrelerin yüzeye tutunması ve yeni ortama alışması için 37C⁰'de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.2.4. Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması

3.2.2.4.1. Ayıraçlar

1. Saf etanol
2. Vitamin D₂ (VD₂)
3. Serbest yağ asidi (FFA) 2:1 oleat:palmitat
4. DPBS

3.2.2.4.2. Vitamin D Dozunun Ayarlanması

İki falkon tüpü hazırlanmıştır. 1.Tüpe: Besiyeri + Etanol eklenmiştir. 2.Tüpe: Besiyeri +10⁻⁶M konsantrasyonunda VD₂ eklenmiştir. VD₂ saf etanolde çözülmüştür.

3.2.2.4.3. Serbest Yağ Asidi Dozunun Ayarlanması

İki falkon tüpü hazırlanmıştır. 1. Tüpe: Besiyeri eklenmiştir. 2. Tüpe: Konsantrasyonu 100 mM stok yağ asidinden son konsantrasyon 0,25 mM, 0,5 mM ve 1 mM olacak şekilde eklenmiştir.

3.2.2.4.4. Yöntem

1. Çalışmada kontrol, VD₂, FFA, ve kombinasyon grubu (VD₂+ FFA) olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur.
2. 24 saat inkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri aspiye edilerek uzaklaştırılmıştır.
3. Kontrol ve VD₂ içeren kuyucuklara 1.5 ml besiyerinden, FFA ve VD₂+ FFA için kuyucuklara da 1.5 ml FFA+ besiyeri karışımından eklenmiştir. Bütün tüpler 37C⁰'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
4. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri aspiye edilerek uzaklaştırılmıştır.
5. Kontrol ve FFA içeren kuyucuklara 2 ml etanol+besiyeri karışımından eklenmiş, VD₂ ve FFA+VD₂ yazan kuyucuklara 2 ml VD₂+ besiyeri karışımından eklenmiştir. Bütün tüpler 37C⁰'de 24,48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.
6. 24,48 ve 72 saat inkübe edilen hücrelerin üzerindeki besiyeri aspiye edilerek uzaklaştırılmıştır.

7. 1 ml DPBS eklenip ortam yeniden aspiye edilmiştir.

8. 600 µl lizis tamponu eklenip, hücreler kazındıktan sonra şırıngayla 2-3 defa karıştırılıp ependorf tüplerine aktarılmıştır.

3.2.2.5. Nil Kırmızısı Boyama

3.2.2.5.1. Prensip

Nil kırmızısı (9-diethylamino-5H-benzo(alpha) phenoxazine-5 one) boyama, floresans mikroskobu tarafından intrasellüler lipid damlacıklarının tespiti için uygulanan canlı bir boyama tekniğidir.

3.2.2.5.2. Yöntem

1. Kültüre edilen LX-2 ve primer hepatik stellat hücreleri 10 dakika boyunca soğuk metanol-aseton dilüsyonuyla fikse edilmiştir.

2. PBS solusyonu ile 3 kez yıkanmıştır.

3. Fikse edilen hücreler 1 saat boyunca 20 µg/ml nil kırmızısı ve PBS içerisinde inkübe edilmiştir.

4. Zıt boyama DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) ile gerçekleştirilmiştir.

5. Axiovert 40 LSM mikroskobunda lipid damlacıkları saptanan hücrelerin fotoğrafı çekilmiştir¹⁰⁹.

3.2.3. Hücre Hatlarından Profibrogenik Genlerin (Col-1α, α-SMA, TGF-β,) ve Stres Ligand Genlerin (MICA, MICB) Gen Ekspresyonlarının RNA Düzeyinde Belirlenmesi

3.2.3.1. Total RNA İzolasyonu

LX-2, Primer hepatik stellat hücre, HepG2 ve Huh7 hücre hatlarından total RNA izolasyonu, Qiagen RNeasy mini kit protokolü uygulanarak yapılmıştır¹¹⁰.

3.2.3.1.1. Yöntem

1. Örnekler vortekslenerek üzerine 600 µl % 70'lik etanol ilave edilmiştir.
2. Eppendorf tüpü içerisindeki karışımın 650 µl'si RNeasy spin kolonuna aktararak 30 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
3. Toplama tüpündeki kalan süzüntü dökülmüştür.
4. Eppendorf tüpü içerisindeki karışımın geri kalanı tekrar RNeasy spin kolonuna aktararak 30 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Toplama tüpündeki süzüntü dökülmüştür.
6. Kolonlara 700 µl Buffer RW1 eklenerek 30 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
7. Toplama tüpündeki süzüntü dökülmüştür.
8. Kolonlara 500 µl Buffer RPE eklenerek 30 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
9. Aynı işlem tekrarlanarak 30 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
10. Toplama tüpü değiştirilerek 1dk 13.200 rpm'de santrifüj edilmiştir.
11. Kolonlar yeni eppendorf tüpleri içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 50 µl RNase Free Water eklenerek 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

3.2.3.2. Total RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA konsantrasyonu ve saflığı 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. RNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek için izole edilen her bir RNA örneğinden 4 µl, H₂O'dan 96 µl alınarak 1:24 oranında dilusyon yapılmıştır. Bu dilusyonun 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik absorpsiyonları ölçülmüştür. Ölçüm sonrasında RNase free water eklenerek son konsantrasyonu 0,125 µg/µl olacak şekilde ayarlanmıştır. RNA miktarlarının belirlenmesi için 260nm'deki absorpsiyon değeri, kontamine protein miktarının belirlenmesi için de 280nm'deki absorpsiyon değeri kullanılmıştır. Saf RNA eldesi için OD260/OD280 değerinin 1,8-2,0 arasında olması sağlanmıştır¹¹¹.

3.2.3.3. Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi

Hücre hatlarından izole edilen total RNA'lar QuantiTect Reverse Transcription Kit kullanılarak, üretici firmanın önerdiği biçimde cDNA'ya çevrilmiştir¹¹².

3.2.3.3.1. Yöntem

1. 8 µl RNA, 2 µl gDNA Wipeout ve 4 µl dH₂O toplam hacim 12 µl olacak şekilde bir ependorf tüpüne konulmuştur.

2. 30 sn'ye 10.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra 42⁰ C'de 3 dk boyunca termal döngü içerisinde inkübe edilmiştir.

3. Her bir örnek için 1 µl primer mix, 1 µl RT ve 4 µl RT tamponu eklenmiştir.

4. 30 sn'ye 10.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra 42⁰ C'de 20 dk, 96⁰C'de 3 dk boyunca termal döngü içerisinde inkübe edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

5. Elde edilen cDNA'ların üzerine 30 µl RNaz Free water'dan konularak daha sonra kullanılmak üzere -80°C 'de saklanmıştır.

3.2.3.4. Real Time PCR (RT-PCR) Analizi

Hücre hatlarından elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak Col-1α, α-SMA, TGF-β, MICA ve MICB genlerinin ekspresyon profilleri RT-PCR ile analiz edilmiştir. RT-PCR Quantitect SYBR Green sistemi kullanılarak yapılmıştır¹¹³.

3.2.3.4.1. Prensip

Kantitatif Real-Time PCR (gerçek zamanlı) teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan, uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren ve hassasiyeti yüksek olan bir uygulamadır. RT-PCR, amplifikasyon sonuçlarına ulaşmak için harcanan zaman amplifikasyon ve analizle birlikte yapıldığı için daha kısadır. Diğer kantitatif metodlara oranla verim daha iyidir. Sistemin özellikleri tek bir reaksiyondan elde edilen bilgi miktarını en üst düzeye çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Temel olarak amplifikasyonun ürünlerini aynı zamanda sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek ve devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek reaksiyonun gidişini ölçmeye dayanmaktadır. Bu amaçla, floresans veren bazı boya ya da probalar ile oluşan floresansı saptayabilen ısıdöngü aygıtları (thermal cyclers) kullanılır. Boyalar arasında en sık kullanılanı çift iplikli DNA'ya bağlanan SYBR Green I'dir. Reaksiyon sırasında hedef

nükleik asit dizilerinin sayısı arttıkça, oluşan çift iplikli DNA moleküllerine giderek daha fazla sayıda SYBR Green I molekülü bağlanır ve daha fazla floresans oluşur. Oluşan floresans eş zamanlı olarak okunur. DNA'nın ayrılması sırasında bağlanmamış SYBR green düşük miktarda floresans verecektir^{114, 115}.

Real-Time PCR tekniği kolaylıkla otomatize edilebilmekte ve PCR sonrası işlemleri ortadan kaldırmaktadır. Melting curve analizine dayalı hibridizasyon problemleri, hidroliz problemleri ve Molecular Beacons gibi farklı formatlar uygulanabilmektedir. Real-Time PCR ile tek nükleotid polimorfizminin saptanması, gen ekspresyonunun miktarını belirleme, DNA hasarı (mikrosatellit instabilitesi), anne kanından izole edilen tek hücrede prenatal tanı, hemoglobinopatilerin prenatal tanısında, farmakogenetikte, klinik mikrobiyolojide ve ilaç geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda dizileme, tek iplik konformasyon polimorfizmi ve restriksiyon enzim kesimleri gibi tekniklerinde yerini almıştır^{114, 115}.

Real-Time PCR'ın avantajları ise; entegre bir sistemde amplifikasyon ve analiz, sabit reaksiyon monitörizasyonuna olanak veren floresan boyalar ve problemler, hızlı siklus süresi (35 siklus için 20-40 dakika), yüksek örnek verimliliği, kapalı reaksiyon ortamlarına bağlı olarak düşük kontaminasyon riski, sonuçların kantitatif analizine olanak vermek ve yazılım sistemine sahip olmasıdır^{114,115}.

3.2.3.4.2. Primer Tasarımı

Kontrol olarak Hipoksantin Fosforibozil Transferaz (HPRT) geni kullanılmıştır. Col-1 α , α -SMA, TGF- β , MICA ve MICB'nin, mRNA düzeylerini saptamak için gerekli primerlerin tasarımı için web ortamında bulunan OMIM, ENTREZ, GeneBank, BLAST algorithms ve Primer3 programları kullanılmıştır¹¹⁶(Çizelge 6).

qRT-PCR bilgileri kaydedilip iCycler iQ Optical System Software 3.0a ve daha sonra Gene Expression Analysis for iCycler iQ v1.10 Excel Macros programı (BioRad) ile analiz edilmiştir.

Çizelge 6. Hedef genlere ait primer dizileri.

HPRT	İleri:5'-GAC-CAG-TCA-ACA-GGG-GAC-AT-3'	Geri:5'-CTT-GCG-ACC-TTG-ACC-ATC-TT-3'
MICA	İleri:5'-GTA-TTG-GGA-CCG-GAA-CAC-AC-3'	Geri:5'-ATG-CTC-TGG-AGG-GTG-TGA-GA-3'
MICB	İleri:5'-TGC-CAT-GAA-GAC-CAAGAC-AC-3'	Geri:5'-GGG-GCA-CTG-TTCTCC-TGA-T-3'
Col-1α	İleri:5'-AAC-AGC-CGC-TTC-ACC-TAC-AG-3'	Geri:5'-GGA-GGT-CTT-GGT-GGT-TTG-GT-3'
α-SMA	İleri:5'-TTC-GTT-ACT-ACT-GCT-GAG-CGT-GAG-A-3'	Geri:5'-AAG-GAT-GGC-TGG-AAC-AGG-GTC-3'
TGF-β	İleri:5'-GTA-CCT-GAA-CCC-GTG-TTG-CT-3'	Geri:5'-GAA-CCC-GTT-GAT-GTC-CAC-TT-3'

3.2.3.4.3. Amplifikasyon Koşulları

İlk zincir cDNA sentezlendikten sonra bu cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak spesifik primerler aracılığıyla PCR reaksiyon koşulları sağlanmıştır. PCR reaksiyonu BioRad 'İCycler' cihazında yapılmıştır. Real Time PCR'da kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları çizelge 7'de verilmiştir.

Çizelge 7'deki koşullarda hazırlanan örnekler, 96 kuyucuklu plakların içinde 95⁰C'de 15 dakikalık denatürasyonu takiben 95⁰C'de 30 saniye, 55⁰C'de 30 saniye ve 72⁰C'de 30 saniye olmak üzere 40 döngü olarak ayarlanmıştır¹¹¹.

Çizelge 7. Real Time PCR'da kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

Kimyasal	Konsantrasyon	Son konsantrasyon	Eklenen miktar
Primer F	100 pmol	10 pmol	1 μ l
Primer R	100 pmol	10 pmol	1 μ l
SYBR Gren			15 μ l
cDNA			2 μ l
dH ₂ O			11 μ l
Toplam hacim			30 μ l

3.2.3.4.4. Yöntem

1. 1 µl Primer F, 1 µl Primer R, 15 µl SYBR Green ve 11 µl dH₂O olmak üzere her bir örnek başına toplam 28 µl reaksiyon karışımı hazırlanıp, kuyucuklara dağıtılmıştır.
2. Hazırlanan reaksiyon karışımı üzerine 2 µl cDNA eklenmiştir.
3. Kontrol olarak değerlendirilecek kuyucuklara 2 µl dH₂O eklenmiştir.
4. Uygun PCR programı ayarlanarak deney başlatılmıştır.

3.2.3.5. İstatiksel Analiz

Tüm istatiksel hesaplamalar GraphPad- Prism (version 4.00, GraphPad Software, SanDiego, USA) programı ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki istatiksel farklar student's t testi ile değerlendirilmiş olup, $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

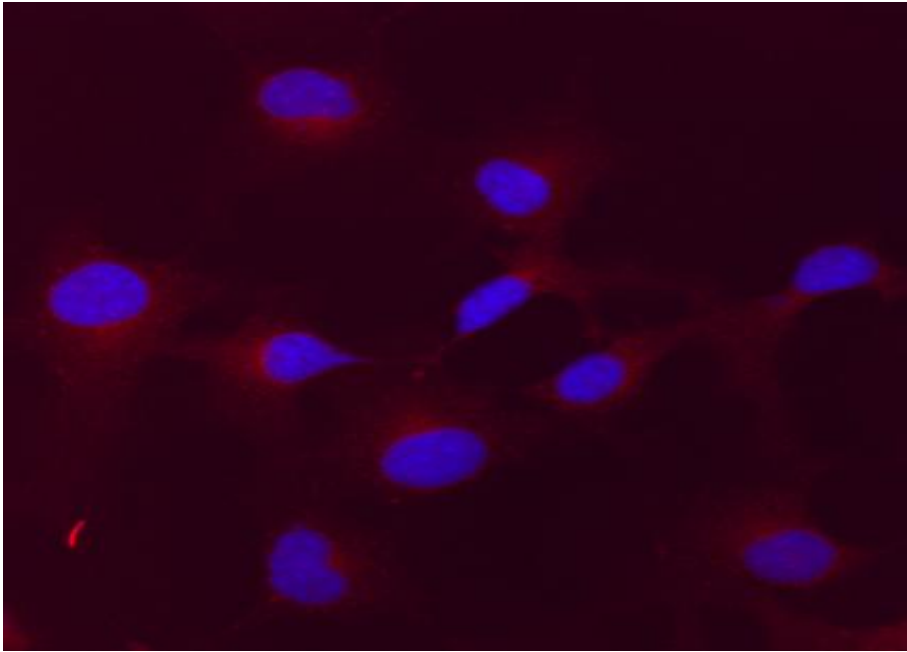
Bu tez çalışmasında LX-2, Primer insan hepatik stellat hücre, HepG2 ve Huh7 hücre dizileri 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0,25 mM, 0,5 mM ve 1mM) FFA ve vitamin D₂ (10⁻⁶ M) ile tedavi edilmiştir (Çizelge 8). Floresan mikroskobu kullanılarak nil kırmızısı (nile red) boyama ile LX-2 ve primer insan hepatik stellat hücrelere FFA girişi gösterilmiştir. Kantitatif Real Time PCR (RT-PCR) cihazı ile de profibrojenik genler olan COL1 α , α -SMA, TGF- β 'nın ve stres ligandları olan MICA ve MICB'nin ekspresyonları incelenmiştir.

Çizelge 8. Hücre hatlarından analiz edilen genler.

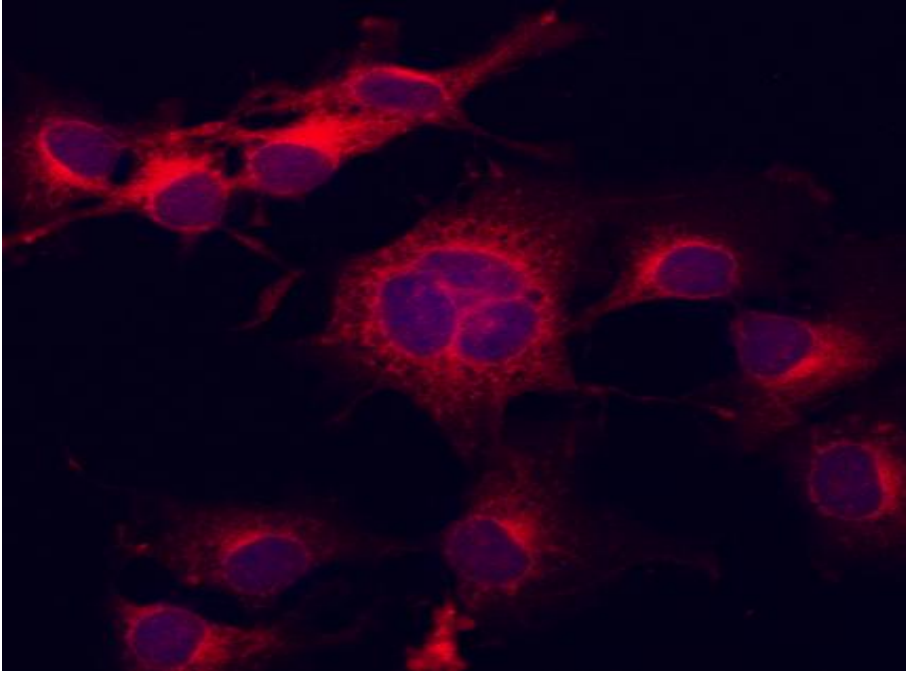
Hücre Hatları	Genler	İnkübasyon Süreleri	FFA Konsantrasyonu	Vitamin D ₂ Konsantrasyonu
LX-2	Col1- α	24 saat	0,5 mM, 1 mM	10 ⁻⁶ M
LX-2	α -SMA	24 saat	0,5 mM, 1 mM	10 ⁻⁶ M
LX-2	TGF- β	24 saat	0,5 mM, 1 mM	10 ⁻⁶ M
LX-2	MICA	24 saat	0,5 mM, 1 mM	10 ⁻⁶ M
LX-2	MICB	24 saat	0,5 mM, 1 mM	10 ⁻⁶ M
Primer İnsan Hepatik Stellat Hücreleri	MICA	24 saat	0,25 mM	10 ⁻⁶ M
Primer İnsan Hepatik Stellat Hücreleri	MICB	24 saat	0,25 mM	10 ⁻⁶ M
HepG2	MICA	24,48,72 saat	0,5 mM	10 ⁻⁶ M
HepG2	MICB	24,48,72 saat	0,5 mM	10 ⁻⁶ M
Huh 7	MICA	24,48,72 saat	0,5 mM	10 ⁻⁶ M
Huh 7	MICB	24,48,72 saat	0,5 mM	10 ⁻⁶ M

4.1. LX-2 Hücrelerine FFA Girişinin Nil Kırmızı Boyama ile Gösterilmesi

LX-2 hücreleri 0,5 mM FFA'nın yokluğunda (kontrol grubu) ve varlığında 24 saat inkübe edilmiştir. FFA girişini gözlemek için nil kırmızı ile boyanan hücreler floresan mikroskopuyla kontrol edilmiştir. Kontrol grubu hücrelerinin sitoplazmasında hiçbir lipid damlacığı tespit edilmemiştir (şekil 10). 0,5 mM FFA ile inkübe edilen hücrelerin sitoplazmasında ise güçlü lipid damlacıklarının birikimi gözlenmiştir (şekil 11).



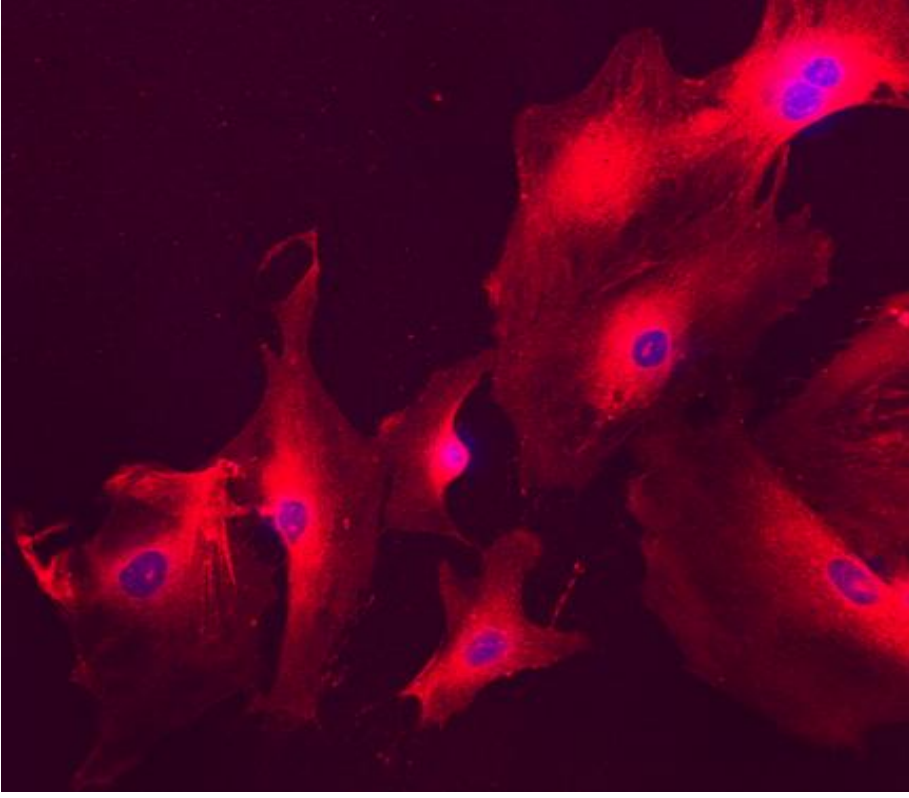
şekil 10. Kontrol grubu LX-2 hücrelerinin floresan mikroskopu görünümü.



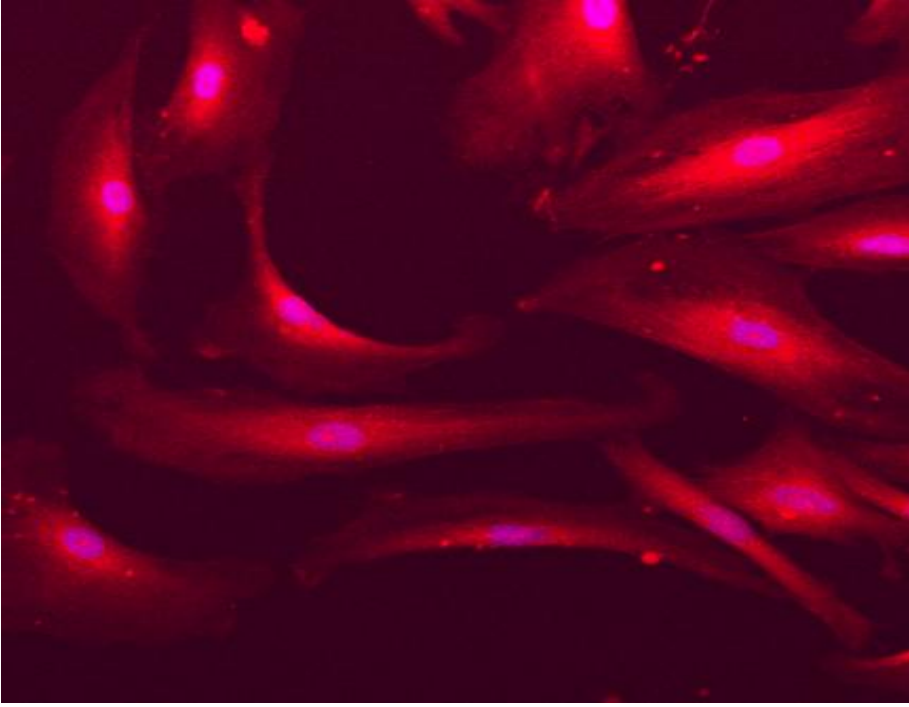
Şekil 11. LX-2 hücrelerinin 0,5 mM FFA inkübasyonundan sonra floresan mikroskobu görünümü.

4.2. Primer İnsan Hepatik Stellat Hücrelerine FFA Girişinin Nil Kırmızısı Boyama ile Gösterilmesi

Primer insan hepatik stellat hücreleri 0,25 mM FFA'nın yokluğunda (kontrol grubu) ve varlığında 24 saat inkübe edilmiştir. FFA girişini gözlemek için Nil kırmızısı ile boyanarak floresan mikroskop ile incelenmiştir. Hücrelerin stoplazmasında lipid damlacıkları gözlenmemiştir (Şekil 12 ve 13).



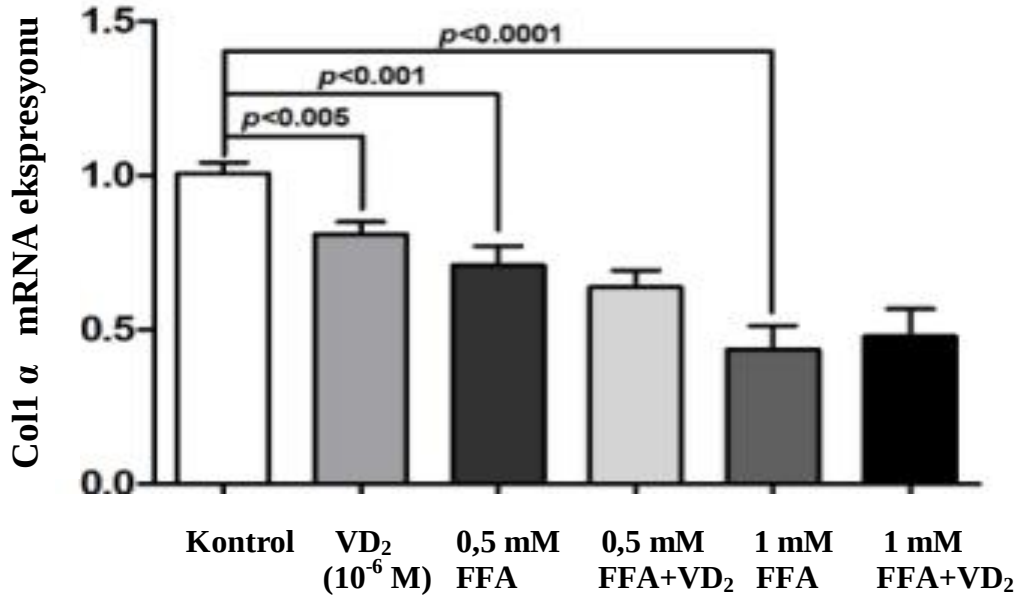
Şekil 12. Kontrol grubu primer insan hepatik stellat hücrelerinin floresan mikroskobu görünümü.



Şekil 13. Primer insan hepatik stellat hücrelerinin 0,25 mM FFA'nın inkübasyonundan sonra floresan mikroskobu görünümü.

4.3. LX-2 Hücre Hattında COL1 α 'nın Gen Ekspresyonu

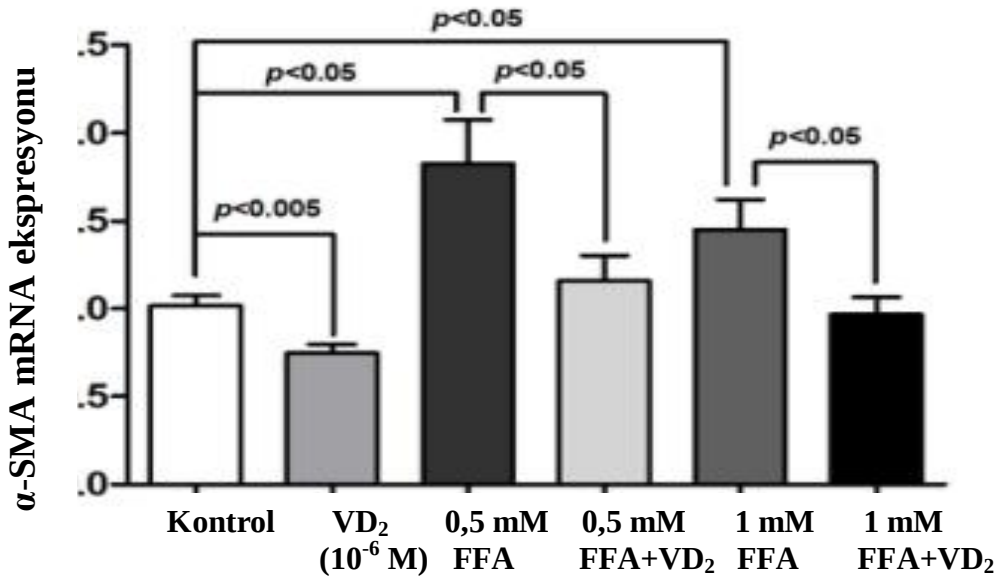
LX-2 hücre hattı VD₂ (10⁻⁶ M), 0,5 mM ve 1 mM konsantrasyonlarında FFA, 0,5 mM FFA+VD₂ ve 1 mM FFA+VD₂ kombinasyon grupları ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve COL1 α 'nın mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında COL1 α 'nın gen ekspresyonunun hem VD₂ hem de 0,5 mM ve 1 mM FFA'lı tedaviden sonra anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (sırasıyla, $p < 0.005$, $p < 0.001$, $p < 0.0001$). LX-2 hücre hattında COL1 α 'nın gen ekspresyon düzeyi şekil 14' de verilmiştir.



Şekil 14. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+VD₂ ve 1 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra COL1 α 'nın gen ekspresyon düzeyleri.

4.4. LX-2 Hücre Hattında α -SMA'nın Gen Ekspresyonu

LX-2 hücre hattı VD_2 (10^{-6} M), 0,5 mM ve 1 mM konsantrasyonlarında FFA, 0,5 mM FFA+ VD_2 ve 1 mM FFA+ VD_2 kombinasyon grupları ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve α -SMA'nın mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında VD_2 'li tedaviden sonra α -SMA'nın gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azaldığı ($p < 0.005$), 0,5 mM ve 1 mM FFA'lı tedaviden sonra anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+ VD_2 ile 1 mM FFA ve 1 mM FFA+ VD_2 'li gruplar kendi aralarında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p < 0.05$). LX-2 hücre hattında α -SMA'nın gen ekspresyon düzeyleri şekil 15'de verilmiştir.

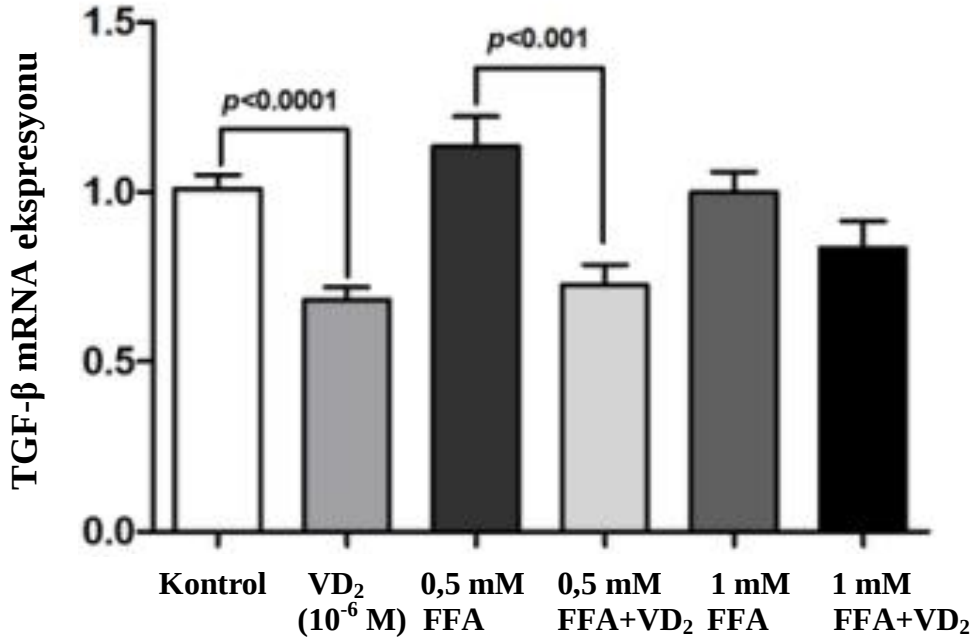


Şekil 15. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD_2 , 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+ VD_2 ve 1 mM FFA+ VD_2 'li tedaviden sonra α -SMA'nın gen ekspresyon düzeyleri.

4.5. LX2 Hücre Hattında TGF- β 'nin Gen Ekspresyonu

LX-2 hücre hattı VD_2 (10^{-6} M), 0,5 mM ve 1 mM konsantrasyonlarında FFA, 0,5 mM FFA+ VD_2 ve 1 mM FFA+ VD_2 kombinasyon grupları ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve TGF- β 'nin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında VD_2 'li tedaviden sonra TGF- β 'nin gen ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir ($p < 0.0001$). Ayrıca, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM

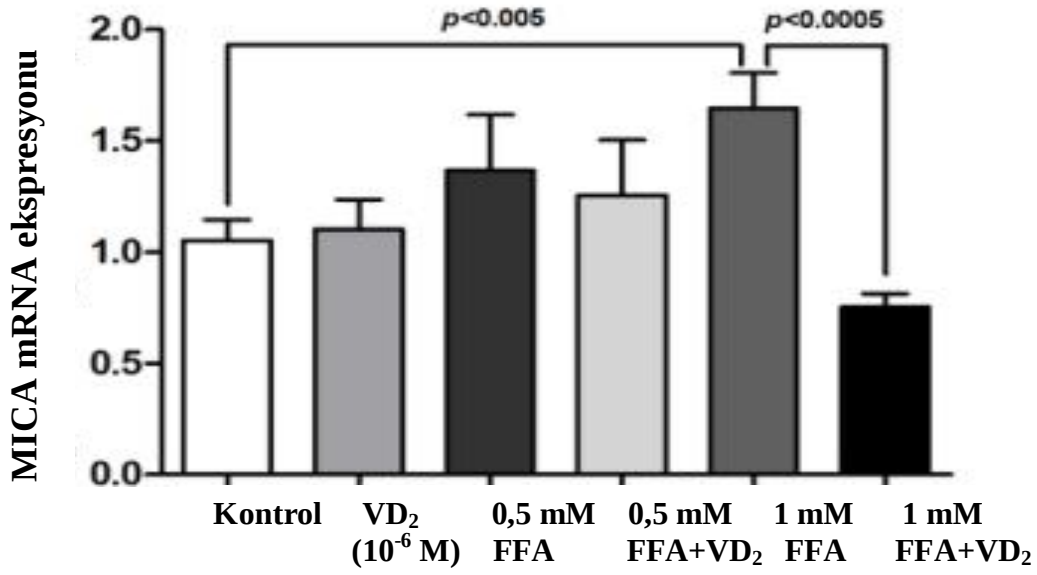
FFA+VD₂'li deney grupları kendi aralarında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p < 0.001$). LX-2 hücre hattında TGF- β 'nın gen ekspresyon düzeyleri şekil 16'da verilmiştir.



Şekil 16. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+VD₂ ve 1 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra TGF- β 'nın gen ekspresyon düzeyleri.

4.6. LX-2 Hücre Hattında MICA'nın Gen Ekspresyonu

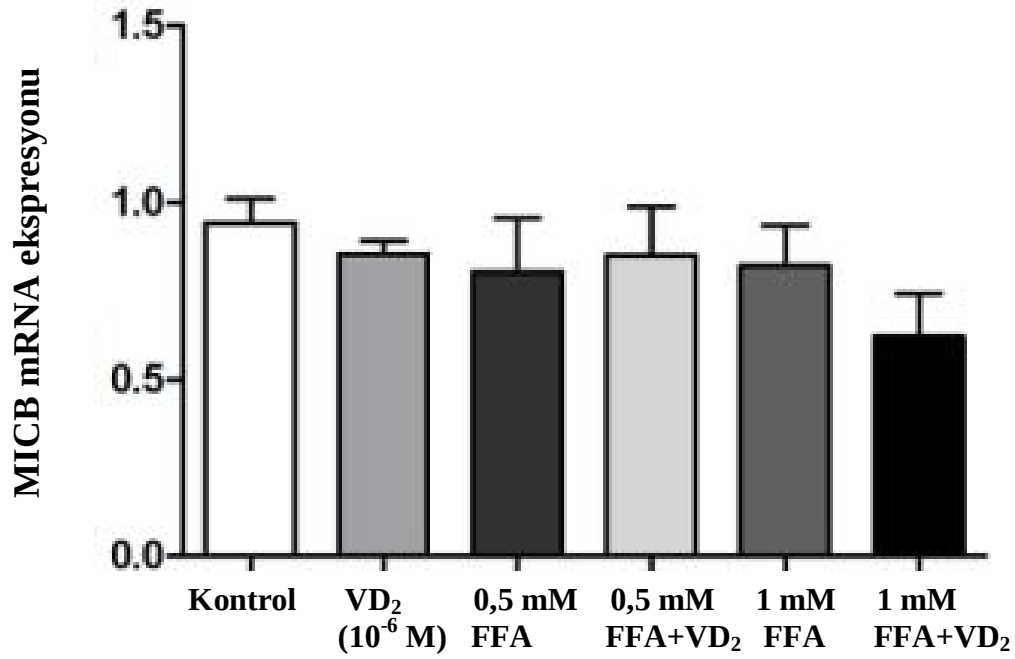
LX-2 hücre hattı VD₂ (10⁻⁶ M), 0,5 mM ve 1 mM konsantrasyonlarında FFA, 0,5 mM FFA+VD₂ ve 1 mM FFA+VD₂ kombinasyon grupları ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve MICA'nın mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 1 mM FFA'lı tedaviden sonra MICA'nın gen ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir ($p<0.005$). 1mM FFA ve 1mM FFA+VD₂ kombinasyon grupları kendi aralarında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır ($p<0.0005$). LX-2 hücre hattında MICA'nın gen ekspresyon düzeyleri şekil 17'de verilmiştir.



Şekil 17. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+VD₂ ve 1 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICA'nın gen ekspresyon düzeyleri.

4.7. LX-2 Hücre Hattında MICB'nin Gen Ekspresyonu

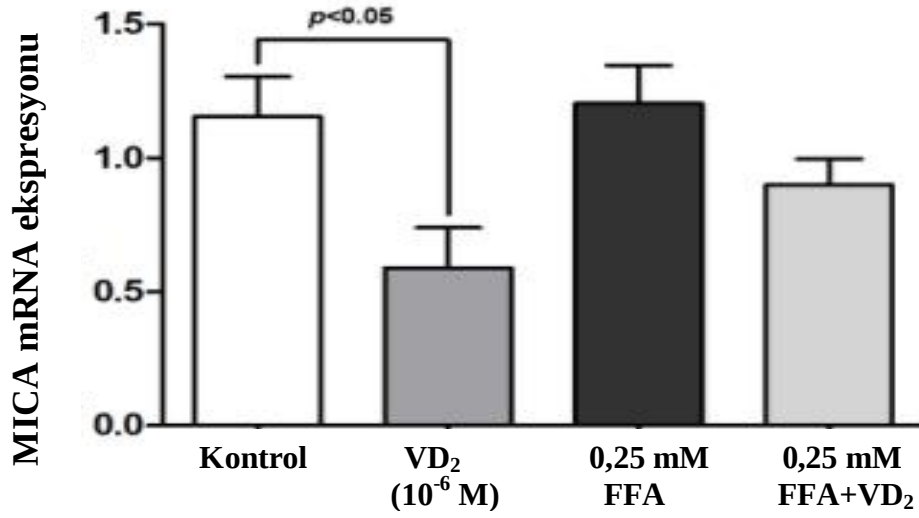
LX-2 hücre hattı VD₂ (10⁻⁶ M), 0,5 mM ve 1 mM konsantrasyonlarında FFA, 0,5 mM FFA+VD₂ ve 1 mM FFA+VD₂ kombinasyon grupları ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve MICB'nin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. MICB mRNA ekspresyonunun FFA ve VD₂'li tedavilerden etkilenmediği saptanmıştır. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD₂ ve FFA'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 18. LX-2 hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA, 1 mM FFA, 0,5 mM FFA+VD₂ ve 1 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB'nın gen ekspresyon düzeyleri.

4.8. Primer İnsan Hepatik Stellat Hücre Hattında MICA'nın Gen Ekspresyonu

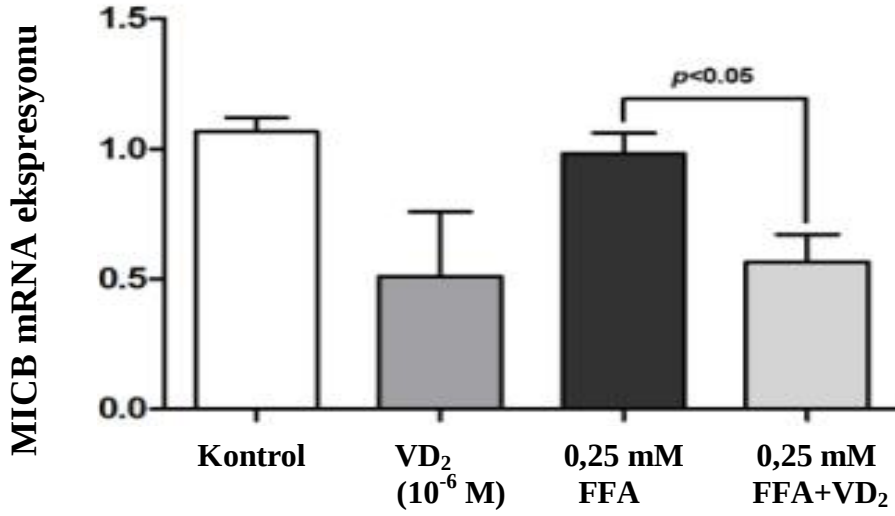
Primer insan hepatik stellat hücre hattı VD₂ (10⁻⁶ M), 0,25 mM FFA ve VD₂+0,25 mM FFA ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve MICA'nın mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında VD₂'li tedaviden sonra MICA'nın mRNA seviyesinde anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). Primer insan hepatik stellat hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,25 mM FFA ve 0,25 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICA gen ekspresyon düzeyleri şekil 19'da verilmiştir.



Şekil 19. Primer insan hepatik stellat hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,25 mM FFA ve 0,25 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICA'nın gen ekspresyon düzeyleri.

4.9. Primer İnsan Hepatik Stellat Hücre Hattında MICB 'nin Gen Ekspresyonu

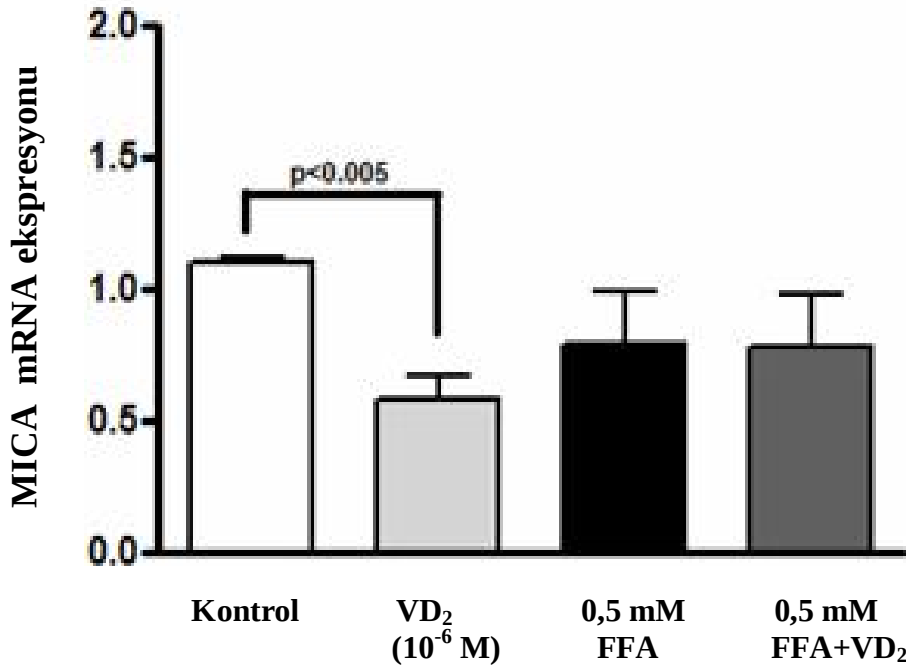
Primer insan hepatik stellat hücre hattı VD₂ (10⁻⁶ M), 0,25 mM FFA ve VD₂+0,25 mM FFA ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve MICB'nin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında VD₂'li tedaviden sonra MICB'nin mRNA seviyesinde azalma gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. 0,25mM FFA ve 0,25mM FFA+VD₂ kombinasyon grupları arasında MICB mRNA ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Primer insan hepatik stellat hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,25 mM FFA ve 0,25 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri şekil 20'de verilmiştir.



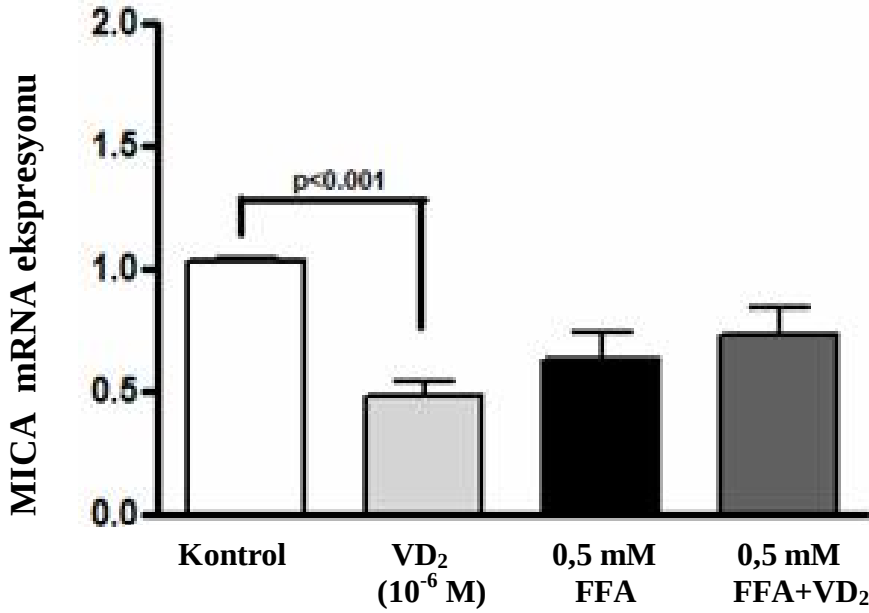
Şekil 20. Primer insan hepatik stellat hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,25 mM FFA ve 0,25 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB'nin gen ekspresyon düzeyleri.

4.10. HepG2 Hücre Hattında MICA'nın Gen Ekspresyonu

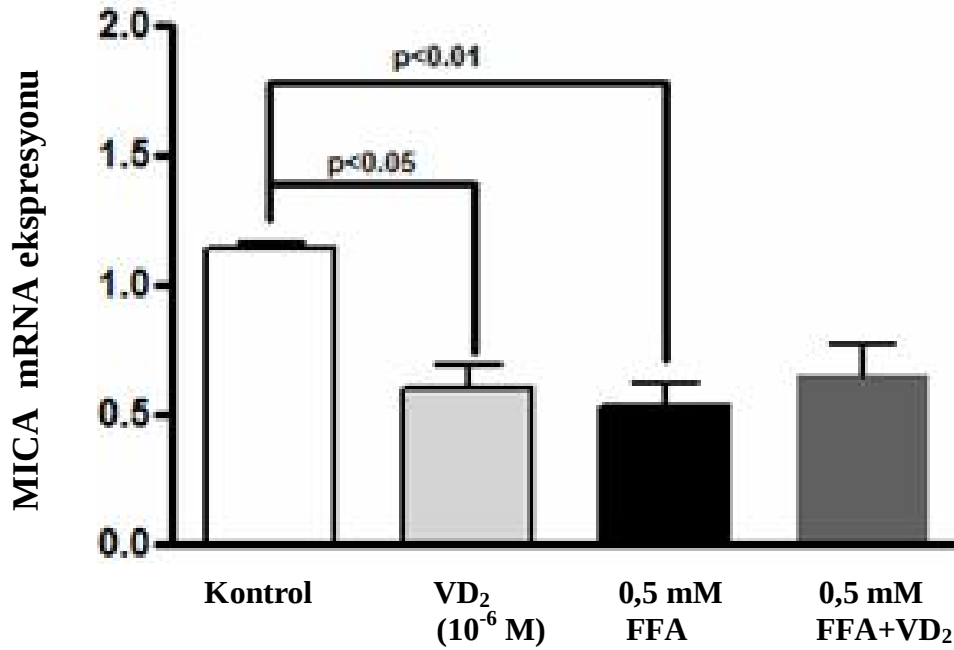
HepG2 hücre hattı VD₂ (10⁻⁶ M), 0,5 mM FFA ve VD₂+0,5 mM FFA ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir ve MICA'nın mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24, 48 ve 72 saatlik VD₂'li tedaviden sonra MICA mRNA seviyesinde anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.005$, $p<0.001$, $p<0.05$). Ayrıca 72 saatlik 0,5 mM FFA'lı tedaviden sonra MICA mRNA ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). HepG2 hücre hattında 24, 48, 72 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICA gen ekspresyon düzeyleri şekil 21, 22 ve 23' de verilmiştir.



Şekil 21. HepG2 hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICA gen ekspresyon düzeyleri.



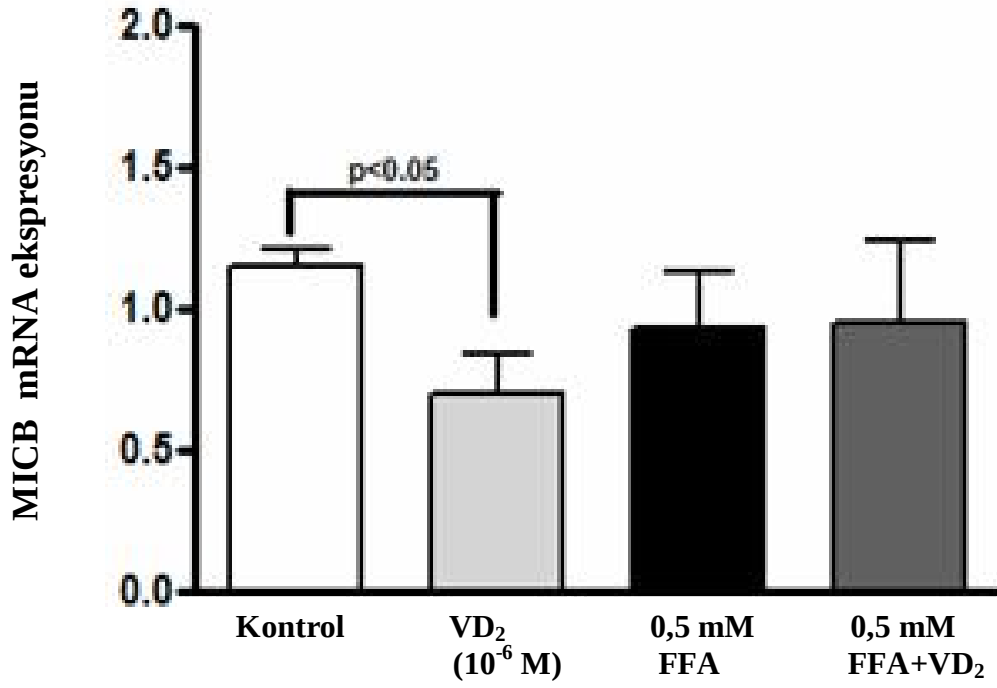
Şekil 22. HepG2 hücre hattında 48 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICA gen ekspresyon düzeyleri.



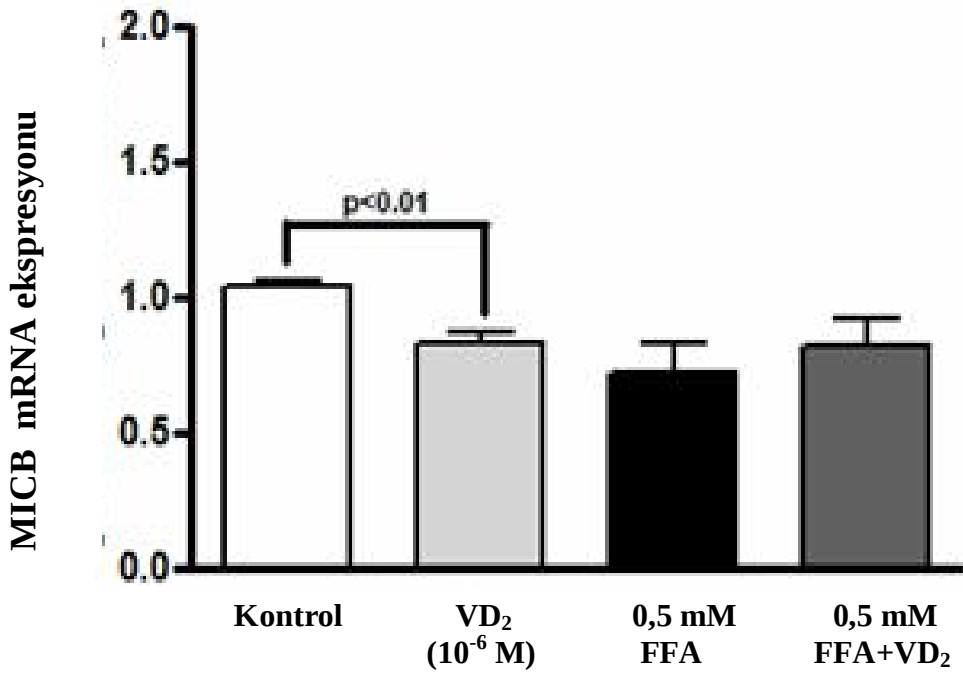
Şekil 23. HepG2 hücre hattında 72 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICA gen ekspresyon düzeyleri.

4.11. HepG2 Hücre Hattında MICB'nin Gen Ekspresyonu

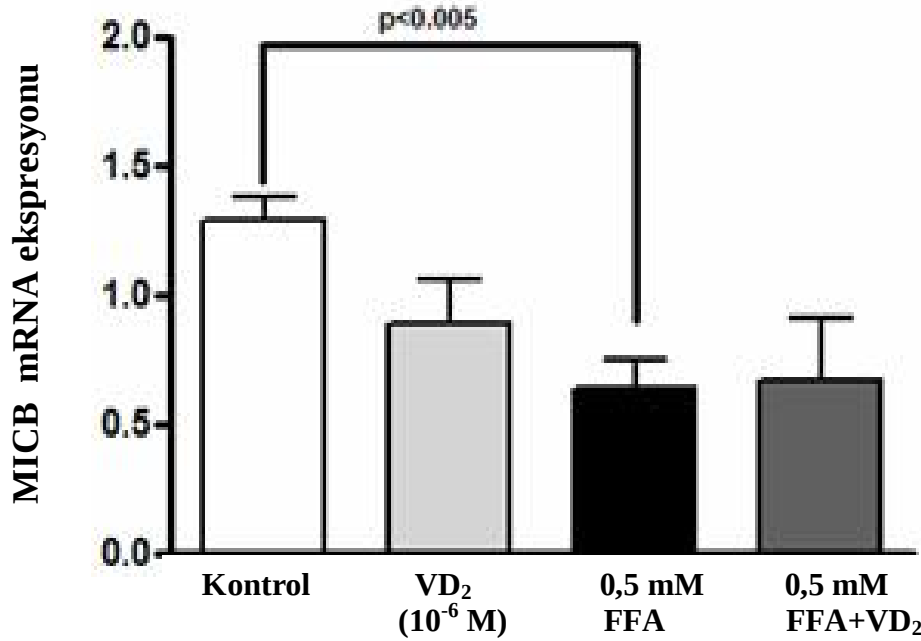
HepG2 hücre hattı VD₂ (10⁻⁶ M), 0,5 mM FFA ve VD₂+0,5 mM FFA ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir ve MICB'nin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 ve 48 saatlik VD₂'li tedaviden sonra MICB mRNA seviyesinde anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir (sırasıyla p<0.05, p<0.01). Ayrıca 72 saatlik 0,5 mM FFA'lı tedaviden sonra MICB mRNA ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.005). HepG2 hücre hattında 24, 48, 72 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri şekil 24,25 ve 26'da verilmiştir.



Şekil 24. HepG2 hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.



Şekil 25. HepG2 hücre hattında 48 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.



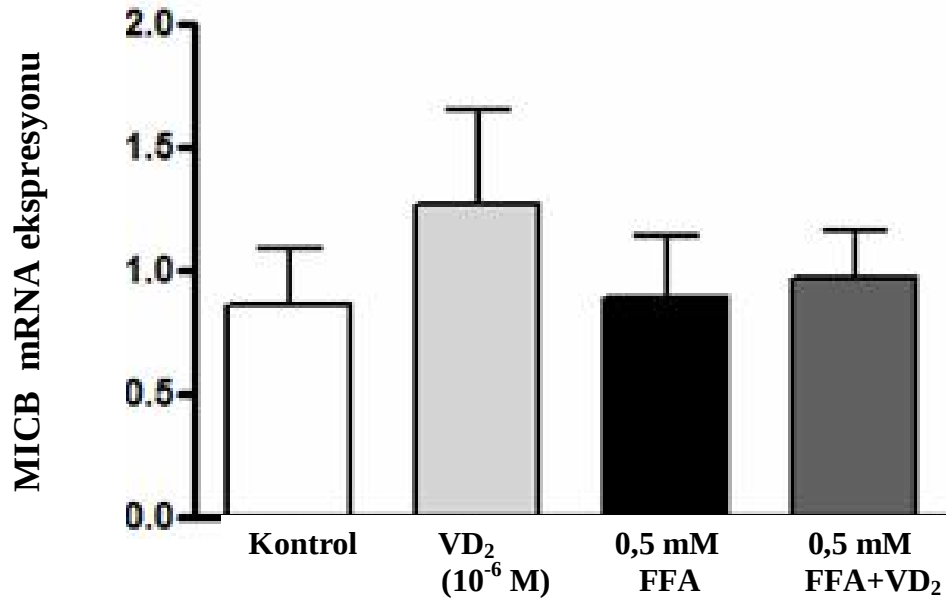
Şekil 26. HepG2 hücre hattında 72 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.

4.12. Huh7 Hücre Hattında MICA'nın Gen Ekspresyonu

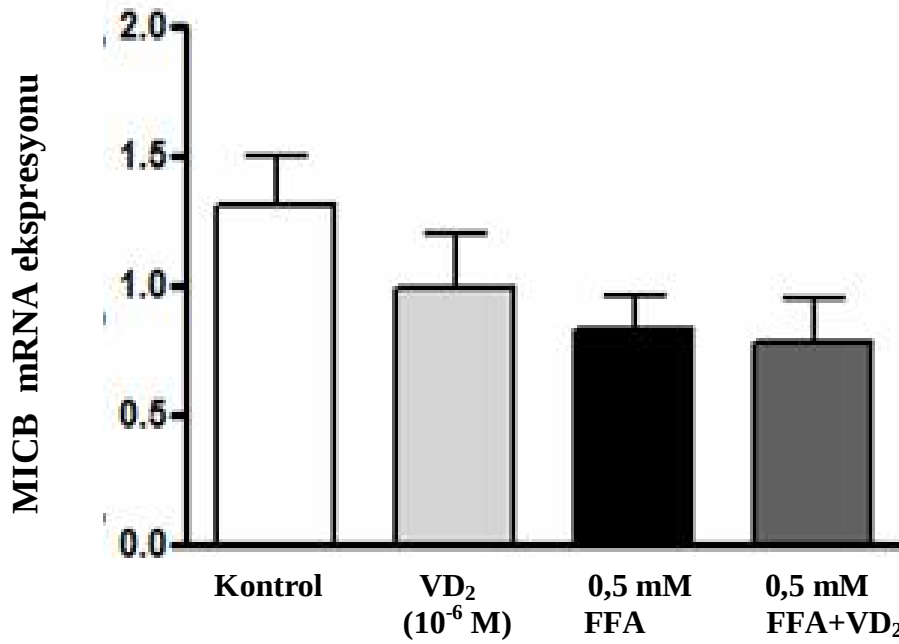
Huh7 hücre hattı VD₂ (10⁻⁶ M), 0,5 mM FFA ve VD₂+0,5 mM FFA ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir fakat MICA'nın mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile analiz edilememiştir.

4.13. Huh7 Hücre Hattında MICB'nin Gen Ekspresyonu

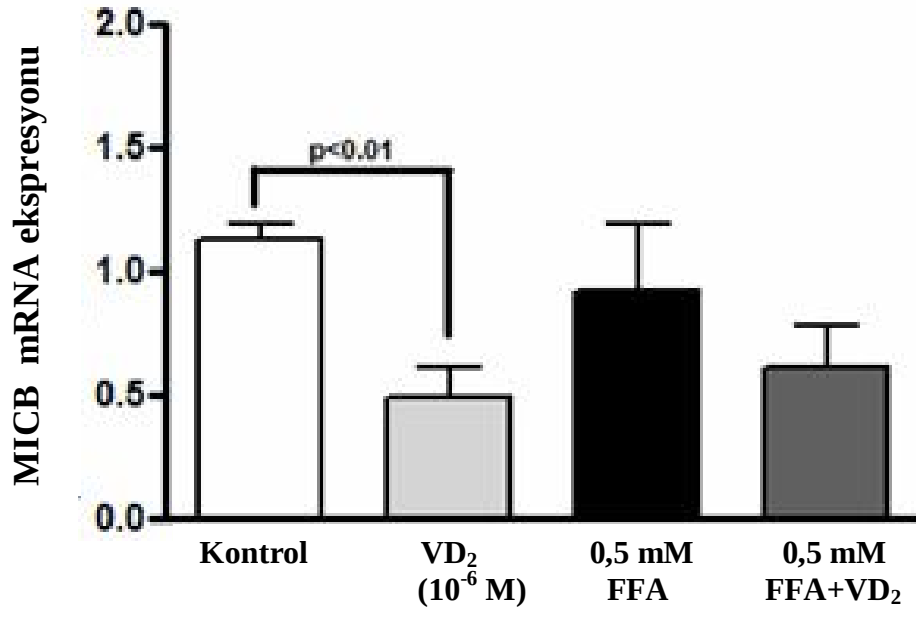
Huh7 hücre hattı VD₂ (10⁻⁶ M), 0,5 mM FFA ve VD₂+0,5 mM FFA ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir ve MICB'nin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 72 saatlik VD₂'li tedaviden sonra MICB mRNA seviyesinde anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir (p<0.01). Huh7 hücre hattında 24, 48, 72 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri şekil 27,28 ve 29'da verilmiştir.



Şekil 27. Huh7 hücre hattında 24 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.



Şekil 28. Huh7 hücre hattında 48 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.



Şekil 29. Huh7 hücre hattında 72 saatlik VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+VD₂'li tedaviden sonra MICB gen ekspresyon düzeyleri.

5. TARTIŞMA

Hepatosellüler karsinoma genel olarak kronik karaciğer hastalığı veya siroz zemininde gelişmekte olan ve tüm dünyada artan insidansı ile birlikte her yıl 500.000 kişinin ölümüne neden olan karaciğerin primer bir tümörüdür. Hepatosellüler karsinoma günümüzde tedavisi zor ancak gelişimi önlenabilir tümörler grubuna girmektedir. Tümör gelişimiyle bağlantılı olarak birçok gen ekspresyonunun değişimiyle ilgili çok basamaklı bir süreçtir ve moleküler patogeneziyle ilgili birçok bilinmeyen vardır. Hepatosellüler karsinomanın tanısı ve tedavisi için, bu kanser türünün gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. Mevcut araştırmaların temel hedefi de hepatosellüler karsinomanın gelişimini önlemek ve tedavi ajanları bulmak üzerinde yoğunlaşmıştır^{3,21}.

Hepatokarsinogenez; kromozomal, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimini içeren çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişikliklerin bir kısmı karaciğerde kanser gelişiminin farklı basamaklarında oluşur ve hücrede önemli moleküler yolların regülasyonunun bozulması ile sonuçlanır. Hepatosellüler karsinoma gelişiminde altta yatan moleküler mekanizmaların tam anlamıyla çözülebilmesi hepatosellüler karsinoma olgularının önlenmesi ve tedavi rejimlerinin geliştirilmesinde son derece önemlidir².

Pek çok kanser tipi için rutinde kullanılan kemoterapötiklerin ne yazık ki hepatosellüler karsinomaya etkisi yoktur. Çünkü hepatosellüler karsinoma patogenetik olarak, çoğu tümöre oranla, multifaktöriyel patogenezin en belirgin olduğu bir gruba girmektedir. Çeşitlilik gösteren etiyolojik ajanların bulunduğu bir ortak nokta vardır ki, o da fibrozis ve siroz gelişimidir. Bu ortak nokta bir anlamda tedavi hedeflerinin belirlenmesini kolaylaştırırken, bir yandan da oluşturduğu fibrotik zemin nedeniyle bu tedavi ajanlarının etkinliğini kısıtlamakta ve ajanların hedeflenen bölgeye ulaşmasını güçleştirmektedir. Hepatositlerin malign transformasyonu genelde kronik karaciğer hasarı, rejenerasyon ve siroz zemininde gerçekleştiği için ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesi hepatosellüler karsinoma gelişiminde çok önemli rol oynar. Yaralanma ve hasara yanıt olarak hepatositlerin proliferasyonu ve ekstrasellüler matriksin komponentlerinin üretimi gerçekleşir. Hasar kalıcı olduğunda ekstrasellüler

matriksin komponentlerinin birikimi sonucunda siroz oluşur ve bu süreç neoplazi gelişimi ile sonuçlanabilir^{34,35}.

Karaciğer fibrozisi, kronik olarak hasar gören karaciğerde ekstrasellüler matriksin yapımı ile yıkımı arasındaki dengenin bozulmuş olması ve aşırı bağ dokusu birikimiyle sonuçlanan, sitokin salınımı ve dokunun yeniden yapılanmasındaki değişiklikleri içeren yara iyileşmesine cevap olarak adlandırılan karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Kronik hepatit ve bu zeminde gelişen siroz hepatosellüler karsinoma gelişiminden sorumlu ana sebeplerdir. Karaciğerde kronik hepatit nedeni olan herhangi bir toksik ya da iltihabi hasara verilen ilk hücresel cevap apoptozdur. Apoptoz ile tetiklenen mekanizmaların başında hepatik stellat hücre aktivasyonu gelmektedir. Apoptoz karaciğerde viral hepatitler, alkolik karaciğer hastalığı, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalıkları (NAFLD), kolestatik karaciğer hastalıkları gibi pek çok durumda verilen ilk hücresel cevaptır. Hastalığın şiddeti, süresi ve karaciğer fibrozisin derecesiyle doğru orantılı olarak hepatosit apoptozu artmaktadır. Hepatosit apoptozu, inflamasyon ve fibrozisin yalnızca bir sonucu olarak değil, tam tersine bu patolojik mekanizmaları tetikleyen ve arttıran bir uyarıcı olarak da kabul edilmektedir. Günümüzde karaciğer fibrozisi engellenebilir ve siroz da geri dönebilir patolojik süreçler olarak kabul edilmekte ve çalışmalar fibrozisi engellemek yönünde yoğunlaşmaktadır³⁴.

Gelişmiş ülkelerde giderek artan bir biçimde görülmekte olan alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NASH) etkin bir tedavisi bulunmayan ciddi bir tıbbi sorun olarak günümüzde karşımıza çıkmaktadır. Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığının fibrozis, siroz ve daha sonra hepatosellüler karsinomaya kadar ilerlemesine yol açan mekanizmaların araştırılması bu açıdan önem taşımaktadır. Ancak, son dönemlerde yürütülen çalışmalarla, hepatositlerde apoptozun patolojik bir biçimde arttığı gösterilmiş ve bunun sonucu olarak da, karaciğerde inflamasyonun indüklenerek fibrozun geliştiği ortaya konmuştur¹¹⁷.

Apoptozis tarafından hücre ölümü çeşitli karaciğer hastalıklarının kalıcı bir özelliğidir. Apoptozis, karaciğer hasarına başlatıcı bir hücresel cevap oluşturarak sitokin kaskadını oluşturmaktadır. Bu yüzden apoptozisin altta yatan moleküler mekanizmasının analizi karaciğer hastalıklarını daha iyi anlamak için önem

taşımaktadır. Son yapılan çalışmalar artan apoptozisle, inflamatuvar mediyatorlerin salınımı ve hepatik fibrozisin gelişimiyle direk bağlantılı olduğunu desteklemektedir⁷³.

Hepatosellüler karsinoma tedavisi ve prognozu açısından hedef oluşturabilecek moleküllerin saptanabilmesi amacıyla in vitro koşullarda hücre hatlarıyla yaptığımız bu çalışmada profibrojenik genlerin ve stres ligand genlerinin ekspresyon düzey değişimleri ve vitamin D₂ (VD₂) ve serbest yağ asidi (FFA) tedavisi uygulaması ile bu proteinlerin nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda hepatik stellat hücre hatlarının ve hepatosellüler karsinoma hücre hatlarının VD₂ ve FFA tedavisine nasıl yanıt verdiklerini, bu yanıtların karaciğer fibrozisi gelişiminde çok önemli bir rol oynayan profibrojenik genler olan COL-1 α , α -SMA ve TGF- β 'yı ve stres ligand genleri olan MICA ve MICB'yi nasıl etkiledikleri araştırılmıştır. Bu amaçla hepatik stellat hücre hatları olarak LX-2 ve primer insan hepatik stellat hücre hattı ve hepatosellüler karsinoma hücre hattı olarak da HepG2 ve Huh7 kullanılmıştır (Çizelge 8).

Hepatosellüler karsinomanın pek çok risk faktörü tanımlanmış olmasına rağmen, obezite ve tip II diyabet te hepatosellüler karsinoma için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Obezite ve onunla ilişkili alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı gelişmiş ülkelerde görülen en yaygın karaciğer hastalığı olduğu için deneysel çalışmalar çoğunlukla lipid metabolizmasını anlama üzerine odaklanmıştır. Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı, karaciğer lipid alımındaki artış, karaciğerde yağ asidinin artmış sentezi ve azalmış çok düşük dansiteli lipoproteinlerin sentezinin sonucunda gelişmektedir¹¹⁸.

Yağ asidlerinin karaciğere girişinin, bu organ tarafından nasıl düzenlendiğine ait literatürde fazla çalışma olmamasına rağmen özellikle kısa ya da uzun zincirli yağ asidlerinin plazmadaki konsantrasyonu direkt karaciğere alınma ile paralellik göstermektedir ve bu durumda konsantrasyona bağımlı mekanizmayı akla getirmektedir. Lavoie ve arkadaşları, karaciğerde yağ metabolizmasının düzenlenmesiyle ilgili yaptıkları çalışmada yağ asidlerin girişinde karaciğerin tampon rolü oynayabileceğini ve bu depolama işlevinin adipoz dokudan salınan yağ asidlerin toksisitesini önleyebileceğini ileri sürmüşlerdir^{118,119}.

FFA'lar basit hepatik steatozisin gelişmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Yağın oral girişi ve daha sonra adipoz dokularda lipolizi serumdaki FFA düzeyinin artmasına yol açmaktadır. Hepatositlerdeki lipid birikimi ve hepatositlerin apoptozisi,

alkole bağılı olmayan yağlı karaciğer hastalığında önemli bir mekanizma olan lipoapoptozis olarak isimlendirilmektedir. Hepatositlerde, doymuş FFA zaman ve doza bağımlı olarak lipoapoptozisi indüklemektedir¹¹⁸.

Felstein ve arkadaşlarının FFA aracılı hepatik lipotoksisite ile ilgili yaptıkları çalışmada, hepatosellüler karsinoma hücre hattını (HepG2) FFA (2:1 oleat/palmitat) ile inkübe ederek hücre sel 'steatozis' durumunu yaratmışlardır ve yapılan bu in vitro çalışmada, FFA'ların Fas/CD95 ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) düzeyini artırdığını gözlemişlerdir. Ayrıca aynı grubun fareler üzerinde yaptıkları başka bir çalışmada, yüksek kalorili diyet sonrası Fas reseptör düzeyinde de artış olduğu saptanmıştır^{120,121}.

Canbay ve arkadaşları, Fas L (Jo2) agonisti ile tedavi edilen obez farelerde alanin aminotransferaz, apoptozis ve inflamasyon düzeyinin artışı ile bağlantılı olarak karaciğer hasarının kanıtlarını ortaya koymuşlardır. Bu yatkinlığın, ölüm reseptörleri aracılı apoptozisle bağlantılı olduğunu göstermişlerdir¹²².

Adipositlerden de novo yağ asidi senteziyle oluşan palmitoleik asid, hem yararlı hemde zararlı metabolik etkilere sahiptir ve potansiyel olarak farklı determinantlar ve endojen doku kaynakların üretimiyle bağlantılıdır. Hayvan çalışmaları dolaşımdaki palmitoleik asidin insülin direnci ve metabolik regülasyonu direk olarak düzeltebileceğini desteklemektedir. Mozaffarian ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada dolaşımdaki trans-palmitoleik asidin düşük insülin direnci ve diyabetle ilişkili olduğu bulunmuştur^{123,124}.

Serbest yağ asidi, hepatositlerin apoptozini indükleyerek karaciğer fibrojeniz sürecini teşvik etmektedir ve profibrojenik olarak işlev görmektedir. Bechmann ve arkadaşları, hepatik stellat hücre hattı (LX-2) kullanarak FFA ile indüklenen profibrojenik genlerin, ölüm reseptörlerinin ve apoptozisle ilgili moleküllerin üzerine resveratrolün etkisini araştırmışlardır. LX-2 hücreleri 0,5 mM FFA (2:1 oleat/palmitat) ile inkübe edilmiştir ve daha sonra resveratrolle tedavi edilmiştir. Çalışma sonucunda 0,5 mM FFA'lı LX-2 hücrelerin inkübasyonunda profibrojenik genlerin (α -SMA, TGF- β , TIMP1), ölüm reseptörlerinin (CD95/Fas, TNFR-1) ve antiapoptotik (Bcl-2, Mcl-1) moleküllerin indüklediğini ve 15 μ M resveratrolün eklenmesiyle de bu genlerin anlamlı düzeyde arttığını ve özellikle bu etkinin sadece FFA'nın varlığında olduğunu saptamışlardır. Bu bulgular resveratrolün insan LX-2 hepatik stellat hücrelerde FFA'nın

profibrojenik etkisini daha da arttırdığını ve artmış FFA'lı obez hastalarda resveratrolün hepatik fibrojenize neden olma ihtimalini gözlemişlerdir¹⁰⁹.

Bu çalışmada insan hepatik stellat hücre hattı olan LX-2 hücreleri 24 saat boyunca 0,5 mM FFA (2:1 oleat/palmitat) ile, primer hepatik stellat hücreleri ise 0,25 mM FFA (2:1 oleat/palmitat) ile inkübe edilmiştir. LX-2 hücrelerinde, kontrol grubu (FFA'sız) hücrelerin sitoplazmasında hiçbir lipid damlacığı gözlenmezken, 0,5 mM FFA ile inkübe edilen hücrelerin sitoplazmasında ise güçlü lipid damlacıkları birikimi gözlenmiştir (Şekil 10,11). Bu sonuçlar FFA'nın LX-2 hepatik stellat hücrelerini aktive ettiğini göstermektedir. Bu bulguların, Lu ve arkadaşlarının yaptıkları sıçan hepatik stellat hücrelerin proliferasyonunda FFA'nın rolü çalışmasıyla, Bechman ve arkadaşlarının hepatik stellat hücrelerde FFA girişinin sonuçlarıyla ve Feldsteinin HepG2 hücrelerinde 1 mM FFA verildikten sonra hücrelerdeki lipid damlacıklarının oluşumuyla ilgili çalışmalarla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ancak 0,25 mM FFA ile inkübe edilen primer hepatik stellat hücrelerin sitoplazmasında ise lipid damlacıkları gözlenmemiştir (Şekil 12,13).

Obez hastalarda yapılan çalışmada adipoz dokuda aşırı üretilen FFA'ların karaciğere geçişinin önemli olduğu vurgulanmaktadır. Donnelly ve arkadaşları obez NAFLD'li hastalarla yaptıkları çalışmada, karaciğerdeki triasilgliserollerin kaynağının % 60 oranında FFA havuzundan geldiğini göstermişlerdir. Böylece karaciğerde triasilgliserollerin konsantrasyonunun yüksek olması ve depolanması belirgin lipid damlacıklarının birikimine neden olmaktadır¹²⁵.

Aktive olan hepatik stellat hücreler ekstrasellüler komponentin hem üretimini artırarak, hem de proliferasyonu sağlayarak fibrojenize katkıda bulunmaktadır. Antifibrojenik tedaviler, karaciğer matris proteinlerini sentezleyen ve yara iyileşmesindeki myofibroblastlara benzeyen aktive mezenşimal hücreleri hedef alan tedavilerdir. Hepatik stellat hücre proliferasyonunun ve kollajen sentezini in vitro olarak birçok ajan inhibe ederken, bu maddelerden çok azının uygun hayvan modellerinde tolere edilebildiği ve etkili olduğu saptanmıştır. TGF- β gibi profibrojenik sitokinleri çözünür tuzak reseptörleri tarafından inhibe etmeye yönelik stratejiler gelişme halindedir, henüz sonuçlar tedavi seçeneği olarak kullanılmamaktadır. Aktive hepatik stellat hücrelerin proliferasyonunun inhibisyonu, apoptozis indüksiyonu ve kollajen

üretimindeki azalmayı gösteren kanıtlar hücre kültürü düzeyinde olup, henüz in vivo etkinliklikleri uygun hayvan modellerinde gösterilmemiştir^{111,126}.

Karaciğer fibrozisi aktive olmuş hepatik stellat hücreler tarafından sentez edilen kollajen tip I ile III ve diğer matriks proteinlerin aşırı birikmesinin sonucunda oluşmaktadır. Fibrozisin en önemli skar komponenti kollajendir¹¹¹.

Lipid peroksidasyonu kültür ortamında stellat hücreler tarafından kollajen ekspresyonunun artmasını sağlamaktadır. Mezey ve arkadaşları, LX-2 hepatik stellat hücrelerinin selenyum, vitamin E ve TGF- β 'lı tedaviden sonra, selenyum ve vitamin E'nin COL-1 α 'nın ekspresyonu üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda selenyum ve vitamin E'nin kombine etkisinin COL-1 α 'nın ekspresyonunu azalttığı ve stellat hücrelerde apoptozisin artmasının kollajen formasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu kombine etki lipid peroksidasyonunu azaltmıştır. Sonuç olarak selenyum ve vitamin E'nin kombine etkisi, stellat hücreler tarafından TGF- β aracılı tip 1 kollajen birikimini azaltarak TGF- β aracılı hepatik fibrozise karşı korumaktadır¹²⁷.

Hepatik stellat hücrelerde bulunan PPAR (peroksizom üreme ile aktive edilmiş reseptör), birçok dokuda büyüme ve farklılaşmayı kontrol eden reseptör-transkripsiyon faktörü olarak önemli işlevler görmektedir. Hepatik stellat hücrelerin aktivasyonu sırasında PPAR- γ düzeyi azalmaktadır. Bataler ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, PPAR- γ ligandlarının hepatik stellat hücrelerde profibrojenik ve proinflamatuvar etkilerini inhibe etmesinin yanı sıra hasarlı karaciğerde kollajen birikiminide azaltarak kollajenaz aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir. Timbrell ve arkadaşlarının yapmış oldukları in vitro çalışmada da Taurinin fibrotik süreçte aşırı kollajen birikimini azalttığı gösterilmiştir^{128,129}.

Hepatik stellat hücrelerin güçlü bir profibrojenik sitokini olan TGF- β , ekstrasellüler matriks birikimini artırmakta ve kollajenaz aktivitesini inhibe etmektedir. Yapılan çalışmalarda TGF- β 'nın, COL-1 α 'nın ekspresyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Xu ve arkadaşları, LX-2 hepatik stellat hücre hattının TGF- β ile tedavisinden sonra, TGF- β 'nın COL-1 α 'nın ekspresyonunu 3-4 kat artırdığını saptamışlardır^{108,130}.

Bu çalışmada, LX-2 hepatik stellat hücrelerde 0,5 mM ile 1 mM FFA ve VD₂ (10⁻⁶)'nin COL-1 α 'nın ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak

hemVD₂'li hem de 0,5 mM ve 1 mM FFA'lı tedaviden sonra COL-1 α 'nın ekspresyonun önemli düzeyde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 14).

Karaciğer fibrozisi gibi patolojik koşullar altında sessiz hepatik stellat hücreler aktivasyona maruz kalarak α -SMA'yı eksprese etmektedir. Pek çok çalışmada hepatik stellat hücrelerde matriks ekspresyonu incenirken fibrojenik hücrelerin bir belirteci olarak α -SMA kullanılmaktadır. Parasetamol kaynaklı akut hasar ile ilgili yapılan çalışmalarda α -SMA sentezleyen, aşırı miktarda miyofibroblast benzeri aktive hepatik stellat hücre saptanmıştır.^{108, 126}.

Bu çalışmada, LX-2 hepatik stellat hücrelerde 0,5 mM ve 1 mM FFA'nın ve VD₂ (10⁻⁶)'nin α -SMA ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak VD₂ tedavisinden sonra α -SMA'nın ekspresyonunun azaldığı, 0,5 mM FFA'lı tedaviden sonra α -SMA ekspresyonun anlamlı bir düzeyde arttığı, VD₂'nin FFA ile artış gösteren α -SMA'nın ekspresyonunu önemli düzeyde azalttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde 1 mM FFA'lı tedaviden sonra da α -SMA ekspresyonun anlamlı bir düzeyde arttığı ve VD₂ eklenmesinden sonra α -SMA'nın gen ekspresyonunun anlamlı bir düzeyde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 15).

Hepatik stellat hücrelerin önemli bir aktivatörü olarak işlev gören TGF- β , hepatik stellat hücrelerin aktivasyonu sırasında komşu hepatositlerden ve plateletlerden salınmaktadır. Karaciğerde doku tamirine, ekstrasellüler matriks üretimine, büyümenin düzenlenmesine ve apoptozise yol açan en güçlü profibrojenik mediyatordür¹¹¹.

TGF- β 'nın oluşumu fibrozis hasarında hepatik stellat hücrenin sitokin üretimini artırmasıyla uygunluk göstermektedir. Deneysel karaciğer fibrozis modellerinde ve insan hepatik fibrozisinde TGF- β 'nin mRNA seviyesinin belirgin olarak arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Garcia ve arkadaşları fibrotik karaciğerdeki reaktif oksijen ürünlerinin artmış üretiminin, kollajen sentezini artıran TGF- β geninin ekspresyonundaki düzensizliğe karşı bir cevap olabileceğini rapor etmişlerdir¹³¹.

TGF- β 'nin artan ekspresyonunun baskılanması fibrotik dokularda önem taşımaktadır. TGF- β 'nin potansiyel olarak fibrojenik etkileri ekstrasellüler matriks proteinlerin ekspresyonunun stimülasyonu, hepatik stellat hücrelerde metalloproteinaz doku inhibitörlerin ekspresyonunu artırarak matriks metalloproteinazlar tarafından parçalanmasını azaltması (matriks parçalanmasının inhibisyonu) ve ekstrasellüler matriks reseptör ekspresyonunun düzenlenmesini içermektedir¹³².

Bu çalışmada, LX-2 hepatik stellat hücrelerde 0,5 mM ve 1 mM FFA ve VD₂ (10⁻⁶)'nin TGF- β ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak VD₂ tedavisinden sonra TGF- β 'nın gen ekspresyonunun anlamlı bir düzeyde azaldığı, 0,5 mM FFA tedavisinden sonra artan TGF- β 'nın gen ekspresyonunun VD₂ eklenmesinden sonra anlamlı bir düzeyde azaldığı saptanmıştır. 1 mM FFA ve 1 mM FFA +VD₂ tedavisinden sonra ise TGF- β 'nın gen ekspresyonunda anlamlı bir düzeyde değişiklik gözlenmemiştir. (Şekil 16).

Ye ve arkadaşları, sıçan hepatik stellat hücre hattında, Jun N terminal kinaz ve aktif protein 1 (JNK ve AP1)'i baskılayarak all- trans retinoik asidin(ATRA) hücre proliferasyonu, kollagen genleri (Prokollajen 1 α) ve profibrojenik genleri (TGF- β , CTGF, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, PAI-1) üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, ATRA'nın, JNK ve AP1'in mRNA ekspresyonunu baskılayarak hepatik stellat hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğini, kollajen ve profibrojenik genlerin mRNA ekspresyonunu azalttığını saptamışlardır¹³³.

Fibroziste FFA'ların rolü ve vitamin D'nin terapötik değeri olabileceği göz önüne alınarak bu çalışma sonucunda, VD₂'nin hepatik fibrojenin belirteçleri olan TGF- β ve α -SMA'nın ekspresyonunu azalttığını, diğer sonuçlardan farklı olarak hem VD₂'li hem de FFA'lı tedavinin COL-1 α 'nın ekspresyonunu da azalttığı saptanmıştır. Böylece FFA'nın profibrojenik faktörler üretmek için invitro ortamda LX-2 hücrelerini aktive ettiği ve bu aktivasyonun VD₂ ile azaltılabileceği ve karaciğeri fibrojenizden koruyabileceği gösterilmiştir (Şekil 14-16).

Karaciğerde immun sisteminin başlatıcı komponenti olarak, naturel killer (NK) hücreler karaciğer hasarının çeşitli süreçlerinde rol oynamaktadır. Son zamanlarda, NK hücre reseptörü olan NKG2D'nin ligandları olarak MICA ve MICB tanımlanmıştır. Stres ile indüklenen moleküller olan MICA ve MICB'nin, kronik karaciğer hastaların ve hepatosellüler karsinomlu hastaların serumlarında arttığı rapor edilmiştir. MICA ve MICB moleküllerinin hücresel stresin bir sensörü olarak işlev gösterdiği bilinmektedir ve doku kültürü sırasında indüklenen hücresel stres MICA ve MICB moleküllerinin ekspresyonunun artmasına yol açmaktadır. Kahraman ve arkadaşları MICA ve MICB moleküllerinin NASH'lı hastalarda karaciğer hasarı, apoptozis ve fibrozis üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak hepatik NK hücrelerinin, NKG2D, MICA ve MICB transkriptlerinin, TRAIL-DR5 ve CD 95/Fas transkriptlerinin NASH'lı

hastalarda arttığını, hepatosit apoptozisin NASH’da up-regule edici olduğunu, hepatik fibrogenesis beliteçlerinin NASH’da önemli düzeyde arttığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar, MICA ve MICB’nin NASH’lı hastalarda hepatositler üzerinden eksprese olduğunu ve onların ekspresyonunun karaciğerin yağ infiltrasyonu aracılı hepatik inflamasyonu sırasında NK hücrelerin kolaylıkla etkilenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir⁷³.

Kohga ve arkadaşları transkateter arteriyal embolizasyon sırasında hepatosellüler karsinomali hastalarda MICA ve MICB’nin serum düzeyinin değiştiğini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar kronik karaciğer hastalığının yanı sıra hepatosellüler karsinomanın ilerlemesiyle de sMICA /sMICB seviyesinin arttığını, Transkateter arteriyal embolizasyon tedavisinden sonrada sMICA /sMICB seviyesinin önemli düzeyde azaldığını ve NK hücreler tarafından NKG2D ekspresyonunun artırıldığı saptanmıştır. İlginç olarak, MICA ve MICB’nin bu artışının NKG2D ekspresyonunun azalmasıyla bağlantılı olduğunu, tümöre karşı yanıtta kaçmak için malignant hücrelerin tipik bir özelliği olarak hepatik NK hücre aktivasyonunu bozduğunu rapor etmişlerdir⁷⁴.

NK hücreler aktive olmuş hepatik stellat hücrelerin öldürülmesinde antifibrotik etkiye sahiptir. Fakat literatürde hepatik stellat hücrelerinde stres ligandlarının rolü hakkında henüz bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada yağlı karaciğer hastalığının hücre kültürü modeli yaratılarak insan hepatik stellat hücrelerinde stres ligandlarının artıp artmadığı moleküler düzeyde saptanmaya çalışılmıştır. Ayrıca FFA’lı ve VD₂’li tedavinin LX-2 ve primer stellat hücrelerinde MICA ve MICB üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak LX-2 hücrelerinde VD₂, 0,5 mM FFA ve 0,5 mM FFA+ VD₂’nin MICA ve MICB gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını fakat 1 mM FFA’lı tedavinin MICA gen ekspresyonunu artırdığı ve daha sonra VD₂’nin eklenmesiyle ekspresyonun anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (Şekil 17,18). Primer stellat hücrelerinde ise VD₂’nin MICA gen ekspresyonunu anlamlı bir düzeyde azalttığı fakat 0,25 mM FFA tedavisinden sonra anlamlı bir değişiklik gözlenmediği saptanmıştır. VD₂’nin MICB gen ekspresyonunu ise azalttığı fakat anlamlı bir düzeyde olmadığı, 0,25 mM FFA tedavisine VD₂’nin eklenmesinden sonra ise MICB gen ekspresyonunun anlamlı bir düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak MICA’nın gen ekspresyonunun VD₂ tedavisinden etkilendiği gösterilmiştir (Şekil 19,20).

MICA ve MICB normal hücrelerden nadiren eksprese olurken, tümör hücrelerinden sıklıkla eksprese olmaktadır. NKG2D'nin tümöre karşı immün cevaptaki ana rolü kanser hücrelerinde gözlenen immün kaçış mekanizmasının varlığı tarafından vurgulanmaktadır. İmmün yanıttan kaçarken, kanser hücreleri NKG2D ligandlarının işlevini, ekspresyonu baskılayarak kontrol etmektedir. Tümör hücresinin yüzeyinden MICA'nın kesilmesi için metalloproteinaz bağımlı mekanizma aracılığıyla ortama NKG2DL(sMICA)'nin çözünür formu salınır. Böylece NK hücrelerindeki NKG2D reseptörü ve hücrel sitotoksite baskı altına alınır. Tümör tarafından salgılanan proteazlar matriks birleşenlerini parçalamak suretiyle dokularla invazyon ve metastazı kolaylaştırmakta, hücre proliferasyonunu artırmakta, hücre yüzeyindeki molekülleri (örn. TNF- α , FasL, IGF, TGF- β) proteoliz ile aktifleştirmekte veya atılımını sağlamaktadır. Bu durum tümörlerin hem immün gözetimden kaçabilmelerine hem de büyümelerine imkan sağlamaktadır. Tümör yüzeyinden proteoliz ile atılan birçok molekülün serumdaki konsantrasyonunun artmış olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Güçlü bir immün baskılayıcı etkiye sahip olan TGF- β ise, T, B ve NK hücrelerini inhibe eder. Bu nedenle bazı kanserleşmiş hücrelerin gelişimi ya da bağışıklık sisteminden kaçışı için kritik rol oynar. Ayrıca tümör hücreleri tarafından salgılanır ve tümörün etrafında parakrin etki tümör proliferasyonunu uyarır. Bu sitokin hem immün sistem hücreleri tarafından homeostaz için hem de kanser hücreleri tarafından immün sistemden kaçış için üretilmektedir ^{134,135}.

Zhang ve arkadaşları, ilerlemiş AE (alveolar echinococcosis)'li hastalardan elde edilen serum örneklerinde sMICA düzeyine ve karaciğer parçalarından MICA, MICB, NKG2D ve TGF- β 1 ekspresyon düzeylerine bakmışlardır. Hepatositlerden MICA ve MICB protein ekspresyonunun güçlü bir şekilde artış gösterdiğini, yüksek MICA ve MICB düzeyinin düşük NK hücreleriyle zıtlık gösterdiğini ve TGF- β 'nın güçlü bir şekilde eksprese olduğunu rapor etmişlerdir ¹³⁶.

Kohga ve arkadaşlarının hepatosellüler karsinomalı hastalarda yüksek düzeyde sMICA olduğunu rapor ettikten sonra HepG2 ve PLC/PRF/5 hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında, hepatosellüler karsinomaya karşı kullanılan ilaçların (epirubicin ve doxorubicin) ADAM 10'un (A Disintegrin And Metalloproteinase 10) ekspresyonunu ve aktivitesini inhibe ederek MICA'nın metalloproteinazlar tarafından baskılandığını göstermişlerdir. Aynı grup aynı hücre hatlarında Sorafenib'inin ADAM 10'un

ekspresyonunu ve aktivitesini inhibe ederek MICA'nın metalloproteinazlar tarafından baskılanmasını sağlamışlardır^{137,138}.

MICA ve MICB'nin ısı şok, viral ve bakteriyel infeksiyonlarla indüklenmesine rağmen, MICA ve MICB ekspresyonunu düzenleyen farmakolojik ajanlar ile ilgili çalışmalar çok yetersizdir. Jinushi ve arkadaşları insan hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında (HepG2 ve Huh7) ve dokularında MICA ve MICB'nin ekspresyonunu, rolünü ve retinoik asid tarafından düzenlenmesini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, MICA ve MICB'nin hepatosellüler karsinoma hatlarının yanı sıra insan hepatosellüler karsinoma dokularındanda eksprese olduğunu, hepatoma hücrelerine karşı NK sitolizinde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. Ayrıca retinoik asidin hepatosellüler karsinomada MICA ve MICB ekspresyonun bir modülatörü olarak işlev gördüğünü ve bu davranışından dolayı NK hücrelerini aktive ettiğini, tümöre karşı ajan olarak hareket edebileceğini göstermişlerdir⁷².

Tang ve arkadaşları hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında (HepG2 ve HEK293T) primidin analogu olan 5 Aza- 2 deoksisitidin (5-aza-Dc)'in MICB üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda promotor bölgesindeki demetilasyonun MICB transkriptini stimüle ettiğini ayrıca MICA ve MICB gen ekspresyon artışına yol açarak DNA hasarını indüklediğini rapor etmişlerdir¹³⁹.

Bu çalışmada hepatosellüler karsinoma hücre hattı olan, HepG2 ve Huh 7'de, 24, 48 ve 72 saatlik 0,5 mM FFA'lı ve VD₂'li tedavinin MICA ve MICB gen ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak HepG2 hücre hattında VD₂'nin, 24, 48 ve 72 saatlik tedaviden sonra MICA gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde azalttığı, 24, 48 saatlik 0,5 mM FFA'lı tedaviden sonra MICA gen ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlenmezken sadece 72 saatlik 0,5 mM FFA'lı tedaviden sonra anlamlı bir azalma saptanmıştır (Şekil 21-23). VD₂'nin 24, 48 saatlik tedaviden sonra MICB gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde azalttığı, 72 saatlik tedaviden sonra ki azalmanın anlamlı bir düzeyde olmadığı, 24, 48 saatlik 0,5 mM FFA'lı tedaviden sonra MICB gen ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlenmezken sadece 72 saatlik 0,5 mM FFA'lı tedaviden sonra anlamlı bir azalma saptanmıştır (Şekil 24-26). Huh 7 hücre hattında ise VD₂ ile 24, 48 saatlik tedaviden sonra MICB gen ekspresyonunun etkilenmediği, 72 saatlik tedaviden sonra gen ekspresyonunun anlamlı

olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca MICB gen ekspresyonunun FFA tedavisinden etkilenmediği de gözlenmiştir (Şekil 27-29).

Vitamin D nin aktif formu kalsiyum metabolizmasının, immun cevabın, hücre proliferasyonu ve diferansiasyonunun düzenlenmesinde ve bu durumlarla ilişkili birçok hastalıkla doğrudan bağlantılıdır. Bu işlevlerine ek olarak güçlü antiproliferatif, prodiferansiyatif, proapoptotik ve immunomodülatör etki göstermektedir. Hücre siklusu, apoptoz ve farklılaşmayı içeren pek çok kompleks genlerin transkripsiyonunu düzenler. Nunn ve arkadaşları vitamin D'nin aktif formunun insan tonsillerindeki T lenfositlerinin proliferasyonunu düzenlediğini göstermişlerdir. Morgan ve arkadaşları insan B lenfosit alt grubunda vitamin D'ye bağımlı gen düzenlemesi olduğunu saptamışlardır. Canning ve arkadaşları ise aktif vitamin D'nin monositlerden aktif immature dendritik hücrelerin matürasyonunu engellediğini göstermişlerdir^{78, 140-143}.

Vitamin D inflamatuvar süreçlerde rol oynayan, ekstrasellüler matriksin yıkımını sağlayan, ekstrasellüler proteinazların önemli bir üyesi olan matriks metalloproteinazların (MMP) belirli tiplerini inhibe etmektedir. Bu bulgular kronik karaciğer hastalığıyla doğrudan ilişkilidir. Hepatositler MMP ve doku inhibitörlerinin major kaynağıdır ve bunların üretimi sirozun varlığından etkilenmezler. Bu yüzden, kronik karaciğer hastalığında vitamin D eksikliği hepatik fibrozisin ilerlemesine neden olmaktadır¹⁰⁰.

Vitamin D eksikliği kanser, kronik karaciğer hastalıkları, otoimmün hastalıklar, insülin direnci ve diyabet gibi çok yaygın ve ciddi patolojik durumlarla bağlantılıdır. Ayrıca, kronik karaciğer hastalarında vitamin D eksikliği hepatik fibrozisin ilerlemesine yol açmaktadır. Petta ve arkadaşları vitamin D düzeyinin azalmasının fibrozisle bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. Bazı çalışmalarda da kronik hepatitisli ve sirozlu hastalarda düşük serum 25(OH) vitamin D düzeyi saptanmıştır. Targher ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada NAFLD hastalarda serum 25(OH) vitamin D düzeyinin azaldığı gösterilmiştir^{91,96, 99}.

Bazı deneysel çalışmalarda, vitamin D'nin oksitadif strese karşı korumada rolü olduğu, fibroblastların gen ekspresyonunda etkili olduğu ve hepatik stellat hücrelerin fibrojenik aktivitesini azalttığı rapor edilmiştir. Son yıllarda, malignant hücre hatlarında 1,25(OH)₂D₃'ün antiproliferatif etkisini göstermek için yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Ancak vitamin D'nin karaciğer kanserinde ilaç tedavisinde kullanımıyla

ilgili çalışmalar çok yetersizdir. Akhter ve arkadaşları 1,25(OH)₂D₃'ün hepatoblastoma hücre hattı HepG2'nin proliferasyonunu inhibe ettiğini, Brelvi ve arkadaşları hepatoma hücre hatlarının büyümesini baskıladığını göstermişlerdir. Bu çalışmaya paralel olarak Pourgholari ve arkadaşları da 1,25(OH)₂D₃'ün çok sayıda sıçan ve insan karaciğer hücre hatlarında (Hep-3B, PLC/PRF/5 ve SKHEP-1) hücre proliferasyonunu önemli düzeyde inhibe ettiğini rapor etmişlerdir¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Bu çalışmada ise insan hepatosellüler karsinoma hücre hatlarından, HepG2 ve Huh7'de VD₂ tedavisinin stres ligand genleri olan MICA ve MICB genlerinin gen ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak HepG2 hücrelerinde 24,48 ve 72 saat VD₂'li tedavinin hem MICA hem de MICB gen ekspresyonunu önemli düzeyde azalttığını, Huh7 hücreler üzerinde ise sadece 72 saat VD₂'li tedavinin MICB gen ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır (Şekil 21-29).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Hepatik stellat hücrelerde ve hepatosellüler karsinomada Vitamin D'nin profibrojenik genler ve stres ligand genleri üzerine olan etkisi hala bilinmemektedir. Bu amaçla bu tez çalışmasında, hepatik stellat hücre hattı olarak LX-2 ve primer insan hepatik stellat hücre, hepatosellüler karsinoma hücre hattı olarak da, HepG2 ve Huh 7 hücre hattı kullanılarak FFA ve VD₂'nin profibrojenik genler ve stres ligand genleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak;

1. FFA'nın profibrojenik genlerin üretimi için in vitro ortamda LX-2 hücrelerini aktive ettiği gözlenmiştir.
2. VD₂'nin stres koşulları altında aktive olmuş LX-2 hücrelerinde profibrojenik genlerin ekspresyonunu azalttığı ve iyileştirdiği gözlenmiştir.

LX-2 hücrelerinde, 0,5 mM FFA ve 1 mM FFA'lı inkübasyondan sonra α -SMA'nın, 0,5 mM FFA'lı inkübasyondan sonra da TGF- β 'nin mRNA ekspresyonunda artış gözlenmiştir. VD₂'nin eklenmesinden sonra da bu artışın önemli bir düzeyde azaldığı gözlenmiştir. COL-1 α 'nın ise mRNA ekspresyonu hem VD₂ hem de FFA'lı inkübasyondan sonra azaldığı gözlenmiştir.

3. LX-2 hücrelerinde FFA girişi stres ligand geni olan MICA'nın gen ekspresyonunun artmasına yol açtığı fakat MICB gen ekspresyonunu etkilemediği gözlenmiştir.

LX-2 hücrelerinde, 1 mM FFA'lı inkübasyondan sonra MICA mRNA ekspresyonunda önemli bir düzeyde artış gözlenmiş. Fakat MICB ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca 0,5 mM FFA'lı inkübasyondan sonra da MICA ve MICB gen ekspresyonunda değişiklik gözlenmemiştir.

4. VD₂'nin primer hepatik stellat hücrelerde stres ligand genlerinin gen ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir.

0,25 mM FFA'lı pre-inkübasyonlu hücrelere VD₂ eklenmesinden sonra MICB mRNA ekspresyonunda azalma gözlenmiştir.

5. VD₂ tedavisinin HepG2 hücre hattında MICA gen ekspresyonunda önemli bir etkisi olduğu gözlenmiştir.
6. VD₂ tedavisinin Huh7 hücre hattında ancak 72 saatlik tedaviden sonra MICB gen ekspresyonunda önemli bir etkisi olduğu gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre;

1. VD₂'nin in vitro ortamlarda hepatik stellat hücrelerin inflamatuvar ve profibrojenik aktivitesini azaltabileceği,
2. MICA ve MICB'nin karaciğer hasarında önemli olabileceği,
3. MICA ve MICB'nin ekspresyonu ve onların NK hücreler tarafından tanımlanması, hasar görmüş (NASH sırasında yağ infiltrasyonu tarafından) enfekte olmuş ya da malignant transforme olmuş hücreler tarafından bulunması için bir mekanizma olarak hizmet verebileceği,
4. Vitamin D ve onun türevlerinin hepatik stellat hücre ve hepatosellüler karsinoma üzerine olan etkilerinin bu çalışmada gözlemlendiği gibi VD₂ tedavisinden sonra bazı genlerin ekspresyonlarının önemli oranda azalması VD₂'nin karaciğer fibrozisin tedavisinde potansiyel bir destek olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. **Bosch FX, Ribes J, Cleries R, Diaz M.** Epidemiology of hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis, **2005**;9:191-211.
2. **Wong CM, Ng IO.** Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. Liver Int, **2008**;28:160-174.
3. **El-Serag HB, Rudolph KL.** Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology, **2007**;132: 2557-2276.
4. **Toylu A.** Hepatosellüler karsinoma hücre dizilerinde hipoksi ve radyasyon stresine karşı hücrenin direnç geliştirmesinde HGF sinyal iletimi sisteminin rolünün belirlenmesi. Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2007**.
5. **Park BC, Huh MH, Seo JH.** Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. J Hepatol, **1995**;22:286-294.
6. **Ghiassi-Nejad Z, Friedman SL.** Advances in anti-fibrotic therapy. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, **2008**;2: 803–816.
7. **Friedman SL.** Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem, **2000**;275:2247-2250.
8. **González S, Groh V, Spies T.** Immunobiology of human NKG2D and its ligands. Curr Top Microbiol Immunol, **2006**; 298:121-138.
9. **Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB.** Cancer incidence in five continents. IARC Sci Publ, **2002**;155:1-781.
10. **Bozkaya G.** Hepatosellüler karsinoma gelişiminde hepatosit büyüme faktörü/c-Met yolağı ile Musin1 ve Musin20 arasındaki etkileşimin rolü. Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2009**.
11. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, **2005**;55:74-108.
12. **Yu MW, Chen CJ.** Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. Cancer Res, **1993**; 53:790-794.
13. **Thorgeirsson SS, Lee J, Grisham JW.** Functional genomics of hepatocellular carcinoma. Hepatology, **2006**;43:145-150.
14. **Feitelson MA, Sun B, Tufan NLS, Liu J, Pan J, Lian Z.** Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. Oncogene, **2002**;21:2593-2604.
15. **Kunter İ.** Hepatosellüler karsinomada IP3 kinaz sinyal yolağının önemi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2007**.

16. **Raidl M, Pirker C, Schulte-Hermann R, Aubele M, Kandioler-Eckersberger D, Wrba F, Micksche M, Berger W, Grasl-Kraupp B.** Multiple chromosomal abnormalities in human liver (pre)neoplasia. *J Hepatol*, **2004**;40:660-668.
17. **Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S.** Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis—A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **2000**; 32: 970-979.
18. **Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL.** Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J*, **2002**;16:935–942.
19. **Bird A.** Perceptions of epigenetics. *Nature*, **2007**; 447: 396–398.
20. **Sümbül AT.** Hepatosellüler karsinomalı hastalarda p53 kodon72 ve MDM2 snp309 gen polimorfizimlerinin sıklığı ve tümöre ait karakteristiklerle karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi. Adana, **2008**.
21. **Çokaklı M.** Hepatosellüler karsinoma dokularında ve hücre hatlarında kaveolin-c-Met ilişkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2006**.
22. **Friedman SL.** Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol*, **1997**;32:424-430.
23. **Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A.** Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, **1998**;27:720–726.
24. **Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A, Surrenti C, Casini A.** Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology*, **2005**;41:1074–1084.
25. **Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z.** Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, **2000**;31:141–148.
26. **Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O.** Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology*, **2002**;35:1010-1021.
27. **Gao B, Jeong WI, Tian Z.** Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*, **2008**;47:729-736.
28. **Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A.** Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis*, **2007**;27:339–350.
29. **Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ.** Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest*, **2003**;83:655-663.
30. **Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, Torok NJ.** Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* **2006**;43:435-443.

31. **Canbay A, Friedman S, Gores GJ.** Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*, **2004**;39:273-278.
32. **Fartoux L, Poujol-Robert A, Guechot J, Wendum D, Poupon R, Serfaty L.** Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut*, **2005**;54:1003-1008.
33. **Friedman SL.** Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol*, **2003**;38:38-53.
34. **Bağcı P.** Fibrojeniz ile TGFβR-1 ve SSTR-1 ekspresyonları arasındaki ilişkinin kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma olgularında değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul*, **2007**.
35. **Wells RG.** Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*, **2008**;12:759-768.
36. **Temel S, Gökçimen A.** Karaciğer yıldız hücreleri (Ito Hücreleri). *T Klin J Med Sci*, **2002**;22:342-348.
37. **Borkham-Kamphorst E, Van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R.** Profibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol*, **2007**;46:1064-1074.
38. **Lechuga CG, Hernandez-Nazara ZH, Hernandez E, Bustamante M, Desierto G, Cotty A, Dharker N, Choe M, Rojkind M.** PI3K is involved in PDGF-beta receptor upregulation post-PDGF-BB treatment in mouse HSC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2006**;291:1051-1061.
39. **Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL.** Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest*, **1994**;94:1563-1569.
40. **George J, Wang SS, Sevcik AM, Sanicola M, Cate RL, Koteliensky VE, Bissell DM.** Transforming growth factor-beta initiates wound repair in rat liver through induction of the EIIIA-fibronectin splice isoform. *Am J Pathol*, **2000**;156:115-124.
41. **Rachfal AW, Brigstock DR.** Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res*, **2003**;26:1-9.
42. **Grotendorst GR.** Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev*, **1997**;8:171-179.
43. **Arthur MJ.** Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2000**;279:245-249.
44. **Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabró A, Ciancio G, Stefanini F.** Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol*, **1994**;144:528-537.
45. **Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW.** Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, **2008**;134:657-667.
46. **Örnek O.** IL-12 ve IL-15 ile uyarılmış insan NK hücrelerinin kolon karsinomuna yönelik anti-tümöral etkileri. *Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul*, **2007**.
47. **Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Peña J, Solana R, Coligan JE.** Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Molec Immunol*, **2002**;38:637-660.

48. Gruen JR, Weissman SM. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood*, **1997**; 90:4252-4265.
49. Oğuz F, Karahan G, Özdilli K, Çarın M. MHC and MIC genes autoimmunity. *Turk J Immunol*, **2005**;10:1-7.
50. Hughes AL, Nei M. Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes. *Immunogenetics*, **1993**;37:337-346.
51. Shankarkumar U. The Human leukocyte antigen (HLA) system. *Int J Hum Genet*, **2004**;4:91-103.
52. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*, **2002**;17:19-29.
53. Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, Nanni M, Biassoni R, Bottino C, Moretta A, Moretta L. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol*, **2001**;31:1076-1086.
54. Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, Trowsdale J. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol*, **2004**;173:1078-1084.
55. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**; 91: 6259-6263.
56. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, **2001**;14:123-133.
57. Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE, Girardi M, Hayday AC. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumour immunosurveillance. *Nat Immunol*, **2005**;6, 928-937.
58. Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, **2002**;13:155-168.
59. Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, Interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol*, **2005**;86:209-239.
60. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, **1999**;285:727-729.
61. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, **2003**;3:781-790.
62. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, **1999**;285:730-732.
63. Petersdorf EW, Schuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA. Population study of allelic diversity in the human MHC Class-I Related MIC-A gene. *Immunogenetics*, **1999**;49:605-612.
64. Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved. *Trends Immunol*, **2001**;22:378-385.

65. **Bahram S, Inoko H, Shiina T, Radosavljevic M.** MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol*, **2005**;17:505-509.
66. **Yiğitbaştürk E.** Türk populasyonunda yüksek rezolusyon MHC Class-I Related Chain A (MICA) genotiplemesi, HLA-B – MICA haplotiplerinin incelenmesi ve yeni MICA alellerinin araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2006**.
67. **Zwirner NW, Fuertes MB, Giart MV, Domaica CI, Rossi LE.** Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: Role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rew*, **2007**;18:169-170.
68. **Notas G, Kisseleva T, Brenner D.** NK and NKT cells in liver injury and fibrosis. *Clin Immunol*, **2009**;130:16-26.
69. **Jeong WI, Park O, Radaeva S, Gao B.** STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology*, **2006**;44:1441-1451.
70. **Coudert JD, Held W.** The role of the NKG2D receptor for tumor immunity. *Sem Cancer Bio*, **2006**;16:333-343.
71. **Chuang WL, Liu HW, Chang WY.** Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma relative to early development and tumor invasion. *Cancer*, **1990**;65:926-930.
72. **Junushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y, Hayashi N.** Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer*, **2003**;104:354-361.
73. **Kahraman A, Schlattjan M, Kocabayoğlu P, Yildiz-Meziletoglu S, Schlensak M, Fingas CD, Wedemeyer I, Marquitan G, Gieseler RK, Baba HA, Gerken G, Canbay A.** Major histocompatibility complex Class I-Related Chains A and B (MIC A/B): a novel role in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, **2010**; 51:92-102.
74. **Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N.** Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) Class I-Related Chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, **2008**;99:1643-1649.
75. **Holdenrieder S, Eichhorn P, Beuers U, Samtleben W, Stieber P, Nagel D, Peterfi A, Steinle A, Salih HR.** Soluble NKG2D ligands in hepatic autoimmune diseases and in benign diseases involved in marker metabolism. *Anticancer Res*, **2007**; 27: 2041-2045.
76. **Shihadeh Y.** Güneşe maruz kalma şekillerinin D vitamini üretimindeki rolü. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, **1998**.
77. **Zempleni, J. Rucker RB, McCormick Suttie JW.** Handbook of Vitamins. 4th ed. CRC Press. New York. **2007**: 315-359.
78. **Özkorkmaz EG.** Vitamin D ve biyolojik önemi. *Bibad*, **2009**; 2: 11-15.
79. **Şimşek E, Kocabay K.** Calcium, phosphorus and magnesium homeostasis. *Türkiye Klinikleri J Pediatr*, **2002**; 11:211-220.
80. **Nowson CA, Margerison C.** Vitamin D intake and vitamin D status of Australians. *M J A*, **2002**;177:149-52.
81. **Yener M.** Fibromyalji'li hastalarda serum 25-hidroksi D vitamini ve parathormon düzeyleri. Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, **2005**.

82. **Erçin S.** 1-24 ay arası sağlıklı süt çocuklarında serum 25-OHD düzeyi. Uzmanlık Tezi, Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2008**.
83. **Kulaylat N.** Hypocalcemic focal convulsions. *Pediatr Int*, **2004**; 19:36-38.
84. **Root VA.** Regulation of Mineral Homeostasis. In: Rudolph AM, Rudolph's Pediatrics, London. Appleton Lange, **1996**;1837-1849.
85. **Nagpal S, Na S, Rathnachalam R.** Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligand. *Endocr Rev*, **2005**;26:662-687.
86. **Mangelsdorf DJ, Koeffler HP, Donaldson CA, Pike JW, Haussler MR.** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60):receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *J Cell Biol*,**1984**;98:391-398.
87. **Kanlı A.** Vitamin D₃ (1,25 (OH)₂ D₃) ile işlenmiş HL-60 hücrelerinde gen anlatımının zamana karşı değişiminin analizi. Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, **2007**.
88. **Van Etten E, Mathieu C.** Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2005**; 97:93-101.
89. **Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA.** 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol*, **2001**;145:351-357.
90. **Aydın S.** Tonsillektomi olmuş çocuklarda serum D vitamini düzeyleri ve gen polimorfizmleri. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, **2009**.
91. **Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A.** Vitamin D status, 1,25- dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr*, **2004**;80:1717-1720.
92. **Robinson PD, Hogler W, Craig ME, Verge CF, Walker JL, Piper AC, Woodhead HJ, Cowell CT, Amber GR.** The re-emerging burden of rickets: a decade of experience from Sydney. *Arch Dis Child*, **2006**; 91 :564-568.
93. **Wortsman J, Matsouka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF.** Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*, **2000**;72:690-693.
94. **DeLuca HF.** Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*, **2004**;80:1689–1696.
95. **Arteh J, Narra S, Nair S.** Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Dig Dis Sci*, **2010**;55:2624-2628.
96. **Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, Arcaro G.** Associations between serum 25-hydroxyvitamin D₃ concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **2007**;17:517-524.
97. **Tsuneoka K, Tameda Y, Takase K, Nakano T.** Osteodystrophy in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *J Gastroenterol*, **1996**;31:669–678.
98. **Masuda S, Okano T, Osawa K, Shinjo M, Suematsu T, Kobayashi T.** Concentrations of vitamin D-binding protein and vitamin D metabolites in plasma of patients with liver cirrhosis. *J Nutr Sci Vitaminol*, **1989**;35:225-234.

99. **Petta S, Camma` C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Cabibi D, Licata G, Porcasi R, Marchesini G, Craxi A.** Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology*, **2010**;51:1158-1167.
100. **Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, Aganna E, Price CP, Boucher BJ.** Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM*, **2002**;95:787-796.
101. **Dobak J, Grzybowski J, Liu FT, Landon B, Dobke M.** 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ increases collagen production in dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*, **1994**;8:18-24.
102. **Akhter J, Hassiotis V, Bolton EJ, Morris DL.** Profound inhibition of human hepatoma cell line by vitamin D3 and analogues. *Aust NZ Surg*, **1998**; 68: 520.
103. **Brelvi ZS, Leavy CV, Franzese J.** Vitamin D3 induced growth suppression of hepatoma cells. *Clin Res*, **1991**;39:149.
104. **Pourgholami MJ, Akhter J, Lu Y, Morris DL.** In vitro and in vivo inhibition of liver cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Cancer Lett*, **2000**;151:97-102.
105. www.turkchaygen.gov.tr/doc/cellculture_handbook.pdf. Erişim Tarihi:15/01/2011.
106. **Arıkan H.** İnsan korpus kavernozum hücre kültürü oluşturulması. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, **2008**.
107. **Yaylalı C.** Tendon kılıfı fibroblastlarının hücre kültüründe tenositlere farklılaşması ve tenositlerin sentezlediği kollajen tiplerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2007**.
108. **Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ.** Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, **2005**;54:142-151.
109. **Bechmann LP, Zahn D, Gieseler RK, Fingas CD, Marquitan G, Jochum C, Gerken G, Friedman SL, Canbay A.** Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells. *Hepatol Res*, **2009**;39:601-608.
110. www.qiagen.com/hb/rneasyminikit_en. Erişim Tarihi:10/10/2010.
111. **Gieseler RK, Marquitan G, Schlattjan M, Sowa JP, Bechmann LP, Timm J, Roggendorf M, Gerken G, Friedman SL, Canbay A.** Amplified activation of hepatic stellate cells by HCV-infected hepatocyte apoptotic bodies: implications for chronic HCV infection. *J Viral Hepat*, **2010**.
112. www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=252. Erişim Tarihi:10/10/2010
113. <http://www.qiagen.com/products/pcr/quantitectpcrsystems/quantitectsybrgreenrtprkit.aspx>. Erişim Tarihi:15/01/2011.
114. **Turhan H.** Mide kanserli hastalarda periferik kanda telomeraz mRNA ekspresyonunun real time PCR kullanılarak belirlenmesi ve klinikopatolojik özelliklerle ilişkisinin saptanması. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, **2008**.
115. **Uzun D.** Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında HER-2/NEU ve EGFR genlerinin real time PCR yöntemiyle incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, **2008**.

116. <http://frodo.wi.mit.edu>. Erişim Tarihi:20/03/2010.
117. **Seydel ř, Akkiz H, Canbay A.** NASH'da yenilikler. Hepatoloji 2010 Sempozyumu. Ankara, 2010.
118. **Kılıçarslan A, Saner F, Menziletoğlu SY, Akkiz H, Gerken G, Canbay A.** Karaciğerdeki lipid metabolizması. İç Hastalık Der, 2009;16:82-91.
119. **Lavoie JM, Gauthier MS.** Regulation of fat metabolism in the liver: Link to nonalcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. Cell Mol Life Sci, 2006;63:1393-1409.
120. **Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ.** Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. J Hepatol, 2003;39:978-983.
121. **Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ.** Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. Hepatology, 2004;40:185-194.
122. **Canbay A, Gieseler RK, Gores GJ, Gerken G.** The relationship between apoptosis and non-alcoholic fatty liver disease: an evolutionary cornerstone turned pathogenic. Z Gastroenterol, 2005; 43: 211–217.
123. **Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, Hotamisligil GS.** Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. Ann Intern Med, 2010;92:1350-1358.
124. **Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, Hotamisligil GS.** Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: a cohort study. Ann Intern Med, 2010;153:790-799.
125. **Donnelly KL, Smith CL, Schwarzenberg SJ, Jessurum J, Boldt MD, Parks EJ.** Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest, 2005;115:1343-1351.
126. **Mas RF.** Deneysel karaciğer fibrozisinde Peginterferon alfa 2b ve taurin tedavilerinin spontan gerilemeye katkısının invivo ve invitro değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2004.
127. **Mezey E, Liu X, Potter JJ.** The combination of selenium and vitamin E Inhibits type I collagen formation in cultured hepatic stellate cells. Biol Trace Elem Res, 2010.
128. **Battaller R, Brenner Da.** Hepatic stellate cells as a target for treatment of liver fibrosis. Sem Liver Disease, 2001;21:427-436.
129. **Timbrell JA, Waterfield CJ.** Changes in taurine as an indicator of hepatic dysfunction and biochemical perturbations. Adv Exp Med Biol, 1996; 403:125-134.
130. **Border WA, Noble NA.** Mechanism of disease TGF- β in tissue fibrosis. N Engl J Med, 1994;331:1286-1292.
131. **García-Trevijano ER, Iraburu MJ, Domínguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A, Rojkind M.** Transforming growth factor β 1 induces the expression of α 1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBP β -dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. Hepatology, 1999; 29:960-970.
132. **Liu X, Hu H, Yin JQ.** Therapeutic strategies against TGF- β signaling pathway in hepatic fibrosis. Liver International, 2006; 26: 8–22.

133. **Ye Y, Dan Z.** All-trans retinoic acid diminishes collagen production in a hepatic stellate cell line via suppression of active protein-1 and c-Jun N-terminal kinase signal. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2010;30:726-733.
134. **Hsiao YW, Liao KW, Chung TF, Liu CH, Hsu CD, Chu RM.** Interactions of host IL6 and IFN gamma and cancer-derived TGF- β 1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol Immunother*, 2008; 57:1091–1104.
135. **Kim R, Emi M, Tanabe K, Uchida Y, Toge T.** The role of Fas ligand and transforming growth factor β in tumor progression. *Cancer*, 2004; 100: 2281–2291.
136. **Zhang S, Hüe S, Sène D, Penfornis A, Bresson-Hadni S, Kantelip B, Caillat-Zucman S, Vuitton DA.** Expression of major histocompatibility complex class I chain–related molecule A, NKG2D, and transforming growth factor–beta in the liver of humans with alveolar echinococcosis: new actors in the tolerance to parasites?. *J Infect Dis*, 2008;197:1341-1349.
137. **Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N.** Sorafenib inhibits the shedding of major histocompatibility complex class I-related chain A on hepatocellular carcinoma cells by down-regulating a distintegrin and metalloproteinase 9. *Hepatology*, 2010; 51:1264-1273.
138. **Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N.** Anticancer chemotherapy Inhibits MHC Class I–Related chain A ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2009; 69:8050-8057.
139. **Tang KF, He CX, Zeng GL, Wu J, Song GB, Shi YS, Zhang WG, Huang AL, Steinle A, Ren H.** Induction of MHC Class I-Related Chain B (MICB) by 5-aza-20-deoxycytidine. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008;370:578-583.
140. **Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP.** Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, 2004;338:143-156.
141. **Nunn JD, Katz DR, Barker S, Fraher LJ.** Regulation of human tonsillar T-cell proliferation by active metabolite of vitamin D₃. *Immunolgy*, 1986; 59: 479-484.
142. **Morgan JW, Kouttab N, Ford D, Maizel AL.** Vitamin D-mediated gene regulation in phenotypically defined human B cell subpopulations. *Endocrinology*, 2000;141:3223-3225.
143. **Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA.** 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol*, 2001;145:351-357.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana’da doğdu. İlk ve orta öğretimini burada tamamladıktan sonra 2000 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde öğrenimine başladı ve 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansına, 2007 yılında da doktora programına başladı. 2009-2010 yıllarında Erasmus staj hareketliliği ve öğrenim hareketliliği programı çerçevesinde Almanya Duisburg-Essen Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji ve Hepatoloji Bölümü, Moleküler Hepatoloji laboratuvarında 15 ay boyunca proje çalışmalarında yer aldı.