



**KRONİK KARACİĞER FİBROZU OLUŞTURULAN
GENÇ VE YAŞLI FARELERDE İNFLAMATUAR VE
ANTI-İNFLAMATUAR SİTOKİN GENLERİNİN İFADE
EDİLME DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynal Mete KARACA

**TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM
DALI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Başak KAYHAN
Doktora Tezi-2020**

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

**KRONİK KARACİĞER FİBROZU OLUŞTURULAN GENÇ VE YAŞLI
FARELERDE İNFLAMATUAR VE ANTI-İNFLAMATUAR SİTOKİN
GENLERİNİN İFADE EDİLME DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynal Mete KARACA

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

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

Bu Araştırma TÜBİTAK Tarafından
217S290 Proje Numarası ile Desteklenmiştir.

**MALATYA
2020**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer.....	3
2.2. Karaciğer Fibrozu.....	4
2.2.1. Fibrozda Ekstraselüler Matriks	7
2.3. Fibrozis ve İmmün Sistem İlişkisi.....	8
2.4. Sitokinler.....	9
2.5. Fibroziste Doğal Bağışıklık Hücreleri	10
2.5.1. Hepatik Makrofajlar	10
2.5.2. NK ve NKT hücreleri.....	11
2.5.3. Dendritik Hücreler	12
2.5.4. Nötrofiller	13
2.6. Fibrozda Kazanılmış Bağışıklık	13
2.7. İmmünoşenesens.....	16
2.8. Yaşlılık ve Karaciğer	18
2.9. Dalak ve Fibrozis İlişkisi	20
2.10. Thioacetamide (TAA) Aracılı Karaciğer Fibroz Modeli	21
2.11. Fibrozun Çözünmesi ve Anti-fibrotik Stratejiler.....	22
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	25
3.2. Farelerin Temini ve Bakımı.....	27
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	27
3.4. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri	28
3.5. Karaciğerde Fibroz Tespiti	28

3.6. ELISA Analizleri	28
3.7. Mikroskopik Analizler.....	29
3.7.1. Hematoksilen-Eozin Boyama	29
3.7.2. Periyodik Asit-Schiff Boyama.....	30
3.7.3. Trikrom Boyama	31
3.7.4. İmmunohistokimyasal Boyama	32
3.8. Kesitlerin İncelenmesi	32
3.9. Transmisyon Elektron Mikroskopi.....	33
3.10. Moleküler Analizler	34
3.10.1. RNA Saflaştırma.....	34
3.10.2. Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi.....	35
3.10.3. Gerçek Zamanlı PZR ile Gen İfadesinin Tayini	35
3.10.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi	37
3.11. İstatistiksel Analizler.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Vücut/Karaciğer Ağırlığı ve Biyokimyasal Analizler	38
4.2. Makroskopik Gözlemler	39
4.3. Histolojik Değerlendirmeler	39
4.4. Knodell Skorumla	44
4.5. Transmisyon Elektron Mikroskopik Bulgular	44
4.6. Moleküler Genetik Bulgular.....	47
4.6.1. RNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	47
4.6.2. Gerçek Zamanlı PZR ile Gen İfadesi Analizi Bulguları	49
4.7. İnflamatuar Yanıttan Sorumlu Sitokin Genlerinin (<i>IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IFN-γ ve TNF-α</i>) İfade Edilme Düzeyleri	57
4.8. Anti-İnflamatuar İmmün Yanıttan Sorumlu Sitokin Genlerinin (<i>IL-4, IL-10, TGF-β</i>) İfade Edilme Düzeyleri.....	63
4.9. İnflamatuar ve Anti-İnflamatuar Sitokinlerin Salınımında Rol Alan Transkripsiyon Faktörü Genlerinin (<i>FOXP3, GATA3, RORγT, TBET</i>) İfade Edilme Düzeyleri.....	66
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	79

KAYNAKLAR	80
EK-1. DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI	93
EK-2. ÖZGEÇMİŞ	94



TEŐEKKÜR

Çalıőmalarım esnasında yardımlarımı esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Histoloji ve Embriyoloji AD öğretim elemanlarına teőekkür ederim.



ÖZET

Kronik Karaciğer Fibrozu Oluşturulan Genç ve Yaşlı Farelerde İnflamatuar ve Anti-İnflamatuar Sitokin Genlerinin İfade Edilme Düzeyinin Araştırılması

Amaç: Vücudumuzdaki en büyük organ olan karaciğerin immün sistem üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Projemizin amacı, kronik karaciğer fibrozu esnasında karaciğer ve sekonder lenfoid organ olan dalakta gelişen hücresel yanıtın moleküler düzeyde analizi ve ayrıca genç ve yaşlı deneklerden elde edilen verilerin karşılaştırılarak yaşlanmanın karaciğerdeki immün yanıt üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Kronik fibroz modeli oluşturmak amacıyla BALB/c farelere ip. Thioacetamide enjeksiyonu yapılmıştır. Tüm gruplarda karaciğer ve dalak dokularında inflammatuar ve anti-inflamatuar sitokin genlerinin ifade edilme düzeyleri araştırılmış, karaciğer dokularında histolojik ve immünohistokimyasal analizler yapılmıştır.

Bulgular: Genç fibrotik deneklerin karaciğer dokularında *TNF- α* , *IL-10* ve *TGF- β* gen ifade düzeyleri genç naive deneklere göre artış gösterirken, *ROR- γ* , ve *IFN- γ* gen ifade düzeylerinde azalma saptanmıştır. Dalak dokularında ise *GATA-3*, *FOXP3* ve *TNF- α* gen ifade düzeyleri artış göstermiştir. Yaşlı fibrotik deneklerin karaciğer dokularında *ROR- γ* , *T-bet*, *IL-10* ve *IFN- γ* gen ifadeleri yaşlı naive deneklere göre azalmaktadır. Dalakta ise *T-bet* ve *IFN- γ* gen ifade seviyeleri azalmıştır. Yaşlanma ile beraber karaciğer dokusunda *T-bet*, *IL-10* ve *TGF- β* gen ifadelerinde artış saptanmıştır. Ayrıca yaşlı deneklerin dalaklarında *TGF- β* , *IL-17*, *ROR- γ* ve *IL-2* dışındaki tüm genlerin ifade düzeyleri artmıştır.

Sonuç: Karaciğer fibrozu esansında genç bireylerde karaciğerin hem inflammatuar hem de anti-inflamatuar yanıtı desteklediği, dalakta ise anti-inflamatuar yanıtı desteklediği anlaşılmaktadır. Yaşlanmaya bağlı olarak fibroza karşı verilen immün yanıtın farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Fibrozis, Karaciğer, Dalak, Sitokin

ABSTRACT

Investigation of the Expression Level of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokine Genes in Young and Aged Mice with Chronic Liver Fibrosis

Aim: The effect of the liver, the largest organ in our body, on the immune system is not fully known. The aim of our project is to analyze the cellular response that develops in the liver and the spleen, at molecular level during chronic liver fibrosis, and also to investigate the effect of aging on the immune response in the liver by comparing the data obtained from young and old subjects.

Material and Method: In order to create chronic fibrosis model thioacetamide was injected via i.p route to BALB/c mice. The expression levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokine genes in liver and spleen tissues were investigated in all groups, and histological and immunohistochemical analyzes were performed on liver tissues.

Results: *TNF- α* , *IL-10* and *TGF- β* gene expression levels in liver tissues of young fibrotic subjects increased compared to young naive subjects, while *ROR- γ* , *IL-4* and *IFN- γ* gene expression levels decreased. *GATA-3*, *FOXP3* and *TNF- α* gene expression levels increased in spleen tissues. *ROR- γ* , *T-bet*, *IL-10* and *IFN- γ* gene expressions in the liver tissues of elderly fibrotic subjects decreased compared to elderly naive subjects. In the spleen, *T-bet* and *IFN- γ* gene expression levels decreased. *T-bet*, *IL-10* and *TGF- β* gene expressions increased in liver tissue as a result of aging. In addition, expression levels of all genes except *TGF- β* , *IL-17*, *ROR- γ* and *IL-2* increased in the spleens of elderly subjects.

Conclusion: Our findings reveal that the liver supports both the inflammatory and anti-inflammatory response in young individuals during liver fibrosis, while the spleen supports the anti-inflammatory response. It appears that the immune response to fibrosis varies depending on aging.

Key Words: Fibrosis, Liver, Spleen, Cytokine

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	:Alanin Aminotransferaz
AST	:Aspartat Aminotransferaz
Bcl-2	:B Hücresi Lenfoma 2
CCl₄	:Karbontetraklorür
CCL	:Kemokin Ligandı
CCR	:Kemokin Reseptörü
cDNA	:Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
ECM	:Ekstraselüler Matriks
ELISA	:Enzyme-Linked İmmunosorbant Assay
EMT	:Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FOXP3	:Forkhead Box P3
H&E	:Hematoksilen-Eozin
HBV	:Hepatit B Virüsü
HCV	:Hepatit C Virüsü
HSH	:Hepatik Stellat Hücre
IFN	:İnterferon
IgG	:İmmunoglobulin G
IL	:İnterlökin
LPS	:Lipopolisakkarit
MAPK	:Mitogen Activated Protein Kinase
MF	:Miyofibroblast
MHC	:Major Histocompabilty Complex
MMP	:Matriks Metalloproteinaz
mRNA	:Messenger Ribonucleic Acid
NASH	:Non Alkolik Steatohepatit
NF-κB	:Nükleer Faktör Kappa B
NK	:Doğal Katil Hücre
NKT	:Doğal Katil T Hücre

PAMP	:Patojenle İlişkili Moleküler Örgüler
PAS	:Periodik Asit Schiff
PBS	:Phosphate Buffered Saline
PPAR	:Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PRR	:Örgü Tanyan Reseptörler
PZR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RORγT	:RAR-Related Orphan Receptor Gamma T
SMA	:Smooth Muscle Actin
STAT	:Signal Transducer and Activator Of Transcription
TAA	:Thioacetamide
TAE	:Tris-Acetate-EDTA
TBET	:T-Box Transcription Factor
TEM	:Transmission Electron Microscope
TGF	:Transforming Growth Factor
T_H	:Yardımcı T Hücre
TIMP	:Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases
TLR	:Toll Benzeri Reseptör
TNF	:Tümör Nekroz Faktör
Treg	:Regülatör T Hücre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Sağlıklı Bir Karaciğer Sinüzoidal Lumen Yapısı ve Hücre Tipleri.	4
Şekil 2.2. Fibrotik Karaciğer Sinüzoidal Lümen Yapısı.	6
Şekil 2.3. Karaciğer Fibrozunda Miyofibroblast Hücrelerin Kaynakları.	7
Şekil 2.4. Fibrozda Rol Alan İmmün Sistem Hücreleri	9
Şekil 2.5. T Hücre Farklılaşmasında Görevli Sitokinler ve Transkripsiyon Faktörleri.	16
Şekil 4.1. Deneklerin Makroskopik Karaciğer Görüntüsü.	39
Şekil 4.2. H&E Boyama.	40
Şekil 4.3. Trikrom Boyama	41
Şekil 4.4. PAS Boyama	42
Şekil 4.5. IHC boyama	43
Şekil 4.6. Genç Naive Grup TEM görüntüleri.....	45
Şekil 4.7. Genç Fibroz Grup TEM görüntüleri.....	45
Şekil 4.8. Yaşlı Naive Grup TEM Görüntüleri.....	46
Şekil 4.9. Yaşlı Fibroz Grup TEM Görüntüleri.....	46
Şekil 4.10. RNA'ların %1 Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi.....	47
Şekil 4.11. Gerçek Zamanlı PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi.	49
Şekil 4.12. <i>IL-2</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	50
Şekil 4.13. <i>IL-4</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	50
Şekil 4.14. <i>IL-6</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	51
Şekil 4.15. <i>IL-10</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	51
Şekil 4.16. <i>IL-12</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	52
Şekil 4.17. <i>IL-17</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	52
Şekil 4.18. <i>IFN-γ</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	53
Şekil 4.19. <i>TNF-α</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	53
Şekil 4.20. <i>TGF-β</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	54
Şekil 4.21. <i>Tbet</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	54
Şekil 4.22. <i>RORγT</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.....	55
Şekil 4.23. <i>GAPDH</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.....	55
Şekil 4.24. <i>GATA3</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.....	56

Şekil 4.25. <i>FOXP3</i> Geninin Erime Noktası Grafiği.	56
Şekil 4.26. İnflamatuar Sitokin <i>IL-2</i> Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.	57
Şekil 4.27. İnflamatuar Sitokin <i>IL-6</i> Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.	58
Şekil 4.28. İnflamatuar Sitokin <i>IL-12</i> Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.	59
Şekil 4.29. İnflamatuar Sitokin <i>IL-17</i> Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.	60
Şekil 4.30. İnflamatuar Sitokin <i>IFN-γ</i> Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri. ...	61
Şekil 4.31. İnflamatuar Sitokin <i>TNF-α</i> Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.	62
Şekil 4.32. Anti-İnflamatuar Sitokin <i>IL-4</i> Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.	63
Şekil 4.33. Anti-İnflamatuar Sitokin <i>IL-10</i> Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.	64
Şekil 4.34. Anti-İnflamatuar Sitokin <i>TGF-β</i> Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.	65
Şekil 4.35. <i>FOXP3</i> Transkripsiyon Faktör Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Edilme Düzeyleri.	66
Şekil 4.36. <i>GATA3</i> Transkripsiyon Faktör Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Edilme Düzeyleri.	67
Şekil 4.37. <i>RORγt</i> Transkripsiyon Faktör Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Edilme Düzeyleri.	68
Şekil 4.38. Tbet Transkripsiyon Faktör Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Edilme Düzeyleri.	69

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar.....	25
Tablo 3.2. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal, Çözelti ve Kitler.	26
Tablo 3.3. Rutin Doku Takip İşlemleri.	29
Tablo 3.4. Hematoksilen&Eozin Boyama Yöntemi.	30
Tablo 3.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi.....	30
Tablo 3.6. Trikrom Boyama Yöntemi.....	31
Tablo 3.7. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi.	32
Tablo 3.8. Elektron Mikroskopta Doku Takibi ve Grid Boyama (Kontrastlama) Yöntemi.	34
Tablo 3.9. Kullanılan Primerlerin Özellikleri.	36
Tablo 4.1. Vücut /Karaciğer Ağırlık Oranları ve Biyokimyasal Değerlendirmeler.....	38
Tablo 4.2. Karaciğer Dokularında Histolojik Değerlendirme.....	44
Tablo 4.3. Elde Edilen RNA Miktarları ve Absorbans Değerleri.	48
Tablo 4.4. Dalak dokusunun gruplar arasındaki gen ifadesi kat değişimleri	70
Tablo 4.5. Karaciğer dokusunun gruplar arasındaki gen ifadesi kat değişimleri.....	71

1. GİRİŞ

Karaciğer fibrozu, karaciğerde meydana gelen çeşitli kronik hastalıklar nedeniyle ekstraselüler matris proteinlerinin yüksek miktarda birikmesi sonucu ortaya çıkan, patolojik bir durumdur ve dünya çapında morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir (1). Fibroz; hepatoselüler ölümün olduğu hastalıkların hemen hemen tümünde ortaya çıkabilmektedir. Bu hastalıklar arasında, kronik viral hepatit, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, toksik hepatit, alkolik karaciğer hastalığı, kolestatik ve otoimmün karaciğer hastalığı gibi çeşitli hastalıklar bulunmaktadır (2). Fibrozun ilerlemesi ile gelişen son dönem karaciğer hastalığı tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Son dönem karaciğer hastalığında bugün en etkili tedavi yöntemi karaciğer naklidir ancak karaciğer naklinin başarısı donör bulunamayışı, eş zamanlı olarak diğer dokuları etkileyen sekonder hastalıkların varlığı ve nakil sonrası hastalığın nüksü gibi nedenlerle etkilenmektedir (3). Bu nedenle karaciğer fibrozunun mekanizmasının aydınlatılması teşhis ve tedavisinde kullanılacak buluşların önünü açacaktır.

Karaciğer fibrozunda klinik olarak gözlenen splenomegali ve hipersplenizm oluşumlarının yanı sıra dalağın karaciğere portal kan akım yoluyla bağlı olması ve splenektomi yapılan fibrozis vakalarında iyileşmelerin olması bu organı fibrozis gelişimi ile ilgili olarak potansiyel bir hedef haline getirmektedir (4). Bu konuda daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz çalışmalar sonucunda deneysel fibrozis modeli oluşturulan deneklerin dalaklarında $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regülatör T-lenfosit ve $CD19^+CD5^+Cd1d^{high}$ regülatör B-lenfosit düzeylerinde sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin düzeyde artış olduğu tespit edilmiştir. Her ne kadar, bir yara iyileşmesi olsada, karaciğerde var olan bir inflamasyon anında majör sekonder lenfoid organ olan dalakta inflamasyonun baskılanmasına yönelik hücre grubunun tespit edilmiş olması cevaplanmayı bekleyen soruları açığa çıkarmaktadır. Hem bu soruları cevaplayabilmek hem de karaciğerin immün sistem üzerindeki etkisini anlayabilmek için araştırmamızda karaciğer fibrozu esnasında karaciğer ve dalakta inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin ifade edilme düzeyleri araştırılıp, veriler her iki organ için karşılaştırılacaktır. Bilindiği üzere, hücresel ve salgısal immün yanıtta etkili olan yardımcı T-lenfositlerin farklılaşması ile immün yanıtın inflamatuvar ya da anti-inflamatuvar yönde gelişip gelişmeyeceği belli olmaktadır. Bu noktada

belirleyici olan ve araştırmayı planladığımız faktörlerden bir tanesi de reaksiyonun son basamağında yer alan transkripsiyon faktörleridir. Ayrıca yaşlanmanın immün sistem üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Yaşlanma etkisiyle immün hücrelerin etkinliği, sayısı, ürettikleri sitokinlerin çeşitliliği gibi çeşitli özelliklerde farklılıklar yaşandığı bilinmektedir (5, 6). Bu yüzden çalışmamızda yaşa bağlı olarak gelişebilecek immünolojik değişikliklerin de ortaya konulması için karaciğer fibrozunun genç ve yaşlı fareler üzerindeki etkilerini araştırmak üzere genç ve yaşlı BALB/c fareler kullanılacaktır. Fibroz gelişen deneklerin karaciğer ve dalaklarında bazı inflamatuvar sitokinler (*IL-2, IL-6, IFN-γ, IL-12, IL-17, TNF-α*) ve bazı anti-inflamatuvar sitokinler (*IL-4, IL-10, TGFβ*) ve bu sitokinlerin uyarımı sonucu T-hücrelerinin alt tiplerine farklılaşmasında rol alan transkripsiyon faktörlerinin [*T-bet (T-box transcription factor), GATA3 (GATA binding protein 3), RORγT (Retinoic acid-related orphan receptors gamma T), FOXP3 (Forkhead box P3)*] gen ifadelerinin incelenmesi ve karşılaştırılmasının yanı sıra elde edilen karaciğer dokularından histolojik ve biyokimyasal analizler gerçekteştirilecektir.

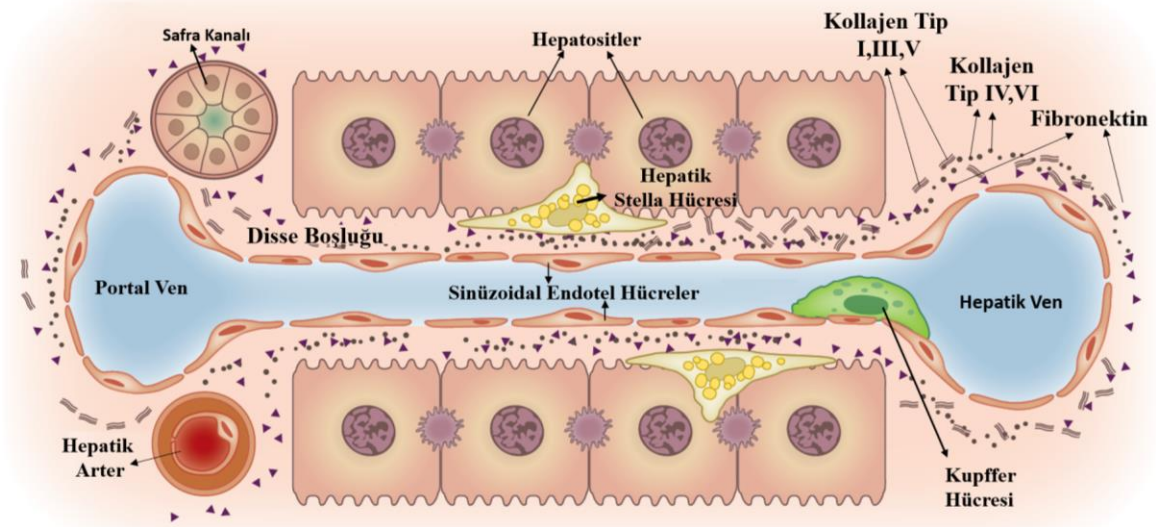
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Karaciğer, vücutta bulunan en büyük organdır ve birçok farklı işlevi yerine getirmektedir. Erişkin bir bireyin karaciğer ağırlığı yaklaşık olarak 1500 gr olup, bu ağırlık vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır (7). Karaciğer birçok fizyolojik süreçte rol alan bir organdır, bunlara makro besin metabolizması, kan hacminin düzenlenmesi, bağışıklık sisteminin desteklenmesi, büyüme sinyal yollarının endokrin kontrolü, lipid ve kolesterol homeostazı ve birçok ilaçın dahil olduğu ksenubiyotik bileşiklerin parçalanması dahildir. Makro besinlerin işlenmesi, ayrıştırılması ve metabolizması diğer tüm işlemleri yürütmek için gereken enerjiyi sağlar ve bu nedenle karaciğerin en önemli işlevleri arasındadır. Ayrıca, karaciğerin glukozu glikojen formunda saklayarak açlık durumuna cevaben glikojenik yollarla glikoz sağlaması kritik öneme sahiptir. Karaciğer, lipitleri okside eder fakat adipoz doku gibi diğer dokularda salgılanması ve depolanması için fazla lipidi paketleyebilir. Son olarak, karaciğer protein ve amino asit metabolizmasının ana işleyicisidir, kanda salgılanan proteinlerin çoğunluğundan, amino asitlerin enerji için işlenmesinden ve protein parçalanmasından oluşan azotun üre metabolizması yoluyla bertaraf edilmesinden sorumludur. Bütün bu önemli görevlerinden dolayı çeşitli sebeplerden (örneğin viral enfeksiyon, aşırı beslenme veya onkolojik yük) kaynaklanan karaciğer yetmezliği küresel çapta önemli bir sağlık sorunudur (8).

Karaciğer fibrozunun patolojisini kavrayabilmek için sağlıklı bir karaciğerdeki temel hücrenel yapılanmayı bilmek gerekir. Karaciğerin işlevsel birimine karaciğer lobülü denir. İnsan karaciğerinde yaklaşık 50.000-100.000 adet lobül bulunmaktadır (9). Karaciğer lobülleri sinüzoidal lümenlerden oluşmaktadır, sinüzoidal lümenin etrafını karaciğer volümünün yaklaşık %80 kadarını oluşturan hepatosit adı verilen karaciğerin parankim hücreleri kaplar. Hepatositler ile sinüzoidal endotel hücreleri arasındaki bölgeye disse boşluğu adı verilir. Hepatik Stellat Hücreleri (HSH) disse boşluğunda yer alır. Bu boşluk parankimal hücrelerin fonksiyonunu korumak için gerekli olan metabolik alışverişi sağlamaktadır. Kan akımı ile hepatositler arasındaki bu bağlantıyı kurmak için düşük yoğunluklu bazal membran benzeri bir matriks içerir. Bununların dışında sinüzoid yapısı

içerisinde sinüzoidal endotel hücreleri üzerine tutunmuş Kupffer hücreleri yer almaktadır (10) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Sağlıklı Bir Karaciğer Sinüzoidal Lumen Yapısı ve Hücre Tipleri (11).

2.2. Karaciğer Fibrozu

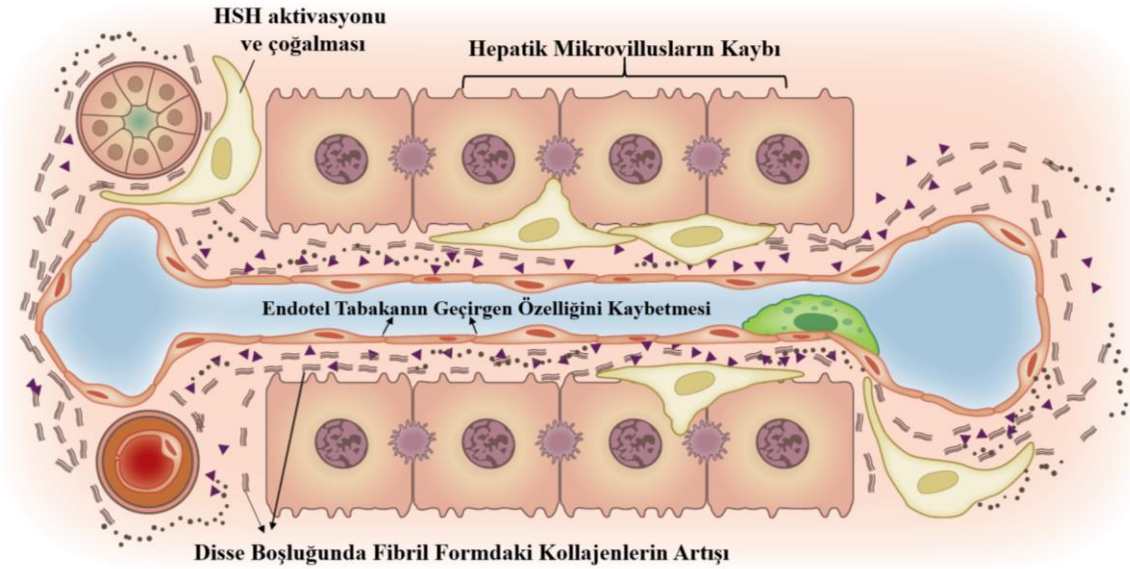
Hepatik fibrozis, fibroblastların ve miyofibroblastların (MF), çoğalması ve aktivasyonunun bir sonucu olarak karaciğerde ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin aşırı birikmesi ile meydana gelmektedir (12). Hasarlanmanın akut veya kendi kendini sınırladığı durumlarda değişiklikler geçicidir ve karaciğer mimarisi normal yapısına geri dönebilmektedir. Bu durumun aksine hasarlanma devam ederse, kronik inflamasyon ve ECM bileşenlerinin birikimi devam ederek zamanla karaciğer parankiminin yara dokusu ile yer değiştirmesine yol açmaktadır. ECM bileşenlerinin disse boşluğunda birikmesi, endotelial tabakanın karakteristik olan geçirgen por yapılarının kaybına yol açarak, portal venöz akım ve hepatositler arasındaki çift yönlü metabolik alışverişin bozulmasına neden olur (Şekil 2.2). Fibrozis boyunca yara dokunun sürekli olarak birikmesi, bir zaman sonra parankima ve damar yapısını bozarak yüksek mortalite oranlarına sahip olan siroz ile sonuçlanabilir (13, 14). Bu son aşamaya ilerleme tipik olarak değişken ve yavaş bir şekilde gerçekleşmektedir. Kronik karaciğer hasarı olan hastalarda siroz çevresel ve genetik faktörlerinde etkisine bağlı olarak yaklaşık 20 ile 40 yıllık bir zaman aralığında gelişmektedir (14). Karaciğer fibrozu büyük ölçüde asemptomatik gelişir ancak siroza ilerlemesi ciddi morbidite ve mortalite riski taşır. Siroz Amerika Birleşik Devletleri'nde neoplastik olmayan sindirim sistemi hastalıkları

arasında en çok ölüme sebep olan hastalıktır ve yılda yaklaşık 30000 ölüme neden olmaktadır, buna ek olarak siroz oluşumu sonrası görülen karaciğer kanseri sebebiyle her yıl 10000 ölüm meydana gelmektedir (15). Karaciğer fibrozunun etiolojisinin daha iyi anlaşılmasının, potansiyel tedavi edici stratejiler ve teşhis edici araçlar geliştirmede yarar sağlayacağı düşünülmektedir. Günümüzde siroz için en etkili tedavi yöntemi karaciğer naklidir. Ancak donör bulunamayışı, eş zamanlı olarak diğer dokuları etkileyen sekonder hastalıkların varlığı ve nakil sonrası hastalığın nüksü gibi nedenler nakil tedavisinin başarısını sınırlamaktadır. Bu sebeple karaciğer fibrozu mekanizmaları aydınlatılarak, fibroz ilerlemesini durdurmaya yönelik tedavi stratejileri geliştirmek amaçlanmaktadır (3).

Fibrozisin gelişimi ile ilgili farklı yollar tanımlanmıştır. Bunların etiolojisinin temelinde hasarın bölgesi (portal veya merkezi), fibrojenik hücrelerin nereyle ilişkili olarak kaynaklandığı ve baskın fibrojenik mekanizmalar vardır (13). Kronik viral hepatit B ve C, köprü fibrozunun başlıca sebebidir ve portal merkezi septa oluşumu ile sonuçlanır. Perisinüzoidal veya perisellüler fibroz tipik olarak alkolle ilişkili bozukluklarda ve non alkolik yağlı karaciğer hastalığında görülür. Alkole bağlı fibroz sinüzoidler veya hepatosit etrafındaki disse çevresinde ekstrasellüler matriksin birikmesi ile karakterize edilir. Biliyer fibroz, safra kanallarının ve periduktüler miyofibroblastların proliferasyonunu içerir, bu da karaciğer nodüllerini çevreleyen portal-portal fibrotik septa oluşumuna yol açar (14).

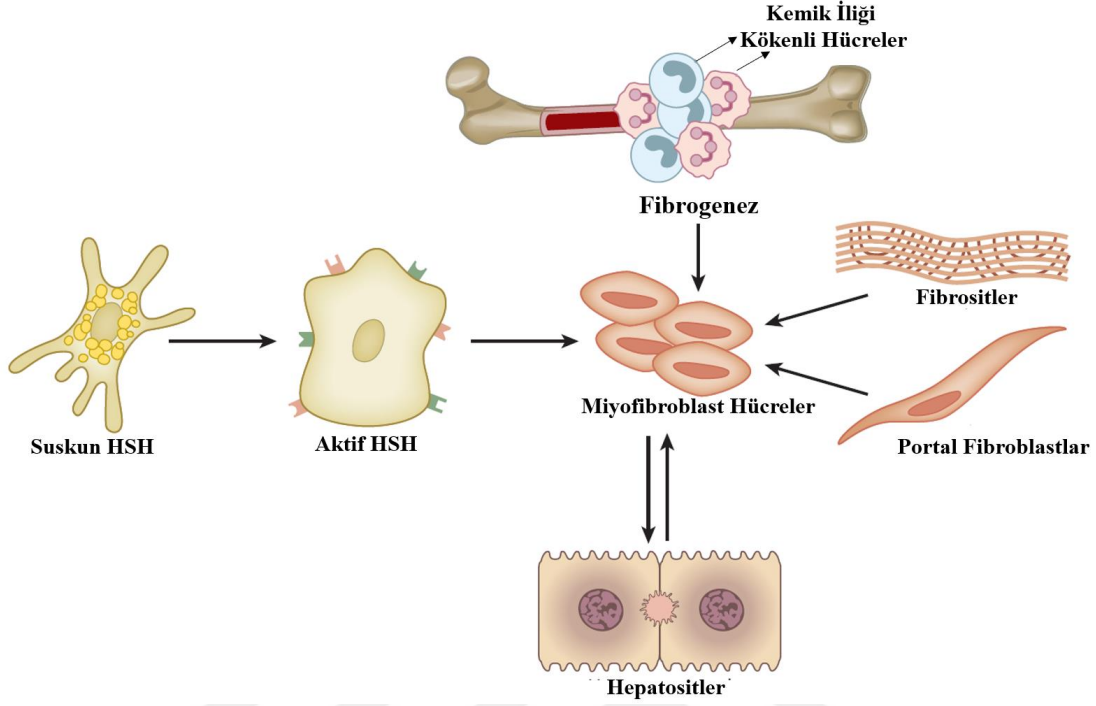
Fibrozisin anlaşılmasındaki en önemli gelişme HSH hücrelerinin hem normal hem de fibrotik karaciğerde ECM bileşenlerinin birikimini düzenlediğinin keşfedilmesidir. HSH hücreleri ilk olarak 1876 yılında Karl Wilhelm von Kupffer tarafından tanımlanmıştır ve karaciğerdeki yerleşik hücrelerin yaklaşık %10'unu oluştururlar. Bu hücre tipinin en belirgin özelliği sitoplazmik lipit damlacıklarında A vitamini depolamasıdır. HSH'ler karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri ve hepatositler arasındaki disse subendotelyal boşluğunda endotel hücrelerine bitişik halde veya hepatositlerin mikrovillusları içerisine gömülü olarak yer alırlar. Ayrıca, HSH'ler birbirleriyle sinir sonlanmaları ile bağlantı yaparlar. Normal karaciğerde HSH'ler proliferatif olmayan, suskun bir fenotip gösterir. Ancak karaciğerin yaralanma, iltihaplanma, hepatit B virüsü (HBV) veya hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu gibi patolojik koşullara maruz kalması sonucu hasar gören hepatositler ve inflamatuvar hücreler, büyüme faktörleri ve pro-fibrojenik sitokinleri serbest bırakırlar. Bu uyarılara maruz kalan HSH hücreleri suskun halden aktif duruma geçerek proliferatif, inflamatuvar tipte

yüksek ECM bileşen üretimi ile karakterize kontraktıl ve fibrojenik MF hücrelerine dönüşerek fibrozu başlatırlar (Şekil 2.2) (11, 16-18).



Şekil 2.2. Fibrotik Karaciğer Sinüzoidal Lümen Yapısı (11).

MF hücrelerin birincil ve en önemli kaynağı HSH hücreleridir ancak başka tipte hücrelerde MF hücrelerine dönüşebilmektedir. Bu hücrelerden portal fibroblastlar; portal alanların bağ dokusundaki konumlarından dolayı, yerleşik fibroblastların aktivasyonu MF hücreye dönüşümünde ve özellikle de iskemi ve kolestaz ile ilişkili hastalıklarda önemlidir (19-21). Bunun dışında dolaşımdaki fibrositlerde MF hücre oluşumuna katkıda bulunabilirler. Birçok araştırma, karaciğer hasarını takiben, kemik iliğinin karaciğer fibrozunun ilerlemesine katılabilecek MF benzeri hücreler sağladığını göstermiştir (22-24). Epitel hücreleri, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) olarak bilinen biyolojik bir işlemle ölü veya zarar görmüş hepatositlerin yerine geçerek fibroza katkıda bulunabilirler. Çünkü bu hücreler dokuda göç edebilen, apoptoza direnci yüksek, yüksek miktarda ECM üretimi ve ECM'nin farklı şekilde yapılanmasına neden olan fibroblastik tipli hücrelerdir (21, 25, 26). Bu durum sadece doku rejenerasyonu ve fibroz ile değil, aynı zamanda tümörün ilerlemesi ile de yakından ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.3) (27).



Şekil 2.3. Karaciğer Fibrozunda Miyofibroblast Hücrelerin Kaynakları (11).

2.2.1. Fibrozda Ekstraselüler Matriks

Normal şartlarda karaciğerdeki ECM'in yıkımı ve sentezi arasında son derece kusursuz düzenlenmiş bir denge vardır. Bu denge Matriks Metalloproteinazlar (MMP) ve metalloproteazların spesifik doku inhibitörleri [*ing.* Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP)] arasındaki denge ile sağlanır. Matriksinler olarak da bilinen MMP'ler, kollajenöz ve kollajenöz olmayan ECM substratlarını parçalayan kalsiyum bağımlı enzimlerden oluşan bir ailedir ve ECM'nin miktarını sıkı bir şekilde düzenlemektedirler. MMP'ler TIMP'ler tarafından kontrol edilirler (28, 29). TIMP'ler geri dönüşümlü MMP'lerin aktif bölgesine bağlanır ve MMP'lerin aktivitesini antagonize ederek karaciğer hasarı sırasında biriken matriksin yıkımının önlenmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca TIMP-1'in HSH'ler üzerinde antiapoptotik bir etkisi vardır; yaralanma sırasında aktif HSH'lerin temizlenmesini önler ve B hücreli lenfoma 2'nin [*ing.* B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)] indüksiyonu ile hayatta kalmalarını destekler (30). HSH'lerinde hasarlı karaciğerde önemli bir TIMP kaynağı olduğu düşünülmektedir. Fibrozis esnasında miyofibroblast hücrelerin matriks yıkımını engelleyici TIMP'leri yüksek miktarda ifade etmesi karaciğerdeki TIMP / MMP oranındaki artışa sebep

olarak ECM'in MMP'ler tarafından yıkımının inhibe edilmesine neden olur ve sonuç olarak ortamda ECM birikerek fibroza sebep olur (13, 31-33).

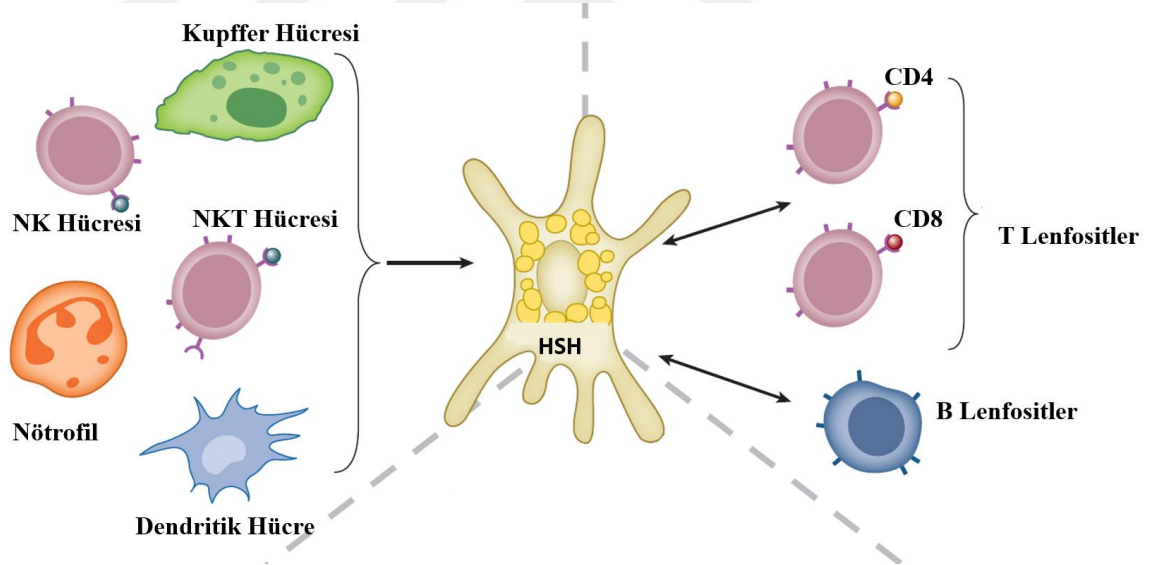
Hepatik fibrozis, karaciğer parankimi için fonksiyonel ve yapısal bütünlük sağlayan ECM'in hem kalitesini hem de bileşenlerinin miktarını etkiler. Kronik karaciğer hasarı sırasında, ortamda ECM birikmesiyle birlikte fibrotik septa kalınlaşması ve kollajenlerin kimyasal çapraz bağ yapmaları sonucu hepatik fibroz gelişir. Bunun dışında ECM içeriğindeki değişiklikler doğrudan fibrojenezi uyarabilir (34). Karaciğerdeki en önemli yapısal ECM bileşenleri kolajen, proteoglikanlar, laminin, fibronektin ve matriksdeki hücrel proteinlerdir. Normal karaciğerde disse boşluğunun düşük yoğunluklu matriksi esas olarak kolajen IV ve VI'dan oluşur ancak Karaciğer hasarı gerçekleştiği zaman matriks içeriğindeki fibril kollajenlerin tipi değişerek kollajen I, III ve fibronektin ağırlıklı bir yapıya dönüşür (35, 36). ECM bileşimindeki bu kantitatif ve kalitatif değişiklikler matriks mikro ortamını değiştirir ve sinüzoidal lümen ile hepatositler arasındaki iki yönlü plazma akışına fonksiyonel ve fiziksel bir engel oluşturarak hepatik fonksiyonu bozar (Şekil 2.2) (14).

2.3. Fibrozis ve İmmün Sistem İlişkisi

İmmün sistem, enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmalara karşı vücudu koruyan hücre ve moleküllerden oluşmaktadır. İmmün sistem doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık adı verilen mekanizmalar sayesinde yürütülmektedir. Doğal bağışıklığın bileşenleri mikroorganizmalara karşı ilk savunmayı göstermektedir. Bu bileşenler epitel doku, antimikrobiyal ürünler gibi kimyasal ve fiziksel bariyerler, hücrel bileşenler, fagositler, kompleman sistem ve sitokinlerdir. Doğal bağışıklık hücreleri mikroorganizmaların sahip olduğu patojenle ilişkili moleküler örgüleri [*ing.* Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP)], örgü tanıyan reseptörler [*ing.* Pattern Recognition Receptors (PRR)] aracılığıyla tanıyarak algılamakta ve immün yanıt oluşturmaktadır. Mikroorganizmalara karşı ilk yanıtı veren doğal bağışıklık sisteminin yanıtı özgül değildir ve mikroorganizmaların ortak patojenik yapılarını tanıyarak tepki vermektedir. Bunlara lipopolisakaritler (LPS), peptidoglikan, flajellin ve virüs, bakteri, mantar ve protozolardan kaynaklanan nükleik asitler örnek olarak verilebilir. Kazanılmış immün yanıt doğal immün yanıtta göre antijenlere karşı daha özgül ve güçlü yanıt vermektedir. Kazanılmış immün yanıtın en önemli özelliği hafıza oluşturması ve aynı antijenle tekrar karşılaştığı zaman hızlı

ve güçlü şekilde yanıt verebilmesidir. Kazanılmış immün yanıt antijen sunan hücrelerin antijenleri peptid yapılarına indirgeyerek T hücrelerine sunması ile gerçekleşir. Lenfositler yüzeylerinde bulunan çeşitli reseptörler sayesinde lipid, protein, nükleik asit veya polisakkarit yapıdaki antijenik yapıları tanıyabilmektedir (37, 38).

Kronik inflamasyon ve fibroz ayrılmaz bir şekilde bağlantılıdır ve yara oluşum bölgelerindeki immün efektör hücreler, lokal fibroblastlar ve doku makrofajları arasındaki etkileşimler karaciğer hasarının sonucunu belirlemektedir. İnflamasyon ve fibrozu yöneten süreçlerin daha iyi anlaşılmasıyla, hem kazanılmış hem de doğal bağışıklık sistemlerinin fibrozisin düzenlenmesinde rol oynadığı açıklığa kavuşmuştur (39). İmmün sistemin doğal ve kazanılmış bağışıklık hücreleri ve bu hücrelerin salgıladıkları sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri gibi ürünler, HSH aktivasyonunda içinde bulunduğu fibrozisin temelinde yatan mekanizmalarda önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.4) (17, 40, 41).



Şekil 2.4. Fibrozda Rol Alan İmmün Sistem Hücreleri (11).

2.4. Sitokinler

Sitokinler birçok bağışıklık ve inflamatuvar reaksiyona aracılık eden immün sistem hücreleri, parankimal ve parankimal olmayan hücreler de dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanan çözümlü peptitlerdir. Viral ajanlar, alkol tüketimi, hepatotoksinler ve otoimmünite gibi faktörler sebebiyle hasarlanan karaciğerde; Kupffer hücreleri, hepatositler, HSH'ler, doğal katil [ing. Natural Killer (NK)] hücreleri, lenfositler

ve dendritik hücreler gibi hücre tipleri sitokinler üreterek fibrozis sürecinde rol alırlar (14, 42).

Karaciğerde üretildiği bilinen en önemli sitokinler, Transforming Growth Factor β (TGF- β) , Tümör Nekroz Faktör- alpha (TNF- α) , İnterlökin 1, 6, 10 (IL-1, IL-6, IL-10) ve İnterferon Gamma (IFN- γ) 'dır (43). Bu sitokinlerin yaklaşık %80-90'ı Kupffer hücreleri tarafından üretilir. Farklı karaciğer hastalıklarında sitokin çeşitlerinin seviyelerinde değişiklikler gözlenmektedir. Örneğin; kronik alkolik karaciğer hastalığında TNF- α , IL-1, IL-6 ve kemokin IL-8 üretimi artarken, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığında ise TNF- α önemli bir aracı olarak ön plana çıkar (44).

Fibrozis sürecinde profibrotik sitokinler arasından en önemlisi olarak tanımlanan TGF- β , miyofibroblast farklılaşması ve aktivasyonunda önemli rol almasının yanı sıra miyofibroblastlar tarafından kendi üretimini uyarır ve otokrin bir döngü oluşturur. Bu durum fibrozis tedavisinde bir tedavi stratejisi olarak düşünülmüş ve anti-TGF- β denemeleri deneysel fibrojeniz tedavisi için başarıyla kullanılmıştır. Ancak, TGF- β pleiotropik doğası nedeniyle fibrozis dışında birçok hücresel süreçte rol almaktadır (45). TGF- β yolağının farmakolojik olarak geniş çapta hedeflenmesi muhtemelen sorunlu olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle, TGF- β fibrojeniz stimülasyonunun altında yatan temel mekanizmanın aydınlatılması, özellikle profibrojenik TGF- β sinyalleşmesini hedefleyen yaklaşımların geliştirilmesi için gereklidir (39).

2.5. Fibroziste Doğal Bağışıklık Hücreleri

2.5.1. Hepatik Makrofajlar

Toplam karaciğer hücre popülasyonunun %15'ini oluşturan Kupffer hücreleri, dolaşımdaki monositlerden türetilen doku makrofajlarıdır. Makrofajlar fibrotik yara oluşumu ve fibrozis çözülmesinin kritik belirleyicileridir. Bu hücrelerin karaciğer patofizyolojisinde birçok mekanizmada önemli rol aldığı bilinmektedir. Kupffer hücreleri karaciğerde antijen sunumu yapabilir. Kupffer hücreleri çok sayıda pro-inflamatuar ve fibrojenik aracıyı üreterek doğal bağışıklık ve inflamatuar yanıtları düzenlerler (46, 47). Fibroblastların makrofajdan üretilen TGF- β 1 veya IGF (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü) ile aktivasyonu, matriks yeniden modellenmesini başlatmak için fibroblast gen ekspresyonunda bir geçiş (değişim)

sağlar bu durum fibrogenezin erken bir özelliğidir (30). Kupffer hücreleri, kronik hasarlanma karşısında HSH'lerin aktivasyonunu teşvik ederek veya tam tersine, regresyon sırasında (çözünme) HSH'lerin apoptozunu indükleyerek karaciğer fibrozu üzerinde zıt etkiler ortaya çıkarır. Bu farklı roller, makrofaj fonksiyonunun mikro ortamdaki sitokinlere yanıt olarak fibrojenez sırasında değiştiğini göstermektedir (48).

Kupffer hücreleri aynı zamanda gastrointestinal sistemden türetilen endotoksinlerde dahil olmak üzere bakteri ürünleri için ilk temas noktasıdır. Bu nedenle Kupffer hücreleri ana ligandı LPS olan doğal bağışıklık reseptörü Toll benzeri Reseptör 4 [ing. Toll like Receptor(TLR)-4]'ü oldukça fazla miktarda ifade ederler. TLR'ler PAMP'ları tanıyan ve konağın mikrobik enfeksiyonu saptamasına izin veren yüksek oranda korunmuş bir reseptör ailesidir ve karaciğer fibrozu ile yakından ilişkilidir (46, 47). LPS uyarımı ile uyarılan Kupffer hücreleri TLR4 sinyali ile TNF- α , IL-1 ve IL-6 dahil olmak üzere diğer birçok profibrojenik sitokinin ifade edilmesini uyarır (39). HSH'ler de dahil olmak üzere çoğu yerleşik karaciğer hücresi TLR4'ü ifade eder (49). TLR4'ün LPS ile aktivasyonu HSH'lerin TGF- β sinyaline duyarlılığını artırarak fibrozu artırır (50).

Kupffer hücrelerinin fibrozdaki rolleri üzerinde bazı araştırmalar yapılmıştır. Karbon tetra klorür (CCl₄) ile fibroz oluşturulan sıçanlarda Gadolinyum klorür kullanılarak Kupffer hücrelerinin ekarte edilmesi sonrası fibroza yönelik azalan histolojik bulgular ve TGF- β ifadesinin artmamasının sıçanlarda CCl₄ kaynaklı hepatik fibrozun zayıflamasına neden olduğu gösterilmiştir (51). Başka önemli bir bilgi ise Kupffer hücrelerinde bolca bulunan TLR genindeki iki tek nükleotid polimorfizmi (D299G ve T399I), kronik hepatit C virüsü olan hastalarda fibroza ilerleme riskini oldukça düşürerek avantaj sağlamaktadır (52, 53). TLR9 da HSH hücreleri tarafından ifade edilen bir reseptördür apoptotik hepatosit DNA'sı ile aktive olur ve kollajen üretirler (54). TLR9 ihitva etmeyen transgenik fareler deneysel karaciğer hasar modelinde fibrozun daha az olduğu görülmüştür (55).

2.5.2. NK ve NKT hücreleri

Karaciğer, bağırsak ve sistemik dolaşım arasındaki stratejik konumu ile sürekli olarak bakteriyel ürünlere, toksinlere ve gıda kaynaklı antijenlere maruz kalmaktadır. NK ve NK-T hücreler bulaşıcı mikroplar ve neoplastik hücreler ile mücadelede ilk savunma hattını oluşturmaktadırlar. Lenfositlerden ayrı bir grup olarak değerlendirilen NK hücreleri viral

patojenlere karşı ve tümör hücrelerine karşı gelişen immün yanıtta ön safta görev almaktadır. Bu görevinde enfekte ve/veya malign hücrelere karşı perforin ve granzim gibi litik enzimleri kullanırlar. NK hücrelerinin işlevleri, uyarıcı ve inhibitör reseptörlerden gelen sinyallerin dengesi ile kontrol edilir. NK hücreleri periferik kandaki düşük yüzdelerinin aksine karaciğerdeki yerleşik lenfoid hücrelerin büyük kısmını oluşturur. Bu hücreler TNF ile ilişkili apoptoz ligandına (TRAIL) bağımlı olarak HSH apoptozunun indüklenmesi ve antifibrotik sitokinlerin üretimi yoluyla fibroza karşı koruyucu bir rol üstlenirler (56).

NK hücreleri de ifade ettikleri TLR'leri sayesinde hepatik fibroz patogenezinde katılırlar. NK hücreleri TLR3 uyarımı ile aktive olduklarında IFN- γ üretimi yoluyla HSH hücrelerinde hücre döngüsünü durdurarak apoptozunu indükler ve HSH hücrelerinin ölümüne sebep olur ve bu sayede de karaciğer fibrozunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda NK hücrelerinin yok edilmesi ve fonksiyonlarında bozulma olamsı karaciğer fibrozunu arttırdığı gösterilmiştir (39, 57).

İnsan NKT hücreleri, hem T hücre belirteçlerini ($\alpha\beta$ -TCR) hem de NK hücre belirteçlerini (NK1.1/CD161) ifade eden heterojen bir hücre grubudur. NKT hücreleri normal karaciğer dokularında bulunur ve nekro-inflamatuar aktivite olduğu durumlarda sayıları artar. Kronik viral hepatitte NKT hücrelerinin fibroz ilerlemesini destekleyen IL-4 ve IL-13'ün de dahil olduğu profibrotik sitokinleri salgıladıkları gösterilmiştir (58). Ayrıca NKT hücrelerinin ekarte edildiği deneysel modellerde, NKT bulunmayan farelerin CCl₄ ile indüklenen karaciğer hasarına ve fibrozise karşı daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (59).

2.5.3. Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler karaciğer bağışıklığını modüle eden süreçlerin merkezindedir. Dendritik hücreler çoğu zaman güçlü bağışıklık tepkilerine aracılık etselerde karaciğer dendritik hücreleri belirgin şekilde tolerojenik bir fenotip sergiler ve hepatik toleransın temelini oluştururlar. Dendritik hücreler fibrotik hepatik dokudaki lökositlerin yaklaşık %25'ini temsil eder. Dendritik hücre fonksiyonunun tolerojenikten immünojenik etki gösteren hale dönüşmesi, karaciğer fibrozundaki immünojenik ve inflamatuvar değişikliklerin temelini oluşturur. Karaciğer fibrozisinin fare modelindeki çalışmalar, fibrozda hepatik dendritik hücre popülasyonunun beş kat arttığını, aktif bir yüzey fenotipi aldığını ve en önemlisi NK hücrelerini, T hücrelerini ve HSH'leri uyarmak için bir yetenek kazandığını

göstermiştir. Ayrıca dendritik hücrelerin ekarte edilmesi, fibrotik karaciğerde yüksek seviyelerde üretilen birçok inflamatuvar aracı maddenin tamamen ortadan kalkmasına sebep olmuştur (39).

2.5.4. Nötrofiller

Nötrofiller dolaşımda en fazla bulunan lökosit popülasyonudur ve bakteri, maya ve mantar gibi çoğu patojen türüne karşı ilk savunma hattını temsil eden, yüksek miktarda bulunmalarına rağmen kısa ömürlü hücrelerdir. Nötrofiller inflamasyon alanından toplanıp yıkılmak istenen mikroorganizma parçalarını hücre içine alarak enzimatik yolla yıkan doğal immün sistem hücreleridir. Ancak nötrofillerin yüksek aktivasyonunun karaciğer hasarını artırabildiği belirtilmektedir (60).

Nötrofiller, karaciğer hasarını takiben doğal bağışıklık sisteminin erken tepkisinde rol oynamaktadır ve özellikle hem alkollü hem de non-alkolik steatohepatitte (NASH) öne çıkmaktadır. Ayrıca, IL-8 de dahil olmak üzere çok sayıda kemokin tarafından hasarlı karaciğere doğru göç etmek üzere uyarılabilirler (165).

2.6. Fibrozda Kazanılmış Bağışıklık

T lenfositler, B lenfositlerle birlikte adaptif immün sistemin hücresel olan komponentlerini oluştururlar. Kemik iliğinden köken alan T lenfositler timusta olgunlaşır ve kan dolaşımına geçer. Dolaşımda bulunan lenfositlerin %60-80 kadarını T hücreleri oluşturur, bunların üçte ikisi CD4⁺, üçte biri CD8⁺ yüzey belirteçlerini taşır. Karaciğerde ise bu oran tersine dönmüştür. CD4⁺ hücreler CD8⁺ hücrelerin iki katıdır (10) Naive CD4⁺ T hücreleri salgıladıkları sitokinlere göre ve ortamda bulunan sitokinlerin etkisi ile farklı alt gruplara ayrılır. Farklı karaciğer hastalıklarında immün sistemin hücreleri tarafından ifade edilen sitokin profilinde farklılık göstermektedir. Fibroz esnasında üretilen sitokinlerin tipi ve miktarı naive T lenfositlerin farklılaşacağı yardımcı T lenfosit alt tiplerini belirlemektedir. Bunlar farklı immün özelliklere sahip yardımcı T lenfosit-1 [*ing.* T helper-1 (T_H1)], yardımcı T lenfosit-2 [*ing.* T helper-2 (T_H2)], yardımcı T lenfosit-17 [*ing.* T helper-17 (T_H17)], regülatör T lenfositler, [*ing.* Regulatory T-lymphocytes (Treg)] hücreleridir. Bu dönüşümü indükleyen farklı sitokinler ve transkripsiyon faktörleri vardır. T_H1 aracılı immün yanıt, hücre içi ve dışı mikroorganizmalara karşı fagosit aracılı savunmada yer alırken T_H2 aracılı

immün yanıt ise, helmantik enfeksiyonlara karşı, IgE ve eozinofil-mast hücresi aracılı immün yanıtı güçlendirir (10, 12, 61).

Naive T hücresi aktivasyonunun başlangıcında ortamda IFN- γ ve IL-12 sitokinlerinin baskın olması durumunda T_{H1} gelişimi indüklenir. Bu sitokinler enfeksiyon esnasında doğal bağışıklık hücreleri tarafından üretilmektedir. Örneğin, NK hücreleri IFN- γ 'nın en önemli kaynaklarıdır. IFN- γ ve IL-12'yi de içeren birçok anahtar sitokin Janus Kinaz [ing. Janus Kinases (JAK)]-Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktive Edici [ing. Signal Transducer And Activator of Transcription (STAT)] hücre içi sinyal yolunu uyararak spesifik gen ağlarının aktivasyonunu sağlar. JAK ve STAT ailelerinin farklı üyeleri farklı sitokinlerle aktive edilir. IFN- γ ve IL-12'nin naive T lenfosit reseptörlerine bağlanmasıyla STAT1 ve STAT4 aracı molekülleri aktive olur ve bu sayede T_{H1} farklılaşmasının regülatörü olan T-bet transkripsiyon faktörü uyarılarak IFN- γ üreten T_{H1} tipi hücreler oluşur. Bu hücreler antifibrotik etki gösteren IFN- γ 'yı üretirler (61) (şekil 2.5).

T_{H2} tipi hücrelerin gelişimi için IL-4 gereklidir. IL-4 reseptörünün ligandı ile bağlanması sonrası STAT6 molekülü aktive olur ve sonrasında STAT6 transkripsiyon faktörü olan GATA3'ün ifadesine neden olur. Bu durum naive T hücresinin T_{H2} hücresine dönüşmesini sağlar. GATA3 aynı zamanda kendi ifadesini de indükleyerek T_{H2} farklılaşmasının stabil olmasını sağlar (Şekil 2.5). T_{H2} tipi hücreler IL-4, IL-13 gibi anti-inflamatuar sitokinleri üretirler, T_{H2} alt tipi immünitede doku tamirini yöneten hücre tipidir ve karaciğerde fibrotik etki gösterirler. Doku inflamasyonunu azaltarak ve önemli doku rejenerasyon mekanizmalarını aktive ederek koruyucu aktivite gösterirler (12, 61, 62). Ancak; IL-4 ve IL-13 karaciğerdeki hasar kronikleştiği zaman fibrotik etki göstermektedir. Örneğin IL-13, fibroz esnasında kollejen üretimini ve fibroz gelişimi ile ilgili genleri α -düz kas aktin [ing. α -smooth muscle actin (α -SMA)] ve bağ dokusu büyüme faktörü [ing. Connective Tissue Growth Factor (CTGF)] direkt olarak indüklediği bilinmektedir (62).

T_{H1} ve T_{H2} hücrelerinin birbirini antagonize ettikleri bilinmektedir IL-4, T_{H2} gelişimini teşvik eder ve T_{H1} gelişimini antagonize ederken, IFN- γ ve IL-2, T_{H1} gelişimini teşvik eder ve T_{H2} gelişimini antagonize eder. T_{H1}/T_{H2} dengesi fibrosizde önemli bir kavramdır (12).

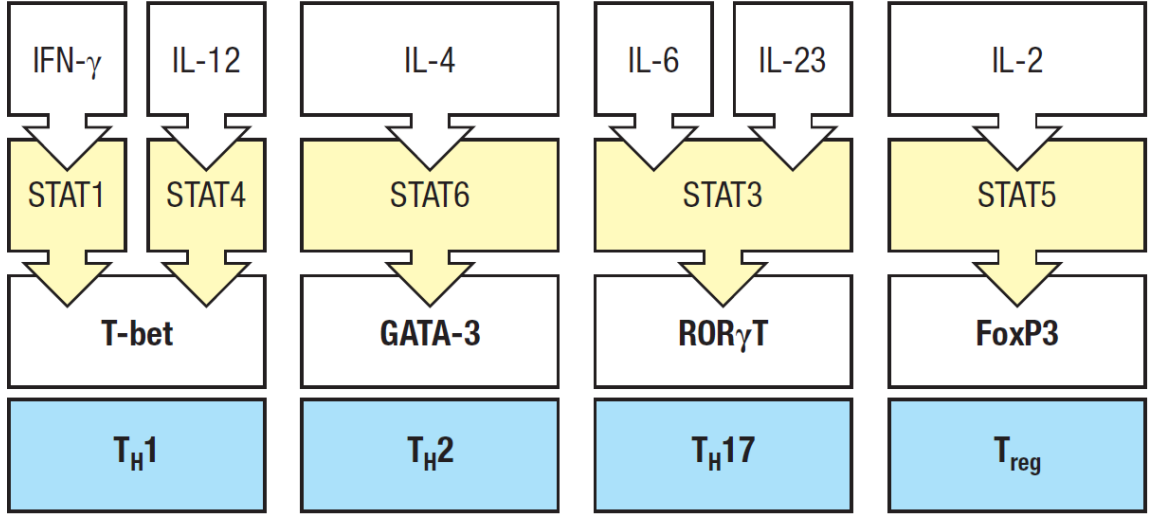
T_{H17} gelişimi için IL-6 sinyali ile STAT3 aktivasyonu sağlanmalıdır. STAT3'ün aktive olmasıyla bu hücreler IL-23 reseptörü ifade etmeye başlarlar ve bu sayede IL-23'ün

reseptöre bağlanması T_H17 'nin efektör fonksiyon kazanmasına neden olur. T_H17 hücre farklılaşmasının transkripsiyon faktörü veya ana düzenleyicisi bir nükleer hormon reseptörü olan ROR γ T 'dir. T_H17 farklılaşması için ortamda IL-6 ve TGF- β 'nın yüksek miktarlarda olması gereklidir. IL-17'de HSH'leri aktive ederek fibrotik etki gösteren bir sitokindir (Şekil 2.5) (12).

Treg hücreler T efektör hücrelerinin baskılanması yoluyla immünolojik self toleransın sürdürülmesi ve yabancı antijenlere karşı immün yanıtların düzenlenmesi için önemlidir. Treg hücreler güçlü bir immünoşüpresif faktör olan; ancak buna karşın en güçlü profibrotik sitokinlerden biri olan TGF- β 'yı üretebilir (12).

Treg hücreleri sitokin üretimini ve HSH hücrelerini baskılayarak antifibrotik etki gösterirler. Naive T hücreleri ortamda TGF- β ve IL-2 olduğu, IL-6'nın ve diğer pro-inflamatuar sitokinlerin olmadığı koşullarda iTreg hücrelerine farklılaşırlar. Bu yüzden ortamda TGF β 'nin varlığında IL-6'nın bulunup bulunmaması Treg veya T_H17 farklılaşmasında belirleyicidir. IL-6'nın durumu patojenlerin varlığı veya yokluğu ile düzenlenir. Patojen varlığında IL-6 üretimi uyarılırken; yokluğunda IL-6 üretimi düşüktür ve bu durum bağışıklık bastırıcı Treg hücrelerinin farklılaşmasını destekleyerek istenmeyen bağışıklık tepkilerini ve fibrozisi önler. iTreg hücreleri, transkripsiyon faktörü FOXP3 ve hücre yüzeyi CD25'in ifadesi ile ayırt edilir. iTreg hücreleri bağışıklık tepkilerini ve inflamasyonu baskılamak için inhibe edici bir şekilde hareket eden IL-10' un yanı sıra TGF- β üretebilir ve daha fazla iTreg farklılaşmasını destekleyecek şekilde hareket edebilir. STAT5'in IL-2 ile aktivasyonu, iTreg farklılaşmasında önemlidir ve FOXP3 ekspresyonunun akış yönünde harekete geçer (Şekil 2.5) (12, 61, 63).

Bu tezde seçtiğimiz transkripsiyon faktörleri ve sitokin genleri T hücre farklılaşmasının anlaşılabilmesi için seçilmiş anahtar genlerdir. (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , GATA-3, ROR γ t, T-bet, FOXP3) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. T Hücre Farklılaşmasında Görevli Sitokinler ve Transkripsiyon Faktörleri (38).

2.7. İmmünoşenescens

Günümüzde immün sistemin yaşlanma süreci ile birlikte niteliksel ve niceliksel değişimlere uğradığı artık bilinen bir durumdur. İmmünoşenescens adı verilen bu süreçte mortalite ve morbidite artmaktadır (64, 65). Yaşlılık dönemindeki hormonal değişiklikler, telomerazların kısalması, metabolik değişiklikler, hematopoietik kök hücre miktarının azalması, timus bezinin küçülmesi gibi çeşitli nedenler immün sistemi etkilemektedir. İmmün sistemdeki yaşlanmaya bağlı değişiklikler; enfeksiyona yatkınlık, yeni antijenlere karşı yetersiz immün yanıt verilmesi, aşı yanıtı yetmezliği, otoimmünite ve kanserde artış, T ve B lenfositlerin ürettikleri sitokin çeşidi ve seviyesindeki değişiklikler, antijene spesifik lenfositlerin aktivitelerinin azalması ve antijen sunumunda yetersizlik ön planda yer alan immünoşenescens etkileridir (66, 67).

Yaşlanma nötrofiller, NK hücreleri, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi doğal immün sistem hücrelerinin yanı sıra adaptif immün sistemin hücrelerinde de aktivasyon bozulmalarına sebep olmaktadır. Ancak, immün sistemde yaşa bağlı olarak en yıkıcı değişiklikler adaptif immün sistemde meydana gelmektedir (68, 69).

Yaşlı bireylerin nötrofillerinde bir takım işlev bozuklukları (kemotaksis, fagositoz, serbest radikallerin üretimi ve apoptoza yatkınlık gibi) görüldüğü bildirilmiştir. Yaşlılıkla birlikte TLR'ler gibi PAMP'ları tanıyan yüzey reseptörlerinin ifadesi ve fonksiyonunun yanı sıra sitokin üretimi ve doku uygunluk kompleksi sınıf II [*ing.* Major Histocompatibility

Complex II (MHC-II)] antijenleri gibi diğer yüzey moleküllerinin ifadesinde azalmaktadır. Bu nedenle, enfeksiyonlara karşı savunmada ilk hattı oluşturan bu hücrelerin bozulması yaşlılar için önemli bir immünolojik problem oluşturmaktadır (70). Yaşlı bireylerde monosit ve makrofajların aktiviteleri ve salgıladıkları IL-6 ve TNF- α , CCL5 seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (71, 72). NK hücrelerinin miktarı ilerleyen yaşla birlikte sayıca artsada fonksiyonlarının azaldığı bildirilmiştir. Genç NK hücreleri aktive olmak için yaşlı hücrelere göre daha az miktarda TNF- α gereksinimi duyduğu bildirilmiştir. Yaş ilerledikçe azalan TNF- α NK hücre aktivasyonundaki azalmayı açıklayabilir (71).

Yaşlanma ile birlikte immün sistemin uğradığı önemli değişikliklerden birisi de T lenfosit olgunlaşmasının gerçekleştiği timusta genel olarak kitlesel bir küçülme olmasıdır. Yetmiş yaşındaki bir bireyde aktif timus alanı toplam hacmin %10'u kadardır. Buna bağlı olarak yaş ilerledikçe timusu terk eden naive T lenfosit sayısı da azalmaktadır. Yaşla birlikte apoptoz mekanizmaları Fas-FasL, kaspaz 3 ve kaspaz 8 yolağının aktivasyonundaki artış CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerde kantitatif azalmaya sebep olmaktadır. Yaşlı bireylerde naive T lenfositlerde önemli oranda kısalmış tolemeraz, repertuarda kısıtlanma, IL-2 yapımında azalma, efektör hücrelerin klonal çoğalması ve farklılaşmasında bozulma gibi çeşitli fonksiyonlarda gençlere göre defekt gözlenir. Bunun sonucu olarakta, yaşlı bireylerde yeni antijenlere karşı efektif immün cevapta azalma görülür. T lenfosit fonksiyonlarını baskılayan bir diğer molekül, makrofajlardan salınan Prostoglandin E2 (PGE2)'dir. PGE2'nin yaşlı farelerde ve insanların aktif makrofajlarında arttığı saptanmıştır. Bu artışın IL-12 salgılanmasını baskıladığı, T hücre aktivitesini sınırlandırdığı saptanmıştır (73).

T lenfositlerin aktifleşmesinde T hücre reseptörü, CD3 reseptörü ile antijen sunan hücreler arasındaki etkileşimleri başlatan ve sürdüren IL-2'dir. Yaşla birlikte lenfosit ile antijen sunan hücre etkileşiminde azalma, IL-2 üretiminde düşme gözlenir. Yardımcı kostimulatör olarak görev yapan CD40L, CD25, CD28, CD62L gibi moleküllerin üretimi azalır (68).

Yaşlılıkta, T helper aktivitesindeki azalmaya bağlı B lenfosit fonksiyonlarında azalmanın yanında kemik iliğinde pro ve pre B lenfosit sayısında azalma olmaktadır. Yaşla birlikte salgısal immün yanıt kalitesi azalmakta, spesifik ve etkili antikor yapımı, antikor affinitesi, IgG izotip değişimi azalırken, özgül olmayan antikor yanıtı artış göstermektedir. Oto-antikor artışı ve bu duruma bağlı olarak otoimmün hastalıkta artış gözlenmektedir (74).

Yaşlılıkta, üretilen sitokin profilinde de değişiklikler gerçekleşmektedir. Yaşlanma ile sitokin profili ilişkisi üzerine yapılan birçok çalışmada sitokinlerin miktarı ve çeşidinin değiştiği saptanmıştır. Örneğin Lorena ve ark. (6) yaptıkları bir araştırmada IL-12p70, IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-10'un dolaşımdaki seviyeleri yaş ile pozitif korelasyon gösterirken IL-17'nin yaş ile negatif korelasyon gösterdiği tespit etmişlerdir.

2.8. Yaşlılık ve Karaciğer

Yaşlanma, vücutta yapısal değişiklikler veya işlevsel bozukluklar nedeniyle homeostazisi sürdürme yeteneğinin yavaş yavaş kaybedildiği ve bu yüzden dışarıdan gelebilecek hasar etkenlerine karşı vücudun savunmasız hale geldiği bir durumdur (75). Yaşlanma çoğu kronik hastalık için önemli bir risk faktörüdür. Sosyoekonomik gelişmeler ve tıbbi bakım hizmetlerinin ilerlemesi sayesinde, insanların yaşam ömrü istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Bu durum, dünyadaki yaşlı nüfusunda dramatik bir artışa yol açmıştır. Dünyadaki 60 yaş ve üzerindeki nüfus 2015 yılı itibariyle 900 milyondur ve 2050 yılına gelindiğinde toplam 2 milyar olması beklenmektedir. Yaşlı bireyler serebrovasküler hastalık, kanser ve diyabet, görme bozukluğu, işitme kaybı, artrit ve bunama gibi hastalıklara daha yatkındır (76). Yaşlanma ile ilişkili olarak sağlıklı karaciğer ve karaciğer hastalıklarındaki değişiklikler konusunda çalışmalar yapılmıştır (77). Yaşlanma süreci hepatik yapı ve fonksiyonun kademeli olarak değişmesinin yanı sıra karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinin de dahil olduğu çeşitli karaciğer hücrelerindeki değişikliklerle ilişkilidir (78). Yaşlanma ayrıca çeşitli karaciğer hastalıkları için riskleri artırabilir ve olumsuz bir prognostik faktör olarak rol oynayabilir ve bu da mortalite oranında bir artışa neden olur (76).

Yaşlanma ile birlikte karaciğerin hacmi ve kan akışının yavaş yavaş azaldığı bildirilmektedir. Ultrason kullanılarak yapılan araştırmalara göre, yaşlandıkça karaciğer hacmi %20-40 azalmaktadır (76). Bu değişiklikler, karaciğerdeki kan akışındaki düşüşle ilişkilidir, çünkü 65 yaş ve üstü olan bireylerin 40 yaşın altındaki bireylerle kıyaslayınca karaciğerin kan hacminde yaklaşık %35 azalma olduğu saptanmıştır (79, 80).

Karaciğer hücrelerinde yaşlanma ile ilgili değişiklikler arasında hacim değişiklikleri, poliploidi çekirdekleri, karaciğer hücrelerinde lipofuskin birikimi, granülsüz endoplazmik retikulum alanlarının azalması, mitokondrilerin fonksiyonlarını kaybetmesi ve sayıca azalması gözlemlenir (75). Karaciğer hücrelerinin hacmi orta yaş dönemi yaklaştıkça

kademeli olarak artar, ancak yaşlandıkça tekrar azalmaya başlar. Lipofuskinler son derece yüksek çapraz bağ yapma yeteneğine sahip protein agregatlarıdır. Oksidatif stres sebebiyle zarar gören ve denatüre olan proteinlerin hücre içerisinde parçalanamadığı zaman oluşmaktadır. Lipofuskinler, hücrede reaktif oksijen türlerinin artmasında ve hücre yaşam süresinin kısalmasına sebep olmaktadır (81). Yaşlanmanın bir sonucu olarak, hepatositlerdeki poliploidi, mitokondrinin sayısındaki azalma ve işlev bozukluğu sıklıkla bir arada görülme eğilimindedir ve ATP düzeyinde düşüşe neden olmaktadır (82, 83). Ayrıca yaşlanma ile birlikte granülsüz endoplazmik retikulum alanı azalır, bu da karaciğerdeki mikrozomal proteinlerin sentezini azaltmaktadır (77).

Yaşlanmanın karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri, Kupffer hücreleri ve HSH üzerinde ne tür bir etkisi olduğu hakkında bilinenler pek fazla değildir. Bazı çalışmalar yaşlanmanın sinüzoidal vasküler sistemde önemli bir morfolojik değişikliğe neden olarak karaciğerin işlevini olumsuz etkilediğini öne sürmüştür (84). Yaşlılıkta sinüzoidal endotel hücrelerin kalınlığı % 50 oranında genişlerken fenestrasyonların (gözeneklerin) sayısı ve çapı azalır (85, 86). Kupffer hücrelerinin yaşlılıkla birlikte sayılarının ve aktivasyonunun arttığı bilinmektedir. Kupffer hücrelerinin işlevi, karaciğer sinüzoidal vasküler sistemdeki antijen-antikor komplekslerini veya yaşlanan hücre fragmanları gibi nanopartikülleri uzaklaştırmaktır (87). Son zamanlarda yapılan bir araştırmada 73 donörden elde edilen karaciğer hücrelerinin telomerlerinin uzunluğu analiz edilmiş ve telomerlerin uzunluğunda yaşlanmaya bağlı azalmanın sadece Kupffer hücreleri ve HSC'lerle sınırlı olduğu ve kolanjositler ve hepatositlerin uzunluğunun azalmadığı bildirilmiştir (88).

Yaşlılıkla birlikte gelişen artmış oksidatif stres, artmış inflamatuvar yanıt, mitokondrilerin sayısal ve fonksiyonel olarak azalması gibi değişiklikler karaciğerdeki hasara karşı verilen hücresel yanıtları önemli ölçüde etkiler. İntraperitoneal yolla etanol veya tiyoasetamid enjeksiyonu ile oluşturulan akut karaciğer hasarının, yaşlı sıçanlarda genç sıçanlara kıyasla şiddetli olduğu görülmüştür (89, 90). Yaşlı hayvanlarda muhtemelen endojen hasarların birikmesinden kaynaklanan DNA hasarı toksik ajanlara maruz kalındığında onarımın yetersiz olmasına sebep olmaktadır. Yaşlanma karaciğerin rejeneratif yeteneği azalttığı ve bu durumun karaciğer restorasyonunu önemli ölçüde geciktirdiği bulunmuştur (76).

2.9. Dalak ve Fibrozis İlişkisi

En büyük sekonder lenfoid organ olan dalak, karın boşluğunun üst sol kadranında diyaframa yakın yer alan kapsüllü bir organdır. Erişkin bir insanın dalağı yaklaşık 13x8 cm boyutunda ve 180-250 gr ağırlığındadır. Dalağın dış katmanı kollajen liflerden yapılmış bir kapsülden ibarettir ve bu kapsül kısa trabekülalar olarak organın parenkimine girer. Bu yapı, retiküler ağla birlikte iki ana tip dalak dokusunu destekler; dalak kesitinde koyu renkli görülen bölgelere kırmızı pulpa soluk renkli görülen bölgelere ise beyaz pulpa adı verilir. Üçüncü bir kompartman ise marjinal bölgedir ve beyaz pulpanın dış sınırında bulunur. Kırmızı pulpa venöz sinüzoidlerden ve hücresel kordonlardan oluşmuştur ve içerisinde dinlenme halindeki makrofajlar, eritrositler, trombositler, granülositler, lenfositler ve çeşitli plazma hücreleri bulunur. Beyaz pulpa dalağa giren atar damarların en son uç kısımları olan merkezi arterioller çevresindeki lenfoid dokudur. T hücreleri ve B hücreleri ve bol miktarda antijen sunucu hücre ihtiva eder. Bu dokuda periarterioller lenfoid kılıf olarak adlandırılan bölge T hücrelerini içeren bölgedir ve merkezi arteriollerin etrafını sarar. Marjinal bölge ise B hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreleri içerir (91, 92).

Dalak bağışıklık cevabının koordinatörlüğü, kan elemanlarının onarımı ve miktarının kontrolü, kanın filtre edilmesi, kanda dolaşan granülosit ve trombositlerin depolanması gibi önemli süreçlerde rol oynar. Fetüste ayrıca hematopoezin önemli ölçüde yapıldığı bir yerdir ve postnatal olarak bu görevi belli patolojik koşullarda tekrar üstlenebilir. Tüm bunlara rağmen dalak yaşam için esansiyel değildir, dalağın çıkarılması halinde birçok fonksiyonu karaciğer ve diğer mononükleer fagositik sistem dokuları tarafından yerine getirilebilir. Karaciğer, vasküler sinüzoidleri kaplayan büyük fagositik Kupffer hücreleri kütlesiyle, partikül antijenlerin kan dolaşımından temizlenmesine ve enfeksiyona karşı dirence önemli bir katkıda bulunur. Bakteri ve virüslerin komplemanla kaplanmasıyla oluşturulan immün kompleks sıklıkla karaciğer tarafından temizlenmesine rağmen, geriye kalan kısmı ise dalak tarafından temizlenir. Dalağın vücut dışına çıkarıldığı durumlarda patojenlere karşı savunmada çoğunlukla görevi karaciğer devralır, ne var ki dalak, kapsüllü bakterilerin temizlenmesinde elzemdir (91-93).

Lenf sistemi konakçının içerisinde yaygın biçimde dağılmıştır ve bu sayede periferik dokulara erişebilen antijenlere karşı güçlü bir şekilde antikor ve T hücresi yanıtı verilebilmektedir. Bununla birlikte dalak doğrudan dolaşıma bağlıdır antijenlere karşı lenf

düğümüleri veya diğer lenfoid dokulara göre çok daha etkili şekilde yanıt vermektedir. Sonuç olarak, dalak yapısındaki lenfositik doku, dolaşan elemanlar ve mononükleer fagositik hücreler tarafından oluşturulduğundan hem doğal bağışıklıkta hem de kazanılmış bağışıklıkta düzenleyici bir rol oynamaktadır (91, 92).

Dalağın portal dolaşım yoluyla karaciğere bağlı olması nedeniyle karaciğer fibrozu olan hastaların büyük bir kısmında splenomegali görülmektedir. Daha önceki çalışmalar, bu dalak anormalliklerinin karaciğer fibrozunun siroza ilerlemesini destekleyebileceğini ve birçok olası yoldan hastalık prognozunu şiddetlendirebileceğini ileri sürmektedir. Birçok araştırma dalak makrofajlarının pro-fibrojenik TGF- β 1 kaynağı olduğunu ve fibrozise katkıda bulunduğunu söylemektedir. Ayrıca bir takım araştırmalar splenektominin karaciğer fibrozu ve rejenerasyon parametrelerini geliştirirken serum TGF- β düzeylerini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Bunun dışında dalakta bulunan fibrotik etkili T_H2 tipi yardımcı T lenfositlerin karaciğere göç ederek burada fibrotik yanıtı tetiklediği düşünülmektedir (94).

2.10. Thioacetamide (TAA) Aracılı Karaciğer Fibroz Modeli

Deneysel hayvan modelleri, fibrozis oluşumunu, gelişimini ve geri dönüşüm mekanizmalarını araştırmak ve yeni anti-fibrotik tedaviler geliştirebilmek için önemlidir. Bu konuda en bilinen modeller kemirgenler kullanılarak oluşturulan modellerdir. Fareler daha düşük maliyetleri ve az miktarda terapötik madde gerektirmeleri sebebiyle en çok tercih edilen deney hayvanlarının başında gelmektedir (95).

TAA aracılı kronik karaciğer fibroz modeli oldukça sık kullanılan bir modeldir. TAA'nın toksik hale gelmesi için bir metabolik aktivasyon gereklidir. CYP450 enzimleri tarafından katalize edilen bu biyoaktifleştirme işlemi, genel toksisiteden sorumlu Thioacetamide Kükürtdioksit oluşumuyla sonuçlanır. Karaciğer fibrozunun Thioacetamide Kükürtdioksit ile indüklenmesinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, yağ asidi β oksidasyonu, dallı zincirli amino asitler ve metionin bozulması ile ilişkili enzimlerin azalan ifadesi, lipit peroksidasyonu ve oksidatif strese bağlı proteinlerin ifadesindeki artış ile açıklanabilir. Sonuç olarak HSH aktivasyonu ile sonlanan şiddetli bir oksidatif hasar gerçekleşir. Kronik karaciğer fibroz modelinde TAA, 6-8 hafta arasında haftada 3 kez 100 ila 200 mg/kg vücut ağırlığında intraperitoneal olarak verilir. Bu hayvanlarda sentrilobüler nekroz ve hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile birlikte alanin

aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) serum seviyelerinin yükselmesiyle büyümüş bir karaciğer görülür. Son zamanlarda, bu model haftada 3 kez 150 mg / kg dozunda 8 ila 12 hafta arasında standartlaştırılmıştır. Ağızdan tatbik edildiğinde, vücut ağırlığına göre 200 ila 300 mg/kg ve daha yüksek dozlar 16 hafta boyunca kullanılır. Ayrıca C57BL/6 fareleri, içme suyunda 300 mg/L'lik oral yoldan uygulandığında önemli bir fibroz gelişmesi için 2-4 ay gereklidir (96).

2.11. Fibrozun Çözünmesi ve Anti-fibrotik Stratejiler

Günümüzde son dönem karaciğer rahatsızlığında en etkili tedavi yöntemi karaciğer transplantasyonudur. Ne var ki, transplantasyonun oldukça maliyetli ve yüksek komplikasyon riskine sahip bir tedavi olması nedeniyle, araştırmacılar farklı medikal tedavi arayışlarına yönelmişlerdir. Fibroz tedavisinde hedef, hasar etkeninin ortadan kaldırılması, karaciğerdeki inflamatuvar yanıtın baskılanması, HSH aktivasyonunun engellenmesi ve ECM yıkımının sağlanmasıdır. Bu sayede fibrozun gerileyerek kendiliğinden iyileşmesi beklenmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda hayvan modelleri ve insanlarda hem karaciğer fibrozunun hem de sirozun gerileyebileceği gösterilmiştir. Fibrozisin tersine çevrilmesi artık klinikte bir gerçektir ve başarılı bir şekilde tedavi edilen farklı etiyolojilerde kronik karaciğer hastalığı olan hastalardan alınan biyopsi örneklerinin seri değerlendirmesi, fibrozun çift yönlü bir süreç olduğunu karaciğerin iyileşme ve yeniden modelleme için doğal bir kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir (97). Deney hayvanları ile yapılan fibroz modellerinde fibrozise neden olan etkenin ortadan kaldırılması fibroziste gerilemeye sebep olmaktadır. İnsanlarda da hemen hemen her çeşit fibrozis etkeninin başarılı bir şekilde tedavi edilmesi fibrozisi tersine çevirebilmektedir. (14, 97, 98)

Deney hayvanlarında yapılan safra kanalı ligasyonu ve karbon tetraklorür (CCl₄) uygulaması fibroz ilerlemesi ve çözünürlüğü ile ilgili araştırmalarda kullanılan diğer iki önemli deneysel modeldir. Biliyer tıkanıklığı tersine çevirmek için bir bilio-jejunal anastomozun kurulmasından 4-6 hafta sonra veya CCl₄ uygulamasının kesilmesinden hemen sonra spontan olarak fibrozun çözülmeye başladığı gözlenmiştir (14).

Sirozun tersine çevrilmesine yönelik araştırmalardan biriside İssa ve ark. (99) tarafından yapılmıştır, 12 haftalık bir CCl₄ uygulamasının ardından toksin uygulamasının kesilmesinden sonra ilk patolojik değerlendirmede makro ve mikronodüler sirozun bir arada

var olduğu ortaya konulmuştur. Ancak, bir yıl sonraki incelemede ise mikronodüler sirozun yerini, makronodüler sirozun aldığı görülmüştür. Ayrıca, CCl₄ uygulamasının kesilmesiyle Matris Metalloproteinazların doku inhibitörleri [*ing.* Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase (TIMP)] mRNA seviyesinin azaldığı ve HSH hücrelerinin apoptoza uğradığı belirtilmiştir.

Karaciğer fibrozundaki spontan çözünmenin en belirgin sebebi hepatik MF hücrelerinin apoptozu olduğu ortaya koyulmuştur. Bu yanıt kemirgen modellerinde iyi karakterize edilmiş olsa da, insan hastalığındaki kanıtlar sınırlıdır. Ayrıca, insan hepatik MF'si kemirgen hücrelerine göre nispeten daha yüksek Bcl-2 seviyelerine sahiptir, bu nedenle de proapoptotik uyarılara daha dirençli ve apoptoza daha az duyarlıdır (100).

MF hücrelerinin apoptozla ortadan kaldırılması fibrozis çözünürlüğü için kritik görüldüğünden, kapsamlı çalışmalarla altta yatan mekanizmalar araştırılmıştır. Örneğin Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB), aktivasyonunun MF hücrelerin apoptozunu inhibe ettiği bildirilmiştir. HSH aktivasyonu sırasında, transkripsiyonel olarak aktif NF-κB seviyesi önemli ölçüde artar, böylece hem proinflamatuvar ve profibrotik genlerin (IL-6, IL-8, MCP 1 ve ICAM1) ifadesi uyarılır hem de apoptoza direnç kazanılır (14). Bunlar gibi karaciğer fibrogenezinin altında yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılması ile birlikte antifibrotik tedavilerin gelişimi de hız kazanmıştır. Bir çok hayvan modeli ümit vaat etmektedir, ancak hiçbir ilaç, klinik kullanım için antifibrotik ajan olarak onaylanmamıştır. Bu yaklaşımlardan en temeli primer hastalığı ortadan kaldırmaya yönelik tedavilerdir, viral hepatitlerde antiviral ilaçların kullanımı bu stratejiye bir örnek olarak verilebilir. Sanyal ve ark (98). yaptıkları araştırmada kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda, HBV'nin tenofovir disoproksil fumarat ile 5 yıl gibi uzun süreli baskılanmasının, fibroz ve sirozun gerilemesine yol açtığını belirtmişlerdir. Bunların dışında bir çok tedavi stratejisi denenmiş ve hala denemeler devam etmektedir. Bunlar arasında resveratrol gibi antioksidanların kullanımı, kaspaz inhibitörleri, sitokin antagonistleri, TGF-β inhibitörleri, TIMP inhibitörleri, apoptozu teşvik edici ligandlar, ECM yıkımını sitümüle edici moleküller gibi tedavi denemeleri hala sürmektedir (98). Örneğin bu önemli araştırmalardan bir diğeri , E vitamini ve sentetik bir Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gamma [*ing.* Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPARγ)] ligandı olan pioglitazon ile kontrol plasebonun karşılaştırılmasıdır, E vitamini fibroziste bir azalmaya yol açarken, pioglitazon da ise azalmış iltihap ve

transaminazlar gösterilmiştir, ancak istenmeyen yan etkilere sahiptir (101). Bununla birlikte, Elafibranor isimli PPAR α,δ agonisti kullanılan çalışmalar, yan etkileri olmadığı için daha umut verici görünmektedir (102). Son cesaret verici araştırmalardan bir tanesi bir farnesoid X reseptörü agonisti üzerine yapılan bir faz 2 çalışmasında, NASH'in fibroz ve histolojik özelliklerinde iyileşme rapor edilmiştir. Bu molekülün şu anda NASH'de etkili olup olmadığını devam eden bir faz 3 çalışması kesin olarak saptamaya çalışılmaktadır (103). Yakın zamanda bir CCR2 / CCR5 antagonistinin NASH'de fibrozis iyileşmesi sağladığı göstermiştir. Bu bileşik şimdi aynı zamanda primer sklerozan kolanjitte değerlendirilmektedir (104).

Dalaktaki anormalliklerinin hedeflenmesinin karaciğer fibrozu tedavisinde önemli olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda sirozla ilişkili ölümcül komplikasyonları iyileştirmek için splenektomi kullanılmıştır. Bununla birlikte, trombositopeni gibi engelleyici durumları olan birçok hasta için splenektomiye bir alternatif gereklidir. Fibrozisle birlikte görülen splenomegali ve hipersplenizmin mTOR sinyal yolunun aktivasyonu önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Bu sebeple splenomegali ve hipersplenizmin iyileşmesi için dalak mTOR sinyallemesinin hedeflenmesinde potansiyel terapötik değerin bulunduğu düşünülmektedir. Dalak makrofajlarında TGF- β üretiminin inhibisyonunun, karaciğer sirozu ilerlemesinin tedavisinde başka bir terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir. Dalak makrofaj veya T hücresi aktivasyonunu seçici olarak modüle eden terapiler, bu bağışıklık hücrelerinin hepatik fibrojenezin arttırılması ile bağlantılı olduğu için yararlı olabilir. Bu yaklaşımların önündeki en büyük engellerden biri geleneksel olarak terapötik ajanların dalak üzerine seçici olarak etki edememesidir. Bununla birlikte, bu sorun, yeni ve hedeflenmiş ilaç dağılımı için nanoparçacıkların kullanılmasıyla atlatılabilir. Farelerde LPS kaynaklı sistemik inflamasyon sırasında nanopartikül dağılımı üzerine yapılan bir çalışmada, incelenen diğer tüm organlara kıyasla dalakta farklı boyutlardaki nanoparçacıklarının tutulduğu gösterilmiştir (94). Özet olarak moleküler mekanizmalar aydınlandıkça hedef moleküller üzerine tedavi stratejileri gelişmeye devam etmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Deneylerde kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de, kimyasallar, çözeltiler ve kitler ise Tablo 3.2’de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.

Cihaz	Marka/Model/Ülke
PZR Cihazı	BİO-RAD/ MyCycler/ USA
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı	QIAGEN/ Rotor gene Q/ Germany
Mikro Volüm Spektrofotometre	Maestro/ MN-913/ Taiwan
Jel Görüntüleme Sistemi	KODAK /Gel Logic 2200/ USA
Masaüstü Santrifüj Cihazı	Hettich-Zentrifugen/ Micro 200/Germany
Elektroforez Güç Kaynağı	Wealtec/ Elite 300/USA
Elektroforez Tankı	BİO-RAD/ USA
-80°C Derin Dondurucu	Nüve /DF 490/ Türkiye
Buzdolabı	Altus/AL370/ Türkiye
Mikrodalga Fırın	Beko/MD/Türkiye
Su Saflaştırma Sistemi	Millipore /Direct-Q3/Germany
Hassas Otomatik Pipetler	Eppendorf/Germany
Hassas Terazı	ADAM/ NBL 254İ/UK
pH Metre	HANNA/ HI2211/İtaly
Manyetik Karıştırıcı	CAT/M13/Germany
Vorteks	BIOSAN/ FV-2400/Lativa
Mikrotom	Leica /RM2145/USA
Işık Mikroskobu	Leica /DFC280/USA
ELISA Okuyucu	BİO-RAD/CODA/USA

Tablo 3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal, Çözelti ve Kitler.

Kimyasal/Çözelti/Kit	Marka/Tanımlayıcı Kod
Thioacetamide (TAA) (C ₂ H ₅ NSİ)	Acros Organics, CAS No: 62-55-5
Ethanol Absolut (C ₂ H ₆ O)	Sigma, CAS No: 64-17-5
10X Tris Asetat Tamponu (TAE)	İnvitrogen, Cat No: 15558-026
Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	Sigma, Cat No: D8537
Etidyum Bromür (C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, CAS No: 1239-45-8
Agaroz	Sigma, CAS No: 9012-36-6
GelPilot 100bp DNA Ladder	Qiagen, Cat No: 239035 Lot No: 142358923
RNA Saflaştırma Kiti (RNeasy Plus Mini Kit)	Qiagen, Cat No: 74134 Lot No: 148032608
PZR Kiti (RT ² SYBR Green qPCR Mastermix)	Qiagen, Cat No :330501 Lot No: 7480757
cDNA Sentez Kiti – (RT ² HT First Strand Kit 96)	Qiagen, Cat No: 330411Lot No: 7480743
Fare ALT-AST ELISA Kiti	Cloud-Clone SEB214Mu
Ksilen [C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂]	Sigma, CAS No: 1330-20-7
Hematoksilen C ₁₆ H ₁₄ O ₆	Merck, CAS No: 517-28-2
Eozin C ₂₀ H ₈ Br ₄ O ₅	Merck, CAS No: 15086-94-9
Uranil Asetat C ₄ H ₈ O ₆ U	Polysciences, CAS No:6159-44-0
Kurşun Sitrat (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ Pb ₃	Sigma, CAS No: 6107-83-1
Gluteraldehit Solusyonu (%25) OHC(CH ₂) ₃ CHO	Merck, CAS No: 111-30-8
Osminyum Tetroksit Solusyonu (%4) OsO ₄	Merck, CAS No: 20816-12-0
Aseton CH ₃ COCH ₃	Sigma, CAS No: 67-64-1
Araldit CY212	Sigma
DDSA (Dodecenly Succinic Anhydride), C ₁₆ H ₂₆ O ₃	Supelco, CAS No: 26544-38-7
BDMA (Benzyl Dimethylamine), C ₆ H ₅ CH ₂ N(CH ₃) ₂	Sigma, CAS No: 103-83-3
Trisodyum sitrat, HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂	SAFC, CAS No: 6132-04-3
Sodyum hidroksit, NaOH	Merck, CAS No: 1310-73-2
BSA (Bovine Serum Albumin)	Capricorn Scientific,Cat No: BSA-1U
α-Smooth Muscle Actin Fare Monoklonal Antikor	Cell Signaling Technology, Product No: 56856S
Anti Mouse IgGκ Sekonder Antikor	Santa Cruz, Cat No: sc-516102
Hidrojen Peroksit H ₂ O ₂	Sigma,CAS No: 7722-84-1
10X Tris Buffered Saline with Tween® 20	Cell Signalin Technology, Product No: 9997
Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 50X Schiff Solusyonu	Supelco, CAS No: 7411-49-6 Sigma

3.2. Farelerin Temini ve Bakımı

Bu araştırma için, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları yerel etik kurulundan 11/05/2017 tarihli ve 2017/A-35 protokol no'lu karar ile etik onay alınmıştır (Ek 1). Araştırmada genç gruplar için 14 haftalık yaşlı gruplar için ise 78 haftalık erkek BALB/c türü deney fareleri kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan BALB/c fareler, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edilerek kullanılmıştır. Çalışma bütçesinin tamamı TÜBİTAK tarafından desteklenen 1002/217S290 no'lu projeden karşılanmıştır. Deney süresince fareler sıcaklığın 21° C ve ortam neminin %55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda tutuldu ve tüm deney hayvanları deney süresince standart fare yemi ile *ad libitum* olarak beslendiler.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Öncelikle gruplarda yer alması gereken hayvan sayısını belirlemek için güç analizi yapıldı. Yapılan güç analizinde tip1 hata $\alpha=0.05$ ve tip 2 hata $1-\beta=0.80$ alındığında kontrol grubuna göre TGF- $\beta 1$ deki ortalama gen miktarındaki artışın 2 birim olması için her bir grupta en az 8 denek olması gerektiği hesaplanmıştır. Daha sonra hayvanlar genç hayvanların oluşturduğu 3 grup ve yaşlı hayvanların oluşturduğu 3 grup olmak üzere toplam 6 gruba ayrıldı. Fibroz gruplarına 12 hafta boyunca iki günde bir haftada 3 defa intraperitoneal (i.p.) yoldan 100mg/kg vücut ağırlığı dozunda PBS içerisinde çözülmüş TAA verildi. Uygulanacak TAA dozu literatürde daha önceden uygulanan şekilde yapılmıştır (105). TAA, deney hayvanlarına haftada 3 gün olacak şekilde gün aşırı enjekte edildi. Deney grupları şu şekilde belirlenmiştir;

Genç Fibroz Grubu; Bu grupta genç hayvanlara 12 hafta boyunca ip. yolla (100 mg/kg/vücut ağırlığı) PBS'de çözülmüş TAA enjeksiyonu yapıldı. **Yaşlı Fibroz Grubu;** Bu grupta yaşlı hayvanlara 12 hafta boyunca ip. yolla (100 mg/kg/vücut ağırlığı) PBS'de çözülmüş TAA enjeksiyonu yapıldı. **Genç PBS;** bu grupta genç hayvanlara ip olarak (100 mg/kg/vücut ağırlığı) PBS enjeksiyonu yapıldı **Yaşlı PBS;** bu grupta yaşlı hayvanlara ip olarak (100 mg/kg/vücut ağırlığı) PBS enjeksiyonu yapıldı. **Genç Naive** ve **Yaşlı Naive** gruplara enjeksiyon yapılmamıştır.

3.4. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri

Son uygulamadan 24 saat sonra hayvanlar yüksek doz anestezi altında sakrifiye edildi. Moleküler, ışık mikroskopik, elektron mikroskopik ve biyokimsal tetkikler için hızlıca karaciğer, dalak ve kan örnekleri alındı. Gruplardan alınan doku örnekleri mRNA seviyelerinin tespiti için, buz üzerinde steril şartlarda küçük parçalar halinde kesildi ve hızlı bir şekilde RNA saflaştırma işlemine geçildi. Histolojik incelemeler için alınan doku örnekleri %10'luk formaldehit içine alındı. Elektron mikroskopik incelemeler için alınan örnekler %2.5'luk gluteraldehit soluyonu içerisine alındı. ELISA analizleri için alınan kan örneklerinden serumları ayrılarak -80 °C'de saklandı.

3.5. Karaciğerde Fibroz Tespiti

Karaciğer fibrozunun oluşup oluşmadığı farklı parametrelerin takibi ile tespit edilmiştir. Bu parametreler, deney hayvanlarının karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranı, karaciğer makroskopik görüntüsü, serum ALT, AST düzeyleri ve karaciğerin histopatolojik analizleridir. Deney hayvanlarına yoğun anestezi verilerek deneyin sonlandırılmasından önce deneklerin vücut ağırlıkları, deneyin sonlandırılması sonrası deneklerin karaciğer ağırlıkları ölçüldü. Karaciğerlerin makroskopik görüntülemeleri yapıldı ve histopatolojik incelemeye alındı. Serum örneklerinde ALT, AST düzeyleri kantitatif testler fareye özgül Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) ticari kiti (Cloud-Clone SEB214Mu; PRC) ile çalışıldı.

3.6. ELISA Analizleri

Deneklerin ALT ve AST seviyeleri ELISA yöntemi ile firmanın önerdiği şekilde ölçüldü. Prosedür kısaca şu şekildedir; ilk olarak serum örnekleri ve standartlar mikropalakaya eklendikten sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra plate içerisindeki sıvılar döküldü, ve kit içerisinde bulunan "Detection Reagent A" solusyonu eklenerek tekrar 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra mikropalate içerisindeki solusyon uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 3 kez yıkama solusyonu ile yıkandı. Yıkama solusyonu uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara kit içerisinde yer alan "Detection Reagent B" solusyonu eklendi ve 37°C'de 30

dk inkübe edildi, sonrasında 5 kez yıkama işlemine tabi tutuldu. Bir sonraki adımda kuyucuklara substrat solüsyonu eklendi, plaklar 37°C’de 15 dk inkübe edildi ve oluşan reaksiyon stop solüsyonu eklenerek durduruldu. Son olarak kuyucuklardaki absorbans değerleri vakit kaybetmeden ELISA okuyucusunda 450 nm’de okutularak değerlendirildi. Standart eğri, her plak için uygun olan standartlar ile oluşturuldu. Örneklere ait ALT ve AST düzeyleri, standart eğri üzerinde işaretlenerek pg/ml cinsinden belirlendi.

3.7. Mikroskopik Analizler

Histolojik hasarın belirlenmesi ve düzeyinin saptanması amacıyla her gruptaki deney hayvanlarının karaciğerleri makroskopik inceleme sonrası %10 nötral tamponlu formalin ile tespit edildi ve rutin doku takip işlemleri uygulandı (Tablo 3.3). Takip işleminden sonra parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan bu parafin bloklardan mikrotom ile kesilen 5 µm kalınlığındaki kesitler lam üzerine alınarak Hematoksilen&Eozin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Trikrom boyama yöntemleri ile boyandı. İmmunohistokimyasal boyama için alınan kesitler polizin kaplı lamalar üzerine alındı.

Tablo 3.3. Rutin Doku Takip İşlemleri.

Deney Basamakları, Uygulanan Çözelti/Kimyasal	Uygulama Süresi
Su (distile olmayan)	1 saat, 2 Tekrar
%80 Alkol	1 saat
%96 Alkol	1 saat, 2 Tekrar
Absolü Alkol	1 saat, 2 Tekrar
Ksilen	1 saat, 3 Tekrar
Parafin	1 saat, 4 Tekrar

3.7.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

Karaciğerin inflamasyon düzeyi ve fibroz oluşumu H&E boyama ile saptanmıştır. Lamlara alınan doku örnekleri 60°C’de 1 saat bekletilerek parafinin erimesi sağlandı ve daha sonra rutin H&E boyama tekniği uygulandı. Deney prosedürü Tablo 3.4’de özetlenmiştir.

Tablo 3.4. Hematoksilen&Eozin Boyama Yöntemi.

Deney Basamakları, Uygulanan Çözelti/Kimyasal	Uygulama Süresi
Ksilen	5 dakika, 3 tekrar
%96 Alkol	3 dakika, 3 tekrar
Absolü Alkol	3 dakika, 2 tekrar
Distile Suda Yıkama	2 dakika
Hematoksilen	10 dakika
Su (Distile olmayan)	20 dakika
Eozin	2 dakika
%96 Alkol	3 dakika, 3 tekrar
Ksilen	5 dakika, 3 tekrar

3.7.2. Periyodik Asit-Schiff Boyama

Karaciğerin glikojen depolama durumu, sitoplazmik inklüzyonların dağılımı ve seroid pigmentin hepatosit içindeki varlığı Periyodik Asit Schiff boyama yöntemi ile saptanmıştır. Deney prosedürü Tablo 3.5’de özetlenmiştir.

Tablo 3.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi.

Deney Basamakları, Uygulanan Çözelti/Kimyasal	Uygulama Süresi
Ksilen	5 dakika, 3 Tekrar
%80 Alkol	3 dakika
%96 Alkol	3 dakika, 2 Tekrar
Absolü Alkol	3 dakika, 2 Tekrar
Su (Distile olmayan)	5 dakika
Periyodik Asit	5 dakika
Distile Suda Yıkama	5 dakika
Schiff Solüsyonu	15 dakika

Suda (Distile olmayan) Yıkama	10 dakika
Hematoksilen	5 dakika
Suda (Distile olmayan) Yıkama	5 dakika
%96 Alkol	3 dakika, 2 Tekrar
Absolü Alkol	3 dakika, 2 Tekrar
Ksilen	5 dakika, 3 Tekrar

3.7.3. Trikrom Boyama

Fibroz oluşumuna eşlik eden bağ ve destek dokusu oluşumu Gomori'nin trikrom boyama yöntemi ile saptanmıştır. Deney prosedürü Tablo 3.6'da özetlenmiştir.

Tablo 3.6. Trikrom Boyama Yöntemi.

Deney Basamakları, Uygulanan Çözelti/Kimyasal	Uygulama süresi
Ksilen	5 dakika, 3 Tekrar
%80 Alkol	3 dakika
%96 Alkol	3 dakika, 2 Tekrar
Absolü Alkol	3 dakika, 2 Tekrar
Distile Suda Yıkama	5 dakika
Demirli Hematoksilen	10 dakika
Suda (Distile olmayan) Yıkama	5 dakika
Biebrich Scarlet – Asit Fuksin	15 dakika
Distile Suda Yıkama	5 dakika
Fosfomolibdik Asit – Fosfotungustik Asit Solüsyonu	15 dakika
Light Green	1 dakika
Distile Suda Yıkama	5 dakika
Fosfotungustik Asit	15 dakika
%96 Alkol	3 dakika, 2 Tekrar
Absolü Alkol	3 dakika, 2 Tekrar
Ksilen	5 dakika, 3 Tekrar

3.7.4. İmmunohistokimyasal Boyama

Karaciğer fibroz oluşumunda belirleyici bir belirteç olan Düz Kas Aktin [*ing.* Smooth Muscle Actin (SMA)] düzeyindeki artış α -SMA immünohistokimyasal boyama uygulanarak araştırılmıştır. Uygulanan boyama yönteminin ayrıntıları Tablo 3.7’de özetlenmiştir.

Tablo 3.7. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi.

Deney Basamakları, Uygulanan Çözelti/ Kimyasal	Uygulama Süresi
Antijen Retrieval Aşaması	16 dakika
Distile Su	3 dakika
PBS	5 dakika
H ₂ O ₂ (Hidrojen Peroksit) Aşaması	10 dakika
PBS	5 dakika
Protein Blok Aşaması	5 dakika
Primer Antikor Aşaması	2 saat
PBS	5 dakika, 2 Tekrar
Sekonder Antikor	10 dakika
PBS	5 dakika, 2 Tekrar
Streptavadin Peroksidaz (HRP) Aşaması	10 dakika
Kromojen Aşaması	10 dakika
PBS	3 dakika
Distile Su	3 dakika
Hematoksilen	1 dakika
Suda (Distile olmayan) Yıkama	5 dakika
Distile Su	5 dakika

3.8. Kesitlerin İncelenmesi

Kesitler kör bir araştırmacı tarafından ışık mikroskopunda incelendi ve görüntü analiz sisteminde (Leica QWin) görüntülendi. Hasar, inflamasyon düzeyi ve rejenerasyonun sayısal olarak analizi için karaciğer fibrozunda sıklıkla kullanılan Knodell skorlama sistemi

kullanılmıştır. Buna göre değerlendirme ana kriterleri bölük-parçalı nekroz, intralobular dejenerasyon, portal inflamasyon ve fibroz ana başlıkları olarak belirtildi. Bu ana başlıklarda bölük-parçalı nekroz için hiç (0 puan); hafif (1 puan); orta şiddette (3 puan); belirgin (4 puan); orta şiddette ve köprü nekrozlu (5 puan); belirgin ve köprü nekrozlu (6 puan); çok loblu nekroz (10 puan) olarak değerlendirildi. İntralobular dejenerasyon ise; hiç (0 puan), hafif (1 puan), orta şiddette (3 puan), belirgin (4 puan) olarak değerlendirildi. Portal inflamasyon ise; hiç (0 puan), hafif (1 puan), orta (3 puan), belirgin (4 puan) olarak değerlendirildi. Fibroz başlığı ise; hiç (0 puan); portal dağılımlı fibroz (1 puan), körülü fibroz (3 puan), siroz (4 puan) olarak değerlendirildi. Histolojik puan yukarıda sayılan 4 değerlendirmenin toplamını ifade etmektedir.

3.9. Transmisyon Elektron Mikroskopisi

Karaciğerden alınan yaklaşık 1 mm³ boyutundaki dokular %2,5'lük gluteraldehit çözeltisi içerisinde +4°C'de 12 saat tespit edildi. Daha sonra Leica EM AMW cihazı ile elektron mikroskobu doku takibi yapılarak dokular silikon kalıplar içerisinde rezinle bloklandı. Rezin içine gömülen dokular 45°C'de 4 saat, 60°C'de 24 saat polimerizasyona bırakıldı. Polimerize olan rezin blokları trimlendikten (Leica EM trimmer) sonra ultramikrotom (Leica Ultracut R) ile 80 nm kalınlığında kesitler bakır gridler üzerine alındı. Daha sonra kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlama işlemine tabi tutuldu ve son olarak kesitler Zeiss Libra 120 TEM ile incelenerek fotoğraflar alındı. Prosedürün ayrıntıları Tablo 3.8'de özetlenmiştir.

Tablo 3.8. Elektron Mikroskopta Doku Takibi ve Grid Boyama (Kontrastlama) Yöntemi.

EM Doku Takibi Prosedürü			Kontrastlama	
Uygulanan çözelti	Uygulama sıcaklığı ve süresi	Uygulama Tekrar sayısı	Uygulanan çözelti	Uygulama biçimi
1. PBS	20°C, 2dk	3 Tekrar	1.Uranil Asetat	5 dk
2.Osmium Tetroksit %1	20°C, 90dk	1 kez	2.Deiyonize su	1 dk
3. PBS	20°C, 2dk	4 Tekrar	3.Kurşun Sitrata	3 dk 4°C, karanlıkta
4. Aseton %30	20°C, 5dk	1 kez	4.Deiyonize su	1dk, 5 tekrar
5. Aseton %50	20°C, 5dk	1 kez		
6. Aseton %70	20°C, 5dk	1 kez		
7. Aseton %90	20°C, 5dk	2 Tekrar		
8. Aseton %100	20°C, 2 dk	3 Tekrar		
9. Araldit %50	20°C, 2 dk	3 Tekrar		
10. Araldit %75	20°C, 2 dk	3 Tekrar		
11. Araldit %100	20°C, 2 dk	3 Tekrar		

3.10. Moleküler Analizler

3.10.1. RNA Saflaştırma

Total RNA fare karaciğer ve dalak dokularından RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Germany) (Cat. No. 74134 Lot:148032608) ile izole edildi. Dokulardan toplam RNA saflaştırması firmanın önerdiği kit protokolüne göre aşağıdaki metotla yapıldı. Bu protokole göre önce 50-100 mg arası doku tartıldı, üzerine % 5 (w/v) olacak şekilde RLT Buffer eklendi. Daha sonra homojenizatörde 13500 rpm de yaklaşık 2 dakika homojenize edildi. Homojenattan yaklaşık 750 µl alınarak eppendorf tüplerine konuldu ve 15000 rpm de +4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. 700 µl süpernatant alındı, üzerine 700 µl etanol (%70) eklendi ve karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 700µl kit kolonuna eklendi ve 15 sn santrifüj edildi. Alt tüpteki sıvı döküldü kalan 700 µl numune eklenerek tekrar 10000 rpm de 15 sn

santrifüj edildi. Kolon altındaki tüpte kalan sıvı döküldükten sonra 700 µl “RW1 Buffer” eklendi ve 12000 rpm’ de 15 sn santrifüj edildi. Kolon altındaki tüp içerisindeki sıvı dökülüp tüp tekrar takıldıktan sonra hazırlanmış 500 µl “RPE Buffer” eklenerek 12000 rpm’ de 15 sn santrifüj edildi sonra alttaki sıvı dökülerek tekrar “RPE Buffer” ile yıkama tekrarlandı. Kolon altındaki tüp içerisindeki sıvı döküldükten sonra hiçbir şey eklemeyen 15000 rpm de 180 sn. santrifüj edilerek filtrenin kuruması sağlandı. Kolon altındaki tüp çıkarılıp temiz steril bir Eppendorf tüp takıldı. Kolona 50µl RNase içermeyen su eklendi ve 60 sn. 10000 rpm’de santrifüj edildi. Elde edilen RNA’ların konsantrasyonları belirlendikten sonra, cDNA’da kullanım için buz üstünde bekletildi. Uzun süreli depolama için ise -80°C’ye kaldırıldı.

RNA varlığı ve kalitesi spektrofotometre cihazı ile değerlendirildi. Absorbans değerleri uygun olmayan örneklerin RNA saflaştırma işlemi tekrarlandı. $A_{260/280}$ oranı yaklaşık 2.0-2.3 olan örneklerde RNA varlığı görsel olarak teyit edilmek amacıyla jel elektroforezinde yürütüldü. Bu amaçla 1X TAE tamponu içerisinde %1'lik agaroz jel hazırlandı ve 20 ng/µl konsantrasyonda 15 µl örnek 3 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi ve 25 dakika 110 Volt'da koşturuldu. Jellerin görüntüsü, KODAK Gel Logic 2200 Imaging System jel görüntüleme cihazında elde edildi ve 28S ve 18S keskin ribozomal RNA bantlarının elde edildiği ve herhangi bir yıkımın olmadığı RNA’lar cDNA işleminde kullanıldı.

3.10.2. Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

Bu çalışma için QIAGEN, RT² HT First Strand Kit (96) (Cat.No.330411) (Lot No. 7480743) kullanıldı. cDNA eldesi için 1000ng RNA örneği ticari kitle belirtilen tampon çözeltiler ile karıştırılarak ticari kit kullanma kılavuzunda belirtildiği gibi 5 dakika 37°C ısı bloğunda bekletildikten sonra reverse transkriptaz karışımı ile karıştırılarak thermal cycler’da 42°C’de 15 dakika, 95°C’de 5 dakika reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen cDNA’lar Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir reaksiyonu için kullanılabilecek kadar -80 °C’de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.10.3. Gerçek Zamanlı PZR ile Gen İfadesinin Tayini

Bu çalışma için QIAGEN, RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Cat.No.330501) (Lot No.7480757) kiti kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde kullanıldı. Analiz öncesi her bir

gen için PZR karışımı hazırlandı. Kit içerisinde bulunan RT² SYBR Green Mastermix'ten her bir örnek için 12.5 µl, RNase-free sudan 6.5 µl, RT² qPCR Primer Assay'den 1 µl alınarak 0.2 ml'lik tüpler içerisine eklendi. Hazırlanan karışım ilgili gen tüplerine 20'şer ul olarak dağıtıldı. Daha sonra her bir gen için 5 µl cDNA bu karışıma eklendi. Tüplerin ağzı kapatılarak RT-PZR çarkına yerleştirildi. Çark Rotor Gene cihazına yerleştirilerek PZR şartları 95°C de 10 dakika (1 döngü), 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 60 saniye (40 döngü) olacak şekilde çalışıldı. Çalışmada kullanılan *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-12*, *IL-17*, *TNF-α*, *IFN-γ*, *TGF-β*, *GATA-3*, *RORγt*, *T-bet*, *FOXP3* *GAPDH* genlerine özgü primerler ile ilgili bilgiler Tablo 3.9 da sunulmuştur.

Tablo 3.9. Kullanılan Primerlerin Özellikleri.

Gen	Referans Segment	Referans Pozisyon	Baz Büyüklüğü (bp)
<i>IL-2</i>	NM_008366.3	128	111
<i>IL-4</i>	NM_021283.2	277	115
<i>IL-6</i>	NM_001314054.1	120	178
<i>IL-10</i>	NM_010548.2	104	81
<i>IL-12b</i>	NM_001303244.1	1025	114
<i>IL-17a</i>	NM_010552.3	129	174
<i>TNF-α</i>	NM_013693.3	897	93
<i>IFN-γ</i>	NM_008337.4	330	95
<i>GATA3</i>	NM_008091.3	1674	191
<i>RORγT</i>	NM_011281.3	1190	95
<i>T-bet</i>	NM_019507.2	1377	161
<i>FOXP3</i>	NM_054039.2	3586	177
<i>TGF-β1</i>	NM_011577.2	1576	63
<i>GAPDH</i>	NM_008084.3	499	140

3.10.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi. 100 baz çiftlik standart DNA markırı ile beraber her bir gen için 15µl PZR ürünü ve 3µl 6X yükleme boyası (*ing.* loading dye) karıştırılarak %2'lik agaroz jelde 100 volt 30 dakika koşturuldu. Jellerin görüntüsü KODAK Gel Logic 2200 Imaging System jel görüntüleme cihazında elde edildi ve kaydedildi.

3.11. İstatistiksel Analizler

Araştırmanın verileri web tabanlı online istatistik programı (<http://biostatapps.inonu.edu.tr/>) kullanılarak analiz edildi (106). Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Varyansların homojen olup olmadığını belirlemek için Levene Testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren gruplar arası karşılaştırmalar için Tek Yönlü Anova testi uygulandı. Normal dağılım gösteren verilerin İkili karşılaştırmaları için varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey testi yapılırken, varyansların homojen olmadığı durumlarda ise Tamhane T2 testi yapıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler için gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis H testi ile yapıldı ve sonrasında ikili karşılaştırmalar için Conover testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Vücut/Karaciğer Ağırlığı ve Biyokimyasal Analizler

Deney hayvanlarının deneyin son günündeki vücut ağırlığının karaciğer ağırlığına oranı analiz edilmiştir. Buna göre; TAA ile karaciğer fibrozunun oluşturulması hem genç hem de yaşlı deneklerde naive gruplara göre belirgin düzeyde vücut/karaciğer ağırlık oranında azalmaya neden olmaktadır. Fibrotik genç ve yaşlı deneklerin vücut/karaciğer ağırlık oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tampon çözelti PBS'in genç ve yaşlı deneklere uygulanması, genç ve yaşlı naive gruplarla karşılaştırıldığında Vücut/Karaciğer ağırlık oranında belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır (Tablo 4.1).

Fibroz gelişimi ile beraber genç ve yaşlı deneklerin serum ALT değerlerinde belirgin düzeyde artış saptanırken, serum AST düzeyi sadece genç deneklerde fibroz gelişimi sonrasında belirgin düzeyde artış göstermektedir (Tablo 4.1).

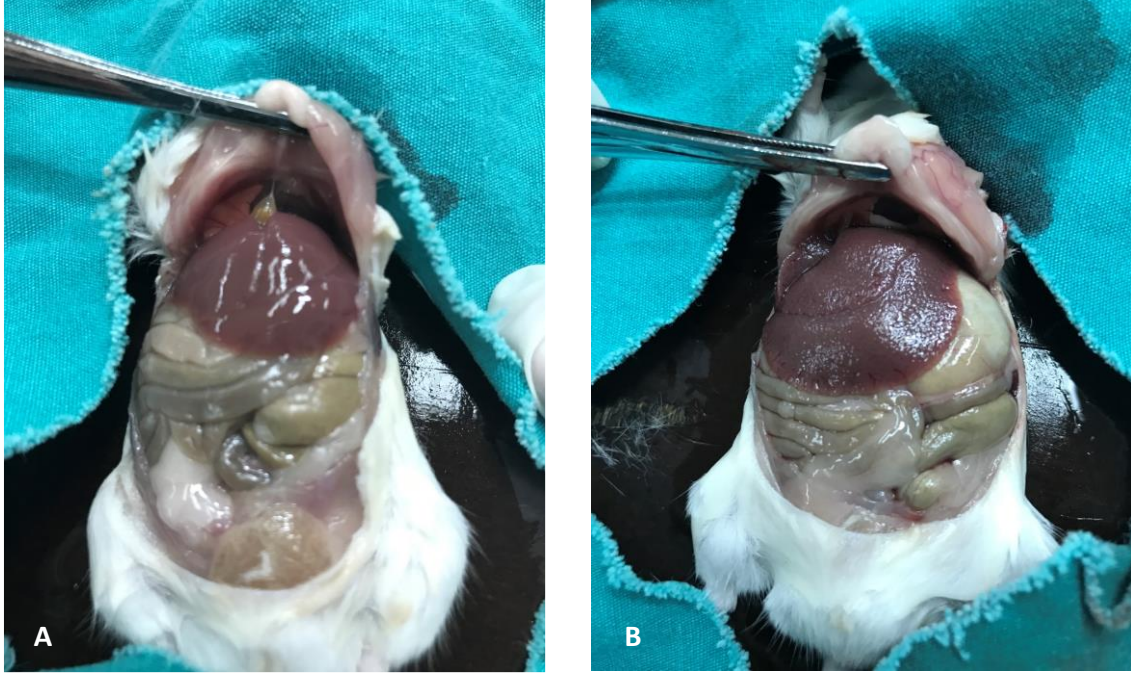
Tablo 4.1. Vücut /Karaciğer Ağırlık Oranları ve Biyokimyasal Değerlendirmeler.

Grup	Vücut/Karaciğer	ALT(ng/mL)	AST(ng/mL)
Genç Naive	17.92 ± 1.09	4.99 ± 1.65	9.25 ± 3.05
Yaşlı Naive	18.86 ± 0.89	6.85 ± 3.15	17.78 ± 5.15
Genç Fibroz	14.77 ± 1.12*	23.88 ± 9.69*	23.87 ± 11.78*
Yaşlı Fibroz	14.68 ± 1.16#	14.43 ± 6.53#	14.96 ± 5.16
Genç PBS	17.33 ± 0.72	6.56 ± 2.20	10.2 ± 2.25
Yaşlı PBS	18.30 ± 0.61	6.12 ± 1.12	9.32 ± 1.12

Genç Naive, Yaşlı Naive, Genç Fibroz, Yaşlı Fibroz gruplarına ilaveten sulandırma tamponu PBS'in enjekte edildiği Genç PBS ve Yaşlı PBS gruplarında vücut/karaciğer ağırlık oranı, serum ALT, AST düzeylerinin ortalaması ± standart sapma değerleri ile beraber sunulmuştur. Vücut/Karaciğer ağırlık oran verilerinde * sembolü Genç Naive-Genç Fibroz arasındaki istatistiksel farkı ($p < 0.001$); # sembolü ise Yaşlı Naive-Yaşlı Fibroz grupları arasındaki farkı simgelemektedir ($p < 0.001$).

4.2. Makroskobik Gözlemler

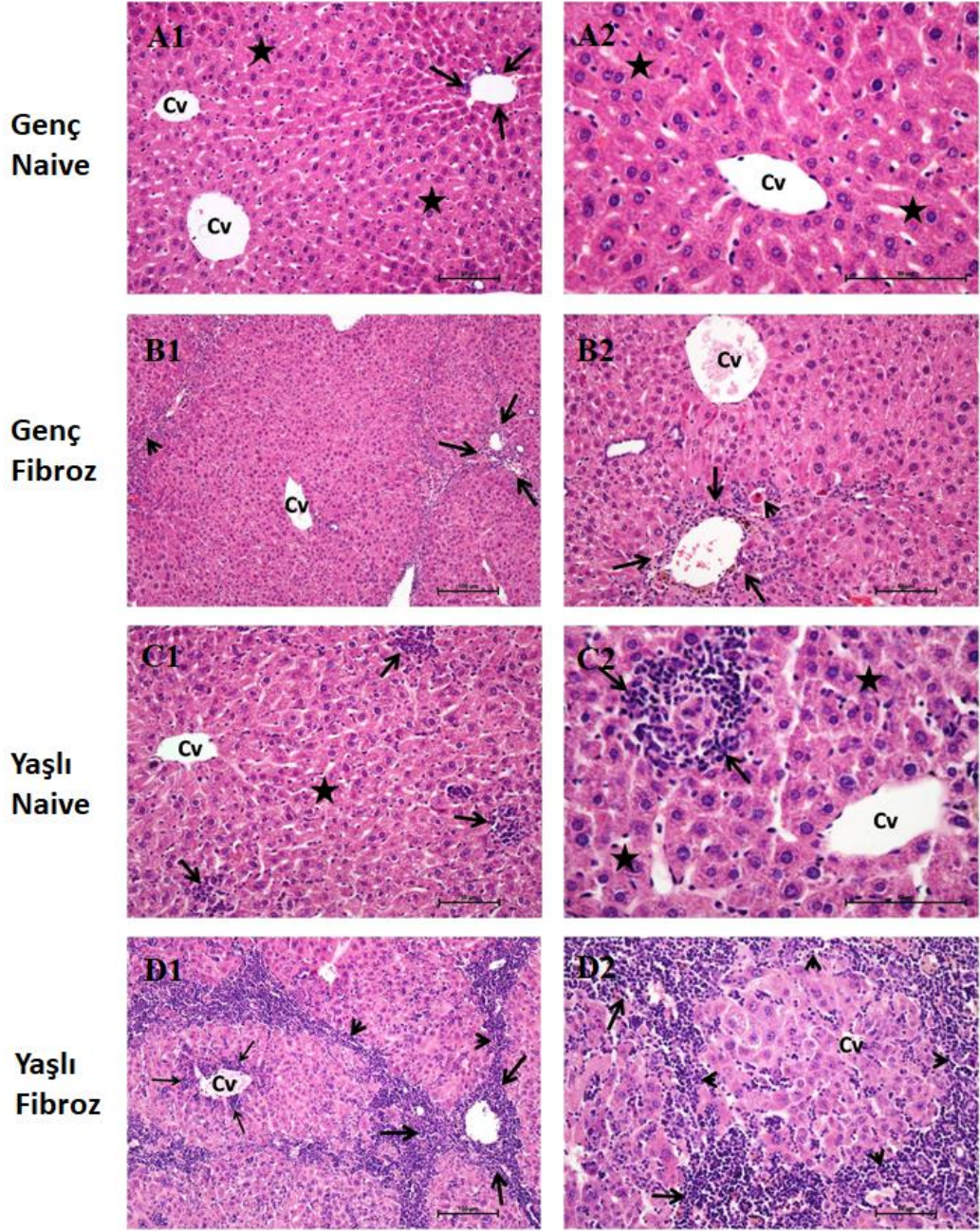
Deney sonunda sakrifiye edilen farelerin karaciğer dokuları incelendiği zaman Genç Naive, Yaşlı Naive, Genç PBS vs Yaşlı PBS gruplarında karaciğer koyukahve renkte parlak ve normal görünümde izlendi (Şekil 4.1-A) Genç TAA ve Yaşlı TAA gruplarının karaciğerinin normalden daha büyük soluk ve pürüzlü bir yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1-B).



Şekil 4.1. Deneklerin Makroskobik Karaciğer Görüntüsü.

4.3. Histolojik Değerlendirmeler

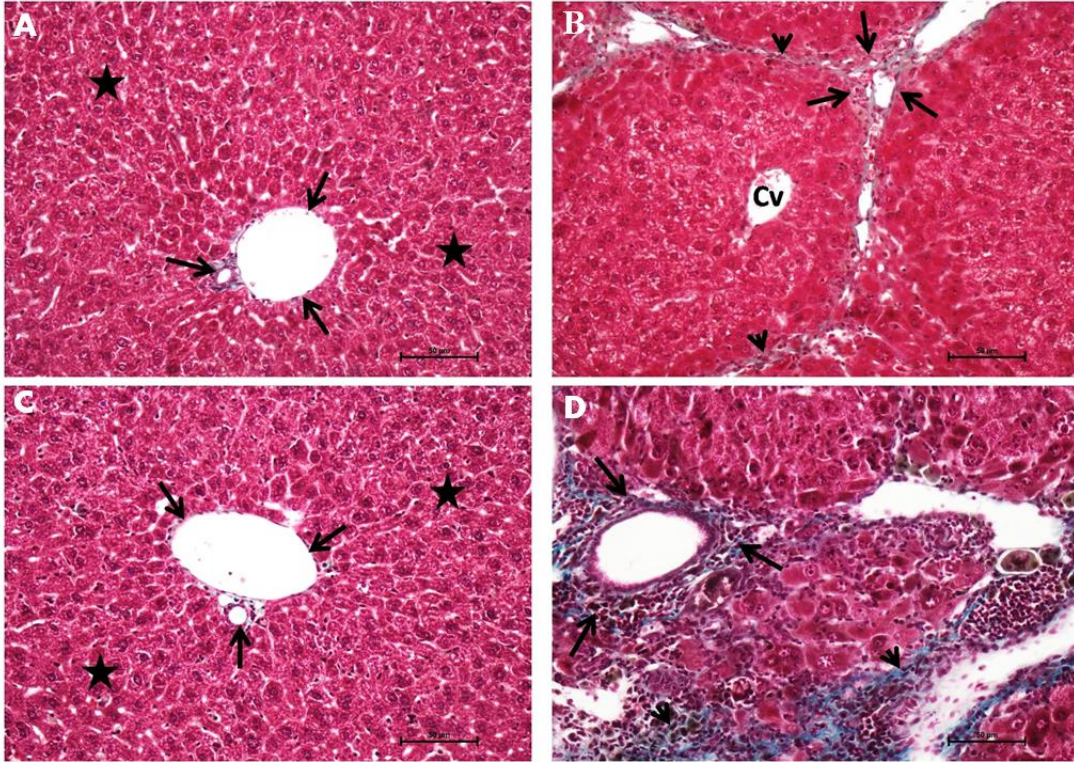
Karaciğer dokusundaki histolojik değerlendirmede inflamasyon düzeyi ve fibroz oluşumu hematoxilen-eozin (H&E) boyama ile saptanmıştır (Şekil 4.2/A1-D4).



Şekil 4.2. H&E Boyama.

Fibroz esnasında karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonu ve inflamasyon kaynaklı dejenerasyonun H&E boyama ile analizi. Genç Naive grupta santral ven (Cv), portal alan (oklar), normal histolojik görünümde karaciğer parankimi ve hepatositler (yıldız) gösterilmiştir (A1, x20; A2, x40). Genç fibroz grupta santral ven (Cv), portal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (oklar), portal alanlar arasında perilobüler fibrozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başı) gösterilmiştir (B1, x10; B2, x20). Ayrıca, apoptotik cisimcik (ok başı) x20 büyütmede gösterilmiştir (B2). Yaşlı Naive grupta santral ven (Cv), fokal nekroz alanları (ok), normal histolojik görünümde hepatositler (yıldız) gözlenmiştir (C1 ve C2, x20). Yaşlı fibroz grupta ise, santral ven (Cv), santral inflamasyon ve nekroz (ince ok), portal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (kalın oklar), portal alanlar arasında köprüleşme nekrozu, perilobüler fibrozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başı) gözlenmiştir (D1, x10 ve D2, x20).

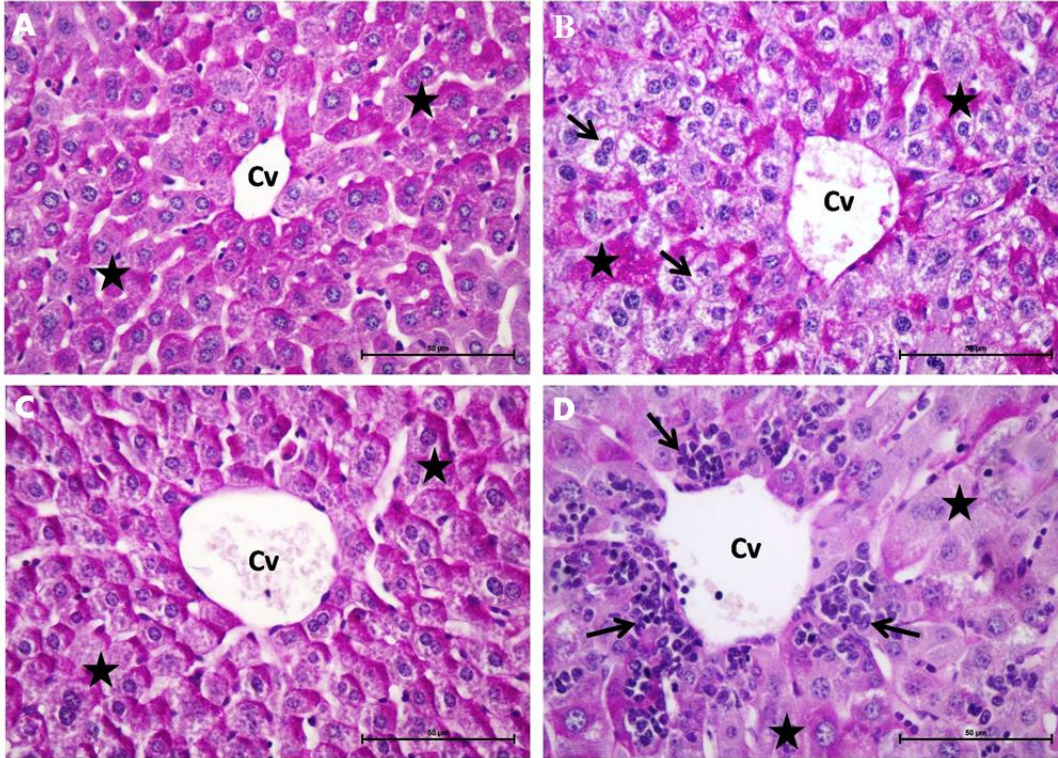
Fibroz oluşumuna eşlik eden bağ ve destek doku oluşumu Gomori'nin trikrom boyama yöntemi ile saptanmıştır. Gruplara ait temsili görüntüler Şekil 4.3/A-D'de sunulmuştur. Genç Naive grupta trikrom boyama görüntüsünde portal alan (oklar), normal histolojik görünümde karaciğer parankimi ve hepatositler (yıldız) görülmektedir (Şekil 4.3/A); Genç Fibroz grupta trikrom boyama görüntüsünde santral ven (Cv), portal alan (oklar), periportal fibrozis (ok başı) görülmektedir (Şekil 4.3/B); Yaşlı Naive grubta trikrom boyama görüntüsünde portal alan (oklar), normal histolojik görünümde karaciğer parankimi ve hepatositler (yıldız) görülmektedir (Şekil 4.3/C); Yaşlı Fibroz grubunda ise; trikrom boyama sonrası portal alanda fibrozis, nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (oklar), periportal fibrozis (ok başı) görülmektedir (Şekil 4.3/D).



Şekil 4.3. Trikrom Boyama

Genç Naive (A), Genç Fibroz (B) Yaşlı Naive (C) ve Yaşlı Fibroz (D) gruplarının karaciğer doku kesitlerine ait Trikrom boyama görüntüleri sunulmuştur. (x20). Yıldızlar normal histolojik görünümde karaciğer parankimi ve hepatositleri, oklar A, B, ve C şekillerinde Portal alanı, D şeklinde ise portal alanda fibrozis, nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, okbaşı ise periportal fibrozisi temsil etmektedir.

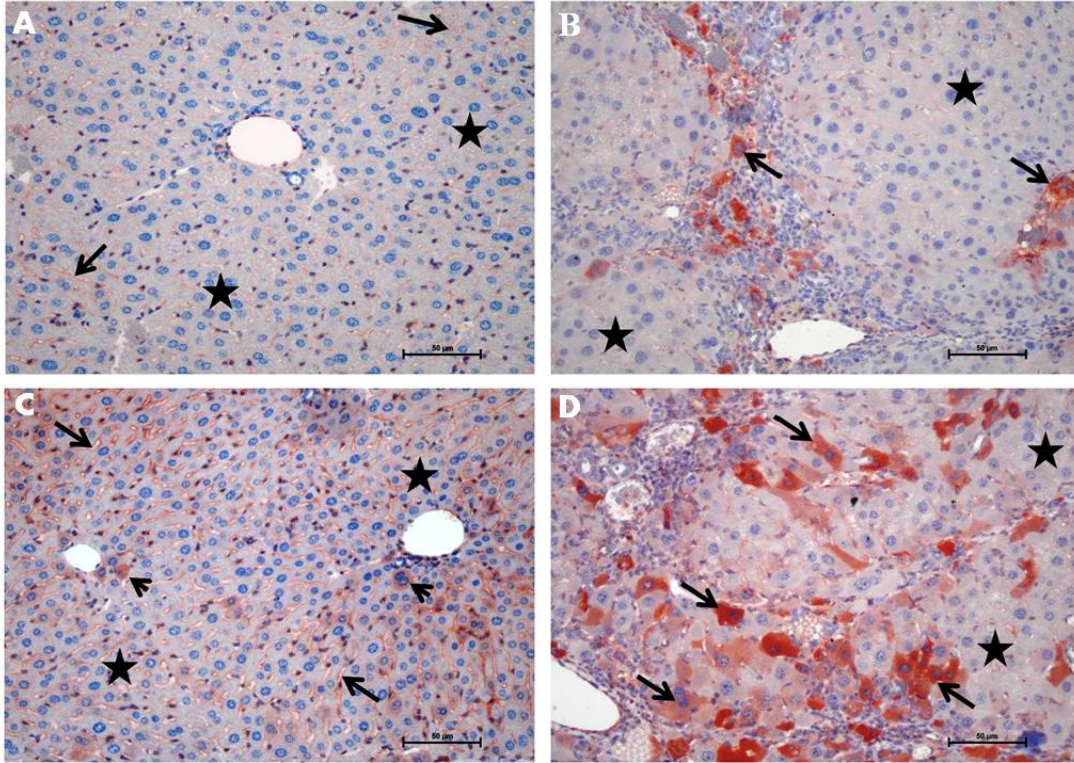
Karaciğerin glikojen depolama durumu, sitoplazmik inklüzyonların dağılımı ve seroid pigmentin hepatosit içindeki varlığı PAS boyama yöntemi ile saptanmıştır, Şekil 4.4/A-D' de gruplara ait temsili görüntüler sunulmuştur. Genç Naive grubun PAS boyama görüntüsünde santral ven (Cv), hepatositlerde PAS boyanma (yıldız) (Şekil 4.4/A), Genç Fibroz grubun PAS boyama görüntüsünde santral ven (Cv), hepatositlerde PAS pozitif boyanma (yıldız), vakuoler sitoplazmalı, PAS negatif hepatositler (ok) (Şekil 4.4/B), Yaşlı Naive grubun PAS boyama görüntüsünde Santral ven (Cv), hepatositlerde PAS pozitif boyanma (yıldız) (Şekil 4.4/C), Yaşlı Fibroz grubun PAS boyama görüntüsünde santral ven (Cv), santral hepatosit nekrozu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok) hepatositlerde zayıf PAS pozitif boyanma (yıldız) (Şekil 4.4/D) görülmektedir.



Şekil 4.4. PAS Boyama

Genç Naive (A), Genç Fibroz (B) Yaşlı Naive (C) ve Yaşlı Fibroz (D) gruplarının karaciğer doku kesitlerinde PAS boyama görüntüleri sunulmuştur (x40). Yıldızlar PAS pozitif boyanan bölgeleri, oklar ise B şeklinde PAS negatif hepatositleri, D şeklinde inflamatuvar hücre infiltrasyonunu temsil etmektedir.

Karaciğer fibroz oluşumunda belirleyici bir belirteç olan α -SMA düzeyindeki artış immünohistokimyasal boyama ile fibrotik karaciğer kesitlerinde gösterilmiştir. Şekil 4.5/A-D’de gruplara ait temsili görüntüler sunulmuştur. Genç Naive grupta perisinuzoidal alanda SMA immunreaktivitesi zayıf pozitif (ok), hepatositlerde SMA immunreaktivitesi negatif (yıldız) (Şekil 4.5/A), Genç Fibroz grupta immünohistokimya boyama görüntüsünde nekroz ve fibroz alanları içindeki hepatositlerde SMA immunreaktivitesi kuvvetli pozitif (ok), hepatositlerde SMA immunreaktivitesi negatif (yıldız) (Şekil 4.5/B). Yaşlı Naive grubun α -SMA boyamasında ise perisinuzoidal alanda SMA immunreaktivitesi orta derecede pozitif (ok başı), SMA immunreaktivitesi zayıf pozitif hepatositler (ok), SMA immunreaktivitesi negatif hepatositler (yıldız) (Şekil 4.5/C), Yaşlı Fibroz grubunda ise hepatositlerde SMA immunreaktivitesi kuvvetli pozitif (ok), SMA immunreaktivitesi negatif hepatositler (yıldız) (Şekil 4.5/D) gözlenmiştir.



Şekil 4.5. IHC boyama

Genç Naive (A), Genç Fibroz (B) Yaşlı Naive (C) ve Yaşlı Fibroz (D) gruplarının karaciğer doku kesitlerinde α -SMA immünohistokimya boyama görüntüleri sunulmuştur (x20). Yıldızlar hepatositlerde negatif SMA immunreaktivitesini, oklar A ve C Şeklinde zayıf pozitif, B ve D şekillerinde hepatositlerde ise kuvvetli pozitif SMA immunreaktivitesini, Ok başı ise orta derecede pozitif SMA immunreaktivitesini temsil etmektedir.

4.4. Knodell Skorlama

Histolojik kantitatif değerlendirme Knodell skorlama ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre; TAA ile oluşturulan karaciğer fibrozu belirgin düzeyde erezyonal nekroz, inflamasyon, lobular nekroz ve fibroz oluşumuna neden olmaktadır. Histolojik analiz sonucu yaşlı fibrotik karaciğer kesit görüntülerinde genç fibrotik gruba göre anlamlı düzeyde artış olduğu saptanmıştır. PBS tampon çözeltisinin karaciğer kesitlerinde sağlıklı gruplara göre anlamlı bir histolojik değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

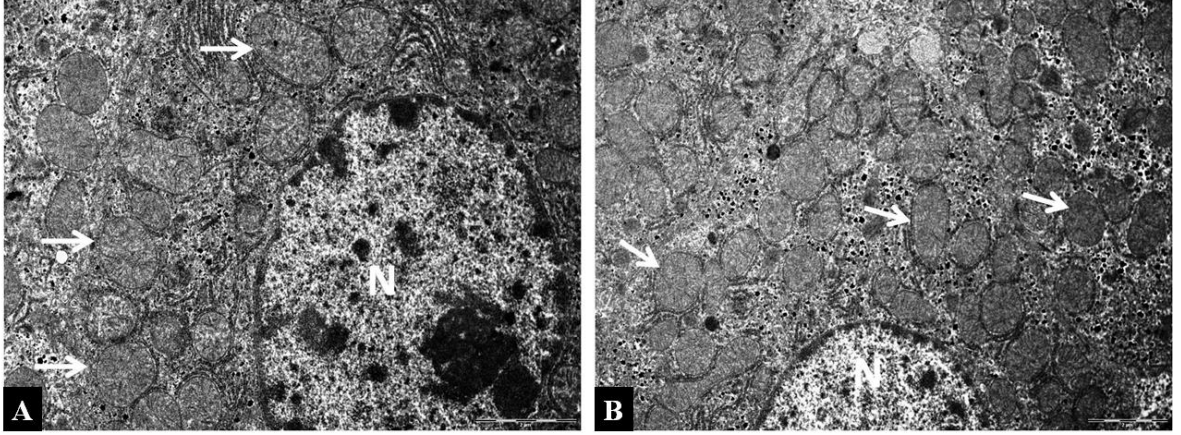
Tablo 4.2. Karaciğer Dokularında Histolojik Değerlendirme.

Gruplar	Patolojik Özellikler				Toplam (maks.53)
	Erezyon Nekroz	Lobular Dejenerasyon ve Fokal Nekroz	Fibroz	İnflamasyon	
Genç Naive	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.31	0.1
Yaşlı Naive	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.51	0.6
Genç Fibroz	3.1 ± 0.56*	1.60 ± 0.96*	1.80 ± 1.03*	1.80 ± 1.03*	8.3*
Yaşlı Fibroz	5.3 ± 0.67# \$	3.6 ± 0.51# \$	2.5 ± 1.08# \$	3.3 ± 0.48# \$	14.7# \$
Genç PBS	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0
Yaşlı PBS	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.31	0.1

Tablodaki değerler tüm deneklerden elde edilen analiz sonuçlarının ortalamasını, ± standart sapma'yı göstermektedir. *, Genç Naive grubu ile Genç Fibroz grubu değerleri arasındaki; #, Yaşlı Naive grubu ile Yaşlı Fibroz grubu değerleri arasındaki; \$ sembolü ise Genç Fibroz ile Yaşlı Fibroz grupları arasındaki istatistiksel farkı simgelemektedir ($p < 0.05$).

4.5. Transmisyon Elektron Mikroskopik Bulgular

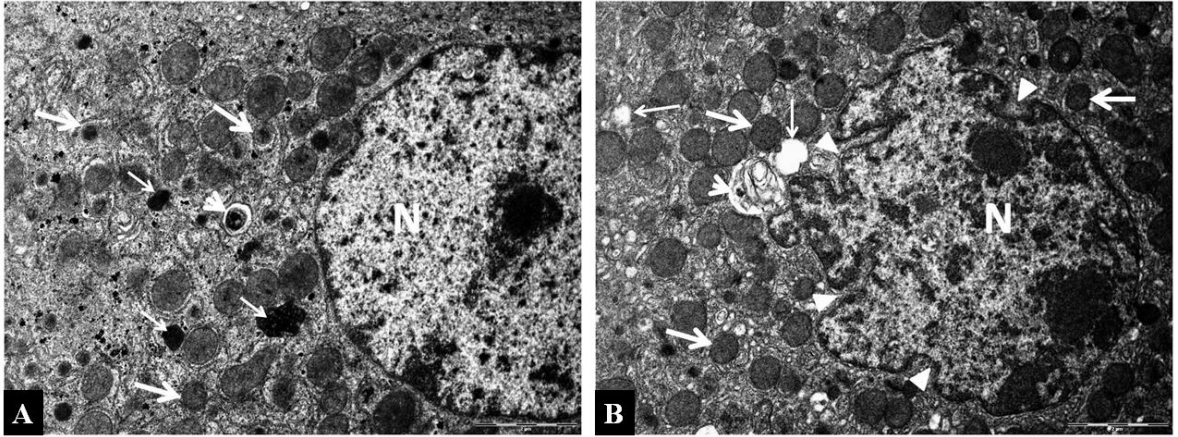
Genç Naive grubun transmisyon elektron mikroskopta incelenen karaciğer kesitleri normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Genç Naive Grup TEM görüntüleri.

Hepatosit Hücre çekirdeği (N) ve Mitokondriler (oklar) (A: TEMx8000, B: TEMx6300)

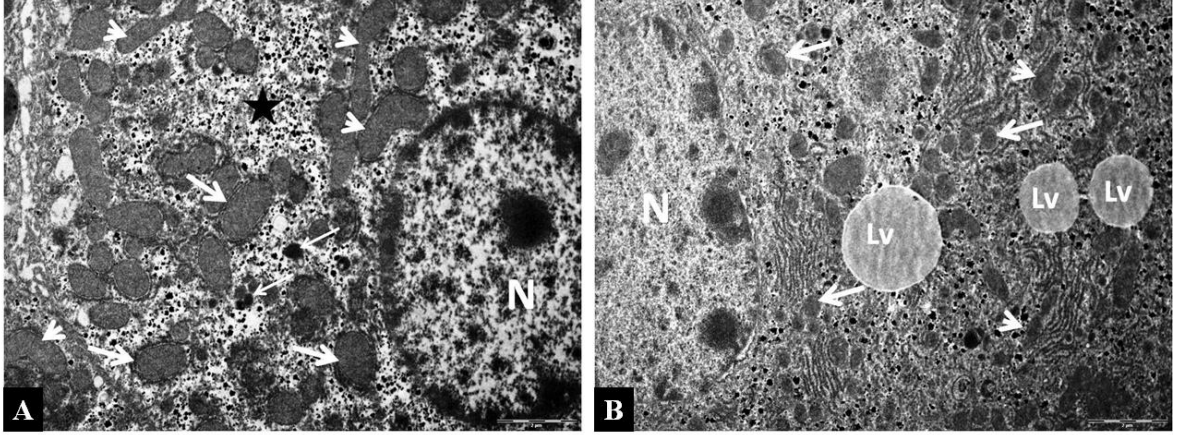
Genç Fibroz grubun incelenen karaciğer kesitlerinde hepatosit nukleus sınırlarında düzensizlik (girintili-çıkıntılı), mitokondrilerde matriks yoğunlaşması, *pyknosis*, krista kaybı ve dejenerasyon izlendi. Ayrıca hepatositlerin sitoplazmasında lizozomlar ve miyelin figürler içeren otofagozomlar tespit edildi (Şekil 4.7)



Şekil 4.7. Genç Fibroz Grup TEM görüntüleri.

A: Hepatosit hücre çekirdeği (N), Yoğunlaşmış Mitokondri (kalın ok), Mitokondri dejenerasyonu (ok ucu), Lizozom (ince ok). TEMx8000. B: Hepatosit hücre çekirdeği (N), Hepatosit hücre çekirdeğinin sınırındaki girintili çıkıntılı düzensizlik (üçgen), Mitokondri yoğunlaşması (kalın ok), Mitokondri dejenerasyonu (ince ok), otofagozom (ok ucu). TEMx8000

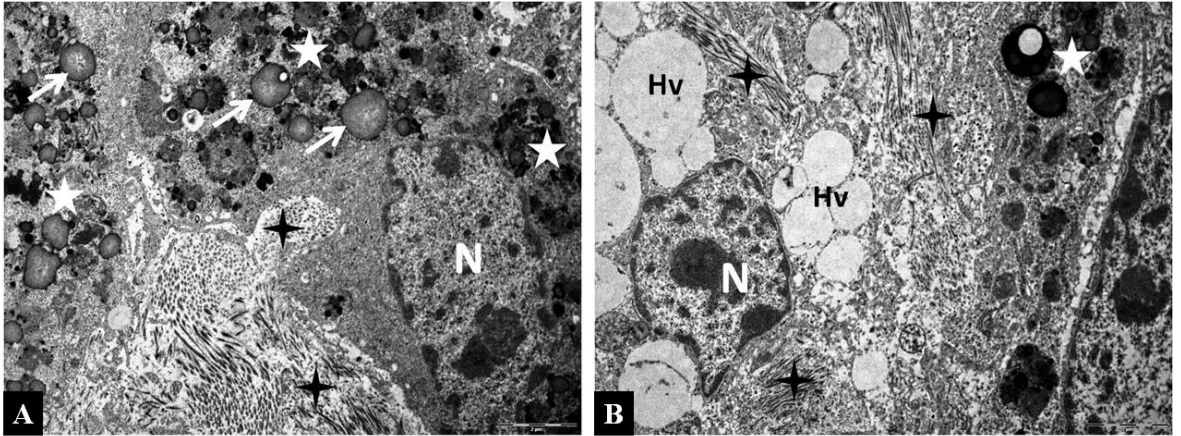
Yaşlı Naive grubun incelenen kesitlerde hepatositlerin mitokondrilerde matriks yoğunlaşması, *pyknosis* izlendi. Ayrıca uzamış-bükülmüş deforme şekilli mitokondrilerde tespit edildi. Hepatositlerde minimal düzeyde intrasitoplazmik ödem, küçük lizozomlar ile farklı çaplarda lipid vakülleri görüldü (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Yaşlı Naive Grup TEM Görüntüleri.

A: Hepatosit hücre çekirdeği (N), mitokondrial matriks yoğunlaşması (kalın ok), uzamış bükülmüş şekilli mitokondriler, (ok ucu), lysosome (ince ok). TEM, x6300, B: Hepatosit hücre çekirdeği (N), yoğunlaşmış mitokondri (kalın ok), uzamış bükülmüş şekilli mitokondriler, (ok ucu), lipid vaküölü (Lv). TEM, x6300

Yaşlı Fibroz grubunun incelenen kesitlerde hepatosit nukleuslarında şekil deformasyonu, sitoplazmada yoğun lipofuskin birikimleri ve lizozomlar saptandı. Ayrıca hepatosit sitoplazmasında farklı çaplarda hidropik vakuoller içeren hepatositler görüldü. Mitokondriyonlarda matriks yoğunlaşması ve kristalarında lizis (*ing.mitochondria cristae lysis*) mevcuttu. Parankimal alanlarda hepatositler arasında fibriler kollajen içeren fibrozis alanları dikkati çekti (Şekil 4.9).



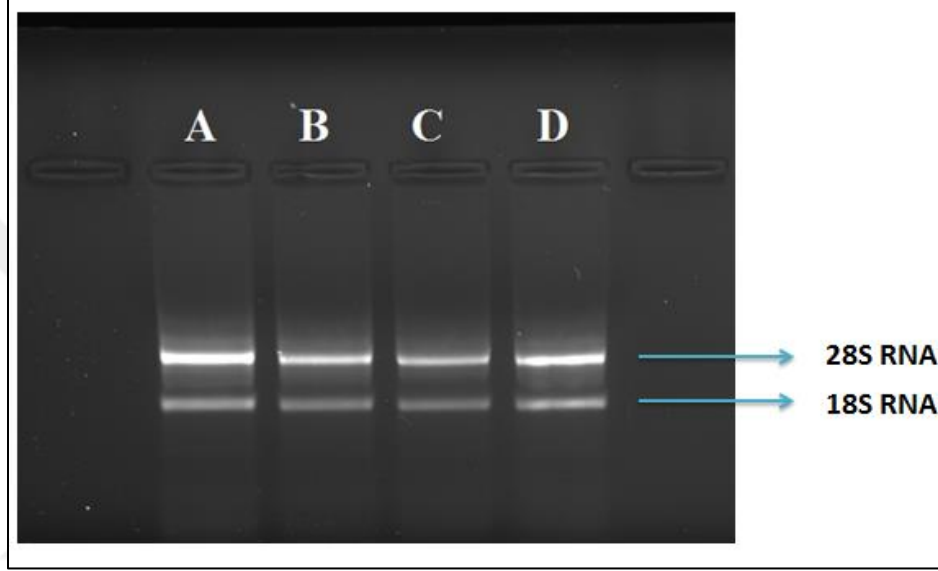
Şekil 4.9. Yaşlı Fibroz Grup TEM Görüntüleri.

A: Hepatosit hücre çekirdeği (N), Mitokondrilerde yoğunlaşmış matriks ve kristaların lizise uğraması (oklar), lipofuskin granülleri ve lizozomlar (5 kollu yıldız), fibriler kollajen içeren fibrozis alanları (4 kollu yıldız). TEM, x6300 B: Hepatosit hücre çekirdeği (N), hidropik vaküoller (Hv), lipofuskin granülleri ve lizozomlar (5 kollu yıldız), fibriler kollajen içeren fibrozis alanları (4 kollu yıldız), TEM, x6300

4.6. Moleküler Genetik Bulgular

4.6.1. RNA Agaroz Jel Elektrofrez

Dalak ve karaciğer örneklerinden RNA izolasyonu sonrası elde edilen RNA'lar agaroz jel elektrofrezinde yürütülerek 28S ve 18S RNA'lar görüntülenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. RNA'ların %1 Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

A; Genç Naive grup Karaciğer dokusundan elde edilen RNA örneği, B; Genç Naive grup Dalak dokusundan elde edilen RNA örneği C; Yaşlı Fibroz grup Karaciğer dokusundan elde edilen RNA örneği D; Yaşlı Fibroz grup Dalak dokusundan elde edilen RNA örneğini simgelemektedir.

Elde edilen RNA'ların 260/280 nm'deki absorbas değerleri Tablo 4.3'de verilmiştir.

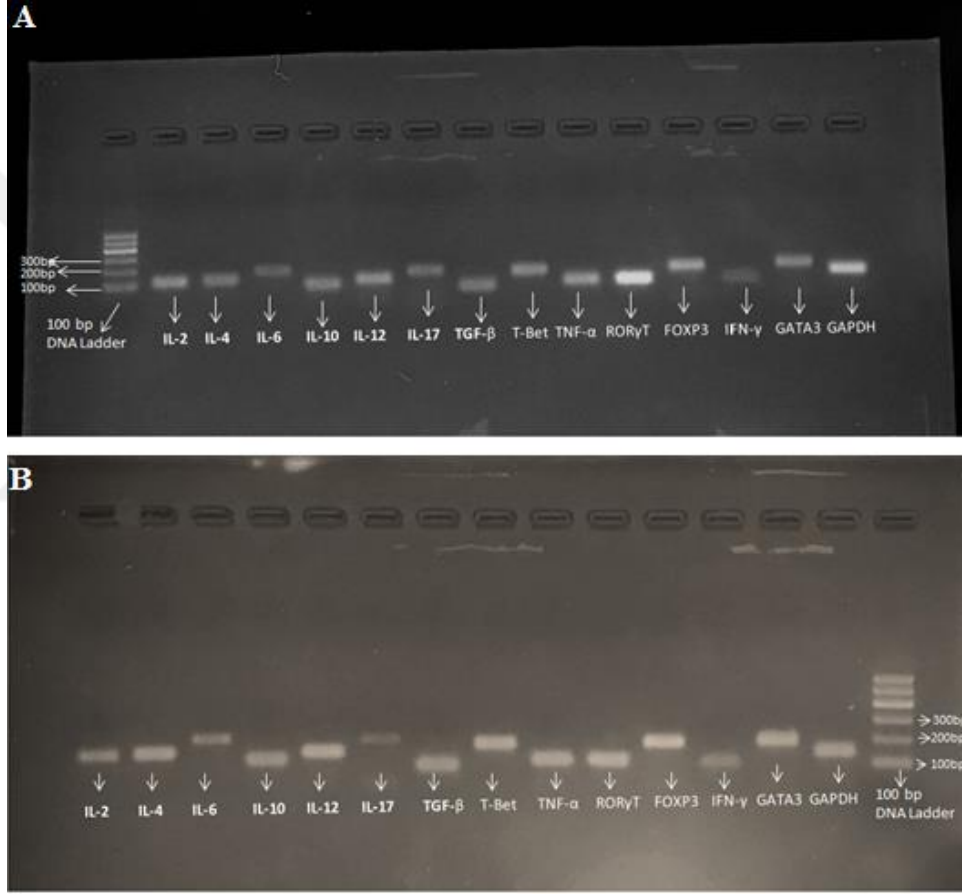
Tablo 4.3. Elde Edilen RNA Miktarları ve Absorbans Değerleri.

Örnek	RNA ng/ml	260/280	Örnek	RNA ng/ml	260/280
GNK1	705	2.32	GND 1	219	1.99
GNK2	1006	2.13	GND 2	193	2.15
GNK3	856	2.13	GND 3	791	2.14
GNK4	1316	2.16	GND 4	1456	2.12
GNK5	824	2.12	GND 5	1726	2.08
GNK6	907	2.14	GND 6	1461	2.13
GNK7	1203	2.15	GND 7	613	2.15
GNK8	842	2.13	GND 8	1225	2.12
GFK 1	1580	2.12	GFD 1	188	2.12
GFK 2	1224	2.17	GFD 2	1053	2.13
GFK 3	1176	2.15	GFD 3	977	2.16
GFK 4	1149	2.14	GFD 4	1043	2.16
GFK 5	466	2.14	GFD 5	935	2.15
GFK 6	883	2.17	GFD 6	98,6	2.05
GFK 7	1463	2.15	GFD 7	223	2.1
GFK 8	1044	2.16	GFD 8	287	2.07

GNK; Genç Naive Karaciğer örneklerini, GFK; Genç Fibroz Karaciğer örneklerini, GND; Genç Naive Dalak örneklerini, GFD; Genç Fibroz Dalak örneklerini simgelemektedir.

4.6.2. Gerçek Zamanlı PZR ile Gen İfadesi Analizi Bulguları

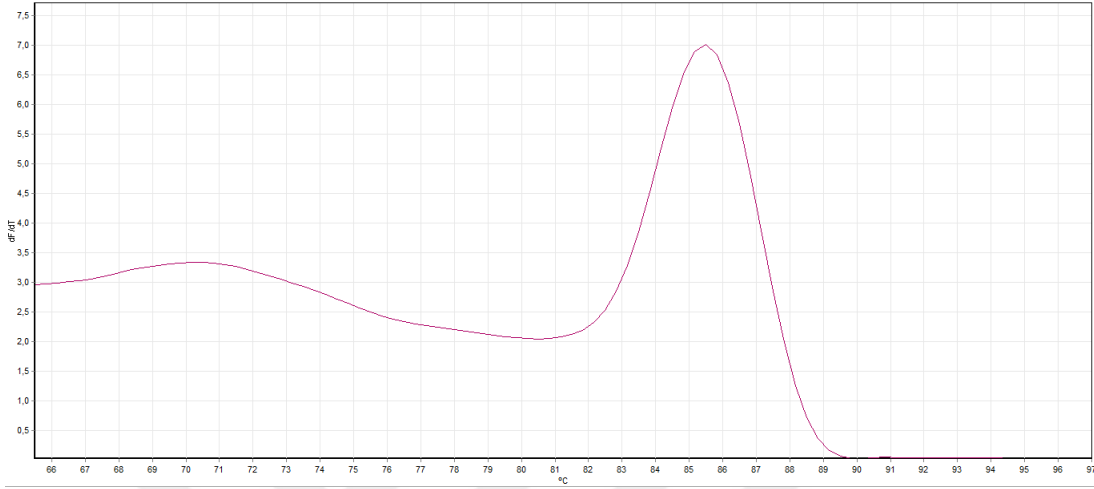
Elde edilen RNA'lerden cDNA elde edilmiş ve sonrasında gen ifade düzeyleri araştırılmıştır. Gen ifadelerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile tayini sonrası her gene ait reaksiyon ürününün varlığı karaciğer (Şekil 4.11-A) ve dalak (Şekil 4.11-B) için agaroz jel elektroforezinde gösterilmiştir.



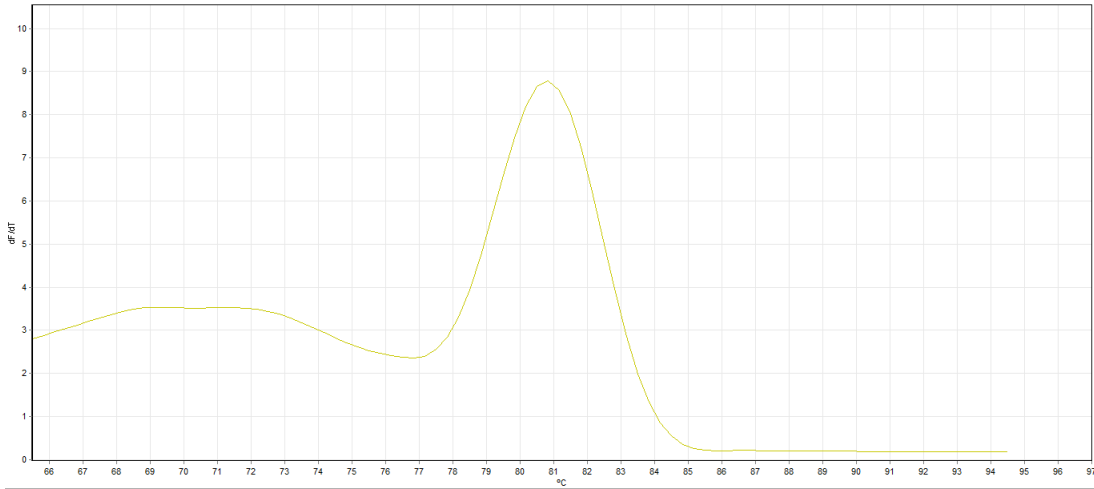
Şekil 4.11. Gerçek Zamanlı PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi.

Deneklerin Karaciğer ve Dalak örneklerinden RNA izolasyonu sonrası cDNA eldesi ve real time PZR sonunda PZR ürünlerinin jel elektroforezinde görüntülenmesini göstermektedir **A**; Karaciğer örneklerine ait PZR ürünlerinin jel görüntüsünü **B**; Dalak örneklerine ait PZR ürünlerinin jel görüntüsünü göstermektedir. PZR ürünlerinin baz büyüklükleri; IL-2 (111bp), IL-4 (115bp), IL-6 (178bp), IL-10 (81bp), IL-12 (114bp), IL-17 (174bp), TGF- β (64bp), Tbet (161bp), TNF- α (93bp), ROR γ T(95bp), IFN- γ (95bp), GATA3(191bp), GAPDH (140bp).

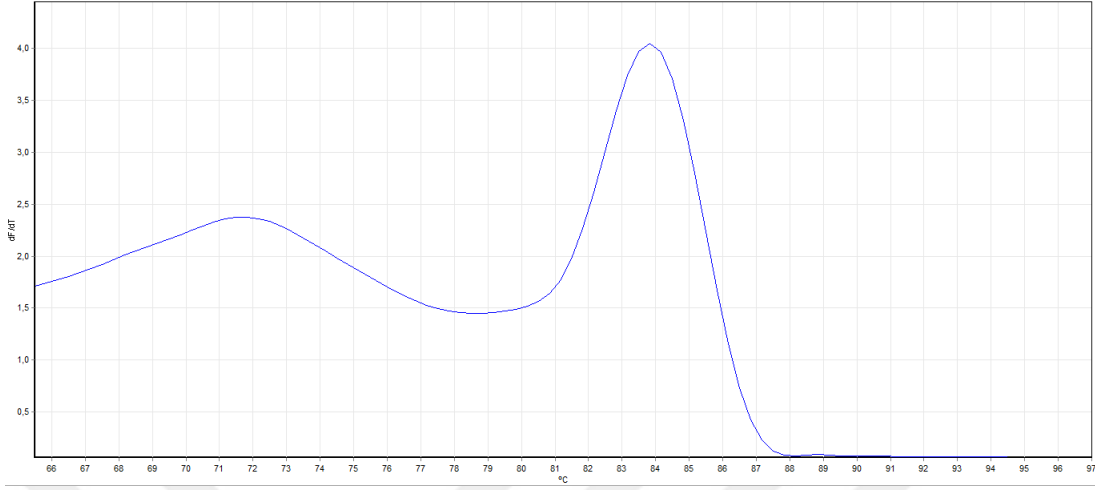
Her bir primer için elde edilen melting point grafiği Şekil 4.12-4.25'de gsterilmiŐtir.



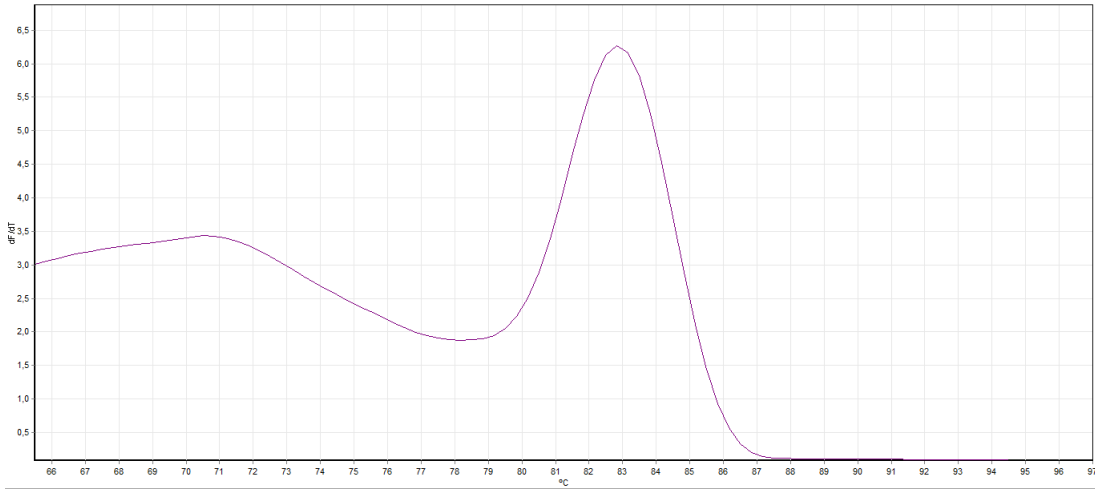
Şekil 4.12. *IL-2* Geninin Erime Noktası Grafiği.



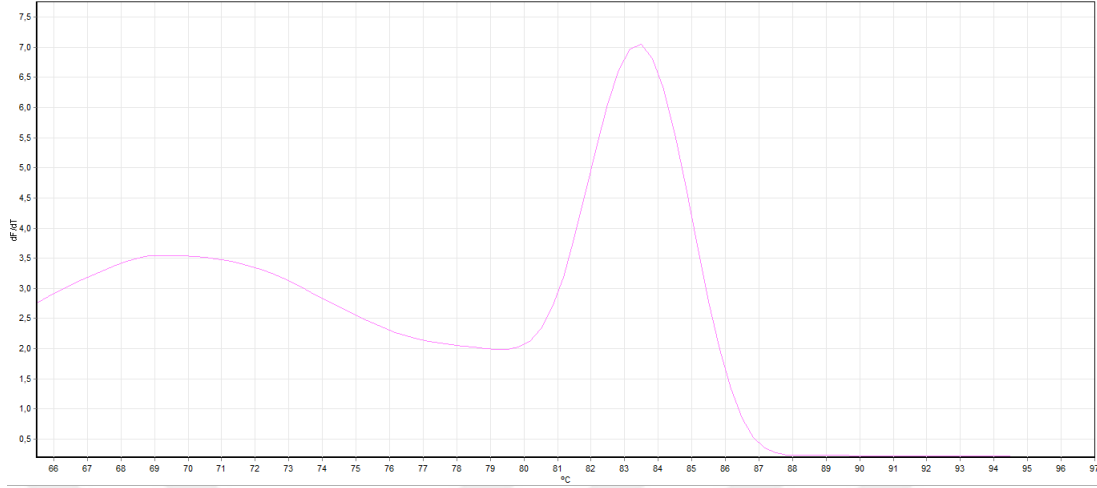
Şekil 4.13. *IL-4* Geninin Erime Noktası Grafiği.



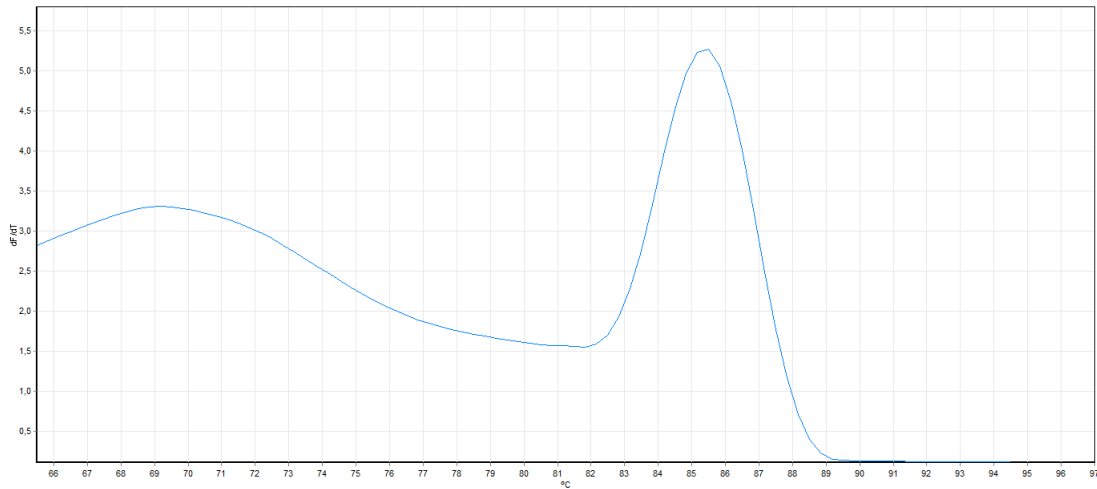
Şekil 4.14. *IL-6* Geninin Erime Noktası Grafiği.



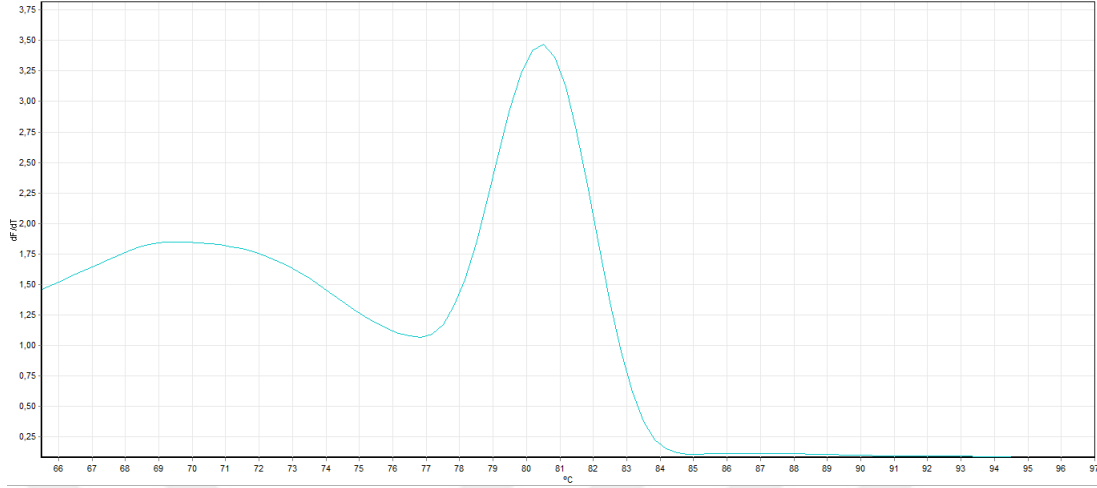
Şekil 4.15. *IL-10* Geninin Erime Noktası Grafiği.



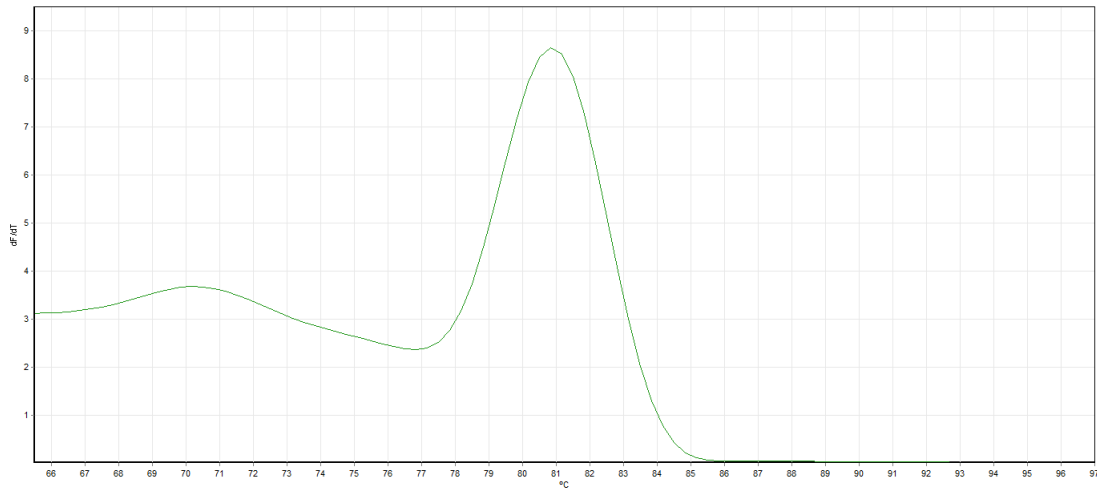
Şekil 4.16. *IL-12* Geninin Erime Noktası Grafiği.



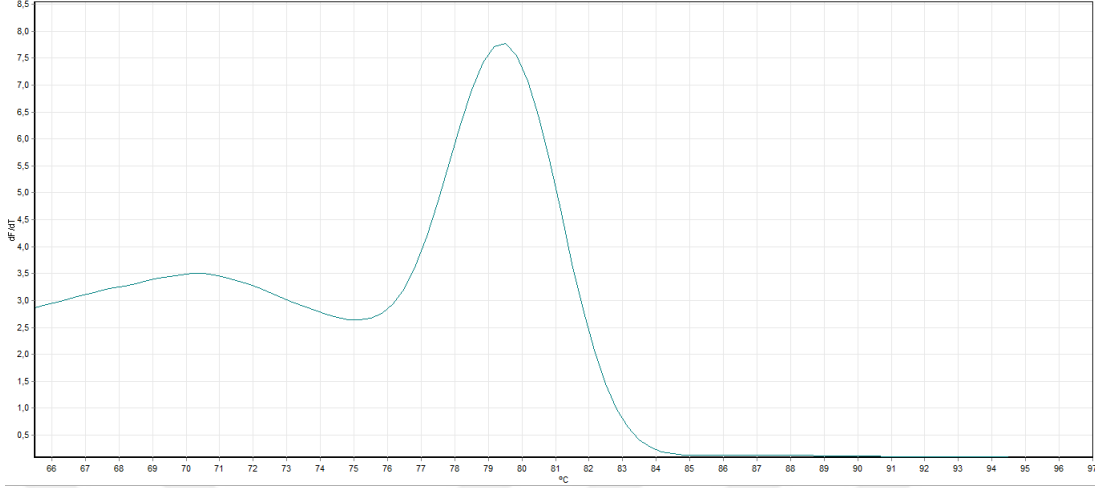
Şekil 4.17. *IL-17* Geninin Erime Noktası Grafiği.



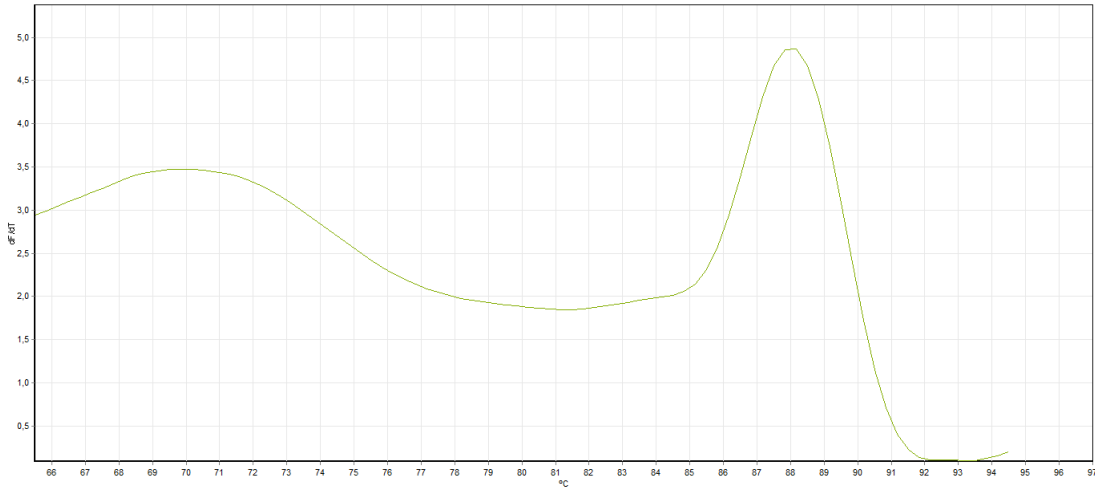
Şekil 4.18. *IFN- γ* Geninin Erime Noktası Grafiği.



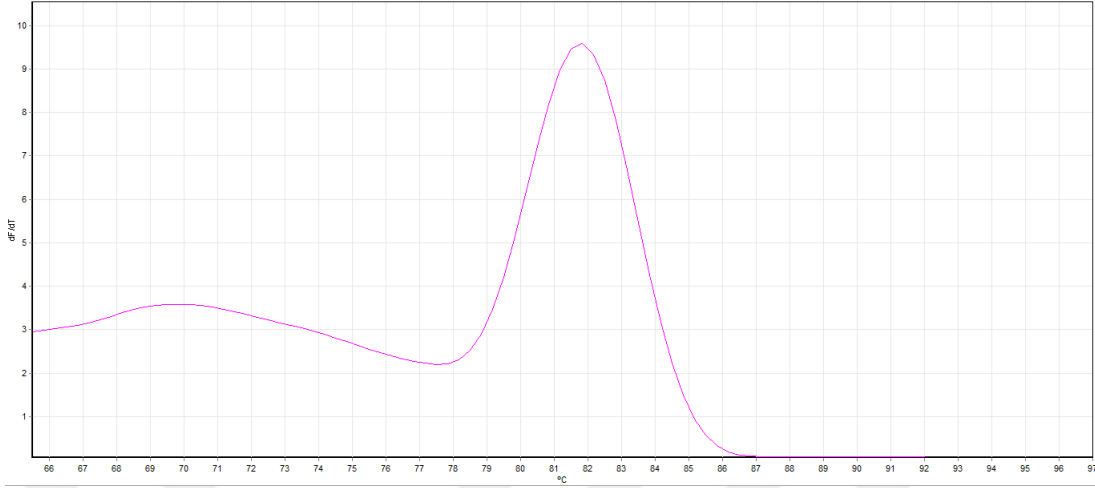
Şekil 4.19. *TNF- α* Geninin Erime Noktası Grafiği.



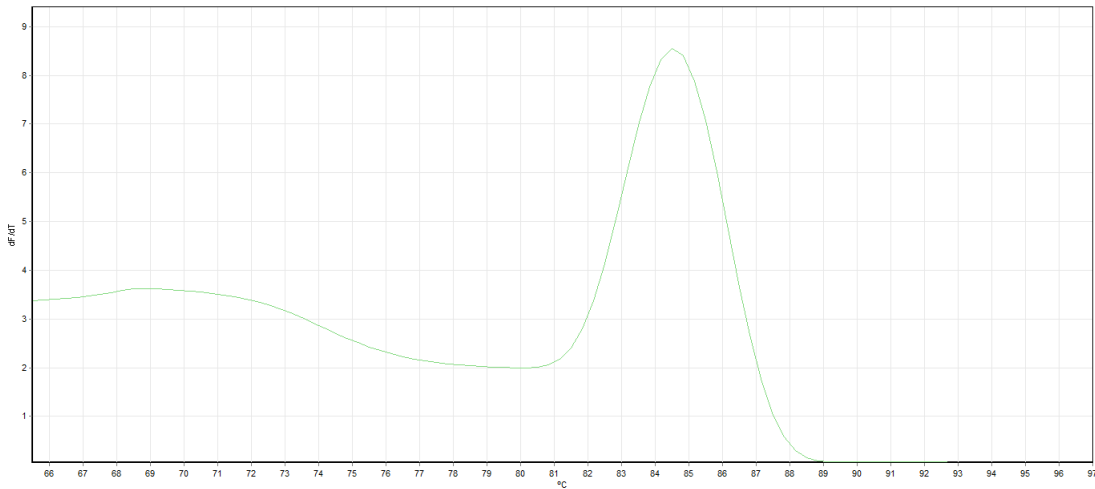
Şekil 4.20. *TGF- β* Geninin Erime Noktası Grafiği.



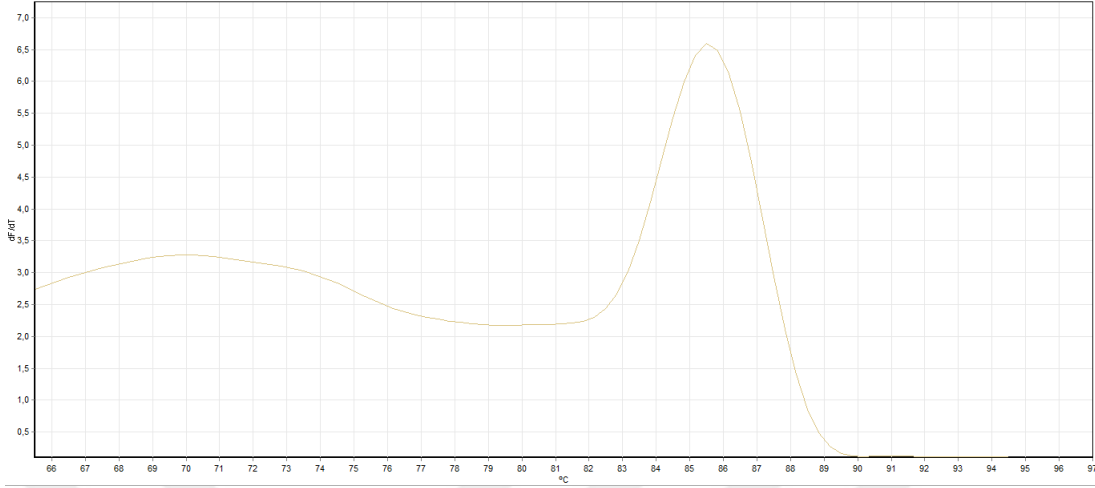
Şekil 4.21. *Tbet* Geninin Erime Noktası Grafiği.



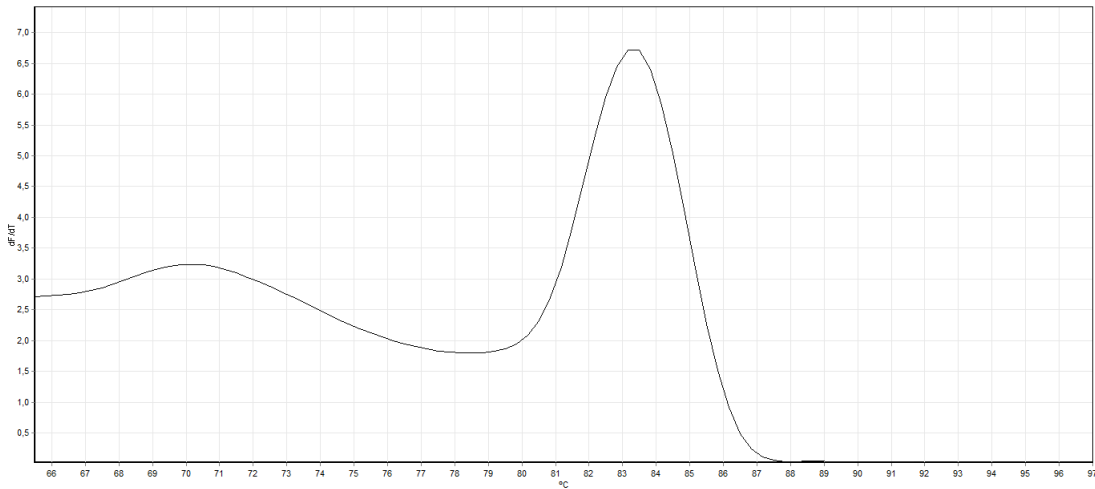
Şekil 4.22. *ROR γ T* Geninin Erime Noktası Grafiği.



Şekil 4.23. *GAPDH* Geninin Erime Noktası Grafiği.



Şekil 4.24. *GATA3* Geninin Erime Noktası Grafiği.



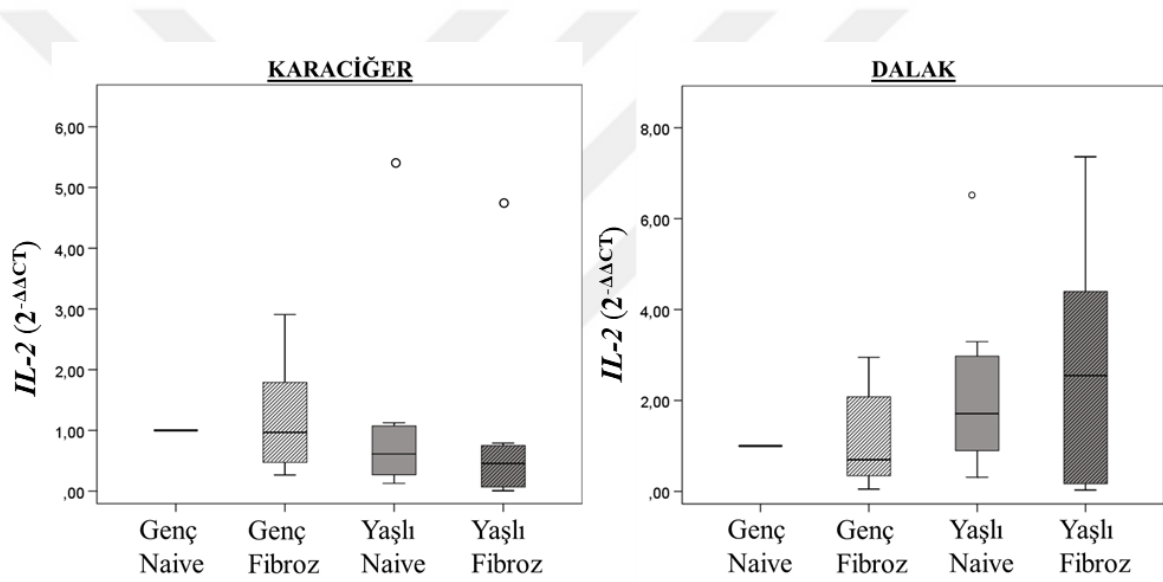
Şekil 4.25. *FOXP3* Geninin Erime Noktası Grafiği.

Gen ifadelerinin hesaplanmasında Livak Metodu olarak da bilinen $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılmıştır (107), hesaplamalar kısaca şu şekilde yapılmıştır ; Öncelikle 3 er tekrarlı olarak çalışılan hedef genler ve house-keeping gen olan *GAPDH* geninin her örnek için ortalama Threshold Cycle (Ct) değerleri hesap edildi. Daha sonra tüm deneklerin hedeflenen Gen Ct değerinden Housekeeping Gen Ct değeri çıkarılarak ΔCT değeri hesaplandı. Bunu takiben deney grubundaki örneklerin ΔCT değerinden kontrol grubunun ΔCT değeri çıkarılarak tüm

örneklerin $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandı. Son olarak ise $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile artış miktarı kat değişimi olarak ifade edildi.

4.7. İnflamatuar Yanıttan Sorumlu Sitokin Genlerinin (*IL-2*, *IL-6*, *IL-12*, *IL-17*, *IFN- γ* ve *TNF- α*) İfade Edilme Düzeyleri

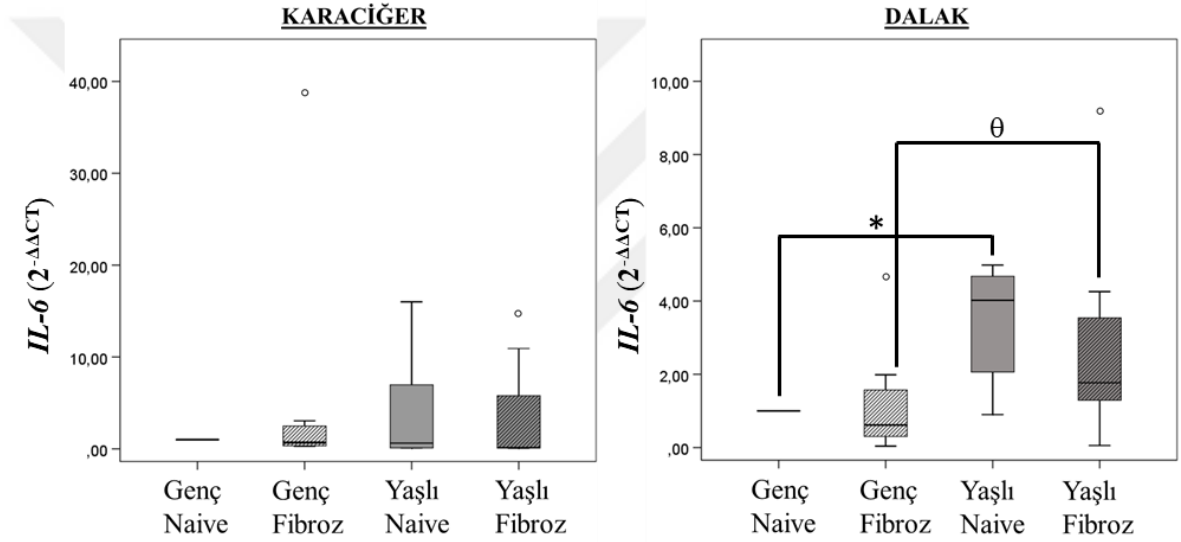
İnflamatuar immün yanıtta sorumlu sitokin genlerinden *IL-2*'nin karaciğer ve dalaktaki ifade edilme düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiki olarak anlamlı bir değişim tespit edilememiştir. (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. İnflamatuar Sitokin *IL-2* Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.

'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

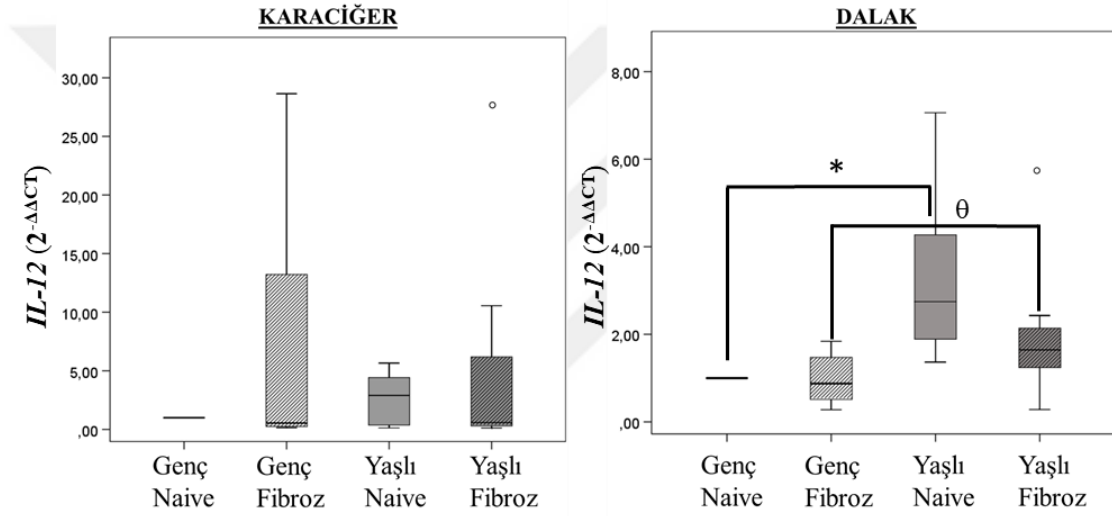
İnflamatuvar immün yanıtta sorumlu sitokin genlerinden *IL-6*'nın karaciğerdeki ifade edilme düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiki olarak anlamlı bir değişim tespit edilememiştir. Dalak dokusundaki incelemelerde herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *IL-6* ifadesi Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca dalak dokusunda Yaşlı Fibroz grubunun *IL-6* seviyeleri Genç Fibroz grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. İnflamatuvar Sitokin *IL-6* Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki; θ simgesi Genç Fibroz-Yaşlı Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. 'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

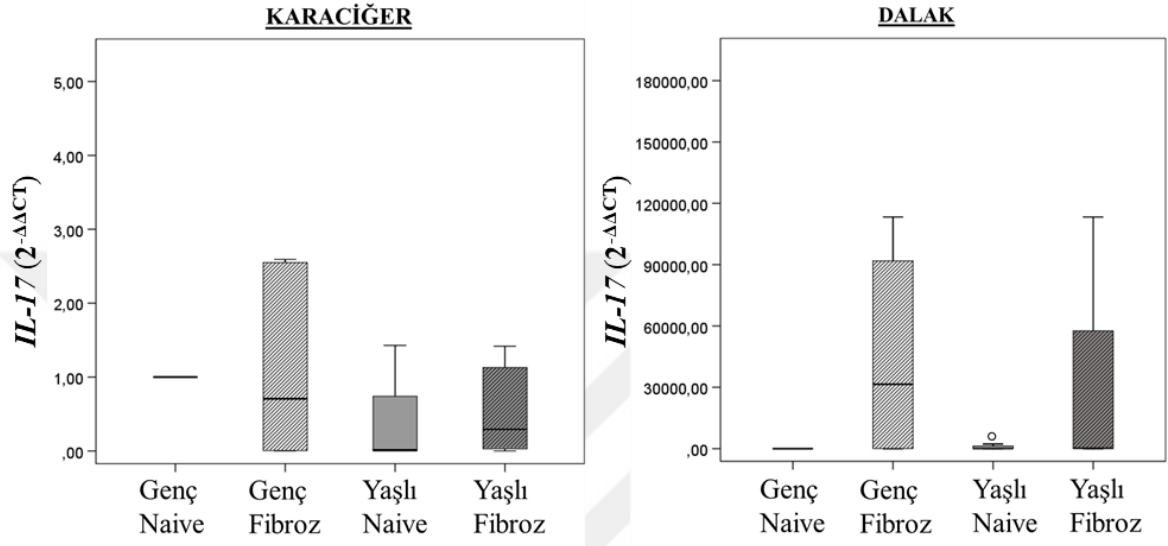
İnflamatuar immün yanıtın sorumlu sitokin genlerinden *IL-12*'nin karaciğerdeki ifade edilme düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiki olarak anlamlı bir değişim tespit edilememiştir. Dalak dokusundaki incelemelerde herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *IL-12* ifadesi Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$) Ayrıca dalak dokusunda Yaşlı Fibroz grubunun *IL-* seviyeleri Genç Fibroz grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. İnflamatuar Sitokin IL-12 Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki istatistiksel farkı; θ simgesi Genç Fibroz-Yaşlı Fibroz arasındaki göstermektedir. 'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

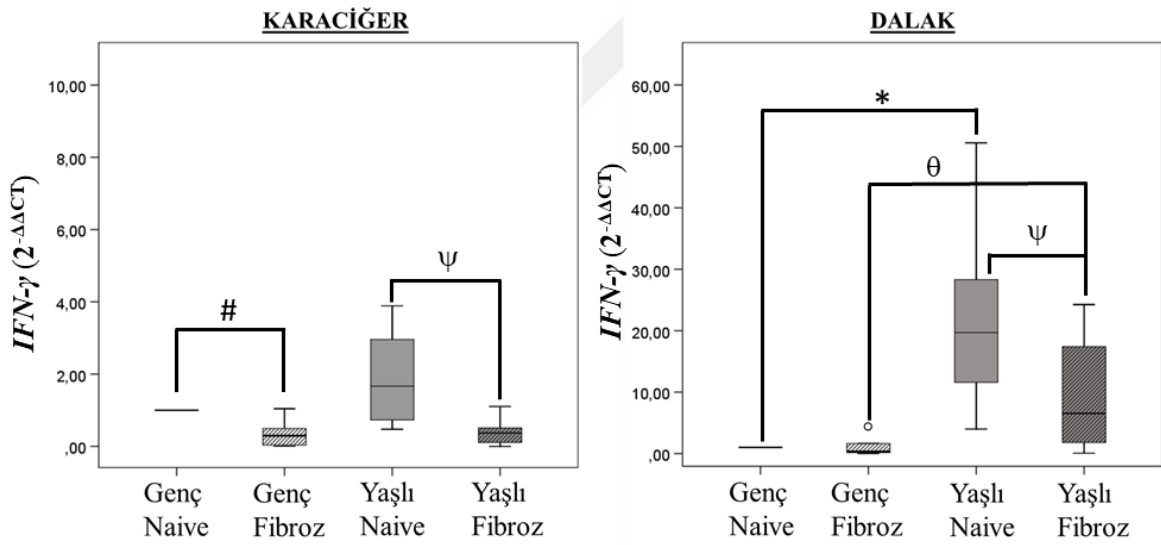
İnflamatuvar immün yanıtta sorumlu sitokin genlerinden *IL-17*'nin karaciğer ve dalaktaki ifade edilme düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiki olarak anlamlı bir değişim tespit edilememiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. İnflamatuvar Sitokin *IL-17* Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.

'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

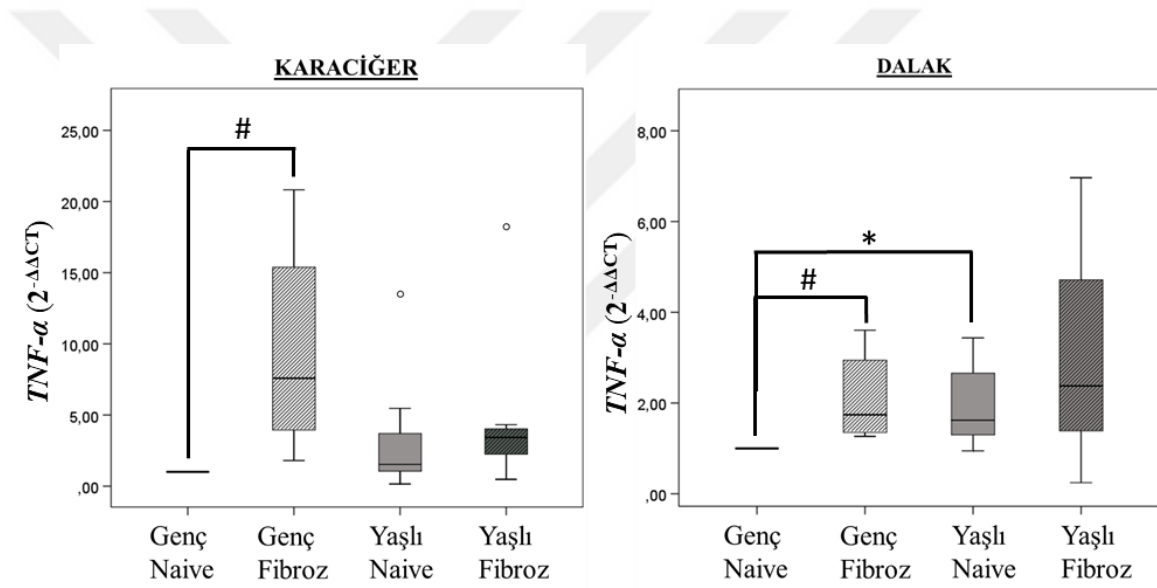
İnflamatuvar immün yanıtta sorumlu sitokin genlerinden $IFN-\gamma$ 'nın karaciğer dokusundaki incelemelerinde Genç Fibroz grubundaki $IFN-\gamma$ gen ifadesinin Genç Naive gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.001$). Yaşlı fibroz grubundaki $IFN-\gamma$ gen ise Yaşlı Naive gruba oranla anlamlı bir biçimde düşüş gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.001$). Dalak dokusundaki incelemelerde herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda $IFN-\gamma$ ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$). Yaşlı Fibroz grubunun $IFN-\gamma$ seviyeleri Yaşlı Naive Grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Yaşlı Fibroz grubunun $IFN-\gamma$ seviyeleri Genç Fibroz grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. İnflamatuvar Sitokin $IFN-\gamma$ Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki; # simgesi Genç Naive- Genç Fibroz arasındaki; θ simgesi Genç Fibroz-Yaşlı Fibroz arasındaki; ψ simgesi Yaşlı Naive-Yaşlı Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

İnflamatuar immün yanıtta sorumlu sitokin genlerinden *TNF- α* 'nın karaciğer dokusundaki incelemelerinde Genç Fibroz grubundaki *TNF- α* gen ifadesinin Genç Naive gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,001$). Dalak dokusundaki incelemelerde herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *TNF- α* ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Genç Fibroz grubundaki *TNF- α* gen ifadesinin Genç Naive gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.31).

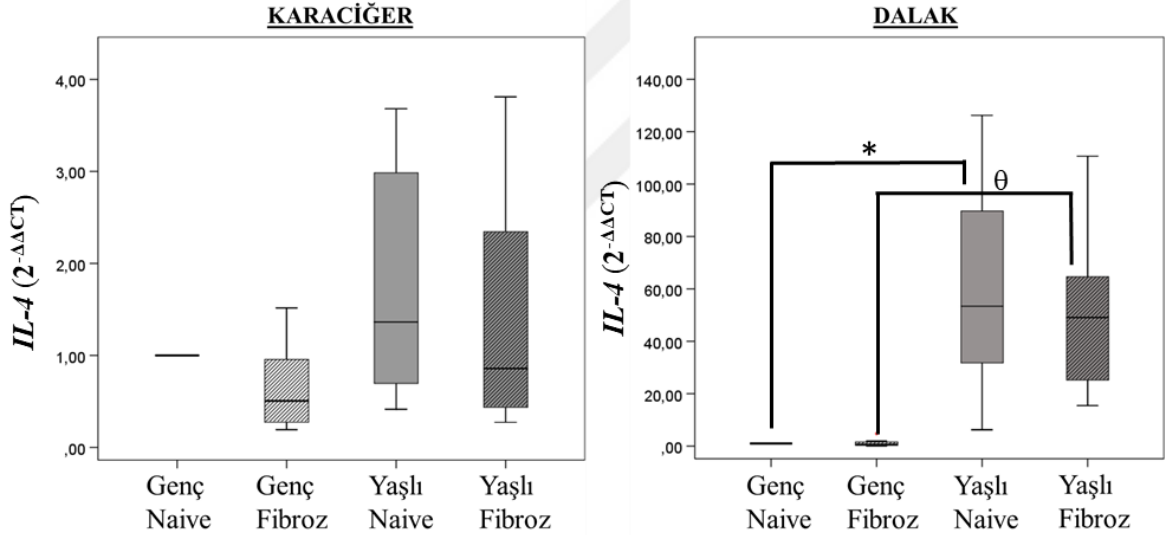


Şekil 4.31. İnflamatuar Sitokin *TNF- α* Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki; # simgesi Genç Naive- Genç Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. 'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

4.8. Anti-İnflamatuar İmmün Yanıttan Sorumlu Sitokin Genlerinin (*IL-4*, *IL-10*, *TGF-β*) İfade Edilme Düzeyleri

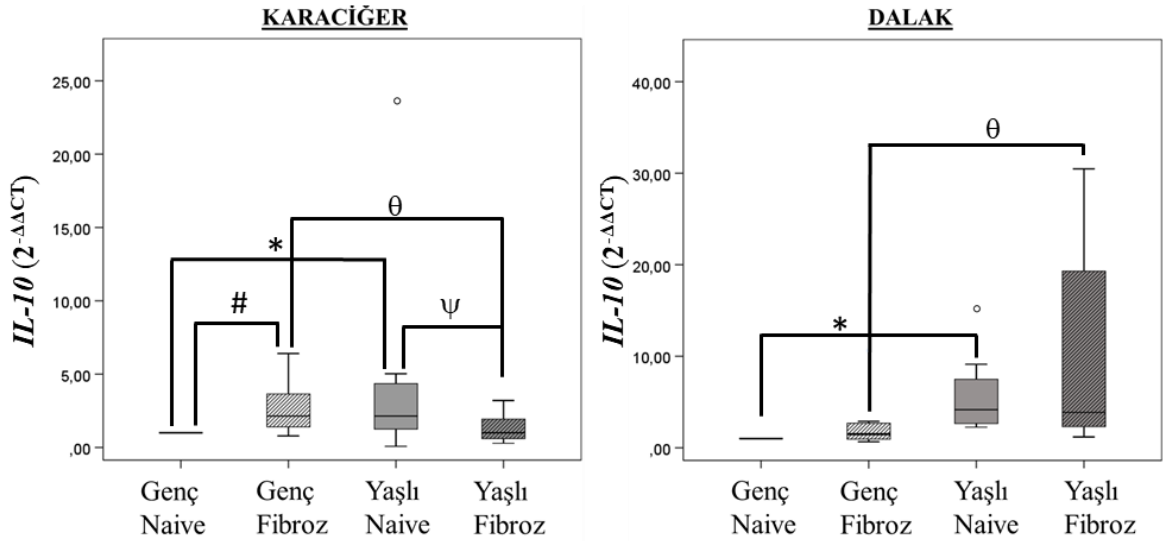
Anti-İnflamatuar immün yanıttan sorumlu sitokin genlerinden *IL-4*'ün karaciğer dokusundaki incelemelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir. Dalak dokusundaki incelemelerde herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *IL-4* ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Yaşlı Fibroz grubundaki *IL-4* gen ifadesinin Genç Fibroz gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Anti-İnflamatuar Sitokin *IL-4* Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki; θ simgesi Genç Fibroz-Yaşlı Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

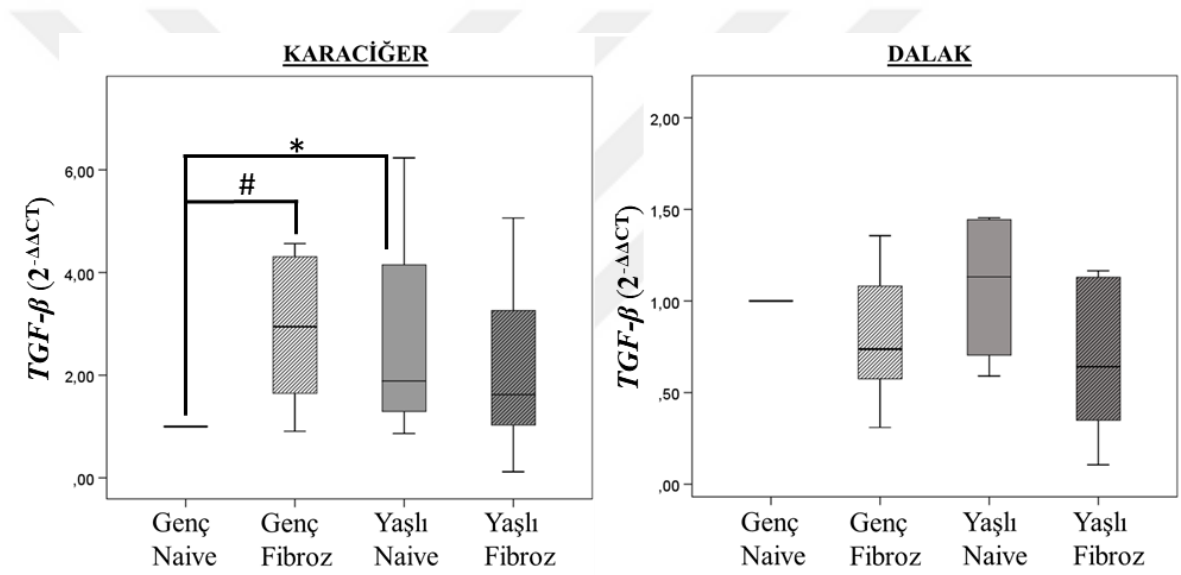
Anti-İnflamatuar immün yanıtta sorumlu sitokin genlerinden *IL-10*'un karaciğer dokusundaki incelemelerinde Genç Fibroz grubundaki *IL-10* gen ifadesinin Genç Naive gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Yaşlı fibroz grubundaki *IL-10* gen ifadesinin Yaşlı Naive grubundaki ifadesine göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *IL-10* ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Yaşlı Fibroz grubundaki *IL-10* gen ifadesinin Genç Fibroz gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Dalak dokusundaki incelemelerde herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *IL-10* ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Yaşlı Fibroz grubundaki *IL-10* gen ifadesinin Genç Fibroz gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,5$) (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Anti-İnflamatuar Sitokin *IL-10* Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki; # simgesi Genç Naive- Genç Fibroz arasındaki; θ simgesi Genç Fibroz-Yaşlı Fibroz arasındaki; ψ simgesi Yaşlı Naive-Yaşlı Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. 'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

Anti-İnflamatuar immün yanıtta sorumlu sitokin genlerinden $TGF-\beta$ 'nın Karaciğer dokusundaki incelemelerinde Genç Fibroz grubundaki $TGF-\beta$ gen ifadesinin Genç Naive gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,001$). Herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda $TGF-\beta$ ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). $TGF-\beta$ geninin dalak dokusundaki ifade edilme düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim tespit edilememiştir. (Şekil 4.34).

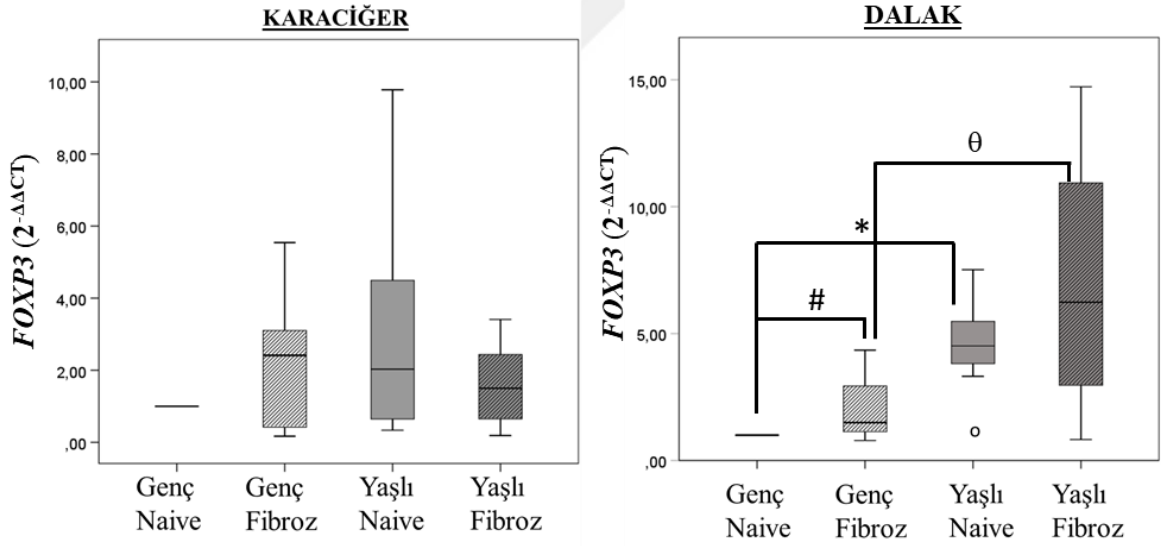


Şekil 4.34. Anti-İnflamatuar Sitokin $TGF-\beta$ Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Düzeyleri.

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki; # simgesi Genç Naive- Genç Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.

4.9. İnflamatuvar ve Anti-İnflamatuvar Sitokinlerin Salınımında Rol Alan Transkripsiyon Faktörü Genlerinin (*FOXP3*, *GATA3*, *ROR γ T*, *TBET*) İfade Edilme Düzeyleri

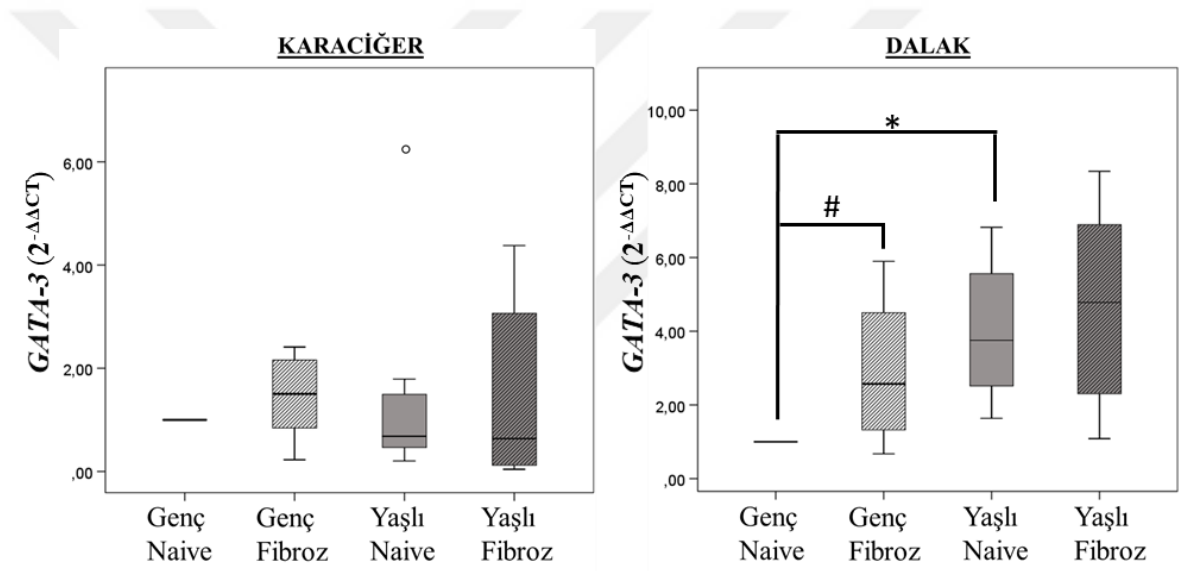
T hücresi farklılaşmasından sorumlu transkripsiyon faktörü genlerinden *FOXP3*'ün karaciğerdeki ifade edilme düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiki olarak anlamlı bir değişim tespit edilememiştir. Dalak dokusundaki incelemelerde herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *FOXP3* ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$), Genç Fibroz Grubunda *FOXP3* ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$) Yaşlı Fibroz grubunun *FOXP3* seviyeleri Genç Fibroz Grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. *FOXP3* Transkripsiyon Faktör Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Edilme Düzeyleri

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki; # simgesi Genç Naive- Genç Fibroz arasındaki; θ simgesi Genç Fibroz-Yaşlı Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. 'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

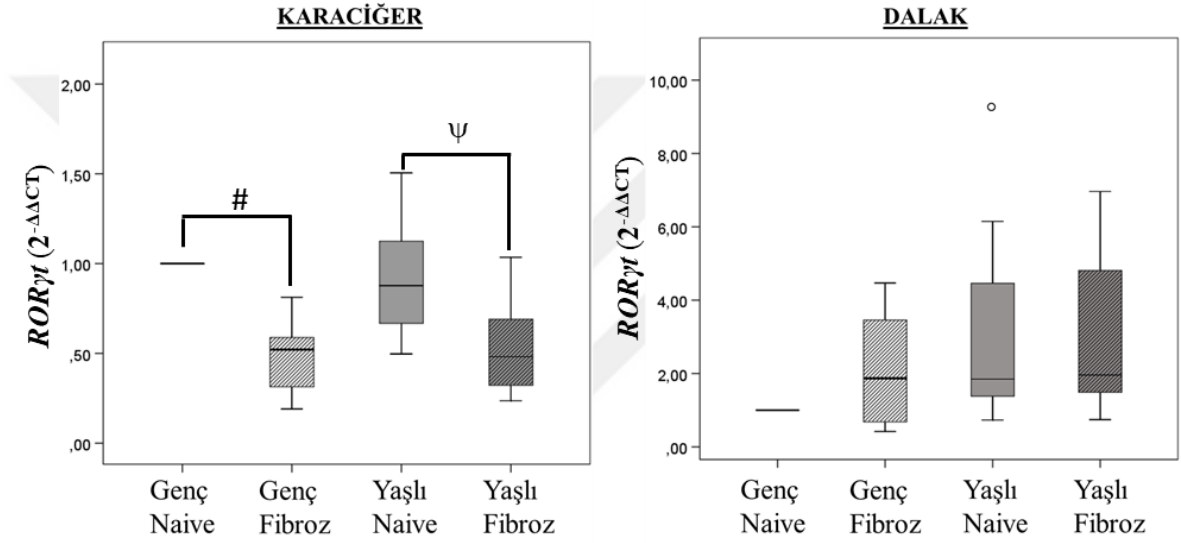
T hücresi farklılaşmasından sorumlu transkripsiyon faktörü genlerinden *GATA3*'ün karaciğerdeki ifade edilme düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiki olarak anlamlı bir değişim tespit edilememiştir. Dalak dokusundaki incelemelerde herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *GATA3* gen ifadesinin Genç Naive gruba göre istatikselsel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Genç Fibroz grubundaki *GATA3* gen ifadesinin Genç Naive gruba göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. *GATA3* Transkripsiyon Faktör Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Edilme Düzeyleri

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki; # simgesi Genç Naive- Genç Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. 'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

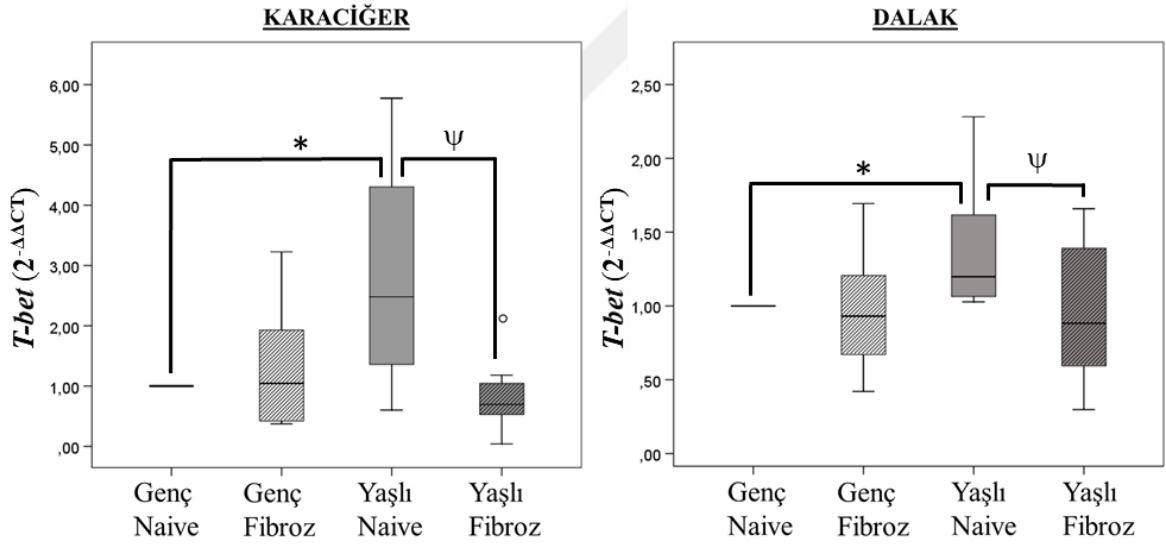
T hücresi farklılaşmasından sorumlu transkripsiyon faktörü genlerinden *ROR γ t*'nin karaciğerdeki ifade edilme düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarında Genç Fibroz grubundaki *ROR γ t* gen ifadesinin Genç Naive gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Yaşlı fibroz grubundaki *ROR γ t* gen ifadesinin Yaşlı Naive grubundaki ifadesine göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Dalak dokusundaki incelemelerde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir. (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. *ROR γ t* Transkripsiyon Faktör Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Edilme Düzeyleri

simgesi Genç Naive- Genç Fibroz arasındaki; ψ simgesi Yaşlı Naive-Yaşlı Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. 'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

T hücresi farklılaşmasından sorumlu transkripsiyon faktörü genlerinden *Tbet*'in karaciğerdeki ifade edilme düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmalarında Herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *Tbet* gen ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Yaşlı Fibroz grubundaki *Tbet* gen ifadesinin Yaşlı Naive gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$). Dalak dokusundaki incelemelerde herhangi bir uygulama yapılmayan yaşlı ve genç grupların karşılaştırılmasında Yaşlı Naive grubunda *Tbet* ifadesinin Genç Naive gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Yaşlı Fibroz grubundaki *Tbet* gen ifadesinin Yaşlı Naive gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Tbet Transkripsiyon Faktör Geninin Karaciğer ve Dalaktaki İfade Edilme Düzeyleri.

* simgesi Genç Naive-Yaşlı Naive arasındaki; ψ simgesi Yaşlı Naive-Yaşlı Fibroz arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. 'o' sembolü uç değerleri simgelemektedir.

Tablo 4.4. Dalak dokusunun gruplar arasındaki gen ifadesi kat değişimleri

	Genç Naive grubu ile kıyaslandığı zaman Genç Fibroz grubundaki kat değişimleri		Genç Naive grubu ile kıyaslandığı zaman Yaşlı Naive grubundaki kat değişimleri		Yaşlı Naive grubu ile kıyaslandığı zaman Yaşlı Fibroz grubundaki kat değişimleri		Genç Fibroz grubu ile kıyaslandığı zaman Yaşlı Fibroz grubundaki kat değişimleri	
	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri
<i>FOXP3</i>	2.03	p<0.05	4.54	p<0.001	1.53	—	3.43	p<0.05
<i>GATA3</i>	2.92	p<0.05	4.02	p<0.001	1.16	—	1.60	—
<i>RORγT</i>	2.1	—	3.1	—	0.96	—	1.43	—
<i>T-BET</i>	0.97	—	1.38	p<0.05	0.69	P<0.05	0.99	—
<i>IL-2</i>	1.16	—	2.27	—	1,19	—	2.33	—
<i>IL-4</i>	1.22	—	60.27	p<0.001	0.84	—	41.3	p<0.001
<i>IL-6</i>	1.22	—	3.42	p<0.05	0.82	—	2.30	p<0.05
<i>IL-10</i>	2.69	—	5.75	p<0.05	1.79	—	3.84	p<0.05
<i>IL-12</i>	0.98	—	3.28	p<0.001	0.62	—	2.06	p<0.05
<i>IL-17</i>	331233.30	—	9,22	—	9627.04	—	0.268	—
<i>IFN-γ</i>	1.05	—	21.71	p<0.001	0.43	—	8.97	p<0.05
<i>TNF-α</i>	1.90	p<0.05	1.73	p<0.05	1.42	—	1.29	—
<i>TGF-β</i>	4.60	—	5.55	—	0.78	—	0.94	—

Kırmızı ile gösterilen kat değişimleri gen ifadesindeki azalmayı, Yeşil ile gösterilen kat değişimleri gen ifadesindeki artışları göstermektedir p<0.05 istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

Tablo 4.5. Karaciğer dokusunun gruplar arasındaki gen ifadesi kat değişimleri

	Genç Naive grubu ile kıyaslandığı zaman Genç Fibroz grubundaki kat değişimleri		Genç Naive grubu ile kıyaslandığı zaman Yaşlı Naive grubundaki kat değişimleri		Yaşlı Naive grubu ile kıyaslandığı zaman Yaşlı Fibroz grubundaki kat değişimleri		Genç Fibroz grubu ile kıyaslandığı zaman Yaşlı Fibroz grubundaki kat değişimleri	
	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri
<i>FOXP3</i>	2.20	—	3.06	—	0.52	—	0.72	—
<i>GATA3</i>	1.46	—	1.47	—	1.02	—	1.04	—
<i>RORγT</i>	0.48	p<0.001	0.92	—	0.58	p<0.05	1.11	—
<i>T-BET</i>	1.30	—	2.83	p<0.05	0.29	p<0.01	0.64	—
<i>IL-2</i>	1.20	—	1.19	—	0.76	—	0.78	—
<i>IL-4</i>	0.65	—	1.77	—	2.2	—	0.80	—
<i>IL-6</i>	5.77	—	3.93	—	0.58	—	0.85	—
<i>IL-10</i>	2.69	p<0.05	4.89	p<0.05	0.27	p<0.05	0.49	p<0,05
<i>IL-12</i>	7.10	—	2.65	—	1.98	—	0.74	—
<i>IL-17</i>	2.37	—	2.70	—	1.16	—	1.33	—
<i>IFN-γ</i>	0.34	p<0.001	3.4	—	0.11	p<0.001	1.14	—
<i>TNF-α</i>	9.56	p<0.001	3.28	—	1.45	—	0.50	—
<i>TGF-β</i>	2.90	p<0.001	2.72	p<0.05	0.78	—	0.73	—

Kırmızı ile gösterilen kat değişimleri gen ifadesindeki azalmayı, Yeşil ile gösterilen kat değişimleri gen ifadesindeki artışları göstermektedir p<0.05 istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA

Vücutumuzdaki en büyük organ olan karaciğerin immün sistem üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bu araştırma projesinde farelerde TAA enjeksiyonu ile geliştirilmiş deneysel kronik karaciğer fibrozu modelinde karaciğer ve sekonder lenfoid organ olan dalakta gelişen T-lenfosit yanıtlarının moleküler düzeyde analizi ve ayrıca genç ve yaşlı deneklerden elde edilen verilerin karşılaştırılarak yaşlanmanın karaciğer ve dalaktaki immün yanıt üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırmamızın amacına yönelik olarak genç ve yaşlı farelerin karaciğer ve dalak dokularında, inflamatuvar (*IL-2*, *IFN- γ* , *IL-17*, *IL-12p40*, *IL-6*, *TNF- α*) ve anti-inflamatuvar (*IL-4*, *IL-10*, *TGF- β*) sitokin genlerinin ve yardımcı T-lenfosit farklılaşmasında rol alan transkripsiyon faktör genlerinin (*Tbet*, *GATA3*, *ROR γ T*, *FOXP3*) ifadesinde meydana gelebilecek değişiklikler gerçek zamanlı PZR yöntemiyle araştırılmıştır.

Araştırmamızda uyguladığımız TAA ile indüklenen karaciğer fibrozis modeli, etik ve bilimsel açıdan uygun bir model olması nedeniyle tercih edilmiştir. TAA ile indüklenen karaciğer fibrozu kemirgenlerde insandaki fibrozis patolojisine benzer değişikliklere sebep olan ve sıklıkla kullanılan bir modeldir (108, 109). TAA ile fibroz oluşturulmasından sonra deney gruplarında karaciğerin fonksiyonu hakkında bilgi veren serum ALT ve AST düzeyleri ölçülmüştür. Sağlıklı bireylerde ve karaciğerin fonksiyonunu tamamıyla kaybettiği durumlarda dolaşımında oldukça düşük seviyelerde bulunan ALT ve AST enzimleri karaciğer hasarında hepatosit yıkımının ve ölümünün artması sebebiyle hücre zarı dışına çıkar ve serumdaki seviyeleri yükselir. Karaciğer fibrozunda da ALT ve AST enzimlerinin serumdaki düzeylerinin arttığı bilinmektedir (110). Bizim araştırmamızda literatüre benzer şekilde genç ve yaşlı gruplarda TAA uygulanan grupların ALT değerleri naive guruplara göre yüksek bulunmuştur. AST değerleri ise genç gruplarda TAA uygulaması ile artmış. Ancak Yaşlı Fibroz grubunda Yaşlı Naive gruba göre anlamlı bir artış saptanamamıştır. Bu durumun sebebi Yaşlı Naive grupta yaşlılıktan kaynaklanan çeşitli sebeplerle AST değerlerinin zaten yüksek olması ve TAA etkisini gölgelemesi olabilir. Yaşlılarda oksitativ stress, telomer kısalması, DNA hasarı, epigenetik değişiklikler, mitokondriyal disfonksiyon, gibi çeşitli sebeplerle karaciğerin rejeneratif kapasitesini düşürdüğü karaciğerin hasarlandığı belirtilmektedir (76).

Araştırmamızda yaşlanmanın karaciğer enzimleri üzerine etkisini görmek için uygulama yapılmayan Genç ve Yaşlı Naive gruplardaki deney hayvanlarının serum ALT ve AST değerleri ölçülmüş ve AST değeri bir miktar artış gösterecek şekilde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir. Bu konu ile ilgili olarak Vespasiani ve ark. (111) insan serum örnekleri ile yaptıkları araştırmalarında ALT değerlerinin 30'lu yaşlardan 50'li yaşlara doğru gittikçe arttığı 50'li yaşlarda pik yapıp 70 yaşına doğru tekrar azaldığını ve 30'lu yaşlardaki düzeyine döndüğünü bildirilmektedir. Fareler ve insanlar arasındaki yaş kolerasyonunun değerlendirildiği araştırmalar göz önüne alınca bizim araştırmamızda deney sonunda Genç Naive grup farelerin ulaştığı yaş olan 6 ay insalarda yaklaşık 25-30 yaşına ve Yaşlı Naive grup farelerin deney sonundaki yaşı olan 21 ay ise insanlarda 60-70 li yaşlara karşılık gelmektedir (112). Araştırmamızda Vespasiani ve ark.'nın çalışmasına paralel olarak, bu yaş dönemlerindeki 6 aylık ve 21 aylık farelerin ALT değerleri birbirine benzerdir ancak deney setimizde insanlardaki 50'li yaşlara karşılık gelen gelen 12-13 aylık fare grubu olmadığı için bu yaş gurubunu değerlendirememiştir.

Literatürde geçen birçok araştırmada TAA uygulaması farelerin vücut ağırlıklarında azalmaya sebep olurken karaciğer ağırlığında ise ECM ve kollajen brikimi nedeniyle artışa sebep olduğu bildirilmektedir (113, 114). Bizim araştırmamızda da deney hayvanlarının sakrifiye edilmeden önceki vücut ağırlıklarının karaciğer ağırlığına oranları analiz edildiği zaman TAA ile oluşturulan karaciğer fibrozis gruplarında vücut/karaciğer ağırlık oranlarının naive gruplara göre belirgin düzeyde azaldığı görülmüştür. Buna paralel olarak hayvanların sakrifiye edilmesi aşamasında karaciğerlerin makroskopik incelemesinde de fibroz oluşturulan hayvanların karaciğerlerinin nispeten daha büyük olduğunu gözlemledik.

Karaciğer dokusunda gerçekleştirdiğimiz histolojik değerlendirmelerde H&E, PAS ve Trikrom boyamalarda TAA uygulanan fibroz gruplarında inflamasyon, nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve perilobüler fibrozis oluşumları görülmüştür. Ayrıca fibrozisin göstergesi olan α -SMA pozitif hücreleri göstermek amacıyla karaciğer kesitleri anti α -SMA antikoru ile immünohistokimyasal yöntemle boyanarak değerlendirildi. Çalışmamızdaki karaciğer kesitlerinin immünohistokimyasal değerlendirilmesinde Genç Naive grubunda çok zayıf SMA immünoaktivitesi, Genç Fibroz grupta kuvvetli SMA immünoaktivitesi, Yaşlı Naive grubunda orta derecede pozitif bir SMA immünoaktivitesi görülürken, Yaşlı fibroz grubunda ise kuvvetli pozitif, SMA immünoaktivitesi gözlenmiştir.

Mikroskopik analizler sonucunda yaşlı fibroz grubundaki dejenerasyon düzeylerinin genç fibroz grubuna göre daha şiddetli olmasının sebebi yaşlanma ile beraber gözlemlenen karaciğer fonksiyon bozukluklarından kaynaklanabilir. Sanz ve ark (115) bizim araştırmamıza paralel olarak TAA enjeksiyon modelinin yaşlı ratlarda gençlere kıyasla daha şiddetli karaciğer hasarı oluşturduğunu belirtmiştir. Ayrıca Kim ve ark (76) yaşlanmanın akut karaciğer hasarına karşı savunmasızlığı artırdığını bildirmiştir.

Araştırmamızda TAA ve yaşlılığın hepatositlerdeki ultrastrüktürel etkileri Transmisyon Elektron Mikroskop ile incelenmiştir. TEM incelemelerinde Genç Naive gruplar normal ultrastrüktürel yapı gösterirken fibroz gruplarında yaşlılarda daha şiddetli olmak üzere özellikle mitokondri üzerine yoğunlaşan bozunmalar görünmekteydi. Her iki fibroz grubunda da mitokondriyonlarda matriks yoğunlaşması, *pyknosis*, krista kaybı ve dejenerasyon, nükleuslarında şekil deformasyonları ve artmış lizozomal yapılar izlendi. Bunlara ek olarak fibroz belirtileri ışık mikroskopik incelemelerde olduğu gibi yaşlı gruplarda genç gruplara göre daha şiddetli şekilde izlendi. Yaşlı Fibroz gruplarında Genç Fibroz gruba ilave olarak mitokondri kristalarında lizis, sitoplazmada yoğun lipofuskin birikimleri ve farklı çaplarda hidropik vakuoller görüldü. Yaşlı Naive grupta ise mitokondrilerde fibroz gruplarına benzer şekilde matriks yoğunlaşması ve *pyknosis* izlendi ayrıca mitokondriler fibrotik gruplardan farklı olarak uzamış-bükülmüş deforme şekilli görünmekteydi. Bu sonuçlar göz önüne alındığında özellikle mitokondri disfonksiyonları fibroz mekanizmasında önemli rol oynuyor olabilir nitekim insanlarda görülen birçok karaciğer hastalığında karaciğer dokularında mitokondrial disfonksiyonlar tespit edilmiştir (116). TAA ile indüklenen fibroz modelinde de mitokondri disfonksiyonunun patogeneze eşlik ettiği bilinmektedir (117). Maria ve ark (118) çeşitli sebeplerle son dönem karaciğer hastalığı yaşayan 45 hastadan nakil sırasında aldıkları karaciğer örneklerinde yaptıkları incelemelerde yaygın olarak mitokondri disfonksiyonu olduğunu belirtmiş ve farklı karaciğer hastalıklarının tedavisinde mitokondrial fonksiyon iyileştirmesinin önemli bir katkı sağlayacağını belirtmiştir. Mitchell ve ark. (119) CCl₄ indüklü fibroz modelinde mitokondrilerin hasar almasını engellenmesinin fibroz oluşumunu yavaşlatıldığını göstermiştir.

Yaşlanma sebebi ile hücrelerde telomer kısalması, DNA hasarı, epigenetik değişiklikler, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon gibi durumlar gözlenmektedir ve çoğu hastalık yaşlanma ile yakından ilişkilidir. Yaşlanmanın sadece akut karaciğer hasarına

karşı savunmasızlığı arttırmakla kalmayıp aynı zamanda fibrotik yanıtın duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (5). Ayrıca yaşlanmanın etkisiyle immün yanıtta bozulmaların olduğu, sitokin üretiminin farklılaştığı ve yaşlı bireylerde hiçbir hastalık ve risk etkeni görülmesi dahi özellikle inflamatuvar sitokinlerin kandaki seviyelerinin artabildiği bilinmektedir (120, 121). Biz de araştırmamızda farelerde yaşlanma ile birlikte dalak ve karaciğer dokularında hem inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar sitokin gen ifadelerinin yükseldiğini tespit ettik. Genç Naive ve Yaşlı Naive grupların dalak dokularındaki gen ifade seviyelerinin karşılaştırılmasında yaşlanmanın etkisi ile CD4⁺ naive hücrelerin alt tiplerine farklılaşmasında görev alan *Tbet*, *GATA3* ve *FOXP3* transkripsiyon faktör genlerinde, anti-inflamatuvar *IL-4*, *IL-10* sitokin genlerinde ve inflamatuvar *IL-6*, *IL-12*, *IFN γ* ve *TNF- α* sitokin genlerinin ifadelerinde artış tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz verilere göre yaşlı hayvanların dalak dokusunda transkripsiyon faktör genlerinde artış olmuş ancak bunlar içerisinde anti-inflamatuvar etkili sitokinleri üreten bir hücre tipi olan T_H2'nin gelişimi için gerekli transkripsiyon faktör *GATA3*'ün gen ifade seviyesindeki artış istatistiksel olarak diğerlerine göre anlamlıdır (p<0,001). Yine dalak dokusunda T_H2 tip hücrelerin gelişimi için gerekli olan ve T_H2 hücrelerce salınan anti-inflamatuvar sitokin *IL-4*'ün gençlere kıyasla 60 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (p<0.001). Ayrıca *IL-4*'ün deney setimizdeki fibroz oluşturulan genç ve yaşlı gruplarının dalak dokusundaki karşılaştırılmasında da Yaşlı Fibroz grubunda yaklaşık 41 kat yüksek olduğu tespit edilmiş ancak aynı yaş gruplarındaki sağlıklı ve fibroz grupların kendi aralarındaki karşılaştırmalarında değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum *IL-4* ifadesindeki yüksekliğin fibrozisden bağımsız olarak tamamen yaşlılığa bağlı bir artış olduğunu düşündürmektedir. Bunun dışında yaşlanmanın etkisi ile anti-inflamatuvar bir sitokin olan ve çeşitli immün hücre tipleri tarafından salınan IL-10 seviyeleride yükselmiştir. Anti-inflamatuvar T_H2 sitokin genlerinin (*IL-10*, *IL-4*) ve *GATA3* transkripsiyon faktör gen ifadelerindeki artış, dalakta birbirini antagonize ettiği bilinen iki hücre alt tipi T_H1 ve T_H2 den T_H2 nin galip çıkabileceğini ve anti-inflamatuvar cevap oluşabileceği izlenimini vermektedir. Ne var ki, yaşlanma ile birlikte dalakta inflamatuvar sitokinler olan *IL-6*, *IL-12*, *IFN- γ* ve *TNF- α* 'nın da gen ifadelerinde artış görülmesi immün yanıtın kendi içindeki regülasyonunu kaybettiğini düşündürmektedir. Daha önce gerçekleştirilen bir çok araştırmada bizim dalak örneklerinde bulduğumuz sonuçlara benzer olarak insanlarda

yaşlanmanın serum IL-6 ve TNF- α seviyelerinde artışa sebep olduğu belirtilmektedir (120, 122, 123). Nitekim; Lorena ve ark. (6) IL-12p70, IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-10'un dolaşımdaki seviyeleri yaş ile pozitif korelasyon gösterirken IL-17'nin yaş ile negatif korelasyon gösterdiğini tespit etmiştir. Bizim araştırmamızda yaşlanma ile ilgili olarak dalak *IL-17* gen seviyelerinde bir değişiklik ölçülemedi. Bu farklılığın sebebi Lorena ve arkadaşlarının IL-17 seviyesini kan serum örneklerinde ELISA yöntemi ile ölçmesi olabilir. Burada göz ardı edilmemesi gereken bir diğer nokta da sitokin mRNA düzeyleri ile bu sitokinlerin dolaşımdaki miktarları arasında korelasyonun zayıf olduğunun farklı çalışmalarda belirtilmiş olmasıdır (124). Sonuç olarak dalakta elde ettiğimiz verilere göre yaşlanma sürecinde dalakta her ne kadar T_{H2} tipi yanıt veriliyor gibi görülmüşse, IL-12 ve IFN γ gibi T_{H1} tipi sitokinlerde artış göstermesi T_{H1}/T_{H2} balansının ne yönde olduğu konusunda kesin bir bilgiye varılamamasına sebep olmuştur. Dalaktaki normal koşullarda baskın olan T hücre alt tipinin T_{H2} tipi hücreler olduğu söylenmektedir (125). Yaşlanma esnasında dalaktaki T_{H1}/T_{H2} dengesinin bilinmesi karaciğer hastalıklarında önemlidir çünkü dalak portal dolaşım yoluyla karaciğere bağlıdır ve kan yoluyla hücre kaynaklı mediatörlerin ve çeşitli hücrelerin karaciğere geçtiği bilinmektedir (94). T_{H2} tipi sitokinler olan IL-4 ve IL-13, fibrozun ilerlemesine katkıda bulunurken, T_{H1} tipi sitokinler özellikle IFN γ güçlü antifibrotik etki gösterir. Tanabe ve ark. (125) farelerde oluşturdukları karaciğer fibrozu modelinde, dalaktaki CD4⁺ hücrelerinin karaciğer hasarına yanıt olarak karaciğere göç ettiğini ve fibrotik karaciğerdeki T_{H2} hücrelerinin çoğunun dalak kaynaklı olduğunu göstermiştir. Bu bulgular dalakta baskın olan T_{H2} lenfositlerinin yaralı karaciğere göç ettiğini göstermektedir. Bu göçün amacı ya karaciğerdeki T_{H1} / T_{H2} dengesini T_{H2} egemenliğine doğru değiştirerek karaciğer fibrozunu teşvik etmek ya da karaciğerdeki inflamatuvar yanıtı azaltmaya yönelik regülasyonu tekrar temin etmeye yönelik bir hamle olarak düşünülebilir. Araştırmacılar splenektominin, karaciğerdeki T_{H2} lenfosit sayısını azalttığını ve T_{H1} / T_{H2} dengesini tersine çevirerek karaciğer fibrozunun inhibisyonuna neden olduğunu göstermişlerdir.

Genç Naive ve Yaşlı Naive grupların karaciğer dokularındaki karşılaştırmalarda Yaşlı Naive gruplarda göze çarpan önemli durum ise hemen hemen tüm karaciğer hastalıklarında arttığı bilinen TGF- β seviyesinin Yaşlı Naive grup karaciğer dokusunda yüksek bulunmasıdır bu durum yaşlılığın doğal sürecinde karaciğerin hasarlandığını göstermektedir. Yaşlılık

TGF- β seviyeleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren araştırmalar incelendiği zaman Forsey ve ark.(126)'nın yanı sıra Carrier ve ark.(127) yaptıkları araştırmalarda yaşlı bireylerde plazma TGF- β seviyelerinin genç bireylere göre yüksek olduğunu belirtmiştir. Belkide bu yüksekliğin sebebi karaciğerde yaşlılık sebebiyle görölen patoljik durumdur. Bunun dışında T_H1 farklılaşmasının transkripsiyon faktörü Tbet, seviyelerinin artışı da dalaktakinin yaklaşık 2 katı oranda daha yüksek bulunmuştur. Ancak T_H1 tipi herhangi bir infalamatuar sitokinde artış tespit edilememiştir.

Sonuç olarak Genç Naive ve Yaşlı Naive grupların karşılaştırmalarında yaşlılığın etkisi ile dalakta T_H2 tip immün yanıtı çağrıştıran artmış düzensiz bir immün yanıt vardır. Karaciğerde ise yaşlanmanın fibrotik hasara sebep olduğunu belirten TGF β seviyeleri ve ve yaşlanmanın etkisi ise hasar aldığı görölen karaciğer dokusunda rejenerasyonunun önemli bir parçası olan IL-10 seviyesinin arttığı göröldü.

Genç Naive ve Genç Fibroz grupların karşılaştırmalarda Dalakta *GATA3* ve *TNF- α* gen ifade seviyelerinin yükseldiğini karaciğerde ise *ROR γ T* ve *IFN γ* gen ifade seviyeleri düşerken *IL-10*, *TNF- γ* ve *TGF- β* gen ifade seviyelerinin yükseldiğini tespit ettik. Karaciđer ve dalaktaki *TNF- α* sitokin gen seviyesindeki artışının dışında infalamatuar yanıtı destekleyen bir farklılık yoktu ve karaciğerdeki *TNF- α* artışı dalaktaki ile kıyaslandığı zaman çok daha şiddetliydi. Karaciđerde fibrozis oluşumu aćısından önemli sonuçlar elde edildi. İnflamatuar bir sitokin olan IFN γ 'nın antifibrotik etkili olduğu, anti inflamatuar bir sitokin olan TGF- β 'nın fibroza teşvik eden bir sitokin olduğu bilinmektedir. Bizim bulgularımızda literatürdeki bu bilgileri destekler şekildedir antifibrotik etkili *IFN γ* gen ifadesi azalırken fibrotik etkili *TGF- β* gen ifadesi yükselmiştir. Araştırmamızla benzer olarak Montes ve ark.(128) CCl₄ ile fibroz oluşturdukları Wistar Albino rat'larda 24. ve 48. saatlerde karaciğerde pro-inflamatuar (TGF- β , TNF- α) ve anti-inflamatuar (IL-4 ve IL-10) sitokinlerinin mRNA seviyelerini analiz etmişlerdir. Sonuçlarına göre pro-inflamatuar sitokin genlerinin mRNA düzeylerinin 24 ve 48. saat dilimlerinde arttığı bulunmuştur. Anti-inflamatuar sitokin *IL-10* artarken 24. Ve 48. saatlerde artarken. *IL-4* ün ifadesi tespit edilememiştir. Karaciđerdeki anti-inflamatuar *IL-10* inflamatuar *TNF- α* gen ifadesinin artışı karaciğer fibrozu esnasında hem dejenerasyon hem de rejenerasyon reaksiyonlarının varlığı ile aćıklanabilir. Bununla ilgili olarak Yin ve ark.(129) farelerde Chae ve ark.(130) ise insanlarda karaciğer rejenerasyon sürecinde IL-10 ve TNF- α 'nın birlikte görev aldığını

belirmişlerdir. Ayrıca Hung ve ark.(131) yaptıkları araştırmada *IL-10* gen terapisinin farelerdeki TAA indüklü karaciğer fibrozunu geri döndürebileceğini belirtmektedir. Bu sonuçlar anti-inflamatuar sitokin IL-10'un karaciğer rejenerasyonunda rol oynadığını desteklemektedir. Karaciğerde fonksiyon bozukluklarında TNF- α düzeyinin arttığı bilinmektedir. Bu grupta aynı zamanda dalakta da TNF- α artışı olduğu saptanmasına karşın bu artış karaciğerde çok daha şiddetli bir şekilde gerçekleşmiştir. Bu durum dalaktaki TNF- α sitokinlerinin kan yoluyla karaciğerden gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Dalaktaki GATA3 seviyelerinin artması ise dalakta anti-inflamatuar yanıt oluştuğunu desteklemektedir.

Yaşlı sağlıklı grupta yaşlı fibroz grup arasındaki veriler arasında en göze çarpanı karaciğer fibrozunda artış gösterdiği bilinen TGF- β 'nın sağlıklı yaşlılardaki seviyesi ile fibrotik yaşlılardaki seviyeleri arasında bir fark bulunamamasıdır. Bunun sebebi daha önce değindiğimiz Forsey ve Carrierinin (126, 127) araştırmalarında bahsettikleri yaşlılık sürecinde karaciğerin kendi kendine aldığı hasar sebebiyle TGF- β 'nin hali hazırda zaten yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

Fibroziste rejenerasyon kapasitesinin yaşlı bireylerde düştüğü ve IL-10'un rejenerasyon sürecinde önemli bir rol oynadığı söylenmektedir (129, 132-134). Deney setimizdeki yaşlı ve genç farelerin fibroza verdiği yanıtı incelediğimiz Genç Fibroz grubun Yaşlı Fibroz grupta karşılaştırılmasında fibroz esnasında karaciğer dokularındaki IL-10 seviyeleri yaşlılarda gençlere oranla düşük bulunmuştur. Yaşlı Naive ve Yaşlı Fibroz grup karşılaştırmamızda ise IL-10 seviyeleri fibroz oluşumu ile genç gruplardaki yükselmesinin aksine yaşlı fibrotik gruplarda düşüş göstermiştir bu durum yaşlılıkta karaciğerde rejenerasyon için gerekli olduğu bildirilen IL-10 cevabının yetersiz olması sebebiyle rejenerasyonun iyi bir şekilde gelişmeyeceğini göstermektedir.

Ayrıca yaşlı fibrotik farelerde hem karaciğer hemde dalak dokusunda Tbet ve IFN γ genç fibrotik farelere göre düşük bulunması yaşlılıkta görülen immün yanıtın azalması durumu ile açıklanabilir. Bununla ilgili olarak yaşlılık ve immün yanıt arasındaki ilişkinin incelendiği araştırmalar bizim araştırmamızla benzer şekilde yaşlılığın immün cevabı azalttığını belirtmektedir (135, 136).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Elde ettiğimiz mikroskobik, biyokimyasal ve moleküler veriler sonucunda yaşlılık sebebiyle oluşan problemlerin karaciğerde hasarlanmalara sebep olduğuna, immün yanıtızlığa, rejenerasyon ile ilgili sitokinlerin (IL-10) azalmasıyla rejeneratif kapasitenin düşmesine ve hasarlanma ile ilgili (TGF- β) sitokinlerin artışına sebep olmaktadır. Elde ettiğimiz mikroskobik ve moleküler bulgular birbirini destekler niteliktedir. Dalakta ise T_H2 tipi sitokinlerin (IL-10, IL-4) hakim olduğu anti-inflamatuar tarzda olması muhtemel ve kontrolsüz şekilde yükselen bir sitokin cevabı tespit edilmiştir.

Ayrıca araştırmamızın başında öne sürdüğümüz karaciğerde inflamatuvar bir yanıt varken dalakta anti-inflamatuar bir yanıt olabileceği düşüncesini genç sağlıklı ve fibroz grupların karşılaştırılmasında dalaktaki FOXP3 ve GATA3 seviyesinin artması ile desteklenmektedir. Dalakta anti inflamatuvar bir yanıt varken karaciğerde ise hem anti inflamatuvar hem de inflamatuvar sitokinlerin birlikte arttığı bir inflamasyon durumu görülmektedir. Dalakta Fibroz grubundaki inflamatuvar TNF- α artışı her ne kadar ters görünsede Karaciğerdeki TNF- α karşılaştırılınca önemsiz bir yükselmedir. Bu yükselme muhtemel kan akımı nedeniyle karaciğer kaynaklı oluşan sitokin artışıdır. Araştırmamız sonucunda yaşlı fibrotik deneklerin dalaklarında FOXP3 ifadesinde bir değişkenlik saptanmamıştır.

Ayrıca diğer bir amacımız olan genç bireyler ve yaşlı bireylerin fibroza verdikleri immün yanıt açısından karşılaştırılmasında en önemli farklar yaşlı bireylerin karaciğer ve dalak dokularında inflamatuvar yanıtın düşmesi ve karaciğerde rejenerasyon sürecinde önemli rol oynayan ve rejeneratif kapasiteinin izlenmesinde önemli bir belirteç olan IL-10'un seviyelerinin azalmasıdır.

İleri ki dönemde hem karaciğer hem de dalak homojenatlarında sitokin düzeylerinin araştırılması protein düzeyi ile gen ifade düzeyi arasında korelasyonu göstermek açısından önemli olacaktır. Ayrıca, hücre göçünde rol alan ve inflamatuvar yanıtta etkin olan kemokin genlerinin ve reseptörlerinin ifade edilme düzeylerinin araştırılması bu projede elde ettiğimiz sonuçları destekleyici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008, 134(6): 1655-69.
2. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP, Schwabe RF. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nature communications* 2013, 4: 2823.
3. Fallowfield JA, Iredale JP. Targeted treatments for cirrhosis. *Expert Opin Ther Targets* 2004, 8(5): 423-35.
4. Li L, Duan M, Chen W, Jiang A, Li X, Yang J, Li Z. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. *Journal of translational medicine* 2017, 15(1): 111-.
5. Kim IH, Kisseleva T, Brenner DA. Aging and liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015, 31(3): 184-91.
6. Álvarez-Rodríguez L, López-Hoyos M, Muñoz-Cacho P, Martínez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol* 2012, 273(2): 124-32.
7. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*, 12th ed. New York, Oxford University Press, 2011: 57-60.
8. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Current Biololgy* 2017, 27(21): 1147-51.
9. Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, 13th ed. ed. California, Elsevier Health Sciences, 2015: 124-5.
10. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nature Immunology* 2013, 14(10): 996-1006.
11. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011, 6: 425-56.
12. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpissinger TF, Feichtinger J, Zelger B, Sgonc R, Wolfram D. The immunology of fibrosis. *Annu Rev Immunol* 2013, 31: 107-35.

13. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002, 36(2): 200-9.
14. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 6* 2011, 6: 425-56.
15. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007, 132(7): 2557-76.
16. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017, 14(7): 397-411.
17. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011, 25(2): 195-206.
18. Ozturk Akcora B, Storm G, Prakash J, Bansal R. Tyrosine kinase inhibitor BIBF1120 ameliorates inflammation, angiogenesis and fibrosis in CCl4-induced liver fibrogenesis mouse model. *Sci Rep* 2017, 7: 44545.
19. Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2009, 41(11): 2089-93.
20. Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Molecular aspects of medicine* 2008, 29(1-2): 58-66.
21. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 2003, 112(12): 1776-84.
22. Baertschiger RM, Serre-Beinier V, Morel P, Bosco D, Peyrou M, Clement S, Sgroi A, Kaelin A, Buhler LH, Gonelle-Gispert C. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS One* 2009, 4(8): e6657.
23. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Ruge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004, 126(4): 955-63.
24. Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006, 130(6): 1807-21.

25. Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology* 2009, 50(6): 2007-13.
26. Okada H, Strutz F, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contrib Nephrol* 1996, 118: 147-54.
27. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006, 172(7): 973-81.
28. Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)* 2007, 112(5): 265-80.
29. Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997, 29(1): 43-54.
30. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005, 115(1): 56-65.
31. Breitkopf K, Godoy P, Ciucan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006, 44(1): 57-66.
32. Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007, 56(2): 284-92.
33. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, 279(2): G245-9.
34. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a Modulator of Hepatic Fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001, 21(03): 351-72.
35. Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001, 108(9): 1369-78.
36. Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995, 22(2 Suppl): 28-36.
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. *Cellular and molecular immunology*, Ninth edition. ed. Philadelphia, PA, Elsevier, 2018: x, 565 pages.
38. Male DK. *Immunology*. Mosby Elsevier, 2006.
39. Xu R, Zhang Z, Wang FS. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Cell Mol Immunol* 2012, 9(4): 296-301.

40. Duval F, Moreno-Cuevas JE, Gonzalez-Garza MT, Maldonado-Bernal C, Cruz-Vega DE. Liver fibrosis and mechanisms of the protective action of medicinal plants targeting inflammation and the immune response. *Int J Inflamm* 2015, 2015: 943497.
41. Jeong WI, Gao B. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008, 23 Suppl 1: S112-8.
42. Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int* 2006, 26(9): 1029-39.
43. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001, 21(3): 417-26.
44. McGaha TL, Bona CA. Role of profibrogenic cytokines secreted by T cells in fibrotic processes in scleroderma. *Autoimmun Rev* 2002, 1(3): 174-81.
45. Pinzani M, Vizzutti F. Fibrosis and cirrhosis reversibility: clinical features and implications. *Clin Liver Dis* 2008, 12(4): 901-13, x.
46. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008, 47(2): 729-36.
47. Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis* 2007, 27(4): 339-50.
48. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 2008, 118(11): 3522-30.
49. Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003, 37(5): 1043-55.
50. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007, 13(11): 1324-32.
51. Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR, Burchardt E-R, Rippe RA, Thurman RG. Attenuation of CCl4-induced hepatic fibrosis by GdCl3 treatment or dietary glycine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2001, 281(1): G200-G7.
52. Guo J, Loke J, Zheng F, Hong F, Yea S, Fukata M, Tarocchi M, Abar OT, Huang H, Sninsky JJ, Friedman SL. Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide

- polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses. *Hepatology* 2009, 49(3): 960-8.
53. Huang H, Shiffman ML, Friedman S, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, Rowland CM, Catanese JJ, Leong DU, Sninsky JJ, Layden TJ, Wright TL, White T, Cheung RC. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007, 46(2): 297-306.
 54. Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA, Town T, Badou A, Flavell RA, Mehal WZ. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology* 2007, 46(5): 1509-18.
 55. Gabele E, Muhlbauer M, Dorn C, Weiss TS, Froh M, Schnabl B, Wiest R, Scholmerich J, Obermeier F, Hellerbrand C. Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 376(2): 271-6.
 56. Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 2003, 37(1): 87-95.
 57. Gao B, Radaeva S. Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1832(7): 1061-9.
 58. Bonecchi R, Facchetti F, Dusi S, Luini W, Lissandrini D, Simmelink M, Locati M, Bernasconi S, Allavena P, Brandt E, Rossi F, Mantovani A, Sozzani S. Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J Immunol* 2000, 164(7): 3862-9.
 59. Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St Clair J, Mitchell AP, Ibrahim J, Stroud A, Pachter HL, Bar-Sagi D, Frey AB, Miller G. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha. *J Clin Invest* 2009, 119(11): 3213-25.
 60. Moles A, Murphy L, Wilson CL, Chakraborty JB, Fox C, Park EJ, Mann J, Oakley F, Howarth R, Brain J, Masson S, Karin M, Seki E, Mann DA. A TLR2/S100A9/CXCL-2 signaling network is necessary for neutrophil recruitment in acute and chronic liver injury in the mouse. *J Hepatol* 2014, 60(4): 782-91.
 61. Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. W.W. Norton, 2016.
 62. Liu Y, Munker S, Müllenbach R, Weng H-L. IL-13 Signaling in Liver Fibrogenesis. *Frontiers in immunology* 2012, 3: 116-.

63. Wick G, Backovic A, Rabensteiner E, Plank N, Schwentner C, Sgonc R. The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. *Trends Immunol* 2010, 31(3): 110-9.
64. Muller L, Pawelec G. Aging and immunity - Impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun* 2014, 39: 8-22.
65. Ostan R, Bucci L, Capri M, Salvioli S, Scurti M, Pini E, Monti D, Franceschi C. Immunosenescence and Immunogenetics of Human Longevity. *Neuroimmunomodulat* 2008, 15(4-6): 224-40.
66. Fulop T, Montgomery RR. Editorial overview: Immune senescence: known knowns and unknown unknowns. *Curr Opin Immunol* 2014, 29: vii-ix.
67. O'Connor JE, Herrera G, Martinez-Romero A, de Oyanguren FS, Diaz L, Gomes A, Balaguer S, Callaghan RC. Systems Biology and immune aging. *Immunol Lett* 2014, 162(1): 334-45.
68. Agarwal S, Busse PJ. Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allerg Asthma Im* 2010, 104(3): 183-90.
69. Tavares SM, Junior Wde L, Lopes ESMR. Normal lymphocyte immunophenotype in an elderly population. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014, 36(3): 180-3.
70. Muller L, Pawelec G. Aging and immunity - impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun* 2014, 39: 8-22.
71. Agarwal S, Busse PJ. Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010, 104(3): 183-90; quiz 90-2, 210.
72. Linton PJ, Thoman ML. Immunosenescence in monocytes, macrophages, and dendritic cells: lessons learned from the lung and heart. *Immunol Lett* 2014, 162(1 Pt B): 290-7.
73. Wu D, Meydani SN. Age-associated changes in immune function: impact of vitamin E intervention and the underlying mechanisms. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2014, 14(4): 283-9.
74. Güleç M. Yaşlılık ve İmmün Sistem. *Türkiye Klinikleri J* 2015, Geriatr-Special Topics(1:(3)): 1-7.
75. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013, 153(6): 1194-217.

76. Kim IH, Kisseleva T, Brenner DA. Aging and liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015, 31(3): 184-91.
77. Schmucker DL. Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease ? *Exp Gerontol* 2005, 40(8-9): 650-9.
78. Le Couteur DG, Warren A, Cogger VC, Smedsrød B, Sørensen KK, De Cabo R, Fraser R, McCuskey RS. Old age and the hepatic sinusoid. *Anat Rec (Hoboken)* 2008, 291(6): 672-83.
79. Le Couteur DG, McLean AJ. The aging liver. Drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis. *Clin Pharmacokinet* 1998, 34(5): 359-73.
80. Zoli M, Magalotti D, Bianchi G, Gueli C, Orlandini C, Grimaldi M, Marchesini G. Total and functional hepatic blood flow decrease in parallel with ageing. *Age Ageing* 1999, 28(1): 29-33.
81. Hohn A, Grune T. Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol* 2013, 1: 140-4.
82. Le Couteur DG, Cogger VC, Markus AM, Harvey PJ, Yin ZL, Anselin AD, McLean AJ. Pseudocapillarization and associated energy limitation in the aged rat liver. *Hepatology* 2001, 33(3): 537-43.
83. Sastre J, Pallardo FV, Pla R, Pellin A, Juan G, O'Connor JE, Estrela JM, Miquel J, Vina J. Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 1996, 24(5): 1199-205.
84. Le Couteur DG, Warren A, Cogger VC, Smedsrod B, Sorensen KK, De Cabo R, Fraser R, McCuskey RS. Old age and the hepatic sinusoid. *Anat Rec (Hoboken)* 2008, 291(6): 672-83.
85. Toomajian C, Ajioka RS, Jorde LB, Kushner JP, Kreitman M. A method for detecting recent selection in the human genome from allele age estimates. *Genetics* 2003, 165(1): 287-97.
86. McLean AJ, Cogger VC, Chong GC, Warren A, Markus AM, Dahlstrom JE, Le Couteur DG. Age-related pseudocapillarization of the human liver. *J Pathol* 2003, 200(1): 112-7.
87. Hilmer SN, Cogger VC, Le Couteur DG. Basal activity of Kupffer cells increases with old age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007, 62(9): 973-8.

88. Verma S, Tachtatzis P, Penrhyn-Lowe S, Scarpini C, Jurk D, Von Zglinicki T, Coleman N, Alexander GJ. Sustained telomere length in hepatocytes and cholangiocytes with increasing age in normal liver. *Hepatology* 2012, 56(4): 1510-20.
89. Giavarotti L, D'Almeida V, Giavarotti KA, Azzalis LA, Rodrigues L, Cravero AA, Videla LA, Koch OR, Junqueira VB. Liver necrosis induced by acute intraperitoneal ethanol administration in aged rats. *Free Radic Res* 2002, 36(3): 269-75.
90. Sanz N, Diez-Fernandez C, Andres D, Cascales M. Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1587(1): 12-20.
91. Dailey MO. *The Immune Functions of the Spleen*, In: Bowdler AJ, editor. *The Complete Spleen: Structure, Function, and Clinical Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press; 2002. p. 51-69.
92. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. *Immunology*. Elsevier Science Health Science Division, 2007.
93. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013, 14(10): 996-1006.
94. Li L, Duan M, Chen W, Jiang A, Li X, Yang J, Li Z. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. *J Transl Med* 2017, 15(1): 111.
95. Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies. *Hepatology* 2009, 50(4): 1294-306.
96. Crespo Yanguas S, Cogliati B, Willebrords J, Maes M, Colle I, van den Bossche B, de Oliveira CP, Andraus W, Alves VA, Leclercq I, Vinken M. Experimental models of liver fibrosis. *Archives of toxicology* 2016, 90(5): 1025-48.
97. Ellis EL, Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *J Hepatol* 2012, 56(5): 1171-80.
98. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014, 14(3): 181-94.
99. Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, Sands E, Suliman I, Trim N, Knorr A, Arthur MJ, Benyon RC, Iredale JP. Spontaneous

- recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004, 126(7): 1795-808.
100. Novo E, Marra F, Zamara E, Valfrè di Bonzo L, Monitillo L, Cannito S, Petrai I, Mazzocca A, Bonacchi A, De Franco RS, Colombatto S, Autelli R, Pinzani M, Parola M. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut* 2006, 55(8): 1174-82.
 101. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR, Nash CRN. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010, 362(18): 1675-85.
 102. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leheret P, Serfaty L, Romero-Gomez M, Boursier J, Abdelmalek M, Caldwell S, Drenth J, Anstee QM, Hum D, Hanf R, Roudot A, Megnien S, Staels B, Sanyal A. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* 2016, 150(5): 1147-59.e5.
 103. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, Dasarathy S, Diehl AM, Hameed B, Kowdley KV, McCullough A, Terrault N, Clark JM, Tonascia J, Brunt EM, Kleiner DE, Doo E. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015, 385(9972): 956-65.
 104. Friedman S, Sanyal A, Goodman Z, Lefebvre E, Gottwald M, Fischer L, Ratziu V. Efficacy and safety study of cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis in adult subjects with liver fibrosis: CENTAUR Phase 2b study design. *Contemp Clin Trials* 2016, 47: 356-65.
 105. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Cl Ga* 2011, 25(2): 319-33.
 106. <http://biostatapps.inonu.edu.tr/IAY/>. (Son erişim tarihi 10.10.2020)

107. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25(4): 402-8.
108. Salguero Palacios R, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, Gressner OA, Weiskirchen R, Graf J, Roeb E. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2008, 88(11): 1192-203.
109. Zhang X, Xu Y, Qi Y, Han X, Yin L, Xu L, Liu K, Peng J. Potent effects of dioscin against thioacetamide-induced liver fibrosis through attenuating oxidative stress in turn inhibiting inflammation, TGF- β /Smad and MAPK signaling pathways. *Journal of Functional Foods* 2015, 16: 436-47.
110. Newsome PN, Cramb R, Davison SM, Dillon JF, Foulerton M, Godfrey EM, Hall R, Harrower U, Hudson M, Langford A, Mackie A, Mitchell-Thain R, Sennett K, Sheron NC, Verne J, Walmsley M, Yeoman A. Guidelines on the management of abnormal liver blood tests. *Gut* 2018, 67(1): 6-19.
111. Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, Piccinocchi G, Piccinocchi R, Schena E, Galati G, De Vincentis A, Dell'Unto C, Picardi A. Determinants of alanine aminotransferase levels in a large population from Southern Italy: relationship between alanine aminotransferase and age. *Dig Liver Dis* 2014, 46(10): 909-15.
112. Fox JG, Barthold S, Davisson M, Newcomer CE, Quimby FW, Smith A. *The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models*, 2th Edition ed. Burlington, Elsevier Science, 2006: 637-72.
113. Chen IS, Chen YC, Chou CH, Chuang RF, Sheen LY, Chiu CH. Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. *J Sci Food Agric* 2012, 92(7): 1441-7.
114. Saad RA, El-Bab MF, Shalaby AA. Attenuation of acute and chronic liver injury by melatonin in rats. *Journal of Taibah University for Science* 2013, 7(2): 88-96.
115. Sanz N, Díez-Fernández C, Andrés D, Cascales M. Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1587(1): 12-20.

116. Mansouri A, Gattolliat CH, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology* 2018, 155(3): 629-47.
117. Heidari R, Niknahad H, Sadeghi A, Mohammadi H, Ghanbarinejad V, Ommati MM, Hosseini A, Azarpira N, Khodaei F, Farshad O, Rashidi E, Siavashpour A, Najibi A, Ahmadi A, Jamshidzadeh A. Betaine treatment protects liver through regulating mitochondrial function and counteracting oxidative stress in acute and chronic animal models of hepatic injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018, 103: 75-86.
118. Lane M, Boczonadi V, Bachtari S, Gomez-Duran A, Langer T, Griffiths A, Kleinle S, Dineiger C, Abicht A, Holinski-Feder E, Schara U, Gerner P, Horvath R. Mitochondrial dysfunction in liver failure requiring transplantation. *J Inherit Metab Dis* 2016, 39(3): 427-36.
119. Mitchell C, Robin M-A, Mayeuf A, Mahrouf-Yorgov M, Mansouri A, Hamard M, Couton D, Fromenty B, Gilgenkrantz H. Protection against hepatocyte mitochondrial dysfunction delays fibrosis progression in mice. *The American journal of pathology* 2009, 175(5): 1929-37.
120. Meftahi GH, Jangravi Z, Sahraei H, Bahari Z. The possible pathophysiology mechanism of cytokine storm in elderly adults with COVID-19 infection: the contribution of “inflammation-aging”. *Inflammation Research* 2020.
121. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammation: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* 2018, 15(9): 505-22.
122. Sanada F, Taniyama Y, Muratsu J, Otsu R, Shimizu H, Rakugi H, Morishita R. Source of Chronic Inflammation in Aging. *Front Cardiovasc Med* 2018, 5: 12.
123. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol* 2001, 8(3): 131-6.
124. Bernstein ED, Murasko DM. Effect of age on cytokine production in humans. *Age (Omaha)* 1998, 21(4): 137-51.
125. Tanabe K, Taura K, Koyama Y, Yamamoto G, Nishio T, Okuda Y, Nakamura K, Toriguchi K, Takemoto K, Yamanaka K, Iwaisako K, Seo S, Asagiri M, Hatano E, Uemoto S. Migration of splenic lymphocytes promotes liver fibrosis through modification of T helper cytokine balance in mice. *J Gastroenterol* 2015, 50(10): 1054-68.

126. Forsey RJ, Thompson JM, Ernerudh J, Hurst TL, Strindhall J, Johansson B, Nilsson BO, Wikby A. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech Ageing Dev* 2003, 124(4): 487-93.
127. Carrieri G, Marzi E, Olivieri F, Marchegiani F, Cavallone L, Cardelli M, Giovagnetti S, Steconci R, Molendini C, Trapassi C, De Benedictis G, Kletsas D, Franceschi C. The G/C915 polymorphism of transforming growth factor beta1 is associated with human longevity: a study in Italian centenarians. *Aging Cell* 2004, 3(6): 443-8.
128. Salazar-Montes A, Delgado-Rizo V, Armendáriz-Borunda J. Differential gene expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute and chronic liver injury. *Hepatology Research* 2000, 16(3): 181-94.
129. Yin S, Wang H, Park O, Wei W, Shen J, Gao B. Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3. *The American journal of pathology* 2011, 178(4): 1614-21.
130. Chae MS, Moon KU, Chung HS, Park CS, Lee J, Choi JH, Hong SH. Serum interleukin-6 and tumor necrosis factor- α are associated with early graft regeneration after living donor liver transplantation. *PLOS ONE* 2018, 13(4): e0195262.
131. Hung KS, Lee TH, Chou WY, Wu CL, Cho CL, Lu CN, Javan B, Wang CH. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 336(1): 324-31.
132. Schmucker DL, Sanchez H. Liver regeneration and aging: a current perspective. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2011, 2011: 526379-.
133. Timchenko NA. Aging and liver regeneration. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2009, 20(4): 171-6.
134. Louis H, Le Moine O, Goldman M, Devière J. Modulation of liver injury by interleukin-10. *Acta Gastroenterol Belg* 2003, 66(1): 7-14.
135. Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *The Journal of clinical investigation* 2013, 123(3): 958-65.

136. Pinti M, Appay V, Campisi J, Frasca D, Fülöp T, Sauce D, Larbi A, Weinberger B, Cossarizza A. Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *Eur J Immunol* 2016, 46(10): 2286-301.



EKLER

EK-1. DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 11-05-2017
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2017/A-35
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Fare
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : BALB/c
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 9 Aylık, 25-35 g

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Başak KAYHAN'ın yürütücüsü olduğu "Kronik Karaciğer Fibrozu Oluşturulan Genç ve Yaşlı Farelerde İnflamatuvar ve Anti-İnflamatuvar Sitokin Genlerinin İfade Edilme Düzeyinin Araştırılması." isimli 2017/A-35 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

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

 Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Başkan	 Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Metin ATAMBAY Üye
 Prof. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN Üye	 Prof. Dr. Başak KAYHAN Üye	 Doç. Dr. Şengül YÜKSEL Üye
 Vet. Hek. Özge ÖZYALIN Üye	 Akın ÖZ Sivil Üye	 Dr. Mehmet DENİZ Sivil Üye

EK-2. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynal Mete KARACA

Doğum Tarihi : 01.06.1987

Doğum Yeri : Malatya

Uyruk : T.C.

Eğitim Bilgileri

2010-2011 : İnönü Üniversitesi (Malatya) Pedagogik Formasyon

2007-2011 : İnönü Üniversitesi (Malatya) Biyoloji Bölümü Lisans

2011-2014 : İnönü Üniversitesi (Malatya) Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Tezli Yüksek Lisans.

2014-Devam ediyor : İnönü Üniversitesi (Malatya) Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Doktora.