



T.C.

**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ
TIBBİ BİYOKİMYA KLİNİĞİ**

**OSTEOSARKOM HÜCRELERİ ÜZERİNDE
STATİNLERİN VE VİTAMİN D'NİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Araş. Gör. Betül ÖZBEK İPTEÇ

Ankara, 2019



T.C.

**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ
TIBBİ BİYOKİMYA KLİNİĞİ**

**OSTEOSARKOM HÜCRELERİ ÜZERİNDE
STATİNLERİN VE VİTAMİN D’NİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Araş. Gör. Betül ÖZBEK İPTEÇ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Leyla Di dem KOZACI

Ankara, 2019

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca her konuda ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, yaptığım en küçük çalışmanın bile karşılığını fazlasıyla bana gösteren, bu tezi hazırlayabilmek için bana her türlü imkânı sunan ve tezimin hazırlanmasında ve yazılmasında gece gündüz demeden bana yardım eden, tez danışmanım, değerli hocam sayın Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI'ya;

Uzmanlık eğitimim boyunca bana birçok deneyim ve bilgi kazandıran sayın hocalarım Prof. Dr. Özcan EREL, Prof. Dr. Fatma Meriç YILMAZ, Prof. Dr. Gülsen YILMAZ, Prof. Dr. Cemile BİÇER, Doç. Dr. Serpil ERDOĞAN, Doç. Dr. Ceylan BAL ve Dr. Öğr. Üyesi Salim NEŞELİOĞLU'na;

Laboratuvar çalışmalarım süresince bana her türlü desteği sunan sevgili arkadaşlarım Büşra GÖRGÜN ve Kübra FİDAN'a;

Bana inanıp, iyi niyetleriyle beni her zaman motive eden değerli arkadaşlarım Cemil NURAL ve Arzu SAKALLI'ya;

Histoloji çalışmalarımda tecrübelerini paylaşan sevgili arkadaşım Gülben AKCAN'a ve histoloji sonuçlarımın yorumlanmasında bana yardım eden canım annem Prof. Dr. Elvan ŞAHİN'e;

Akım sitometre çalışmalarım ve analizlerimde başım sıkıştığı zaman danıştığım, beni sabırla dinleyip, yardımlarını esirgemeyen Dr. Tamer KAHRAMAN'a;

Hayatımın her aşamasında beni sevip destekleyen, huzur bulduğum canım annem Prof. Dr. Elvan ŞAHİN ve biricik meleğim canım kardeşim Esra ÖZBEK'e;

Bu yoğun ve sıkıntılı süreçte beni her zaman anlayış ve sevgiyle kucaklayıp bana yol gösteren sevgili eşim Mutlu İPTEÇ'e sonsuz teşekkür ederim.

Betül ÖZBEK İPTEÇ

Ankara, 2019

ÖZET

Ergenlik dönemi ile ileri yaşlardaki bireyleri hedef alan ve sağkalım oranları günümüz teknolojisine rağmen %60-70 oranlarında seyreden osteosarkom yüksek dereceli primer kemik malignitelerinden biridir. Non-spesifik şikayetler ile başvuran hastaların %30'unda teşhis konulduğu anda metastatik lezyonlar izlenmesine ek olarak bu hastaların 5 yıllık sağkalım oranları %20 civarındadır. Farklı kanser türlerinde etkili olan ajanların metastaz potansiyeli yüksek osteosarkom vakalarında da faydalı olup olmayacağı sorusu araştırmacı ve klinisyenleri bu ilaçların farklı hücresel mekanizmalar üzerindeki etkilerini anlamaya yöneltmiştir. Bu etkiler açısından ele alınabilecek ilaçlar arasında statinler de yer almaktadır. Statinler birçok kanser türünde anti-metastatik ve anti-proliferatif etkiler göstermektedir. Benzer şekilde vitamin D'nin de anti-kanser etkiler gösterdiği bilinmektedir. Çalışmadaki amacımız bu iki ajanın MG-63 osteosarkom hücrelerinde TNF- α varlığında/yokluğunda ölüm yolları üzerindeki tek başına ve kombine etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda MG-63 hücreleri, farklı dozlarda atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M), TNF- α (20 ng/mL) ve/veya vitamin D (10^{-6} M) varlığında 24 ve 48 saat süreyle kültüre edilmiştir. 24 saat kültürden sonra otofajik, apoptotik ve endoplazmik retikulum (ER) stres yollarında yer alan proteinlerin ekspresyon düzeyleri qPCR ve akım sitometre analizleri ile, kemik matriks proteini olan osteokalsin'in mRNA seviyeleri qPCR, osteokalsin ve kollajen-1'in protein düzeyleri immunositokimyasal boyamalar ile değerlendirilmiştir. 24-48 saat sonunda hücre canlılığı ve laktat dehidrojenaz (LDH) düzeyleri ölçülmüş, tedavi süresi boyunca hücrelerin gerçek zamanlı görüntüleri alınarak morfolojik değişiklikler incelenmiştir. Ayrıca, 48. saatte alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi saptanmıştır. Çalışma sonuçlarımıza göre atorvastatin otofajik ve apoptotik yolda yer alan proteinlerin ve ER stres belirteçlerinin ekspresyonlarını uyararak MG-63 hücrelerinin canlılığını azaltmış ve matriks protein yıkımına yol açan enzimlerin ekspresyonunu arttırmıştır. Vitamin D MG-63 hücrelerinde ölüm yolları üzerinde atorvastatin ile birlikte uygulandığında bu yollarda mevcut proteinlerin ekspresyonu üzerine atorvastatinin etkilerini zayıflatmıştır. Sonuç olarak, vitamin D'nin osteoblast-osteosit farklılaşmasına yönelik olası etkileri üzerinden atorvastatin ile antagonist etki oluşturabileceğini ve bu nedenle bu ajanların kombine halde verileceği tedavilerde dikkatli olunması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Osteosarkom, Atorvastatin, Vitamin D, Otofaji, Apoptoz, Endoplazmik Retikulum Stres

ABSTRACT

Osteosarcoma is one of the high-grade primary bone malignancies that target adolescence and older individuals and have a survival rate of 60-70% despite current technology. In addition to the presence of metastatic lesions in 30% of patients with non-specific complaints at the time of diagnosis, the 5-year survival rate of these patients is around 20%. The question of whether agents that are effective in different types of cancers will also be useful in cases of osteosarcoma with high metastatic potential has led researchers and clinicians to understand the effects of these drugs on different cellular mechanisms. Statins are among these drugs with such various effects. They have anti-metastatic and anti-proliferative effects in many cancer types. Similarly, vitamin D is known to have anti-cancer effects. The aim of this study was to investigate the effects of these two agents on death pathways (alone and in combination) in the presence/absence of TNF- α in MG-63 osteosarcoma cells. In our study, MG-63 cells were cultured in the presence of different doses of atorvastatin (5, 10 and 50 μ M), TNF (20 ng/mL) and/or vitamin D (10^{-6} M) for 24 and 48 hours. After 24 hours of culture, expression levels of proteins in autophagic, apoptotic and endoplasmic reticulum (ER) stress pathways were evaluated by qPCR and flow cytometer analysis. Osteocalcin expressions of bone matrix protein was evaluated by qPCR in mRNA and by immunocytochemical staining in protein levels of osteocalcin and collagen-1. Cell viability and lactate dehydrogenase (LDH) levels were measured at the end of 24-48 hours. Real-time images and morphological changes of the cells were examined during treatment. In addition, alkaline phosphatase (ALP) activity was determined at 48 hours. According to our results, atorvastatin decreased the viability of MG-63 cells by stimulating the expression of autophagic and apoptotic pathway proteins and ER stress markers and increased expression of the enzymes leading to matrix protein degradation. When vitamin D was co-administered with atorvastatin, it weakened the effects of atorvastatin on expression of proteins present in death pathways in MG-63 cells. In conclusion, we think that vitamin D might be antagonizing atorvastatin over its possible effects on osteoblast-osteocyte differentiation and therefore, we suggest that caution should be exercised in the treatment of these agents in combination.

Key Words: Osteosarcoma, Atorvastatin, Vitamin D, Autophagy, Apoptosis, Endoplasmic Retikulum Stres

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
TABLOLAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemik.....	3
2.1.1. Kemik Dokusunun Yapısı	3
2.1.2. Kemik Dokusunun Oluşumu, Kemikleşme.....	3
2.1.3. Kemik Dokusunun Yapısı	4
2.1.3.1. Hücreler	4
2.1.3.2. Ekstraselüler Kemik Matriksi	6
2.1.4. Kemik Metabolizması	9
2.2. İnflamasyon ve Tümör İlişkisi	9
2.3. Osteosarkom	14
2.3.1. Osteosarkom Nedir?	14
2.3.2. Türkiye'deki Durum.....	15
2.3.3. Osteosarkom Risk Faktörleri.....	15
2.3.4. Osteosarkom Bulguları.....	15

2.3.5. Osteosarkom Tanısı.....	16
2.3.6. Osteosarkom Tipleri.....	16
2.3.7. Prognoz	16
2.3.8. Tedavi.....	17
2.4. Statinler	17
2.5. Vitamin D	22
2.6. Hücre Ölüm Yolakları	26
2.6.1. Apoptoz.....	26
2.6.2. Otofaji	28
2.6.3. Nekroz	33
2.6.4. Endoplazmik Retikulum Stres (ER Stres).....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Gerekli Materyaller	36
3.1.1. Sarf Malzemeler	36
3.1.1.1. Kolorimetrik Kitler	36
3.1.1.2. Kimyasal Malzemeler.....	36
3.1.1.3. Hücre Kültürü Malzemeleri.....	37
3.1.1.4. Moleküler Çalışma Malzemeleri	37
3.1.1.4.1. Kitler	37
3.1.1.4.2. PCR Primerleri	37
3.1.1.5. Antikorlar	38
3.1.2. Cihazlar	38
3.2. MG-63 Hücre Kültürü ve Hücrelerin Çoğaltılması	38

3.3. MG-63 Hücrelerinin Pasajlanması ve Hücre Sayımı.....	39
3.4. DeneY Gruplarının Planlanması ve İlaç Dozlarının Hazırlanması.....	39
3.5. WST-1 Yöntemi ile Hücre Canlılığının ve Proliferasyonun Değerlendirilmesi.....	40
3.6. LDH Aktivitesinin Ölçümü.....	41
3.7. Bradford Yöntemi ile Protein Düzeylerinin Saptanması	42
3.8. AlkaleN Fosfataz (ALP) Aktivitesinin Ölçümü	43
3.9. Akım Sitometre Analizi	43
3.9.1. Akım sitometre analizi için kullanılan çözeltiler	44
3.9.2. Antikorların Hazırlanması.....	44
3.9.3. Hücre Fiksasyonu.....	44
3.9.4. Hücrelerin Permeabilizasyonu	45
3.9.5. Hücrelerin İşaretlenmesi	45
3.10. Kantitatif Geri Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu	45
3.10.1. RNA İzolasyonu.....	45
3.10.2. qPCR (qRT-PCR).....	46
3.10.3. cDNA Sentezi.....	47
3.10.4. qPCR Analizi	48
3.11. İmmünositokimya	50
3.12. Hücrelerin Gerçek Zamanlı Görüntülerinin Alınması	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. MG-63 Hücrelerinde Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	52
4.2. MG-63 Hücrelerinin Canlılığının WST-1 Testi ile Saptanması	54

4.3. ZenCell Owl Cihazı Kullanılarak Gerçek Zamanlı Hücre Görüntüleme Analizleri	56
4.4. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Otofaji Yolağı Üzerine Etkileri.	64
4.5. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin TLR/ NF- κ B Sinyal Yolağı ve RANKL Ekspresyonu Üzerine Etkileri	66
4.6. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Apoptoz Üzerine Etkileri.....	69
4.7. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin VDR Ekspresyonu Üzerine Etkileri	71
4.8. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Endoplazmik Retikulum Stres Oluşumu Üzerine Etkileri	72
4.9. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin Matriks Proteinleri Üzerine Etkileri....	73
4.10. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin Matriks Yıkımı Üzerine Etkileri	75
4.11. Akım Sitometre Analizleri	77
4.11.1. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Otofaji Yolağı Üzerine Etkileri	78
4.11.2. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Apoptoz Yolağı Üzerine Etkileri	83
4.11.3. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Endoplazmik Retikulum Stres Üzerine Etkileri.....	87
4.12. İmmunositokimyasal Bulgular	89
5. TARTIŞMA.....	96
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
7. KAYNAKLAR	110
8. EKLER	119
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	119

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACP	Asit Fosfataz
ALP	Alkalen Fosfataz
AMPK	5 'AMP ile Aktifleştirilen Protein Kinaz
ATG	Otofaji İlişkili Gen (Autophagy-Related Gene)
ATG	Otofaji-İlişkili Gen
ATG 4A	Otofaji İlişkili 4A Sistin Peptidaz
Bcl-2	B-Hücreli Lenfoma Apoptoz Regülatör Geni
Bcl-b	Bcl-2 Benzeri Protein 10
Bcl-w	Bcl-2 Benzeri Protein
Bcl-xl	Bcl-X büyük
Bfl-1	Bcl-2 ile İlişkili Protein A1
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
BMP-2	Kemik Morfogenetik Protein-2
BSA	Bovin Serum Albümin
BSP	Kemik Sialoprotein
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CD	Farklılaşma Kümesi (Cluster of Differentiation)
cDNA	Komplementer (Tamamlayıcı) Deoksiribonükleik Asit
CHOP	C/EBP homolog proteini
CO₂	Karbon Dioksit
CT	Döngü Eşikdeğeri (Threshold Cycle)
CYP27A1	Sitokrom P450 Ailesi 27 Altgrup Üyesi 1
DAI	İnterferonun DNA-Bağımlı Aktivatörleri
DAMP	Hasarla İlişkili Moleküler Modelleri
DEPC-H₂O	Dietilpirokarbonat ile Muamele Edilmiş Su
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozid Trifosfatlar
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Buffer Salini
DR	Ölüm Reseptörü

ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF	Endotelial Büyüme Faktörü
ELISA	Enzim Bağlı İmmün Ölçüm Yöntemi
ER	Endoplazmik Retikulum
FBS	Fötal Bovin Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
FPP	Farnezil Pirofosfat
FSC	İleri Saçılım (Forward Scatter)
GABARAP	Gama-Aminobütirik Asit Tip A Reseptör-İlişkili Protein
GADD 153 (CHOP)	DNA Hasarıyla İndüklenebilir Transkript 3
GADD 45	Büyüme Durması ve DNA Hasarına Neden Olan 45
GER	Granüllü Endoplazmik Retikulum
GGPP	Geranil Geranil Pirofosfatı
GTPaz	Guanozin Trifosfataz
HMGB1	Yüksek Mobilite Grup Kutusu 1 Proteini
HMG-KoA	3-Hidroksi-3-Metil-Glutaril-KoA
ICAM1	İntraselüler Adezyon Molekülü 1
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
IRE1	Enzim 1 Gerektiren İnositol
JNK	c-Jun N-terminal Kinaz
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LFA1	Lenfosit Fonksiyon-İlişkili Antijen 1
LPS	Lipopolisakkarit
MAP1LC3B	Mikrotübüle Bağlı Protein 1 Hafif Zincir 3 Beta
MAPK	Mitojenle-Aktiflenen Protein Kinaz
Mcl-1	Miyeloid Hücreli Lösemi 1
M-CSF	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MFI	Ortalama Floresans Yoğunluğu (Mean Fluorescence Intensity)
MKH	Mezenkimal Kök Hücre

MMP	Matriks Metalloproteinaz
MOMP	Mitokondrial Dış Zar Geçirgenliği
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
mTOR	Rapamisin'in Memeli Hedefi (Mamalian Target of Rapamycin)
MyD88	Miyeloid Farklılaşma Primer Yanıt Geni 88
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Okside Formu
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Redükte Formu
NaN₃	Sodyum Azid
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
O₂	Oksijen
Oligo Dt	Oligo Deoksitimin
OPG	Osteoprotegerin
PAMP	Patojen-İlişkili Moleküler Model
PAS	Fagofor Birleşme Bölgesi
PBS	Fosfat Tampon Salin (Phosphate Buffer Saline)
PCR	Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PDGFR	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörleri
PE	Fosfatidiletanolamin
PERK	PKR-Benzeri ER Kinaz
PI3K	Sınıf III Fosfatidilinositol-3-Kinaz
PI3KC3	Sınıf III Fosfatidilinositol 3-Kinaz Kompleksi
PI3P	Fosfatidilinozitol 3-Fosfat
PKR	Protein Kinaz RNA
PP	Pirofosfat
PRR	Patern Tanıma Reseptörleri
PTH	Paratiroid Hormon
qRT-PCR (qPCR)	Kantitatif Geri Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RANK	Nükleer Faktör-Kappa B Reseptör Aktivatörü
RANKL	Nükleer Faktör-Kappa B Ligandının Reseptör Aktivatörü
RIP	Reseptör-Etkileşimli Protein Kinaz
RNA	Ribonükleik Asit

RNaz	RNA'yı Parçalayan Enzim
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTaz	Geri (Revers) Transkripsiyon Enzimi
SIBLING	Küçük İntegrin Bağlayıcı Ligand N-bağlantılı Glikoprotein
SSC	Yan Saçılım (Side Scatter)
ssRNA	Tek Sarmallı Ribonükleik Asit
TAM	Tümör ile İlişkili Makrofajlar
TCR	T-Hücreli Reseptör
TGF	Doku Büyüme Faktörü
TLR	Toll Benzeri Reseptör (Toll Like Reseptör)
TNFα	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TRAIL-R	TNF ile ilişkili Apoptozis İndükleyici Ligand Reseptörü
UPR	Katlanmamış Protein Cevabı
UVB	Ultraviyole B
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
VDES	Vitamin D Endokrin Sistemi
VDR	Vitamin D Reseptörü
VDRE	Vitamin D'den Sorumlu Eleman
VEGFR	Vazo Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörleri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WST	Suda Çözünür Tetrazolyum Tuzu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

No:

Şekil 1. Kemik hücre popülasyonu	5
Şekil 2. Fibriler yapıdaki tip-1 kollajenin moleküler yapısı	7
Şekil 3. Post-translasyonel modifikasyon sonrası osteokalsin	8
Şekil 4. OPG/RANK/RANKL yolağı.....	14
Şekil 5. Statinlerin mevalonat yolu üzerindeki etki mekanizması ve Ras ve Rho sinyal yolları üzerindeki etkisi	18
Şekil 6. Statinler, otofaji ve metastaz arasındaki ilişkiyi açıklayan diyagram	19
Şekil 7. Statinlerin kemik oluşumu-sinyal yolları üzerindeki anabolik etkileri ...	20
Şekil 8. Statinlerin ve ER stresin otofaji üstündeki ortak yolağı.....	21
Şekil 9. Hücre proliferasyonu, apoptoz ve kanserdeki inflamasyonun düzenlenmesinde rol alan 1,25(OH) ₂ D ₃ kaynaklı sinyal yolu	25
Şekil 10. Otofaji Türleri.....	30
Şekil 11. Otofajinin Hüresel, Moleküler ve Fizyolojik Yönleri	32
Şekil 12. Statinlerin UPR, otofaji ve apoptoz üzerindeki etki mekanizması.....	35
Şekil 13. WST-1 testi ile hücre canlılığının ölçümü	41
Şekil 14. LDH testi ile sitotoksitenin ölçümü.....	42
Şekil 15. Döngü eşik değeri (Ct)'nin gösterilmesi.....	47
Şekil 16. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde LDH aktivitesi.....	53
Şekil 17. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulamalarının MG-63 hücre canlılığı üzerine etkisi	55
Şekil 18. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi.....	57
Şekil 19. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi.....	58
Şekil 20. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi.....	59
Şekil 21. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi.....	60
Şekil 22. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görün-	

tülemesi sonucu hesaplanan hücre sayıları	61
Şekil 23. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi sonucu hesaplanan plak tabanına yapışan hücre yüzdeleri	62
Şekil 24. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi sonucu hesaplanan plak tabanından ayrılan hücre yüzdeleri	63
Şekil 25. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki ATG-4, LC-3B ve Beclin-1 mRNA ekspresyonlarına etkileri	65
Şekil 26. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki TLR-2, TLR-4, RANKL ve NF κ B mRNA ekspresyonlarına etkileri	67
Şekil 27. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki GADD-45 mRNA ekspresyonuna etkileri.....	69
Şekil 28. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki Bcl-2 mRNA ekspresyonuna etkileri.....	70
Şekil 29. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki VDR mRNA ekspresyonuna etkileri.....	71
Şekil 30. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki GADD-153 mRNA ekspresyonuna etkileri.....	72
Şekil 31. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulamalarının MG-63 hücrelerinin ALP aktivitesi üzerine etkisi.....	73
Şekil 32. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki osteokalsin mRNA ekspresyonuna etkileri.....	74
Şekil 33. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki MMP-1, MMP-13 ve MMP-9 mRNA ekspresyonuna etkileri.....	76
Şekil 34. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde LC-3B protein ekspresyonu	78
Şekil 35. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde ATG-4 protein ekspresyonu	79
Şekil 36. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde beclin-1 protein ekspresyonu	80
Şekil 37. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki ATG-4, LC-3B ve beclin-1 protein ekspresyonlarına etkileri.....	81
Şekil 38. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde Bcl-2 protein ekspresyonu.....	83

Şekil 39. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki Bcl-2 protein ekspresyonlarına etkileri.....	84
Şekil 40. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde GADD-45 protein ekspresyonu.....	85
Şekil 41. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki GADD-45 protein ekspresyonlarına etkileri.....	86
Şekil 42. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde GADD-153 protein ekspresyonu.....	87
Şekil 43. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki GADD-153 protein ekspresyonlarına etkileri	88
Şekil 44. TNF- α ve farklı dozlarda Atorvastatin uygulanan ve tedavi uygulanmayan (Kontrol) MG-63 hücrelerinde kollajen 1'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar.....	90
Şekil 45. Vitamin D ve TNF- α uygulanan ve tedavi uygulanmayan (Kontrol) MG-63 hücrelerinde kollajen 1'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar	91
Şekil 46. Vitamin D, TNF- α ve farklı dozlarda Atorvastatin ile çeşitli tedavi protokolleri uygulanan MG-63 hücrelerinde kollajen 1'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar.....	92
Şekil 47. TNF- α ve farklı dozlarda Atorvastatin uygulanan ve tedavi uygulanmayan (Kontrol) MG-63 hücrelerinde osteokalsin'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar.....	93
Şekil 48. Vitamin D ve TNF- α uygulanan ve tedavi uygulanmayan (Kontrol) MG-63 hücrelerinde osteokalsin'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar.....	94
Şekil 49. Vitamin D, TNF- α ve farklı dozlarda Atorvastatin uygulanan MG-63 hücrelerinde osteokalsin'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar.....	95

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. Deney (tedavi) grupları	40
Tablo 2. Akım sitometre analizi için kullanılan antikolar	44
Tablo 3. cDNA sentez protokolü	48
Tablo 4. qPCR analizi yapılan genlere ait primerler.....	49
Tablo 5. qPCR protokolü	50



1-GİRİŞ VE AMAÇ

Osteosarkom çoğunlukla genç popülasyonu hedef alan (10-14 yaş), olgunlaşmamış osteoid matriksi üreten yüksek dereceli primer kemik malignitesidir. Malignitenin fenotipik risk faktörleri fizyolojik hızlı büyüme ve yüksek doğum ağırlığı olmakla birlikte vakaların çoğu sporadik mutasyonlar sonrasında gelişir (1, 2). Ülkemizde her yıl 15 yaşın altında 150 yeni osteosarkom olgusu izlenmektedir. Klinik bulgu açısından non-spesifik şikayetler ile kendini gösteren bu hastalık, hastalığın ilerleyen dönemlerinde bile kilo kaybı, kırgınlık, ateş gibi yine hastalığa özgün olmayan şikayetler nedeniyle kendini belli etmeyebilir (3). Genç yaşlarda görülen osteosarkomlar çok daha yüksek malignite gösterir ve çok hızlı bir şekilde metastaz yapar. Sağkalım oranları tümör ile ilgili birçok faktörden etkilense de metastatik olgularda bu oran çok düşüktür. Modern kemoterapiler sayesinde sağkalım oranları dramatik şekilde yükselse de osteosarkom hastalarında bu tedavilere rağmen 5 yıllık sağkalım oranı %60-70 civarındadır (4). Osteosarkom hastalarının %30'u osteosarkom teşhisi konulduğunda metastatik lezyonlar göstermekte ve (5) metastatik osteosarkom olgularında 5 yıllık sağkalım oranları %20-30'lara kadar düşmektedir (1).

Yakın zamanda yapılan çalışmalara göre, geleneksel olarak kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve kolesterol düşürücü etkilerinden dolayı sıklıkla kullanılan statinlerin tümör hücrelerinde ve osteoblastlarda otofajiyi indüklediği aynı zamanda kemik metabolizmasını iyileştirici etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Ek olarak statinlerin, hücre adezyon moleküllerinin çevre doku ve diğer moleküllerle etkileşimini bozarak tümör hücre adezyonunu, invazyonunu ve inflamasyonunu azalttığı, metastaz sonrasında ise tümör hücrelerinin sağlıklı dokulara tutunmasını engelleyerek anti-metastatik etki gösterdiği bildirilmiştir (6, 7).

Vitamin D'nin kemik homeostazı ve büyüme üzerine olan pozitif etkileri birçok araştırma tarafından gösterilmiştir. Bunlara ek olarak D vitamini kanserin önlenmesinde ve otofaji gibi hücre sel yanıtın düzenlenmesinde görev almaktadır (8). Vitamin D'nin hidroksimetil glutaryl KoA (HMG-KoA) redüktaz üzerinde baskılayıcı bir etkisinin olduğu ve D vitamini eksikliği sonucunda bu enzimin aracılık ettiği metabolik yolların inhibe edilememesinden dolayı pek çok kanser türüne yakalanma riskinin arttığı bildirilmiştir (9).

Bu çalışmadaki amacımız kemik metabolizması, hücre ölümü ve anti-metastatik etkilerle ilişkili olan atorvastatin ve 1,25(OH)VitD₃'n, MG-63 osteosarkom hücre hattında TNF- ile oluşturulmuş inflamatuvar süreçte apoptotik, otofajik ve endoplazmik retikulum (ER) stres gibi hücre ölüm yolakları üzerinde oluşturdukları etkileri incelemektir. Çünkü bu yolaklar tümör hücrelerinin lme gitmelerine neden olmanın yanı sıra kimi zaman tümör gelişimi, sağkalımı ve metastaz lehine de farklı etkiler gösterebilir. Bu lm yolaklarının daha iyi anlaşılıp, mekanizmalarına etki edecek yeni tedavilerin ortaya çıkması ve uygulanması yüksek maligniteye sahip osteosarkom ve benzeri hastalıklarda sağkalım oranlarının arttırılması açısından önem arz etmektedir.



2- GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK

2.1.1. Kemik Dokusunun Yapısı

Kemik dokusu, yoğunluk ve paketlenme sıklığı baz alınarak kompakt ve süngerimsi kemik olmak üzere iki şekilde kategorize edilir. Dokunun homeostazından temel olarak üç tip hücre sorumludur. Bunlar; osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositlerdir (10).

Kompakt (kortikal) kemik, sıkı bir şekilde paketlenmiş osteonlardan veya Havers sistemlerinden oluşur. Osteonların merkezinde kemiğin uzun eksenine paralel olarak konumlanan kan damarlarının geçtiği Havers kanalları ve bunları çevreleyen lameller bulunur. Lameller arasında lakuna olarak adlandırılan boşluklarda ise osteositler yer alır (10, 11). Osteonlar ve Havers kanalları arasındaki bağlantıyı Volkmann kanalları sağlar (11).

Trabeküler kemik (spongiöz, kansellöz) kompakt kemiğe kıyasla daha hafif ve daha az yoğun olan süngerimsi trabeküllerden ve kırmızı kemik iliği içeren küçük, düzensiz boşluklara bitişik kemik çubuklarından oluşur. Kanlanmayı sağlamak amacıyla kompakt kemikteki Havers kanallarının yerini süngerimsi kemikte kanaliküller almıştır (10, 11).

2.1.2. Kemik Dokusunun Oluşumu, Kemikleşme

Ekstremitelerin meydana gelmesi gebeliğin 4-8. haftaları arasında gerçekleşir ve bu süreçte öncelikle ekstremiteler tomurcukları oluşur. Altıncı ve yedinci haftalar arasında birincil kemikleşme merkezleri olarak tanımlanan ekstremiteler tomurcuklarından, önce kıkırdak yapımı ve sonrasında oluşan kıkırdak modeli üzerinden kemikleşme süreci gerçekleşir (11). Osteogenez veya ossifikasyon olarak tanımlanan kemik oluşum sürecinin ikincil kemikleşme merkezleri ise çoğunlukla doğum sonrasında kemikleşmeye başlar; komşu bölgelerinde büyüme plakları (fizis) yer alır. Epifiz ve metafiz katmanlarını içeren büyüme plağı, kemiklerin uzunlamasına büyümesine olanak sağlayacak şekilde 20'li yaşların başına kadar kıkırdak yapıda kalır, bu süreden sonra seks hormonlarının ve büyüme hormonlarının etkisiyle tamamen kemikleşir ve uzama durur (10, 11). Kemik üzerinde oluşan strese bağlı olarak kemiklerin kalınlaşması her zaman mümkündür (10).

Ossifikasyon intramembranöz ve endokondral olmak üzere iki şekilde görülür. İntramembranöz ossifikasyon bağ dokusunun içinde membranöz bir zarın içinde meydana gelen kemikleşme şeklidir. Endokondral ossifikasyon ise hyalin kıkırdağın yerini kemik dokusuna bırakmasıdır (10, 11).

2.1.3. Kemik Dokusunun Yapısı

Temel olarak vücudun hareketini sağlama, mekanik destek, yaşamsal organların korunması ve kan yapımının sağlanması gibi fonksiyonlardan sorumlu olan kemik dokusu; osteositler, osteoblastlar, osteoklastlar, kemik yüzey döşeyici hücreleri (Şekil 1) ve ekstraselüler kemik matriksini kapsayan mineralize bir bağ dokusudur (10-12). Bu hücrelerin fonksiyonları arasındaki dengesizlik çeşitli kemik patolojilerine, kan hastalıklarına veya kalsiyum homeostazında bozulmalara neden olabilir.

2.1.3.1. Hücreler

Osteositler: 25 yıla kadar hayatta kalabilen, tüm kemik hücrelerinin %90-95'ini oluşturan, osteoblastların farklılaşmasıyla mezenkimal kök hücrelerinden (MKH) üretilen ve kemik matriksine dahil edilen, lakunalar arasında lokalize halde bulunan hücrelerdir.

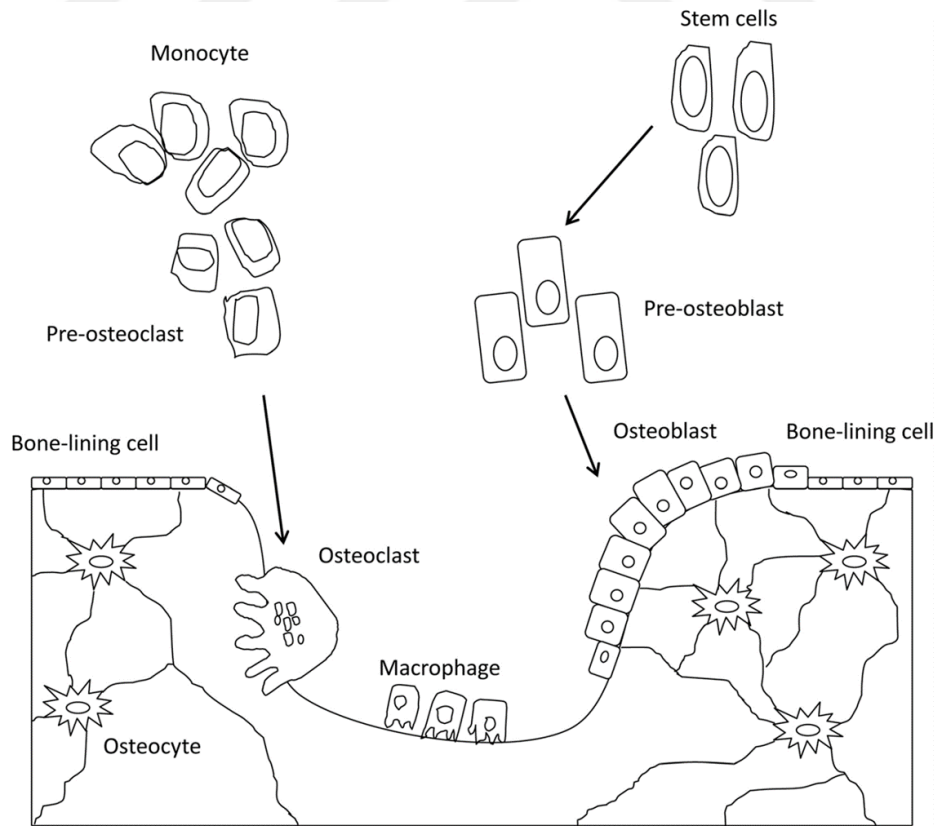
Osteokalsin, kemik sialoprotein (BSP) II, tip I kollajen ve alkalin fosfat (ALP) ekspresyonları azalmaya başlayan mineralize kemik matriksi içinde hapsolmuş olgun osteositler osteoblast ve osteoklastların aktivitesini düzenleyerek kemik remodelingine katkı sağlarlar (11, 12).

Osteoblastlar: Kemik hücrelerinin yaklaşık %5'ini oluşturan osteoblastlar, osteoprogenitör hücrelerinden farklılaşarak meydana gelir. Bu farklılaşma sürecinde Runx2, kollajen tip 1, ALP, BSP ve osteokalsin gibi genlerin ekspresyonlarında artış görüldüğü bildirilmiştir. Osteoblastlar, osteokalsin, osteopontin, osteonektin, BSP ve kemik morfogenetik proteinleri (BMP) gibi kollajen olmayan proteinlerin salgılanmasından sorumludur (12). Kübik bir histolojiye sahiptirler ve ömürleri sınırlıdır. Osteositlere ve kemik yüzey döşeyici hücrelerine farklılaşabilirler. İçerdikleri bol miktarlardaki endoplazmik retikulum (ER) ve golgi cisimciği sayesinde, ekstraselüler kemik matriksinin organik kısmının sentezlenmesinde rol oynarlar, bol miktarda ALP sentezleyerek yeni kemik oluşumunu desteklerler. Osteoklastik aktiviteyi sahip oldukları parathormon reseptörleri ile uyarırlar (11, 12). Osteoklastogenezi artıran reseptör

aktivatör nükleer kappa B ligand (RANKL) ve osteoklastogenezi azaltan osteoprotegerin (OPG) üreterek kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesinde görev alırlar (12).

Osteoklastlar: Hematopoetik kök hücrelerin mononükleer soyundan, makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve RANKL etkisiyle farklılaşan çok çekirdekli hücrelerdir (12). Makrofajlarla benzerlik gösteren osteoklastlar, mineralize kemik matriksinin rezorpsiyonundan, kemik dokusunun yeniden düzenlenmesinden sorumludur (11).

Kemik yüzey döşeyici hücreler: Kemik rezorpsiyonunun ya da yeni kemik oluşumunun görülmediği, kemik yüzeyini kaplayan, az sayıda granüllü ER ve golgi cisimciğine sahip yassı osteoblastlardır. Fonksiyonları tam olarak anlaşılamamış olsa da kemik rezorpsiyonunun gerçekleşmemesi gerektiği durumlarda osteoklastların kemik matriksi ile olan ilişkisini engellediği, bunun yanında osteoklast farklılaşmasına neden olan osteoprotegerin ve RANKL üretimine katkı sağladığı düşünülmektedir (12). Normal koşullar altında metabolik aktivite açısından oldukça yavaş olan bu hücreler kemiğin fizyolojik durumuna bağlı olarak salgılama aktivitelerini arttırabilir hatta aktif osteoblastlara dönüşebilir (11, 12).



Şekil 1. Kemik hücre popülasyonu (13).

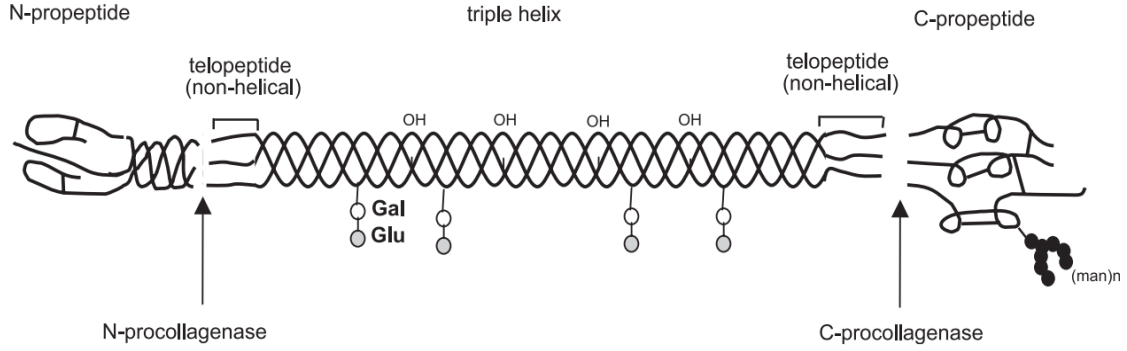
2.1.3.2. Ekstraselüler Kemik Matrisi

Kemik dokusu hücreden fakir, organik matris (kemik dokusunun %25'i) ve inorganik tuzların (kemik dokusunun %60'ı) oluşturduğu yapıdır. Temel olarak kollajen I ve osteokalsinin bulunduğu organik matris aynı zamanda osteonektin, osteopontin, fibronektin ve BSP II, büyüme faktörleri, glikoprotein ve proteoglikanları da içerir. İnorganik matris ise özellikle kalsiyum ve fosfat iyonlarının çekirdeklenerek oluşturduğu hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat tuzlarını içerir (11, 12).

Tip 1 Kollajen: Kollajen sentez süreci, transkripsiyonel faktörlerin çekirdeği uyarması sonucu mRNA üretimi ve sitoplazmaya çıkışı ile başlar. mRNA ile granüllü ER (GER)'de pre-pro-kollajen sentezlenir ve yapıya eklenmiş sinyal peptidlerinin yardımıyla GER lümenine taşınır. Sinyal peptidlerinin uzaklaştırılmasıyla pro-kollajen haline gelen yapı; prolin ve lizin artıklarının çeşitli hidroksilasyon reaksiyonlarıyla eklenmesi, bu yapılara glikozil ve galaktozil artıklarının katılması ve sonuç olarak Glisin-X-Y (hidroksilizin ve daha yoğun olarak prolin ve hidroksiprolinin farklı kombinasyonları) dizilimi ile oluşan 3 adet poli-peptid zincirinin birleşerek oluşturduğu üçlü sarmal formun (tip 1 kollajen için iki özdeş $\alpha 1$ -zincir ve bir $\alpha 2$ -zincirin bir araya gelmesi) meydana geldiği bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrar. Heterotrimer yapılu pro-kollajen golgide intra- ve inter-disülfid bağları ile güçlendirilir ve golgiden veziküller transport ile ekstraselüler matrikse sekrete edilir. Ekstraselüler matrikse pro-kollajen olarak taşınan yapı ve oksidatif deaminasyon sonrası çapraz bağların oluşumu ile matür kollajen haline gelir (14). Kollajen ailesinin en yüksek miktarda bulunan üyesi tip I kollajen, ekstraselüler matrisin de en çok görülen proteinlerinden biridir (Şekil 2). Bu molekül özellikle kemik, deri ve bağ dokularında eksprese edilir ve kemik dokusunun organik matrisini meydana getiren en önemli yapısal proteindir (kemikğin tüm kollajen içeriğinin yaklaşık %95'ini ve kemikte bulunan toplam proteinlerin yaklaşık %80'ini oluşturur) (14, 15). Kemikteki kalsifikasyon sürecinin sonunda kemikğin, yük taşıma, gerilme direnci ve bükülme sertliği ile ilgili önemli biyomekanik özelliklerinin oluşumunu sağlayan tip 1 kollajen aynı zamanda, normal kemik dokusu fonksiyonunun, sentez ve yıkım kapasitesinin gösterilmesinde faydalanılan önemli bir belirteçtir (14).

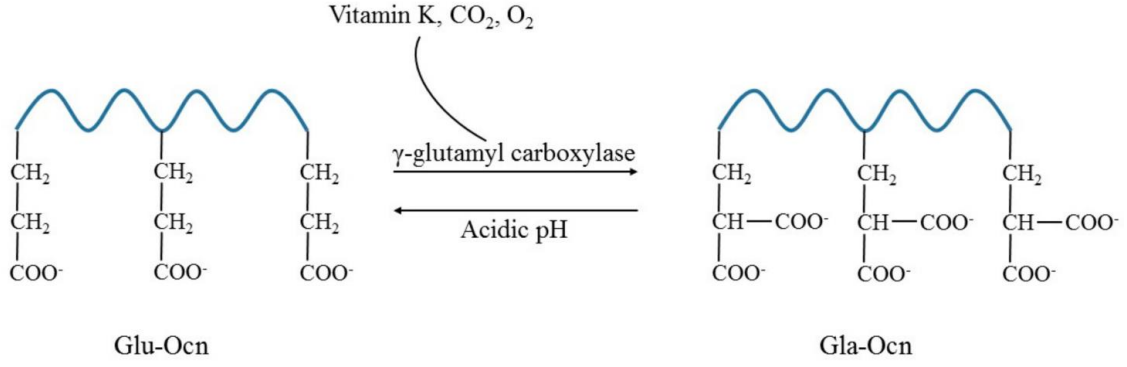
Nativ üçlü sarmallar, pepsin, tripsin veya kimotripsin gibi proteazlara karşı dirençlidirler ve sadece farklı tiplerdeki spesifik kollajenazlar ile yıkılabilirler. Bu üçlü sarmal yapının bozulması, molekül içi esnekliğe ve spesifik proteolitik yıkımların

oluşmasına neden olabilir. Kollajenaz A (matriks metalloproteinaz-1/MMP-1)'nin, çok çeşitli hücreler tarafından eksprese edildiği ve merkezi olarak doku remodelinginde (örn: yara iyileşmesi) yer aldığı düşünülmektedir. Hipertrofik kondrositler, osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından eksprese edilen Kollajenaz C (matriks metalloproteinaz-13/MMP-13)'nin ise kırıkta ve kemik remodelinginde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (14).



Şekil 2. Fibriler yapıdaki tip-1 kollajenin moleküler yapısı. N- ve C-prokollajenazlar için ayrılma bölgeleri ve çeşitli alt üniteler gösterilmiştir (14).

Osteokalsin/ Kemik γ -karboksiglutamik asit (Gla) protein: Olgun osteoblastlar tarafından üretilen, kemik organik matrisinin kollajen olmayan ana proteinlerinden biri olan osteokalsin, osteoblastik farklılaşmayı gösteren, kemik oluşumu ve mineralizasyonunun geç belirteci olarak kabul edilir (16, 17). Bu proteinin karboksile ve karboksile olmayan iki farklı formu bulunur. Hidroksiapatit kristallerine yüksek ilgi gösteren karboksile formu, mineralizasyon esnasında Gla kalıntıları ile kemik matrisine bağlanarak burada depolanır (Şekil 3). Osteoklast rezorpsiyonu ile serbest kalabilirler (12, 17). Karboksile olmayan osteokalsin formu ise mineral yapılara daha az ilgi gösterir. Kemik dokudan kan dolaşımı ile beyin, pankreas, yağ dokusu ve testis gibi dokulara taşınır; bu dokularda GABA sentezi, insülin sekresyonu, testosteron sentezi ve adiponektin gen ekspresyonu üzerine etkiler gösterir (12).



Şekil 3. Post-translasyonel modifikasyon sonrası osteokalsin. Üç glutamik asit kalıntısının γ -glutamyl karboksilaz ile K vitamini, CO₂ ve O₂ kofaktörleri yardımıyla post-translasyonel karboksilasyonu. Karboksilatlı osteokalsin formu (Gla-Ocn), asidik pH'da daha düşük karboksilasyon (Glu-Ocn) derecesine sahip bir forma dönüştürülebilir (17).

Osteopontin: Osteopontin, osteoblast, osteoklast, immün hücreleri, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve kemik dışı hücreler (deri, böbrek ve akciğer) gibi çeşitli dokular tarafından üretilen, kemikle ilişkili, glikozile edilmiş ekstrasellüler matriks fosfoproteinidir (18, 19). Farklı hücre tiplerinde gerçekleşen farklı post-translasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon, glikozilasyon, sülfatlama ve proteoliz) nedeniyle, osteopontin hücre tipinde spesifik yapı ve fonksiyonlar gösterebilir (19). Kemik remodellingi, bağışıklığın düzenlemesi, inflamasyon, yara iyileşmesi ve vaskülarizasyon gibi normal fizyolojik fonksiyonlarının yanı sıra, osteopontinin karsinogenezde (20) de birçok aktiviteye katıldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, integrin ve CD44'ler ile etkileşimlerinden dolayı birçok biyolojik fonksiyonun oluşumuna katkı sağlayan bu protein “küçük integrin bağlayıcı ligand N-bağlantılı glikoproteinler” (SIBLING'ler) ailesinin bir üyesi olarak da kabul edilmektedir. Osteopontin, hücre proliferasyonuna, yapışmasına, yayılmasına ve göçüne yol açan sinyal iletim yollarının aktivasyonunu indükler. Osteopontinin integrin ile bağlanması (osteopontin-integrin kompleksi) sonucunda NF- κ B aracılı apoptoz supresyonu, hücre çoğalması ve sağkalımı indüklenmesi ve bazı kanser tiplerinde metastatik fenotipin oluşumuna neden olan MMP indüksiyonu başlar (18, 19). Yapılan çalışmalar vitamin D, TNF α ve IL-1 β 'nin osteopontin gen transkripsiyonunu ve salınımını arttırdığını göstermiştir (18, 20).

TNF α sekresyonu ile plazma düzeyleri arasında korelasyon bulunan ve tümör gelişimi ve metastazı sırasında salınımı artan osteopontinin, birçok kanserin tanısı,

tedavisi ve izlenmesinde yararlı bir belirteç olarak kullanılabilceği düşünölmektedir (18, 20).

2.1.4. Kemik Metabolizması

Mineral depoları olarak varsayılan kemikler vücuttaki kalsiyumun %99'unu, fosfatın %85'ini içerir. Paratiroid hormon (PTH), kalsitonin, 1,25-dihidroksivitamin D₃ (kalsitriol), glukokortikoidler, tiroid ve seks hormonları kalsiyum homeostazını etkileyen sistemik faktörlerdir (11, 12). Kemik metabolizmasının belirteçleri arasında sentezlenen proteinlerin yanı sıra ALP ve ACP (asit fosfataz) aktiviteleri önem taşır. Bu enzimlerden ALP özellikle kemik döngüsünde osteoblastik aktivite belirteçidir.

Özellikle karaciğer, böbrek, plasenta ve kemiklerde yoğun bir şekilde bulunan ALP enzimi vücuttaki diğer dokularda da yaygın olarak görülür. İskelet-kas sisteminde osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşması sırasında ve yeni oluşun kemiğın mineralizasyonu esnasında osteoblastlardan bol miktarda üretilen ALP kemik doku üretiminin önemli belirteçlerinden biridir (12, 21).

2.2. İNFLAMASYON VE TÜMÖR İLİŞKİSİ

İnflamasyon, vücudun dokularında ve hücrelerinde patojenler, kimyasallar gibi zararlı uyaranlar veya fiziksel veya kanser gibi steril yaralanmalar nedeniyle oluşun hasara karşı gösterdiği fizyolojik yanıttır. Vücudun ana savunma stratejilerinden biri olan bu mekanizma yara iyileşmesi, enfeksiyonun giderilmesi veya kanserli yapıların ortadan kaldırılması gibi olaylarda kritik rol oynar (20). Ancak inflamasyon nedeninin ortadan kaldırılamaması çeşitli patojeniteleri ve inflamatuvar sürecin devam etmesine sebep olur. Bu durum kronik inflamasyon adı verilen aktif doku yıkımı ve doku tamirini içeren uzun süreli, düzensiz ve uyumsuz bir süreci beraberinde getirir (22).

İnflamatuvar yanıtın ilk aşamalarında salınan bazı pro-inflamatuvar sitokinler, rejenerasyonun aktive olmasını tetikleyen yolların indüklenmesine neden olur. Tümör mikro-çevresinde kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks bileşenlerinin üretilmesini sağlayan fibroblastlar, kanser hücresi çoğalmasını ve anjiyogenezini uyarır. Bununla birlikte, inflamasyonda ilk olarak görev alan immun yanıt hücrelerinden nötrofil ve makrofajlar tümör mikro-çevresinde de bol miktarlarda bulunur (20). Bunlardan, tümör

ile ilişkili makrofajlar (TAM), primer ve metastatik bölgelerde, hücre sağkalımını ve çoğalmasını, anjiyogenez, invazyon ve hareketliliğini stimüle ederken ve sitotoksik T lenfosit yanıtlarının baskılanması yoluyla kanser gelişimi ve ilerlemesinde kilit bir rol oynar. Tümöral yapının oluşumunun ilk aşamalarında TAM'lar, IL-1, IL-6 ve TNF α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınmasına inflamasyon benzeri reaksiyonların oluşumuna neden olurken, tümör gelişimi ile seyreden daha sonraki aşamalarda ise büyüme faktörleri ve koloni stimülan faktörlerin salınmasıyla anti-inflamatuar yanıtın ve anjiyogenezin başlamasını tetikleyerek tümör gelişimine katkıda bulunur (20, 23).

Hem otofajinin hem de VDR sinyallerinin, inflammatuar yanıtları kontrol etmede kritik rol oynadığı gösterilmiştir (22).

TNF / TNFR sitokin süper ailesinin bir üyesi olan TNF- α , stromal hücrelerin yanı sıra aktive edilmiş immün hücreler tarafından üretilen konak savunması, kronik inflamasyon, doku hasarı, hipotansiyon, koagülasyon, hücre sağkalımı ve kanser oluşumu ile ilişkilendirilmiş bir sitokindir (22, 24-26). TNF'nin ilk başlarda, insanlarda tümör hücrelerinde hemorajik nekrozu hızlı bir şekilde indüklemesinden dolayı anti-tümöral bir sitokin olarak kullanılabileceği düşünülürken daha sonra elde edilen veriler aslında bu sitokinin güçlü bir inflammatuar ajan olduğunu göstermiştir (27).

İki farklı TNF reseptörü vardır: Vücuttaki hücrelerin neredeyse tamamında bulunan TNFRI ve primer olarak hematopoetik hücrelerde eksprese edilen TNFRII. TNFRI'in aktivasyonu iki farklı şekilde sonuçlanabilir. Genel olarak oluşan yolak inflamasyon ve hücre sağkalımı ile ilişkili genlerin indüklenmesidir. Burada ligandın reseptöre bağlanması NF- κ B aktivasyonu ve buna bağlı Bcl-2 gibi bir takım anti-apoptotik regülatörlerin aktivasyonu ile sonuçlanan bir dizi inflammatuar sitokin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasına neden olur. Eğer hücre metabolik olarak risk altındaysa ve NF- κ B aktivasyonu yeterli olmazsa bu sefer hücre kaspaz-8 aracılığı ile apoptoza gider. TNF- α ile uyarılmış hücreler NF- κ B'nin yetersiz aktivasyonundan dolayı apoptoza gider bu nedenle apoptoz TNF- α 'ya verilen geç bir cevaptır (28).

Bazı kanser türlerinde ise tümör mikro-ortamı içinde pikogram düzeylerdeki TNF- α ekspresyonu, NF- κ B ve sitokin ağının aktivasyonu üzerinden kanser hücrelerinin çoğalmasına, invazyonuna ve metastazına neden olur (25). Aynı zamanda yerleşmiş tümörlerde, TNF- α pro-inflamatuar bir ortamın korunmasına katkıda bulunur. TNF- α , direk olarak DNA hasarına neden olabilir, tümör ve stromal hücre etkileşimlerine aracılık

edebilir, apoptozu inhibe edebilir, hücre çoğalmasını teşvik edebilir ve tümör oluşumunu tetikleyen moleküllerin ekspresyonunu indükleyebilir (26). Kanser hücrelerindeki TNF- α üretimi hormonal uyarılara cevabın azalmasını, adezyon moleküllerinin ekspresyonlarının arttırılmasıyla metastaz oranının artmasını (25) ve sonuç olarak kötü prognozu gösterir (28).

TNF- α aterosklerotik damar hücrelerinde JNK yolağı üzerinden beclin-1 ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttırır. Ek olarak, otofajiyi indüklemek için MAP1LC3 (ATG8) ekspresyonunu önemli ölçüde uyarır. Vitamin D₃ ise, makrofajlarda, periferik kan mononükleer hücrelerinde ve kondrositlerde TNF- α 'yı inhibe eder, sirkülasyondaki düzeylerini azaltır (22, 29).

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ailesi bağışıklık, inflamasyon ve tümör gelişimini desteklenmesi gibi çeşitli etkilere sahiptir (22, 28). TNF α ile uyarılmış NF- κ B yolağının tümör oluşumu üzerindeki etkileri iki yönlüdür. Malignite oluşturma potansiyeline sahip olan hücrelerin ölümünü önler, tümör kitlesindeki miyeloid ve lenfoid kökenli hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarır. Daha sonra proinflamatuvar sitokinler neoplastik hücredeki çoğalmayı ve hücre sağkalımını arttırmak için hasar görmüş epitel hücrelere sinyaller göndererek karsinojenik etkileri destekler. Ancak erken dönem kanserlerin bazılarında NF- κ B yolağının aktivasyonu tümör süpresif etkiler de oluşturabilir (28).

NF- κ B'nin otofaji üzerine etkileri ise tam netlik kazanmamıştır. Otofagozom oluşumu için kritik rol oynayan beclin-1 geninin promotöründe NF- κ B'ye ait bir bağlanma bölgesi bulunur ve otofajinin stimülasyonu için NF- κ B önem arz eder. Yine, aktif NF- κ B p65 kompleksi, beclin-1 ekspresyonunu arttırarak otofajiyi uyarır. Ancak bazı hücre serilerinde yapılan çalışmalarda NF- κ B'nin, tümör nekroz faktörü (TNF), reaktif oksijen türleri (ROS) ve açlığın neden olduğu hücresel stres durumlarında beclin-1 ve Atg 5 gibi otofaji indükleyici genlerin ekspresyonlarını azaltarak otofajinin negatif bir regülatörü rolünü üstlendiği gösterilmiştir. Yine vitamin D₃ sinyalizasyonun, NF- κ B aktivitesinin azalmasında rol alan VDR üzerinden otofajiyi azalttığı bildirilmiştir (22).

Kanser patogenezinde rol oynayan diğer bir grup molekül de toll-benzeri reseptörler (TLR)'dir. Artan kanıtlar, doğal bağışıklığın kilit reseptörlerinden olan TLR'lerin kanser gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığını göstermiştir. TLR'ler hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerinde, özellikle bakteriyel patojenler ve diğer

zararlı moleküllere karşı verilen inflamatuvar yanıtlarda rol oynayan membran-bağlı reseptörlerdir (28, 30). Nükleik asit-duyarlı TLR'ler (TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9) hücrenin endozomal kompartmanlarında lokalize olurken, diğer TLR'ler plazma membranında yer alır (31). Metillenmemiş çift sarmallı DNA (CpG), tek sarmallı RNA (ssRNA), lipoproteinler, lipopolisakkarit (LPS) ve flajellin gibi patojen-ilişkili moleküler model (PAMP'lar) veya ölmekte olan hücrelerden salınan hasarla ilişkili moleküler modelleri (DAMP'lar) algılayan intrasellüler veya membran-ilişkili patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) ailesine ait olan bu reseptörler temel olarak doğal immün hücreler üzerinde eksprese edilmesinin yanı sıra epitel veya endotel kökenli kanserler ve osteosarkom hücreleri tarafından da üretilir (31-33).

TLR'ler genellikle ortak bir sinyal yolunu paylaşır; TLR3 dışındaki tüm TLR'ler miyeloid farklılaşma primer yanıt geni 88 (MyD88)-bağımlı yolda görev alır. TLR sinyal yolağının uyarılması, NF- κ B ve mitojenle-aktiflenen protein kinaz (MAPK) aktivasyonuna ve sonrasında birçok sitokin, kemokin ve interferonun salgılanmasına neden olur. NF- κ B ve salgılanan bu pro-inflamatuvar sitokinler anti-apoptotik moleküllerin indüksiyonu sonucu tümör hücresi ölümünü önleyerek kanser gelişiminde önemli bir rol oynar (30, 33).

Malign hücreler, farklı aşamalarda birçok DAMP salgılayabilir ve bunun sonucunda aktiflenen farklı TLR'ler kanser gelişiminde tamamen farklı etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir (Anti-tümöral etki veya pro-tümöral etki). Örneğin, lipopolisakaritler tarafından etkinleştirilen TLR-4 sinyalinin, tümör hücrelerini immün saldırıdan koruduğu ve böylece tümör büyümesini arttırdığı gösterilmiştir. Yine, TLR-9'un kanser hücrelerinde tetiklenmesinin kanser hücrelerini, TNF bağlı apoptoz-indükleyen ligand kaynaklı apoptoza karşı koruduğu ve tümör hücresi proliferasyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (30).

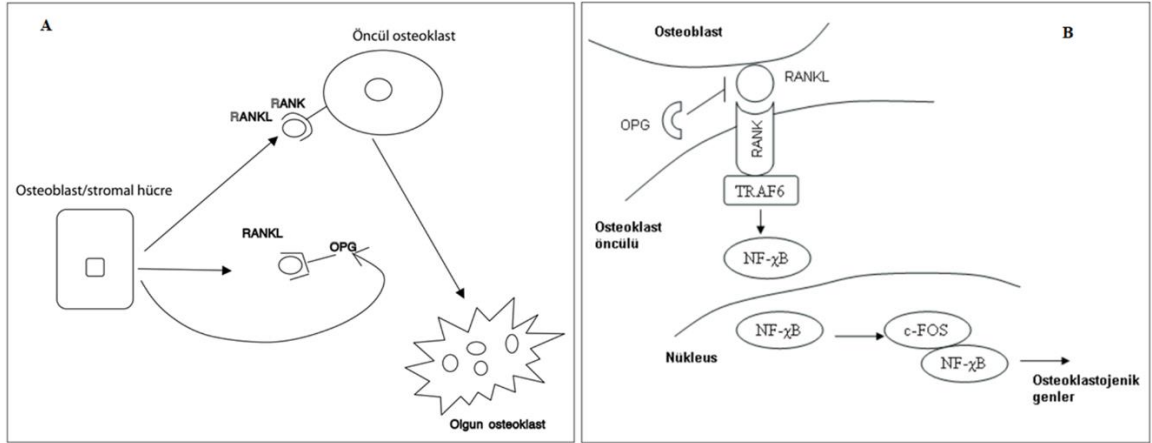
Osteoblast, osteosit ve stromal hücrelerden salınan, TNF ligand ailesinin bir üyesi olan reseptör aktivatör nükleer kappa B ligandı (RANKL), preosteoklastlar üzerinde bulunan reseptörüne (RANK) bağlandıktan sonra bu hücrelerin osteoklastlara farklılaşmasını uyarır ve osteoklastlarda transkripsiyon faktörlerinin ve gen ekspresyonlarının aktive edilmesini sağlar (12, 34). RANKL pre-osteoklast ve olgun osteoklastlar üzerinde bulunan RANK reseptörüne bağlandıktan sonra bazı ara mediatörlerin ve sonrasında NF- κ B aktive olması sonucu osteoklastik genlerin

ekspresyonuna sebep olan kaskadın başlamasına neden olur (Şekil 4). RANKL'ın kemik dokusundaki temel fonksiyonu kemik osteoklastların oluşmasını ve apoptozun inhibisyonunu sağlayarak kemik rezorpsiyonunun arttırılmasını sağlamaktır (34).

RANKL sentezi, vitamin D₃, büyüme faktörleri, peptidler ve TNF α gibi sitokinler ve glukokortikoidler tarafından düzenlenir. Vitamin D₃ ve TNF α , RANKL seviyelerinde artışa neden olarak osteoklastogenezi arttırır. Osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonunda kritik role sahip olan RANKL'ın etkileri osteoblast ve stromal hücrelerden salınan osteoprotegerin proteini ile inhibe edilir. RANKL için yalancı reseptör görevi gören osteoprotegerin, RANKL'ın asıl reseptörü olan RANK ile etkileşimini engelleyerek kemik rezorpsiyonunu önler (12, 34).

RANKL'ın tümör hücrelerinin proliferasyonu, metastaz ve metastaz sonrası vaskülarizasyonda destekleyici yönde etkilerinin olduğunu düşünülmektedir. Artmış RANKL düzeyleri neticesinde meydana gelen kemik yıkımının kanser hücrelerinin daha hızlı çoğalmasına ve hayatta kalmasına neden olan büyüme faktörlerinin sentezinin indüklendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Aynı zamanda RANKL'ın inhibe edilmesinin kemik metastazı, osteoporoz ve inflamatuvar eklem hastalıklarında kemiği koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (34).

Tümör, DNA onarım, tümör süpresör veya protoonkogen mekanizmalarında meydana gelen genetik veya çevresel etkenlere bağlı oluşan mutasyonlar sonucu hücrelerin immün yanıtta, büyüme baskılayıcı sinyallerden ve hücre ölümü yollarından kaçarak kontrolsüz şekilde çoğalıp, normal fonksiyonlarını kaybetmesidir (35). Oluşturduğu risk açısından değerlendirildiğinde kabaca benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olarak iki gruba ayrılabilir. Tümör hücrelerinin lokalize oldukları primer tümör bölgesinden dokulara invaze olmaları, intravazasyon ile kan veya lenfatik sisteme karışıp dolaşımdayken hayatta kalmaları, ekstrasvazasyon ile hedef dokulara yerleşip burada yeniden çoğalması metastaz olarak tanımlanır ve kanser hastalarındaki en büyük ölüm nedenlerinden biridir (6).



Şekil 4. OPG/RANK/RANKL yolağı. **A:** Öncül osteoklastların olgun osteoklastlara farklılaşmasında osteoprotegerin (OPG), RANK ve RANKL'in rolü **B:** OPG, RANKL ve RANK'ın osteoklastojenezdeki rolleri ve hücre içi sinyal iletimi. Fizyolojik koşullarda osteoblastlar tarafından üretilen RANKL'in öncül osteoklastlar yüzeyinde bulunan RANK'a bağlanması TRAF6'yı uyararak NF-κB aktivasyonuna sebep olur. NF-κB ile artan c-Fos sentezi NFATc1 ile etkileşerek osteoklastojenik genlerin transkripsiyonunu tetikler ve böylece uyarı çekirdeğe iletilmiş olur. OPG, RANKL'a bağlanarak onun RANK'a bağlanmasını engeller (34).

2.3. OSTEOSARKOM

Köken aldığı dokuya göre tümörler karsinoma, sarkoma, lösemi ve lenfoma olarak tiplendirilir. Sarkomalar kemik, kıkırdak, yağ, kas, kan damarları ya da bağ dokusunda meydana gelen malignitelerdir (36).

2.3.1. Osteosarkom Nedir?

Osteosarkom, olgunlaşmamış osteoid üreten mezenkim kökenli iğ hücreleri ile karakterize, yüksek dereceli primer kemik malignitesidir. Yetişkinlerde nadir görülen bir tümör olmasına rağmen (ABD'nde milyonda 3,1 vaka insidansına göre yeni kanser tanısı almış yetişkinlerin %1'inden daha azında) ergenlik dönemindeki çocuklarda lösemi ve lenfomadan sonra en sık karşılaşılan malignitedir (0-24 yaş arasındaki bireylerin ise %3-5'inde) (1, 2). Alman tümör veri bankasının verilerine göre bu oranlar 15 yaşından küçük çocuklar için yılda milyonda 2-3 kişi (yani yılda ortalama 40 hasta) olarak bildirilmiştir (37). Erkekler osteosarkom açısından daha riskli grupta olmalarına rağmen (fizyolojik kemik gelişiminin daha hızlı olması, uzun boy), hastalığın başlangıcı kadınlarda daha küçük yaşlarda görülür (puberteye erkeklere kıyasla daha erken girmeleri) (2). Hastalığın

oluşma riskinin pik yaptığı iki farklı yaş dönemi vardır. Birinci ve daha sık görüldüğü dönem ergenliğin başlamasına bağlı olarak kemik gelişiminin hızlandığı 10 ile 14 yaşlardır. İkinci ve daha nadir görüldüğü dönem ise 60 yaşlarından sonradır (1). Genç yaşlarda görülen osteosarkomlar çok büyük oranda yüksek malignite gösterip çok daha hızlı metastaz yaparlar. Bu nedenle etkin bir şekilde tedavi edilmezse mortalite kaçınılmazdır (3, 37).

2.3.2. Türkiye'deki Durum

Ülkemizde her yıl yaklaşık 150 yeni osteosarkom olgusu izlenmekte olup bu vakalar çoğunlukla 15 yaş altındadır. Pediatrik onkolojideki tüm gelişmelere rağmen, osteosarkomdaki sağkalım hızlarında son 10 yılda belirgin değişiklik görülmemektedir. Ülkemizdeki metastatik osteosarkom oranı ise %21'dir (3). Yine, ülkemizdeki osteosarkom hastalarının çoğunda (%91) hastalık, daha çok yük binen ekstremitelerde (femur distali, tibia, fibula ve humerus proksimali) tutulum göstermektedir (35).

2.3.3. Osteosarkom Risk Faktörleri

Osteosarkomun fenotipik risk faktörleri fizyolojik hızlı büyümeye bağlı uzun boy ve yüksek doğum ağırlığıdır (1). Yine erkek çocuklar kızlara kıyasla daha yüksek risk altındadır (2, 3). Osteosarkom vakalarının çoğu sporadik mutasyonların sonucudur ancak patogeneizde p53 gibi tümör süpresör genlerin kaybı önemli bir yere sahiptir. Li-Fraumeni sendromu, retinoblastom, Bloom sendromu (37), RecQ helikazların foksiyonunu kaybetmesi veya mTOR yolağındaki değişiklikler osteosarkom gelişimindeki genetik risk faktörleri arasında yer almaktadır. Sekonder osteosarkom gelişimindeki en önemli faktörler arasında iyonize radyasyon maruziyeti (radyoterapi) ve Paget hastalığı bulunur (1). Alkilleyici ajanlar, metal protez varlığı, osteoblastom, osteokondrom ve kronik osteomyelitin de osteosarkom geliştirme riski olduğu söylenilmektedir (35).

2.3.4. Osteosarkom Bulguları

Bulgular genel olarak etkilenen bölgede ağrı, hareket kısıtlılığı, lokalize sıcaklık gibi nonspesifik şikayetlerdir. Hastaların çok az bir kısmında patolojik kırıklar meydana gelebilir. Kilo kaybı, kırgınlık, ateş genellikle hastalığın ileri derecelerinde görülür (1).

2.3.5. Osteosarkom Tanısı

Şüphelenilen bölgeden alınan biyopsi sonucunun histolojik olarak incelenmesi gerekir (2). Konvansiyonel osteosarkomun histolojik incelemesi, pleomorfik çekirdekli, dağınık mitotik figürler ve farklı düzeylerde anaplazilere sahip malign iğ veya çokyüzlü mezenkimal hücrelerin varlığını gösterir. Olgunlaşmamış ve düzensiz osteoid üretimi karakteristik bir özelliktir ve hastalığın tanısı için gereklidir (1, 3). Semptomatik hastalarda düz radyografinin incelenmesinin ardından osteosarkomdan şüpheleniliyor ise kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve metastazın değerlendirilmesi açısından bilgisayarlı tomografi (BT) gibi ek görüntüleme çalışmaları yapılmalıdır. Osteosarkom tanısı için spesifik bir biyokimyasal parametre bulunmasa da bu hastalarda genelde artmış laktat dehidrogenaz (LDH) ve alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri kötü prognoz açısından önem arz etmektedir (2). Buna ek olarak hemogram ve periferik yayma sonuçlarının analiz edilmesi de maligniteden şüphe edilen durumlarda değerlidir (3).

2.3.6. Osteosarkom Tipleri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) osteosarkom tiplerini mikroskopik görüntülerine göre; konvansiyonel (klasik) osteosarkom, telenjektazik osteosarkom, küçük hücreli osteosarkom, az malignite gösteren santral osteosarkom, sekonder osteosarkom, parosteal osteosarkom, periosteal osteosarkom ve yüksek maligne üst yüzey osteosarkomu olmak üzere 8 sınıfa ayırmıştır (37). Bunlar arasında en sık görülen (tüm vakaların %80-90'ı) ve yüksek maligniteye sahip olan konvansiyonel tip; osteoblastik (%50-78), kondroblastik (%4-25) ve fibroblastik (%4) osteosarkom alt tiplerine ayrılır (1, 3).

2.3.7. Prognoz

Osteosarkomlu hastaların sağkalım oranları tümörün tipi ve boyutu, lokalizasyonu, tanı anındaki tümör derecesi, metastaz durumu, serum ALP düzeyleri, kemoterapiye verilen yanıt ve cerrahi girişimin etkinliği gibi faktörlere bağlıdır (1, 37). Yüksek dereceli osteosarkoma sahip tüm hasta grupları için 5 yıllık sağkalım günümüzde %60-66 civarındadır. Ancak metastatik hastalığı olan bireylerde 5 yıllık sağkalım %20-30'lara kadar düşebilir (1).

2.3.8. Tedavi

Cerrahi ve kemoterapi osteosarkom tedavisinde uygulanan protokollerdir. Metotreksat, sisplatin, doksorubisin ve vinkristin en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardır (35). Buna ek olarak günümüzde mTOR, VEGFR, PDGFR ve tirozin kinaz reseptörü (c-kit) inhibitörlerinin ve bisfosfonatların da hastalık üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (1).

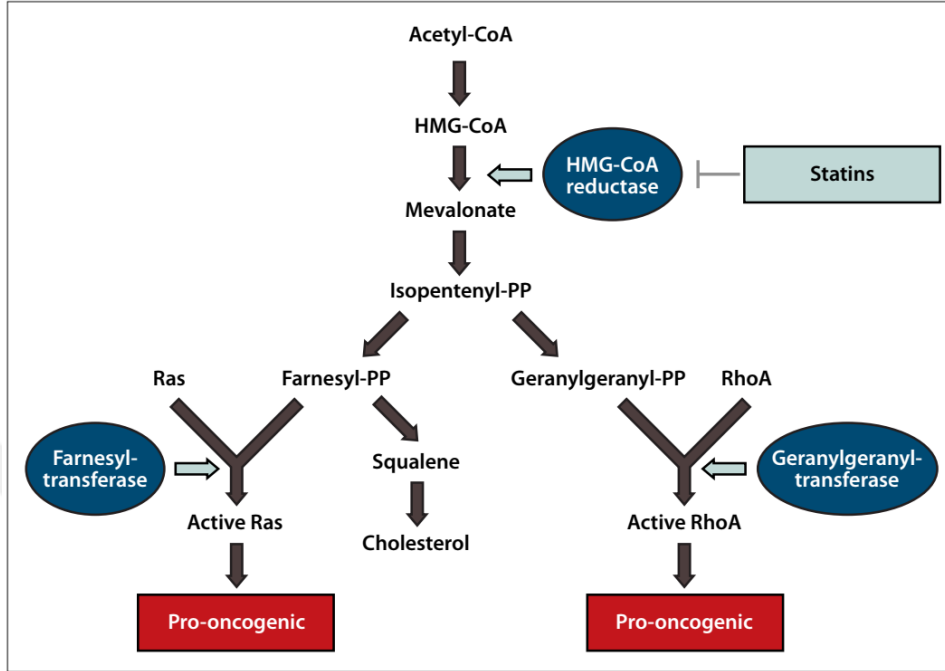
2.4. STATİNLER

Mevalonat yolu, asetoasetil-KoA'nın, HMG-KoA sentaz tarafından katalize edilen 3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA'ya (HMG-KoA) enzimatik dönüşümü ile başlar. HMG-KoA daha sonra, HMG-KoA redüktaz tarafından katalizlenen hız sınırlayıcı bir reaksiyonda mevalonat haline dönüştürülür, ardından kolesterolün sentezlenmesine yol açan bir dizi reaksiyon meydana gelir. Bu yolakta aynı zamanda, CAAX motifi içeren birkaç proteinin C-terminaline post-translasyonel olarak eklenen, farnesil pirofosfat (FPP) ve geranil geranil pirofosfatı (GGPP) içeren prenil karbon zincirlerinin üretimi yapılır. Bu prenilasyon reaksiyonu bazı küçük GTPaz aile üyelerinin (Ras, Rho) hücre membranının iç yüzeyine tutunarak enzimatik aktivite göstermeleri ve intraselüler transportları için zorunludur. Böylece hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre şeklinin korunması ve sitokin ekspresyonu gibi fonksiyonlar kontrol edilir (6, 38). Mevalonat yolağının baskılanması protein glikozilasyonu veya hücre solunumu için gerekli olan aktif dolikol, Heme A ve ubikinon gibi yapıların üretiminde azalmaya neden olur (38).

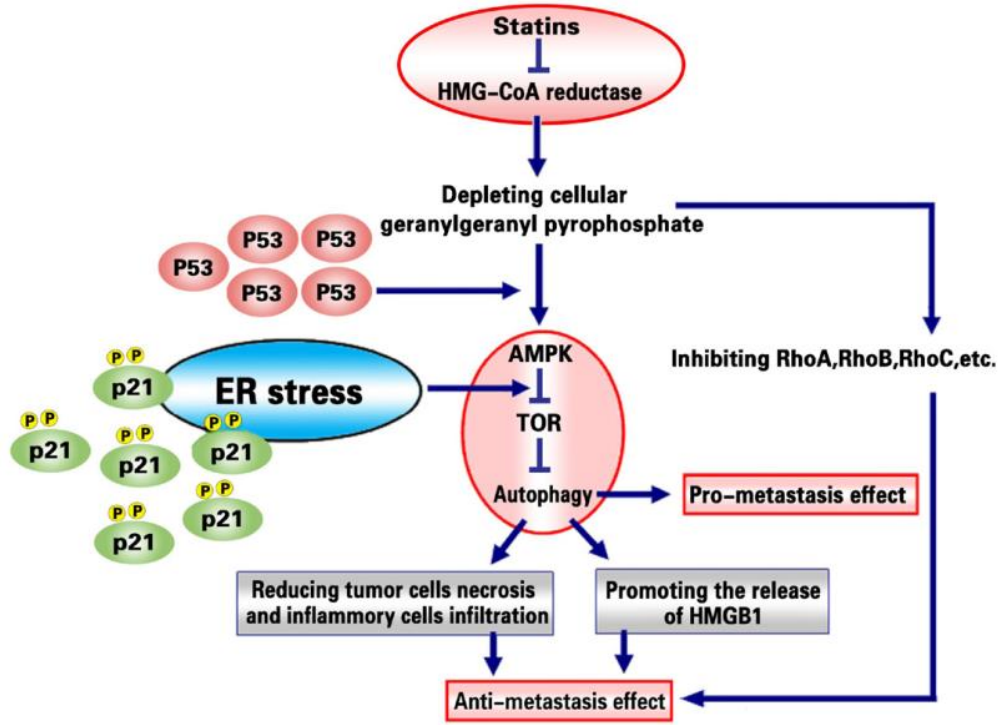
Statinler, kolesterol biyosentezinin ve izoprenoid metabolitlerinin oluşumunu sağlayan mevalonat yolağında HMG-KoA'nın L-mevalonik aside dönüşümünü katalizleyen HMG-KoA redüktazı inhibe eden HMG-KoA'nın yapısal analoglarıdır (6, 39) (Şekil 5).

Statin ailesi, çözünürlüklerine göre lipofilik statinler (serivastatin, simvastatin, lovastatin, mevastatin, fluvastatin ve atorvastatin) ve hidrofilik statinler (pravastatin ve rosuvastatin) olmak üzere ikiye sınıflandırılabilir (6). Mevastatin ve lovastatin ilk olarak mantarlardan elde edilen doğal bileşiklerken daha sonrasında atorvastatin, fluvastatin, ve simvastatin gibi sentetik statinler üretilmiştir (38). Bu ajanlar geleneksel olarak kolesterol düşürücü ve kardiyovasküler hastalıkları önleyici etkilerinden dolayı kullanılsa da son

yıllarda yapılan çalışmalar sonucu bu ilaçların anti-inflamatuar, immünmodülatör, nöroprotektif, antitümöral (7) ve kemik metabolizmasını iyileştirici etkilerinin olduğu da gösterilmiştir (6).



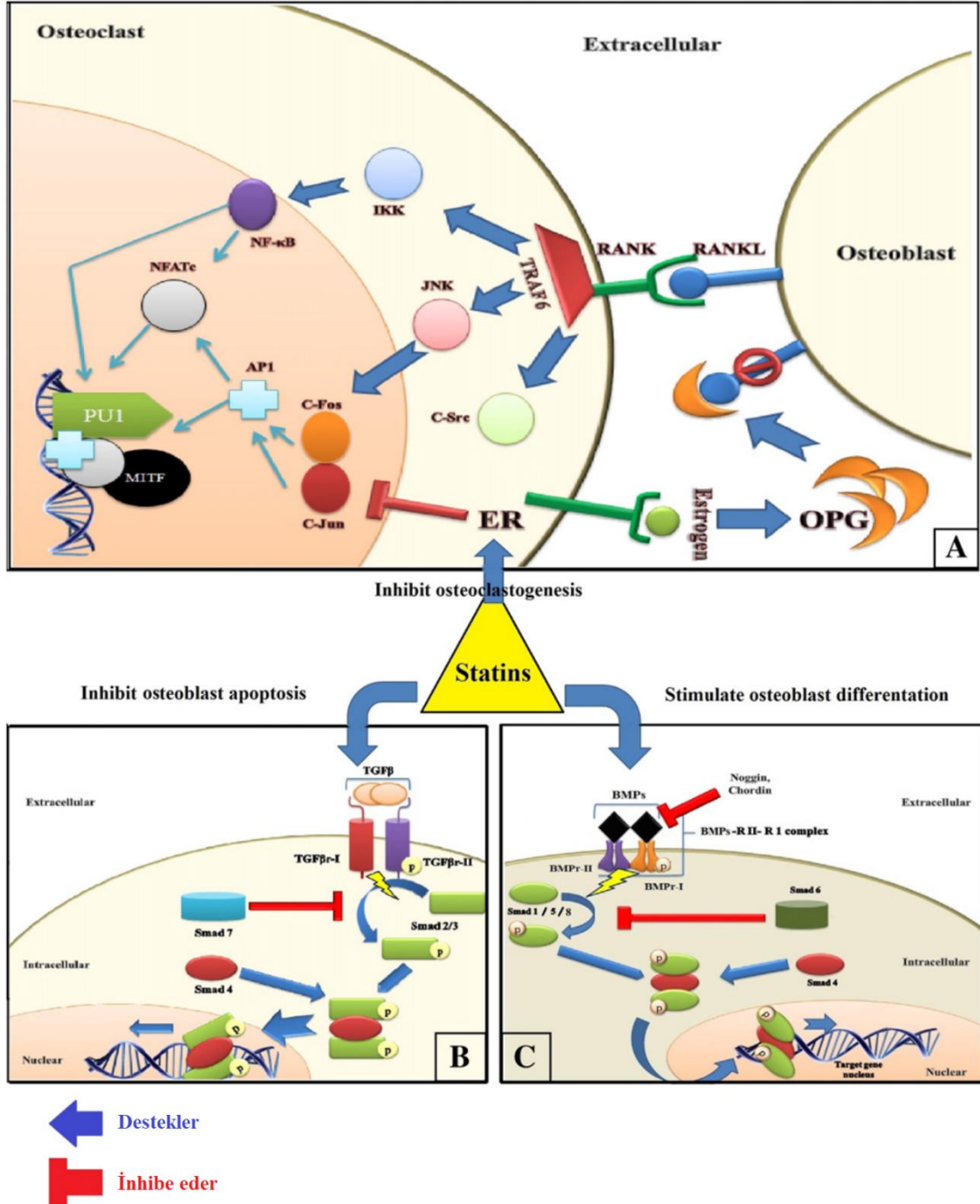
Şekil 5. Statinlerin mevalonat yolu üzerindeki etki mekanizması ve Ras ve Rho sinyal yolları üzerindeki etkisi. Mevalonat yolu. Statinler, HMG-KoA'nın mevalonat'a dönüşümünü inhibe eder ve sonrasında FPP ve GGPP'ın biyosentezine engel olur. Bu yolakta FPP, kolesterol de dahil olmak üzere çeşitli moleküllere dönüştürülebilir. Buna ek olarak, FPP ve GGPP, pro-onkogenik etki gösteren Ras ve Rho gibi bir takım küçük GTPaz süper-aile üyelerinin farnezilasyon ve geranilgeranilasyonunda yer alır (6, 40).



Şekil 6. Statinler, otofaji ve metastaz arasındaki ilişkiyi açıklayan diyagram. Statinler, HMG-KoA redüktaz inhibisyonu sonucu ve mevalonat ve alt yollardaki GGPP'in biyosentezini önler. GGPP'ların tükenmesi AMPK aktivasyonu sonucu TOR inhibisyonuna neden olarak otofajik yanıtların başlamasını tetikler. p21'in AMPK veya Akt tarafından fosforilasyonu, sitozolik lokalizasyonuna yol açar. Sitozolik p21, ER stresine ve otofajiye neden olur. Otofajinin düzenlenmesinde rol oynayan diğer bir faktör ise p53'dür. Otofaji, tümör nekrozunu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu tümörlere sınırlandırarak ve güçlü antitümör immün yanıtlarını tetikleyebilen HMGB1 salınımını kolaylaştırarak anti-metastatik aktiviteye neden olur. Ancak, bazı durumlarda otofaji pro-metastatik etkiye de neden olabilir. Özetle, otofaji, Rho GTPazların inhibisyonuna ek olarak, statin kaynaklı anti-metastatik etkilerden sorumlu olan mekanizmadır. (6)

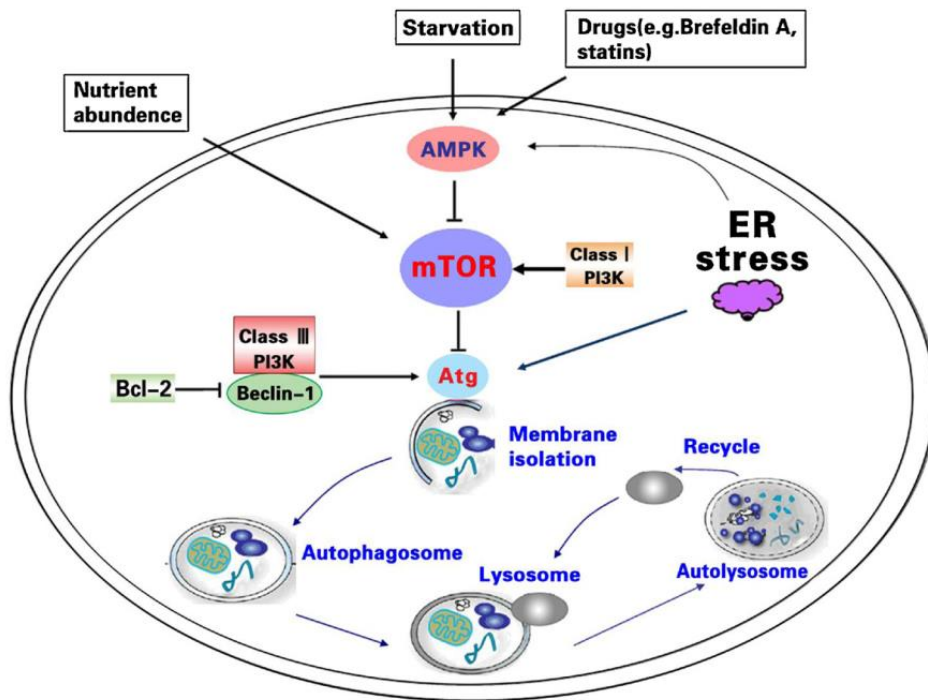
Statinlerin antitümöral rolünün moleküler mekanizmaları iki bölüme ayrılır: HMG-KoA redüktaz bağımsız işlemler ve HMG-KoA bağımlı işlemler. HMG-KoA redüktaz bağımsız süreç, integrin lenfosit fonksiyon-ilişkili antijen 1 (LFA1)'in intraselüler adezyon molekülü 1 (ICAM1) ile olan etkileşiminin interfere edilmesini kapsar. Bu etkileşimin bozulması tümör hücre adezyonunu, invazyonunu ve inflamasyonunu zayıflattığından dolayı anti-metastatik etki gösterir. HMG-KoA redüktaz bağımlı süreçler ise Ras, Rac ve Rho gibi küçük GTPase ailesi üyelerinin aktivasyonuna neden olur. Bu yapıların karsinogeneze yol açarak kötü prognozdan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bir diğer HMG-KoA redüktaz bağımlı süreç de statin ilişkili otofajinin

indüklenmesidir. Son çalışmalar statinlerin tümör hücrelerinde, kök hücrelerde, vasküler endotel hücrelerinde ve osteoblastlarda otofajiyi indüklediğini göstermiştir (6).



Şekil 7. Statinlerin kemik oluşumu-sinyal yollarındaki anabolik etkileri. A: Statinler, OPG / RANKL / RANK sinyal yolağını düzenlemek için östrojen resptör ekspresyonunu artırır, böylece osteoklast farklılaşmasını inhibe eder. B: Statinler, osteoblast apoptozunu TGFβ / Smad3 sinyal yolağı aracılığı ile inhibe eder. C: Statinler, BMP-2 (kemik morfogenetik protein-2) gen ekspresyonunu uyarır. BMP-2, bir dizi kemik spesifik gen transkripsiyonunu artırır ve osteoblastların farklılaşmasını destekler (41).

Atorvastatinin geranilgeranilasyonunun inhibisyonu veya LC3B transkripsiyonunun aktivasyonu, diğer statinlerin, hücrel GPPlerin tüketilmesine bağlı olarak AMPK'nın TOR'u inhibe etmesi sonucu veya ER stresi tetikleyen sinyal yollarının (katlanmamış protein cevabı-UPR) aktive edilmesiyle (39) otofajiyi başlattığı bildirilmiştir (Şekil 6-8). Bunlara ek olarak statinler, tümör hücrelerinin metastaz sonrası endotel dokulara tutunması için gerekli olan E-selektin adezyon molekülünün TNF- α ile indüklenen aşırı ekspresyonunu durdurur (6).



Şekil 8. Statinlerin ve ER stresin otofaji üstündeki ortak yolağı. Açlık veya ilaçlar (örn: brefeldin A, statinler) AMPK'yi aktive eder ve otofajinin indüklenmesine yol açan mTOR aktivitesini baskılar. TOR aktivitesinin inhibisyonu, ATG'lerin aktivasyonunu tetikler ve membran izolasyonu, otofagozom oluşumu ve otolizozom formasyonunu içeren otofajik süreci başlatır. PI3K ailesinin I ve III. sınıfları otofajinin düzenlenmesinde rol oynar ve antagonistik roller sergiler. Buna ek olarak, ER stres AMPK aktivasyonu veya doğrudan ATG aktivasyonu ile otofajiye yol açar (6).

Kanser hücrelerindeki metabolik yollar incelendiğinde mevalonat yolağının onkojenik özellik gösterdiği son zamanlarda rapor edilmiştir. Mevalonat yolağının aktif inhibitörlerinden olan statinlerin de bu nedenle anti-kanser etkiler gösterip bu amaçla kullanılabileceği düşünülmektedir (38). Yine statinlerin UPR'yi artırarak ER strese

neden olduğu ve böylece otofajiyi indükleyerek hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (39).

2.5. VİTAMİN D

D vitaminin, ergokalsiferol (D₂) ve kolekalsiferol (D₃) olmak üzere iki biyolojik formu vardır. Sağlıklı insanlarda, D vitamininin büyük bir kısmı, cildin alt epidermal bölgesinde yer alan 7-dehidrokolesterolün fotokimyasal reaksiyonlara uğraması ile üretilir. Ultraviyole B (UVB) ışınları cilde nüfuz ederek 7-dehidrokolesterol'de yapısal dönüşüme neden olurlar ve D₃ vitamini oluşur.

D₃ vitamini, ciltte fotokimyasal reaksiyonlar sonucu üretildikten sonra dolaşıma verilir. Dolaşıma geçen vitamin D₃ ile yiyeceklerden emilen D vitamini (D₃/kolekalsiferol veya D₂/ergokalsiferol) karaciğere ulaşması ile sitokrom 25-hidroksilaz (CYP27A1) enzimi ile etkileşir. Bunun sonucunda 25(OH)D₂'yi ve 25(OH)D₃'ü içeren 25-hidroksivitamin D veya 25(OH)D oluşur. Meydana gelen bu 25(OH)D molekülleri başka bir hidroksilasyonun gerçekleştiği ve bu süreçte sitokrom 1-alfa-hidroksilaz enziminin görev aldığı böbreklere taşınır. Sonuç olarak, kalsitriol (1-alfa,25-dihidroksivitamin D₃ veya 1,25(OH)₂D) olarak adlandırılan vitamin D'nin aktif formu üretilmiş olur (8). 25-hidroksi vitamin D₃'ü, 1,25 (OH)₂D₃'e katalize eden 25-hidroksivitamin D-1 alfa-hidroksilaz enzimi, aktif D vitamini formunun üretilmesi için kritik değere sahiptir. Hedef hücreler tarafından alındıktan sonra, D₃ vitamini konjuge reseptörü olan VDR'ye bağlanır.

Aktif D vitamini temel olarak böbrek, ince barsak ve kemik üzerine etki ederek, parathormon (PTH) ile birlikte kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde görev alır (9). PTH düzeylerine bağlı olarak kalsiyum ve fosfor seviyelerini regüle eder, kemik homeostazında temel bir role sahiptir. Vitamin D bu fonksiyonlarını vitamin D reseptörleri (VDR) aracılığı ile yerine getirir. VDR, nükleer reseptör üst ailesinin bir üyesidir. Memelilerde, karaciğer, bağırsak, böbrek, cilt ve tiroid bezi gibi metabolik dokularda, tüm dokularda orta derecede ve hatta malign dokularda da ekspres edilir. VDR'ler çoğunlukla hücre çekirdeğinde bulunan klasik steroid duyarlı nükleer reseptör ile yakından ilişkili olmalarına rağmen hücre çekirdeği dışında da yer alabilirler. VDR, Vitamin D₃ (kalsitriol)'e yüksek afiniteyle bağlanmasına ek olarak 25-hidroksivitamin D₃

(kalsidiol) ile de etkileşebilir. VDR ile vitamin D₃ arasında meydana gelen bu bağlanma sitoplazmada, çekirdekte ve hücre membranının dış yüzeyinin hidrofobik bölgesinde gerçekleşebilir; genomik ve genomik olmayan cevaplar oluşabilir (8).

VDR'ler, doğrudan DNA uzantılarına bağlanıp spesifik gen bölgelerini açıp kapatabilen nükleer transkripsiyon faktörleridir. VDR'lerin insan genomundaki yaklaşık 20,488 genin 500 kadarını düzenlediği düşünülmektedir. VDR'ler vitamin D₃'ün efektörleri olarak fonksiyon göstermelerinin yanı sıra vitamin D endokrin sistemi (VDES) için kritik öneme sahip olan vitamin D₃ biyo-aktivasyonu ve yıkımı arasındaki dengenin korunmasından da sorumludur (8).

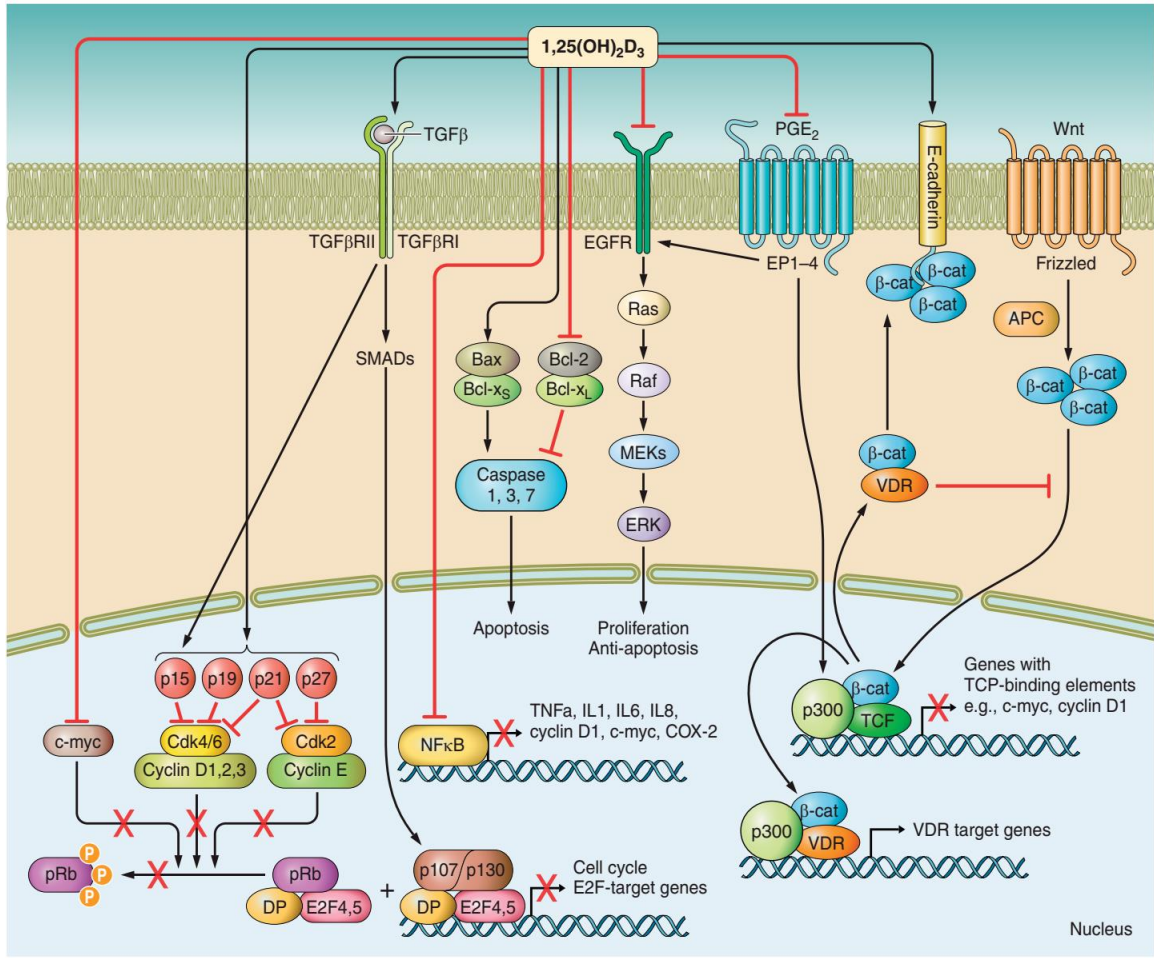
VDR'ler inaktif haldeyken hücre sitoplazmasında ve kaveol olarak adlandırılan hücre membranının dış kısmındaki katlanma bölgelerinde lokalizedir. Bir vitamin D₃ molekülü VDR ile karşılaştığında, vitamin D-VDR ligand kompleksi oluşur ve bu durum VDR proteinlerinin üç boyutlu yapısının değişikliğe uğramasını tetikleyerek transport proteinleri ve diğer proteinlerle olan etkileşiminin değişmesine neden olur. VDR'nin aktif formu, D vitamini hedef genlerin promotör bölgelerinde bulunan VDRE'lere (vitamin D'den sorumlu eleman) bağlanarak transkripsiyonlarını kontrol eder. Oluşan kompleks, kaveolar yerinde, sitoplazmada veya hücre çekirdeğinde translokasyondan sonra fonksiyonel değişikliklere uyarıp, gen transkripsiyon sisteminin proteinleri ile bir araya gelerek bu proteinlerle ilişkili spesifik genleri aktive eder veya devre dışı bırakır. Vit-D₃/VDR sinyali, mineral ve kemik homeostazında, büyüme modülasyonunda, kardiyovasküler süreçlerde, kanserin önlenmesinde ve otofaji de dahil immün yanıtların düzenlenmesinde rol oynar. VDR'lerin sayısı yaşla ve böbrek fonksiyonlarının bozulmasıyla azalma gösterir. Vitamin D₃'ün yararlanılabilirliğine bağlı olarak biyolojik D hormonu etkisi oluşturabilecek VDR taşıyan en az 35 farklı hücre tipi vardır (Osteoblastlar, kondrositler, karaciğer, böbrek, kemik iliği, kanser hücreleri vs.) (8).

Vitamin D₃ eksikliği ve VDR disfonksiyonu, zayıf kemik gelişimine neden olur (22). D vitamini eksikliğinde, D vitamini tarafından sağlanan hidroksimetil glutaril KoA (HMG-KoA) redüktaz üzerindeki inhibisyonun ortadan kalkmasıyla trigliserit seviyelerinin artması sonucu; kardiyovasküler risk, bazı organlardaki anti-tümoral ve anti-proliferatif hücre farklılaşma etkilerinin azalmasına bağlı, kolorektal, meme, prostat, pankreas gibi pek çok kanser türüne yakalanma riskinin arttığı bildirilmiştir (9).

Kalsitriol tarafından düzenlenen konak savunmasında ve inflamatuvar yanıtlarda kritik öneme sahip (8) sinyal yollarında yer alan mTOR (rapamisininin memeli hedefi), Sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksi (PI3KC3), katelisin, kalsiyum metabolizması ve siklin-bağımlı kinaz yolları vitamin D₃ ile regüle edilir. Yine, otofajide önemli role sahip olan beclin-1, Bcl-2, vitamin D₃ ve vitamin D₃ analogları gibi birçok faktör tarafından düzenlenir (Şekil 9). VDR hedef geninin inhibisyonu, vitamin D₃ ile güçlendirilmiş beclin-1 ekspresyonunu ve vitamin D₃ ile indüklenen otofajiyi önemli ölçüde zayıflatır. Ayrıca, vitamin D₃'ün sitotoksik dozları ve ER stres arasında, vitamin D'nin ER'den kalsiyum salınmasını tetikleyerek sitoplazmik kalsiyum seviyelerini arttırdığı ve böylece apoptozdan sorumlu faktörlerin indüklenmesine bağlı hücre ölümüne neden oluğuna dair bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (42, 43).

Buna ek olarak, vitamin D₃ Bcl-2 ile beclin-1 ekspresyonunu da artırabilir. Bu nedenle, vitamin D₃ ve otofaji doğal bağışıklık, inflamatuvar barsak hastalıkları, enfeksiyon ve kanser ile ilişkilidir (22).

Vitamin D₃'ün otofajik yollar üzerine olan etkisi çift yönlüdür. Vitamin D₃ kalsiyum metabolizmasının majör düzenleyicilerinden biridir ve dolaşımda yükselmiş vitamin D₃ düzeyleri VDR miktarının da artmasına neden olarak bağırsaklardan kalsiyum absorpsiyonunu artırır. Buna ek olarak, nöron gibi uyarılabilen hücrelerde vitamin D₃ stimülasyonuna bağlı olarak sarkoplazmik ya endoplazmik retikulum (ER)'dan kalsiyumun salınması otofaji ve birçok hücresel yanıtın oluşmasına neden olur (22). Vitamin D₃ veya analoglarının (100nM, 3 günlük tedavi sonrasında) MCF-7 meme kanserinde LC3B pozitif otofagozom oluşumunu kalsiyuma bağımlı yollar üzerinden anlamlı derecede yükseltip otofaji-bağımlı hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir (44). Benzer şekilde, vitamin D analogu olan EB1089 anti-kanser ilacının, lizozomal asit miktarını ve lizozomal proteazların aktivitesini, hücre morfolojisinde belirgin değişiklik henüz oluşmadan arttırdığı, böylece otolizozom olgunlaşmasını ve degradasyonunu artırabildiği bildirilmiştir. Yine, vitamin D₃ sinyalizasyonu serbest sitozolik kalsiyum seviyesini artırarak otofajinin majör inhibitörlerinden olan mTOR aktivitesini azaltır ve otofajiye neden olur. Bazı yollar aracılığı ile beclin-1 düzeylerini artırır. Otofagozom oluşumunda çekirdeklenme, uzama ve otofagozomun lizozom ile birleşerek otolizozom oluşumunu destekler, lizozomal proteazların aktive olmasını sağlayarak otofajiye katkıda bulunur (22).



Şekil 9. Hücre proliferasyonu, apoptoz ve kanserdeki inflamasyonun düzenlenmesinde rol alan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kaynaklı sinyal yolu. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişini, ya doğrudan farklı siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin düzenlenmesiyle ya da indirekt olarak diğer büyüme faktörlerinin indüklenmesi (örn., TGF-, EGF) yoluyla engeller. Ek olarak, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, içsel apoptotik yolağın aktivasyonu veya TNF- α , EGF, -katenin ve prostaglandinler gibi diğer sinyal yollarıyla etkileşime girerek apoptozu indüksiyonuna neden olur. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ayrıca, IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin üretiminin baskılanmasına yol açan NF κ B aracılı gen transkripsiyonunun inhibisyonu sonucu oluşan immünsüpresif bir etkiye sahiptir (45).

Öte yandan, kalsitriol, çeşitli hücrel stresörlerin varlığında NF- κ B, TNF- α veya IFN- γ düzeylerini düşürerek, hücreleri otofajiye bağlı ölümden koruyan p19INK4D mediyatörlerin seviyelerini yükseltmekle otofajiyi azaltır. Elde edilen kanıtlar hem D vitamini sinyalinin hem de otofajinin kronik inflamasyon ve enfeksiyon patogeneğinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir (22).

2.6. HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARI

Hücre ölümü farklı şekillerde oluşabilir. Dış faktörlerin oluşturduğu kuvvetli hasara karşı hücre bütünlüğünü kaybederek ani ölüme gidebilir veya organizmadaki homeostazisi korumak ve potansiyel tehlike arz eden faktörleri elimine etmek amacıyla çeşitli sinyal yollarının aktive/deaktive edilmesiyle aktif veya programlı hücre ölümüne gerçekleşir. Tanımlanmış üç hücre ölüm mekanizması vardır.

1. Tip I hücre ölümü, apoptoz
2. Tip II hücre ölümü, otofaji
3. Tip III hücre ölümü, nekroz (Mak19)
4. ER Stres

2.6.1. Apoptoz

Apoptoz, kaspaz proteaz aktivasyonunun eşlik ettiği, hücrenin küçülmesi, hücre membran iskeletini oluşturan aktinin disorganizasyonuna bağlı bleb oluşumu ve kromatin yapısının yoğunlaşması (piknoz) ile karakterize tip I hücre ölümü olarak adlandırılan hücre ölüm yollarından biridir. Apoptotik hücre ölümünü tetikleyen iki temel yolak vardır. Bunlar mitokondrial (içsel) ve ölüm reseptörü (dışsal) yollarıdır. Klasik bir ligand-hücre-yüzey-reseptör etkileşimini içeren ölüm reseptörü yolağında TNF reseptör (TNFR) ailesi, Trail reseptörleri (TRAIL-R) veya Fas (CD95) gibi ölüm reseptörleri (DR) görev alır. DR'ler ile uyarın hücre ölümü, immün sistem fonksiyonu ve homeostazisi için kritiktir. Mitokondrial apoptotik yolak ise, DNA hasarı (genotoksik ajanlar veya DNA onarım mekanizmasındaki defektler nedeniyle oluşur) veya ER stres (katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucu oluşur) durumlarında hücrenin hasarı tamir edemeyeceğini anladığı zaman otonom olarak hücre ölümünü tetiklediği sistemdir. Bu durumda mitokondrial dış membran bütünlüğü kaybolur ve sitokrom c gibi proapoptotik faktörler mitokondriden sitozole salınır ve kaspaz-aktivasyon kompleksinin birleşmesine (apoptozom) neden olur. İçsel ve dışsal yolların her ikisi de kaspaz proteazlarının aktivasyonuna bağlı intraselüler protein yıkımı ve hücre parçalanması ile sonuçlanır (46).

İçsel yolak, mitokondrial dış zar geçirgenliğinin (MOMP) regülasyonundan sorumlu olan Bcl-2 protein ailesi tarafından yönetilir (46, 47). Pro- ve anti-apoptotik etkilere sahip 25 farklı proteini içeren Bcl-2 ailesi apoptozun ana kontrolörlerinden biri

olarak kabul edilmektedir ve bu üyelerin anormal ekspresyonları sonucu tümör oluşumu, büyümesi ve kemoterapötik ilaçlara ve radyoterapiye direncin meydana geldiği düşünülmektedir (47). Bunlara ek olarak bu proteinler mitokondrial füzyon, otofaji ve ER'den kalsiyum salınımının kontrolünde de yer almaktadır (46). Bcl-2 aile üyeleri mitokondri, düz endoplazmik retikulum ve hematopoetik hücrelerde yer alır. Transkripsiyonel ve post-translasyonel düzeylerde regüle edilen, anti-apoptotik etkilere sahip Bcl-2 üyeleri arasında Bcl-2, Bcl-x1 (Bcl-X büyük), Bcl-w (Bcl-2 benzeri protein), Bcl-b (Bcl-2 benzeri protein 10), Mcl-1 (miyeloid hücreli lösemi 1) ve Bfl-1 (Bcl-2 ile ilişkili protein A1) proteinleri bulunmaktadır. Bcl-2 ve diğer anti-apoptotik proteinler etkilerini, Bax/Bak ve BH3-only gibi pro-apoptotik süreci tetikleyen ve MOMP geçirgenliğini değiştirerek fonksiyon gösteren bu moleküllere bağlanarak bunların aracılık ettiği apoptozun inhibisyonuyla gösterirler (46, 47).

Apoptozisin uyarılmasında rol oynayan büyüme önleyici ve DNA hasarı ile indüklenebilir 45 (GADD-45) gen protein ailesi hem çekirdek hem de sitoplazmada yer alan, normal hücrelerde düzeyleri düşük yoğunlukta seyreden, GADD-45 α , β ve γ olmak üzere 3 adet proteini kodlar. GADD-45 proteinleri fonksiyonel olarak aynı olmasa da birbirine benzer faaliyetler gösterir ve birbirleriyle etkileşerek oluşturdukları homo veya heterodimerler bu fonksiyonların oluşumu için önemli bir yere sahiptir. Bu proteinler DNA onarımı, hücre döngüsü kontrolü (özellikle G2/M fazında), yaşlanma ve genotoksik stres dahil olmak üzere birçok hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde yer alır. DNA hasarından sonra, tüm GADD-45 protein ailesi üyeleri hızlı bir şekilde indüklenir ve bunun sonucunda hücre döngüsünün durması ve / veya apoptozis meydana gelir veya DNA tamir mekanizmaları aktiflenir. GADD-45 birçok hücre sinyal yolağını birbirine bağlar ve apoptozu indükleyici işlevleri nedeniyle normal hücrelerin malign özellik kazanmasını önleyerek tümör baskılanmasında aktif rol oynar, dolayısıyla bu yolda meydana gelebilecek kusurlar malignitelerin başlamasına ve ilerlemesine neden olabilir. GADD-45 ekspresyonunun indüksiyonu, çoklu kemoterapötik ilaçların antikanser aktivite göstermeleri için gereklidir ve bu genin yokluğu, ilaçların kanser hücrelerindeki etkilerini ortadan kaldırabilir. Tümör oluşumu, kanser hücrelerinin sağkalımı ve metastazı ile ilişkili olan NF- κ B, GADD-45 ekspresyonunu (α ve γ) çeşit kanserlerde onkogen özelliğe sahip olan c-myc ekspresyonunu arttırarak inhibe eder (48).

Bu iki yolağın dışında anoikis olarak adlandırılan apoptozun başka bir formu daha mevcuttur. Buradaki tetikleyici faktör epitel veya endotel hücrelerin ekstraselüler

matriksten (ECM) ayrılmasıysa gelişen sinyalin-yok olmasıdır (46). Metastaz yapan kanser hücreleri ECM'e bağlı olmadan hayatta kalıp anoikisten kaçmak için çoğunlukla büyüme faktörlerinin eksprese edildiği yolakları aşırı derecede aktive eder. İlaveten, hücreyi hayatta tutma mekanizması olan otofaji, ECM'den ayrılan kanser hücrelerinde meydana gelen besin ve enerji yetmezliği nedeniyle aktif hale gelip hücrenin anoikisten kaçarak metastaz yapmasına aracılık eder (6). Yine, anormal mitojenik sinyallere karşı koruyucu mekanizma gösteren onkogenler, özellikle p53, de apoptozu uyarır (46).

2.6.2. Otofaji

Otofaji, ökaryotik hücrelerin çoğunda bazal düzeylerde meydana gelen lizozom aracılı katabolik bir hücresel yanıttır. Bu yolda uzun ömürlü proteinler, organeller ve diğer sitoplazmik bileşenler lizozomlara taşınıp parçalandıktan sonra hücrenin tekrardan kullanabileceği yapıtaşlarına ayrıştırılır. Bu sürecin yönetilmesinden 30'dan fazla otofajili ilişkili gen (ATG) sorumludur. Hücresel içeriğin lizozoma gönderiliş yoluna bağlı olarak, otofaji üç şekilde sınıflandırılır: makrotofaji (sitozolik içeriğin otofagozomlar adı verilen çift zarlı veziküllere paketlenmesinden sonra lizozomlara taşınması), mikrotofaji (hücresel içeriğin direkt olarak lizozomal membranın invajinasyonu ile sindirilmesi) ve şaperon-aracılı otofaji (sitozolik bileşenlerin lizozomal membran boyunca KFERQ motifli şaperon proteinleri aracılığı ile doğrudan taşınması) (22, 49, 50) (Şekil 10).

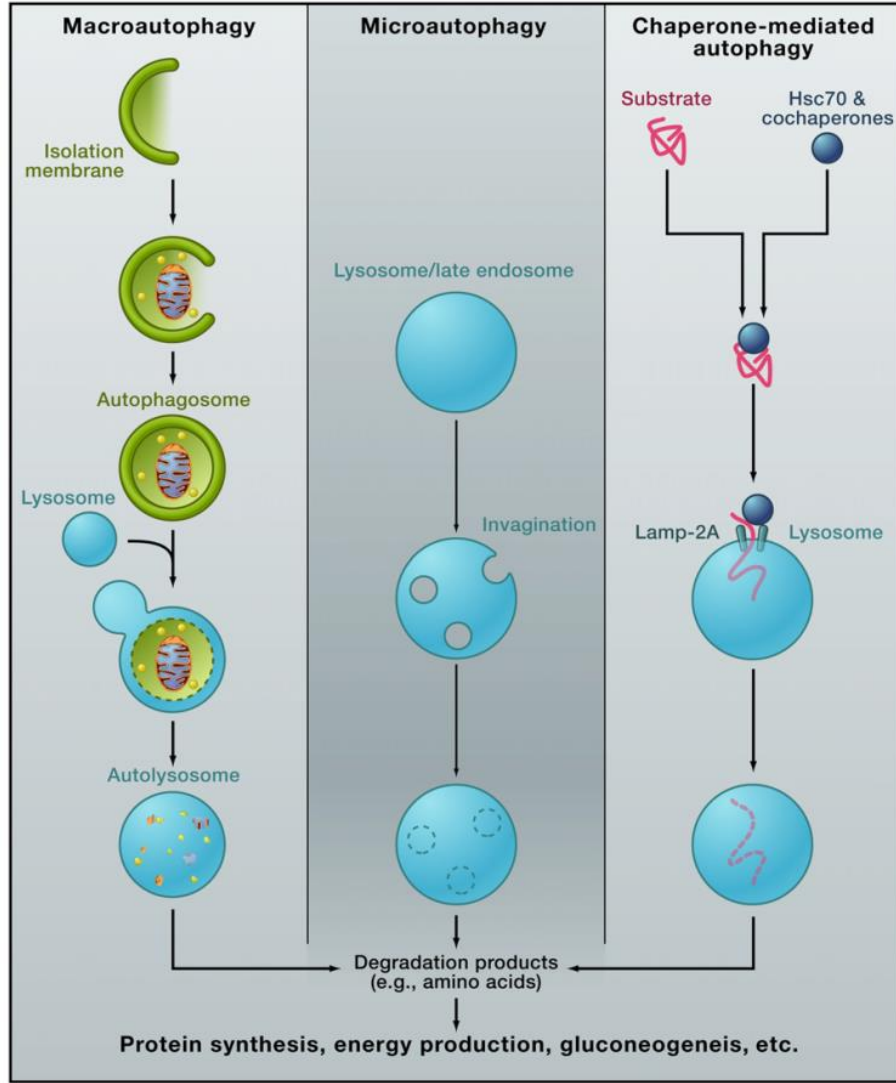
Otofaji, açlık, hipoksi, DNA hasarı (50), biyolojik ajanlar ve kimyasallar gibi hücresel stresi arttıran durumlar (22), veya büyüme faktörlerinin yokluğu (49) karşısında indüklenir. Ancak bu stresörlerin neden olduğu otofajik yanıtın hücre sağkalımını destekleyip desteklemediğine veya hücre ölümünü tetikleyip tetiklemediğine dair çeşitli tartışmalar da mevcuttur (50). Otofajinin hücre sağkalımını arttırmak amacıyla fonksiyon gösterdiği düşünülse de bazı koşullar altında "otofajik dejenerasyon" olarak adlandırılan apoptotik-olmayan tip II hücre ölümü ile de ilişkilendirilmiştir (22, 49). Aslında otofaji genel olarak hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan bir süreç olmasına rağmen, hücrenin maruz kaldığı stres karşısında hayatta kalma mekanizmalarının yetersiz kalması durumunda hücre ölümünü destekleyebilir. Bu tip hücre ölümü otofajinin eşlik ettiği kaspaz-bağımsız hücre ölümü olarak tanımlanır (46). Yapılan bazı çalışmalara göre çeşitli kanser olgularında vitamin D3 ve analoglarının otofajiyi indüklediğini gösterilmiştir.

Ayrıca, otofaji ile vitamin D/VDR sinyal yolağının örtüştüğünü gösteren çalışmalar vardır (22).

Otofaji tümör baskılanması, hücre farklılaşması ve ölümü, yaşlanmanın geciktirilmesi, morfogenez, bağışıklığın düzenlenmesi, hasarlanmış protein veya organellerin parçalanması gibi birçok süreçte görev alır (22, 44) ve bu süreçte meydana gelen aksaklıklar kansere ve kardiyovasküler, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklara neden olur (49, 50).

Memelilerdeki makrootofaji sistemi 5 basamaktan oluşur. 1. Uyarılma veya indüksiyon 2. Çekirdeklenme, 3. Uzama, 4. Matürasyon ve 5. Lizozomla birleşme degredasyon (22, 51). Otofajinin uyarılmasının membran veziküllerinin fagofor birleşme bölgesinde (PAS) kümelenmesi ile başladığı düşünülmektedir. Çift zarlı fagoforun PAS'nde çekirdeklenmesi ikinci basamaktır (52). Fagoforun sitoplazmik membran eklenmesi ile büyüyüp iki ucundan birleşmesi sonucu otofagozom oluşur. Uzama ve kapanma işlemlerinin tamamlanması ile olgun otofagozomlar meydana gelir (Şekil 11). Otofagozomun lizozom veya vakuolle kaynaşmasıyla otolizozomlar oluşur ve otofagozom içeriği lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanarak hücrenin yeniden kullanabileceği yapı taşlarına dönüştürülür (22, 52).

Hücrelerin ana otofaji mekanizmaları, ilk olarak mayalarda keşfedilen ve memelilerdeki ortologları iyi tanımlanmış olan bir dizi yüksek oranda korunmuş otofaji-ilişkili genler (ATG) tarafından kodlanır (51). Mayadaki Atg 6 genin memelideki ortologu olan Beclin-1, otofajinin regülasyonunda merkezi bir yere sahip (22) olmasının yanı sıra otofajik ve apoptotik sistemler arasında ilginç bir bağı temsil eder (44). Beclin 1, sınıf III fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) ve p150 miristile edilmiş kinaz ile kompleks oluşturup otofagozom oluşumunu destekleyen ve otofajik proteinlerin lokalizasyonunu belirleyen bir Bcl-2 etkileşimli protein iken, Bcl-2 ile kompleks oluşturduğunda (Beclin 1 / Bcl-2 kompleksi) otofaji ve otofajik hücre ölümünün engelleyicisi olarak fonksiyon gösterir (22, 44). Otofagozom oluşumu ve matürasyonunda önhazırlık kompleksi ve başlatma kompleksi görev alır. Önhazırlık kompleksi, başlatma kompleksinde yer alan beclin-2, sınıf III PI3K protein kinaz Vsp15'i aktive ederek fosfatidilinozitol 3-fosfat (PI3P) lipid üretimini uyarır (46). Beclin-1; Bcl-2, NF-κB, D₃ vitamini ve D₃ vitamini analogları gibi birçok faktör tarafından düzenlenir (22).

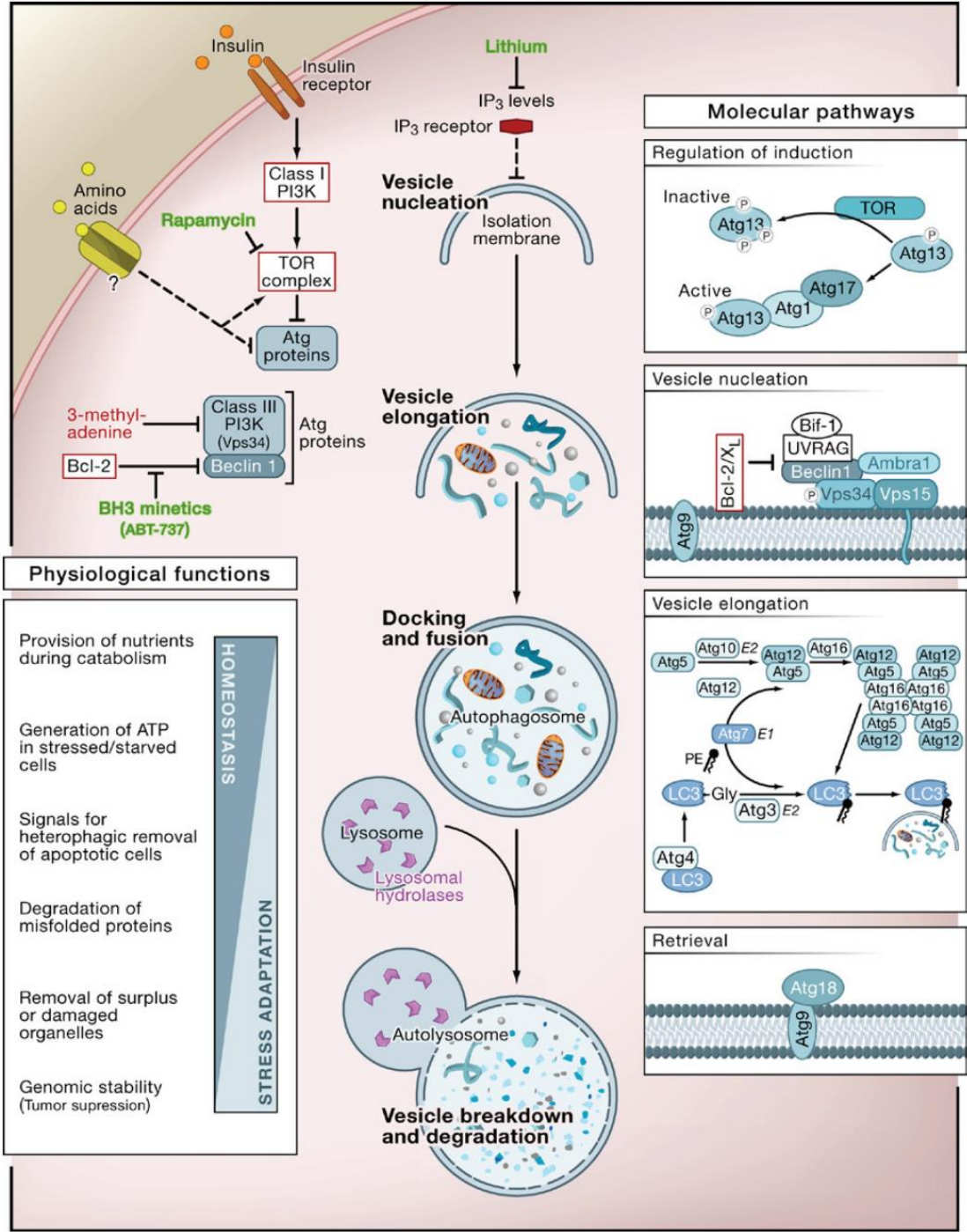


Şekil 10. Otofaji Türleri; **Makrootofaji:** Organelleri de içeren sitoplazmanın bir bölümü, otofagozom oluşturmak için fagofor olarak da adlandırılan çift katlı izolasyon membranı ile çevrelenir. Otofagozomun dış zarı lizozomla birleşerek otolizozomu meydana getirir ve içerde bulunan materyaller sindirilir. **Mikrootofaji:** Sitoplazmanın küçük parçaları, lizozomal veya geç endozomal membranın içeriye doğru invajinasyonu sonucu doğrudan yutulur. **Şaperon-aracılı otofaji:** KFERQ benzeri pentapeptid sekansı içeren substrat proteinleri ilk önce sitozolik Hsc70 ve koşaperonlar tarafından tanınır. Sonra lizozomal Lamp-2A ile bağlandıktan sonra lizozomal lümenine taşınırlar. Üç tip otofaji mekanizmasının sonunda ortaya çıkan bozunma ürünleri, yeni protein sentezi, enerji üretimi ve glukoneogenez gibi farklı amaçlar için kullanılır (53).

ATG4 otofaji sürecinde, mikrotübül ilişkili protein 1A / 1B hafif zincir 3 (pro-LC3, MAPLC3) ve lipide edilmiş LC3'ün işlenmesiyle otofagozom oluşumunu destekler. Otofagozom biyogenezi Atg12-Atg5 ve Atg8-fosfatidiletanolamin (PE)'i içeren iki ubikuitin benzeri konjugasyon sistemine ihtiyaç duyar. ATG4, pro-LC3'ün çözünebilir LC3-I formuna ayrılması ve otofaji sürecinin kolaylaştırılması amacıyla LC3-I salınımına neden olan lipide edilmiş LC3 formunun (LC3-PE, yani, LC3-II) otofagosom

membranlarından veya otofagosom yapılarından ayrılması için gerekli olan Atg8 / mikrotübül-ilişkili protein 1A / 1B-hafif zincir 3 (LC3) lipit konjugasyon sisteminin düzenlenmesinde kilit rol oynar. İnsan genomunda dört tane ATG-4 homologu vardır. Bunlar ATG-4A, ATG-4B, ATG-4C ve ATG4D'dir. ATG4B, LC3-I'in geri dönüşümü ve lizozomlar ile otofagozomlar arasındaki füzyonun gerçekleşmesinde önemli bir fonksiyona sahiptir. Buna ek olarak ATG-4B hem LC3'ün prekürsörleri ve PE konjuge formuna hem de GABA tip A reseptör-ilişkili protein (GABARAP) alt-aile üyelerine karşı proteolitik olarak aktifken, ATG-4A daha çok GABARAP alt-aile proteinleri için etkilidir, LC3 proteinleri üzerindeki etkileri sınırlıdır (54). Bu iki homologun aksine, ATG-4C ve ATG-4D ise kaspazlar tarafından N-terminallerinden ayrılmadığı sürece inaktiftir (51, 55).

ATG-8-benzeri konjugasyon sisteminin memelilerdeki karşılığı LC3 sistemidir (56). Olgunlaşmamış LC3 (pro-LC3), C-terminal bölgesinin ATG4 homologları ile ayrılması sonucunda sitoplazmada ikamet eden LC3B-I formuna dönüşür. Daha sonra burada ATG-3 ve ATG-7 aracılığı ile PE ile konjuge hale gelen yapı LC3B-II olarak tanımlanır. LC3-PE konjugatı membrana bağlama ve hemifüzyon yeteneğine sahiptir bu nedenle, izolasyon membranları ve otofagozomlar az miktarda da otolizozomlar üzerinde yer alarak otofagozom oluşumuna özellikle membran genişleme aşamasında fonksiyon gösterir (56, 57).



Şekil 11. Otofajinin Hücresel, Moleküler ve Fizyolojik Yönleri. Otofajinin farklı basamakları vardır: vezikül çekirdeklenmesi (izolasyon membranının / fagforun oluşumu), vezikül uzaması ve tamamlanması (büyüme ve kapanma), çift membranlı otofagozomun lizozomla füzyonu sonucu otolizozom oluşumu ve sonuç olarak otolizozom içeriğinin parçalanması ve otofagozomun iç membranının lizisi. Bu işlem bazal seviyede gerçekleşir ve çok sayıda farklı sinyal yolu ile düzenlenir. Burada gösterilenler sadece deneysel veya klinik amaçlar için farmakolojik olarak hedeflenmiş olan regülatör yollarıdır. Kırmızı ve yeşil ile gösterilen ifadeler sırasıyla otofaji inhibitörleri ve aktivatörleridir (58).

2.6.3. Nekroz

Hücresel nekroz, hücre şişmesi, plazma membran bütünlüğünün bozulması ve kromatin yoğunlaşması olmadan organel yapı kaybı ile karakterize, onarılamaz hücre hasarının bir sonucu olarak ortaya çıkan tip III hücre ölümüdür. Yüksek sıcaklık, donma-çözme ve mekanik strese maruziyet hücre bütünlüğünü bozacak büyük hasarlara neden olarak herhangi bir sinyal yolağını aktif etmeden (pasif yoldan) nekrotik hücre ölümüne neden olur. Ancak, nekrotik hücre ölümü her zaman tesadüfi veya pasif bir işlem değildir (46).

Nekroptoz olarak adlandırılan diğer nekrotik hücre ölümünün kaynağında bazı sinyal yolaklarının aktivasyonu mevcuttur. Programlı nekrozun en karakteristik formu RIP-kinaz-bağımlı nekrozdur. Burada oluşan sinyal yolaklarının hepsi, DR'ler (TNFR), Toll-like reseptörler (TLR) ve T-hücreli reseptörler (TCR) gibi hücre yüzey reseptörleri ile kompleksler oluşturarak, reseptör-etkileşimli protein kinaz 3 (RIP3) aktivasyonuna neden olur. Buna ek olarak, DNA hasarı da hücre yüzey reseptörlerinden bağımsız şekilde RIP- aktivasyonunu doğrudan uyarır. RIP3'e bağlı nekroz, viral enfeksiyonlar sonucu çift-sarmallı viral DNA'nın sitozolik DNA sensörlerinin ve interferonun DNA-bağımlı aktivatörleri (DAI)'ni regüle eden faktörlerin aktivasyonu ile de tetiklenir (46).

RIP-kinaz yolakları dışında aktif nekroz sinyallerinin diğer türleri arasında: İskemi/reperfüzyon hasarı, TNF ile uyarılmış NADPH oksidaz 1'a bağlı nekroz ve sinir hücrelerinde eksitotoksisite olarak adlandırılan glutamat reseptörlerinin neden olduğu nekroz yer alır (46).

2.6.4. Endoplazmik Retikulum Stres (ER Stres)

Endoplazmik retikulum (ER), protein sentezi-transportu, proteinlerin translasyon sonrası katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanması dahil olmak üzere birçok hücresel fonksiyondan sorumlu olan hücre zarının devamı olarak fonksiyon gösteren hücrenin en büyük organelidir (59, 60).

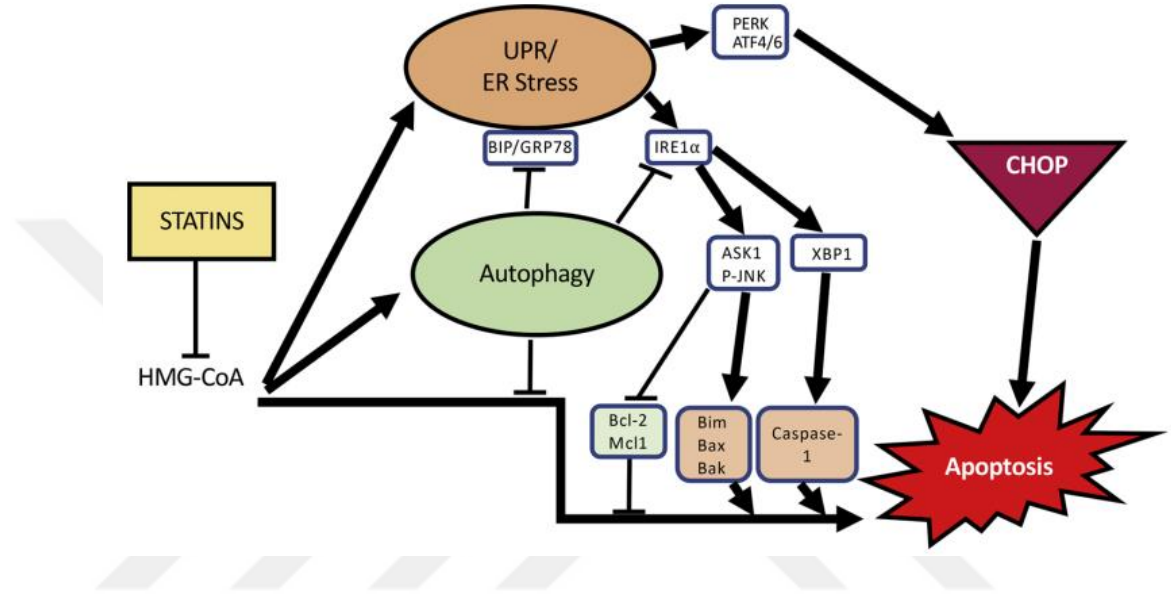
ER'nin en önemli fonksiyonlarından biri protein sentezidir. Birkaç şaperon ve katlama enzimi fonksiyonel olarak mevcut olsa bile, ER lümeninde katlanmış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimi meydana gelebilir (59). Yine, ER'deki kalsiyum

seviyelerindeki değişimler, moleküler şaperonların fonksiyon göstermeleri esnasındaki kalsiyuma duydukları ihtiyaçtan dolayı katlanma işlemini bozabilir ve buna bağlı olarak hatalı protein üretimi meydana gelebilir (60). Hücrenin maruz kaldığı bu durum ER stres olarak tanımlanır. Bu durumda hücrenin verebileceği birkaç cevap vardır: Translasyonun yavaşlatılması, protein degradasyonunun indüklenmesi ve ER homeostazının korunması için ER'nin katlanma kapasitesinin artırılmasıdır (59, 60). Bu denge yeniden oluşturulamazsa hücre ölüme gider.

Bir peptit sekrete edilmek için tasarlanıyorsa hücre ER lümenine girdiğinde, N-bağlı glikozilasyon, disülfid bağ oluşumu ve oligomerizasyonu da içeren birkaç modifikasyona uğrar. Oligosakkariltransferaz, asparajini modifiye ederek proteinlerin katlanmalarının kinetiğini ve termodinamiğini iyileştirir. Hatalı katlanmalar, lümenin özgün yapısından ve yeni sentezlenmiş proteinlerin, sekresyon için hazır olan proteinlerin ve katlanma enzimleri veya moleküler şaperon görevine sahip olan proteinlerin lümen içinde oluşturduğu yüksek protein konsantrasyonlarına bağlı olarak meydana gelebilir. Yüksek protein konsantrasyonuna sahip olan bu lümeninde katlanmaların uygun bir şekilde gerçekleşebilmesi için katlanma enzimlerinin hedef proteini tanımlayabilmeleri gerekir. Glikoz kalıntılarının eklenmesi proteinin tanımlanmasını sağlar, eğer bir protein glukoz kalıntılarında yoksa ER tarafından algılanıp tekrar kimliklendirilmek için işleme alınır. Normal katlanma süreci düzeltilemezse anormal proteinlerin birikimine bağlı olarak üç adet ER membran-ilişkili protein; enzim 1 gerektiren inositol (IRE1), protein kinaz RNA (PKR)-benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6), aktif hale gelerek katlanmamış protein cevabı (UPR)'nın başlamasına neden olur (59, 61) (Şekil 12). Buna bağlı olarak verilen hücresel ilk cevap, hücrenin gerek duyduğu düzgün katlanmış protein miktarını arttırmak amacıyla katlanma sistemini içeren ER bölgelerinin oluşturulması ve ER miktarının artırılmasıdır (59). Geçici ve orta dereceli ER stres UPR tarafından aşılabilirken, uzun süreli veya ciddi ER stres nedeniyle oluşan geri dönüşümsüz hasar, C/EBP homolog proteininin (CHOP) indüksiyonu, c-Jun N-terminal kinazlarının (JNK) aktivasyonu ve UPR-spesifik sistein proteaz kaspaz-12 klevajını içeren apoptotik sürecin başlamasını tetikler (61).

CHOP ve buna denk gelen büyüme önleyici ve DNA hasarına neden olan gen 153 (GADD153) ER stresin belirteçleri olarak tanımlanır ve ER stres aracılı gelişen apoptozda yer alan transkripsiyon faktörlerinden biridir. Stresin olmadığı normal koşullar altında yoğunlukla sitoplazmada çok düşük konsantrasyonlarda bulunan bu faktör, ER

stres altında çekirdekte güçlü bir şekilde aktive edilir (62). CHOP, enerji metabolizması, hücre proliferasyonu, yapışması ve farklılaşması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmaların transkripsiyonel kontrolünde yer almaktadır. Buna ek olarak, heterodimer yapıdaki CHOP, BIM (pro-apoptotik) ve Bcl-2 (anti-apoptotik) gibi genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (63).



Şekil 12. Statinlerin UPR, otofaji ve apoptoz üzerindeki etki mekanizması (64).

3- GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gerekli Materyaller

3.1.1. Sarf Malzemeler

3.1.1.1. Kolorimetrik Kitleri

- Alkalen Fosfataz (BioVision Incorporated, ABD)
- Bradford reaktifi (NYZTech, Portekiz)
- Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Almanya)
- WST-1 Reaktif Solüsyonu (BioVision Incorporated, ABD)

3.1.1.2. Kimyasal Malzemeler

- AEC Chromogen/Substrate Kit (ScyTek Laboratories, ABD)
- Atorvastatin (BioVision Incorporated, ABD)
- BSA (Capricorn Scientific, Almanya)
- Etanol (Sigma Aldrich, Almanya)
- Formaldehit (Merck Millipore, Almanya)
- İzopropil Alkol (Sigma Aldrich, Almanya)
- Kloroform (Merck Millipore, Almanya)
- Large Volume Vision Mount (ThermoFisher Scientific, ABD)
- Mayer's hematoksilen boyası (Merck, Almanya)
- PBS tablet (Merck Millipore, Almanya)
- Saponin (ThermoFisher Scientific, ABD)
- SensiTek Anti-Polyvalent Biotinated Antibody (ScyTek Laboratories, ABD)
- SensiTek HRP (ScyTek Laboratories, ABD)
- Sodyum Azid (Sigma Aldrich, Almanya)
- Super Block (ScyTek Laboratories, ABD)
- TNFa (Biolegend, ABD)
- TRIZol reaktifi (Invitrogen, ABD)
- Tripkan Mavisi (Sigma Aldrich, Almanya)
- Vitamin D (Sigma Biochemicals, Almanya)

3.1.1.3. Hücre Kültürü Malzemeleri

- DMEM (Capricorn Scientific, Almanya)
- Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific, Almanya)
- Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific, Almanya)
- Trypsin-EDTA (Capricorn Scientific, Almanya)

3.1.1.4. Moleküler Çalışma Malzemeleri

3.1.1.4.1. Kitler

- Easy Script Plus™ Reverse Transcriptase Easy Script Plus™ cDNA Synthesis Kit (Applied Biological Materials Inc. abm)
- qPCR analizleri için Eva Green 2X qPCR Mastermix kiti (Applied Biological Materials Inc. abm)

3.1.1.4.2. PCR Primerleri

- Aktin-β (Sentegen)
- ATG-4 (Sentegen)
- Bcl-2 (Sentegen)
- Beclin-1 (Sentegen)
- GADD-153 (Sentegen)
- GADD-45 (Sentegen)
- MAP1LC3B (Sentegen)
- MMP-1 (Sentegen)
- MMP-13 (Sentegen)
- NFκB (Ella Biotech GmbH)
- Osteokalsin (Sentegen)
- Osteopontin (Ella Biotech GmbH)
- RANKL (Ella Biotech GmbH)
- Tip 1 Kollajen (Sentegen)
- TLR2 (Ella Biotech GmbH)
- TLR4 (Ella Biotech GmbH)
- VDR (Sentegen)

3.1.1.5. Antikorlar

- Anti-Phospho-CHOP (St John's Laboratories)
- ATG-4 (Elabscience)
- Bcl-2 (Elabscience)
- Beclin-1 (Elabscience)
- GADD-45 (Elabscience)
- Goat Anti-Rabbit FITC (Elabscience)
- Kollajen-1 (Bioss Antibodies)
- MAP1LC-3B (Elabscience)
- Osteokalsin (Bioss Antibodies)

3.1.2. Cihazlar

- CO2 İnkübatör (Nüve, Türkiye)
- Gerçek Zamanlı PCR Analiz Cihazı (Step One RT-PCR, Applied Biosystems, ABD)
- HEPA Filtreli Klas II Laminar Kabin (MetiSafe, Türkiye)
- Işık Mikroskobu (Nikon, Japonya)
- NovoCyte 3000 Akım Sitometresi (ACEA, ABD)
- Soğutmalı Satrifüj (Hettich, Almanya)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Termal Döngü Cihazı (Applied Biosystems, ABD)
- Varioscan Flash MultiMod Reader (Thermo Scientific)
- Vorteks (IKA/Yellow Line, ABD)
- ZenCell Owl, Live Cell Imaging (InnoME GmbH, Almanya)

3.2. MG-63 Hücre Kültürü ve Hücrelerin Çoğaltılması

Çalışmada insan osteosarkom (MG-63) hücreleri (ATCC; CRL-1427) kullanılmıştır. Hücrelerin çoğaltılması ve kültüründe yüksek glukoz (4.5 g/L), steril L-Glutamin (4.0 mM), %10 FBS (Capricorn Scientific, Fetal Bovine Serum Advanced Heat Inactivated Collected in South America, Cat no: FBS-HI-11B, Lot No: CP18-2138) ve

%1 penisilin/streptomisin (Capricorn Scientific, Cat no: PS-B, Lot no: CP15-1395) içeren DMEM (Cat No: DMEM-HA, Lot No: CP18-2212) besiyeri kullanılmıştır.

3.3. MG-63 Hücrelerinin Pasajlanması ve Hücre Sayımı

Dondurulmuş hücreler besiyeri karışımı içerisinde flasklara ekilerek %80-90 konfluense ulaşana kadar %95 nem ve %5 CO₂ içeren 37°C'ye ayarlı inkübatörlerde çoğalmaya bırakıldı. Kültüre edilip çoğaltılan hücrelerin üzerlerindeki besiyeri atıldıktan sonra 6 mL PBS (fosfat buffer salin) ile 1 defa yıkandı ve üzerine 3 mL tripsin-EDTA (Capricorn, Trypsin-EDTA 0.05% in DPBS, Cat No: TRY-1B) damla damla eklendi, 37°C'de 3 dk bekletilerek flask tabanına tutunmuş hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı. Daha sonra 9 mL FBS içeren besiyeri hücre ve tripsin karışımı üzerine eklenerek tripsinin inhibe olması sağlandı. Hücreler steril bir falkona aktararak 1500 rpm, 25°C, 5 dk santrifüjlenerek hücre pelleti elde edildi. Hücre pelletinin üzerinde kalan süpernatant atıldı ve pellet 1 mL taze besiyeri karışımı ile resüspanse edildi. 50µL süspanse edilen MG-63 hücreleri, 50µL tripan mavisi (Sigma-Aldrich) ile iyice karıştırıldıktan sonra Thoma lamı ile mikroskop altında sayıldı. 1 mL besiyeri içinde bulunan hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Tüm alanlarda sayılan hücre sayısı x Dilüsyon katsayısı x 10⁴ = 1 mL besiyeri içindeki hücre sayısı

3.4. Deney Gruplarının Planlanması ve İlaç Dozlarının Hazırlanması

TNF α (Biolegend, Human recombinant TNF α 0.2mg/mL, Cat No: 570104), Atorvastatin (BioVision Incorporated, Cat No: 2278-10, Lot No: 4K05L22780) ve Vitamin D (Sigma Biochemicals, 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ \geq 99% (HPLC), Cat No: D1530)'nin MG-63 hücreleri üzerindeki etkilerini incelemek için Tablo 1'de gösterildiği gibi farklı deney grupları oluşturuldu.

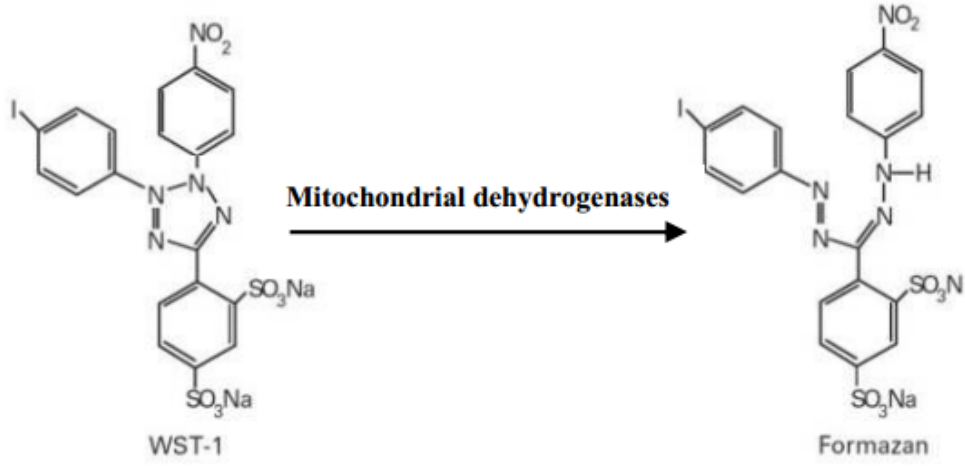
Tablo 1. Deney (tedavi) grupları

1	K	Kontrol
2	T	TNFa (20 ng/mL)
3	A50	Atorvastatin (50 mM)
4	TA5	TNFa (20 ng/mL) + Atorvastatin (5 mM)
5	TA10	TNFa (20 ng/mL) + Atorvastatin (10 mM)
6	TA50	TNFa (20 ng/mL) + Atorvastatin (50 mM)
7	D	Vitamin D (10^{-6} M)
8	DT	Vitamin D (10^{-6} M) + TNFa (20 ng/mL)
9	DA50	Vitamin D (10^{-6} M) + Atorvastatin (50 mM)
10	DTA5	Vitamin D (10^{-6} M) + TNFa (20 ng/mL) + Atorvastatin (5 mM)
11	DTA10	Vitamin D (10^{-6} M) + TNFa (20 ng/mL) + Atorvastatin (10 mM)
12	DTA50	Vitamin D (10^{-6} M) + TNFa (20 ng/mL) + Atorvastatin (50 mM)

Bunun için 20 mM Atorvastatin ve 500 μ M vitamin D ara stok solüsyonları etanol ile hazırlandıktan sonra bu çözeltiler full besiyeri ile dilüe edilip MG-63 hücreleri üzerine uygulandı.

3.5. WST-1 Yöntemi ile Hücre Canlılığının ve Proliferasyonun Değerlendirilmesi

Uygulanan tedavilerin MG-63 hücrelerinin proliferasyon kapasiteleri ve hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 24. ve 48. saatlik uygulamaların sonunda WST-1 analizi yapıldı. WST-1 testinin prensibi, metabolik olarak aktif/canlı olan hücrelerin sarı renkli tetrazolyum tuzunun mitokondriyal dehidrojenazlar ile parçalanarak turuncu renkli formazan boyasına dönüştürülmesi (NADH belirteci) ve bu reaksiyonun spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Canlı hücre sayısındaki artış, oluşan formazan boya yoğunluğu ile koreledir.



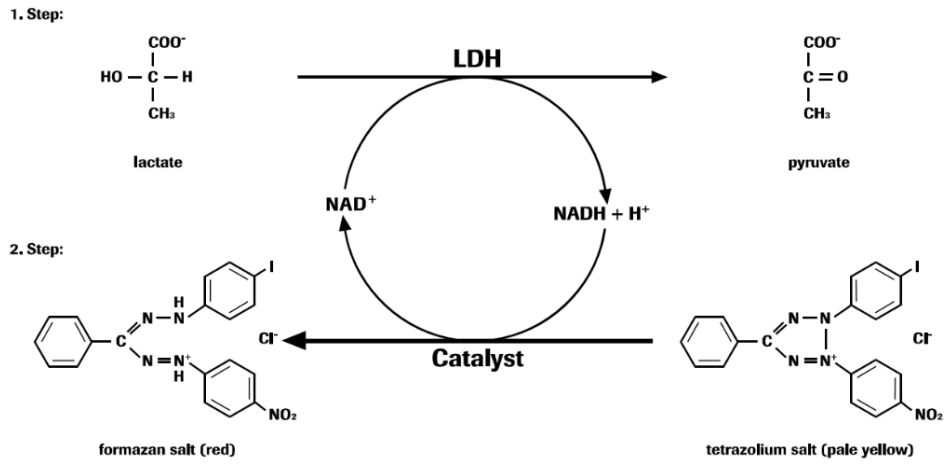
Şekil 13. WST-1 testi ile hücre canlılığının ölçümü. Tetrazolyum tuzunun mitokondrial dehidrojenazlar ile formazan tuzuna dönüşümü

MG-63 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 5×10^3 hücre/100 μ L/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve hücrelerin plaklara tutunması için 8 saat bekletildi. Hücreler kuyucuklara tutunduktan sonra 24 ve 48 saat boyunca Tablo1’de gösterildiği gibi tedaviler uygulandı. Kültür sürelerinin sonunda hücrelerin üzerine 10 μ L/kuyucuk olacak şekilde WST-1 (BioVision Incorporated, WST-1 Reagent Solution, Cat No: K304-2500, Lot No: 3F27K03040) reaktifi eklendi ve hücreler 70 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. 70. dakikanın sonunda oluşan renk değişimi ELISA okuyucusunda (Thermo Scientific, Varioscan Flash MultiMod Reader) 440 nm’de ölçüldü.

3.6. LDH Aktivitesinin Ölçümü

Hücre kültüründeki toksisite değerlendirmesi laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesi ölçümüne dayanan bir test kullanılarak yapıldı. LDH, sitoplazmada çözünebilir bir enzim olup birçok ökaryotik hücrede bulunur ve hücre membranında meydana gelen bir hasar sonucu oluşan hücre ölümünden sonra, hücre kültürü ortamına salınır. LDH aktivitesinin ölçüm prensibi laktatın pirüvata dönüşümünü katalizyen LDH enziminin yardımıyla NAD’ın NADH’a redüklenmesi ve 2 NADH molekülünün diaforaz enzimini katalizlediği reaksiyonda hidrojenlerini tetrazolyum tuzuna aktararak formazon tuzuna indirgenmesi ile gerçekleşir. Bu reaksiyon sonucu meydana gelen renk değişiminin yoğunlu LDH

aktivitesi ve dolayısı ile lizise uğramış veya membranı hasarlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır.



Şekil 14. LDH testi ile sitotoksitenin ölçümü. Tetrazolyum tuzunun redüklenmesi sonucu formazan tuzuna dönüşmesi

Tedavi gruplarındaki ilaç konsantrasyonlarının, MG-63 hücreleri üzerinde toksik etkisinin olup olmadığını değerlendirmek için 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücrelerin plaklara tutunması için ön bekleme yapıldı. Tablo 1'deki tedavi kombinasyonları uygulandı. 24 ve 48 saat inkübasyona (%95 nem, %5 CO₂, 37°C) bırakılan hücrelerin tedavi uygulama sürelerinin sonlarında üzerlerinde bulunan besiyerleri toplandı. Besiyerlerindeki LDH aktivitesinin belirlenmesi için Roche Cytotoxicity Detection Kit (Cat no: 11644793001)'i kullanıldı. 492nm'de spektrofotometrik yöntemle elde edilen absorbans verileri ile tedavilerin toksisitesi değerlendirildi.

3.7. Bradford Yöntemi ile Protein Düzeylerinin Saptanması

Bradford yöntemi numune içerisindeki toplam protein konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılır. Testin prensibi, asidik koşullar altında Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerin aromatik ve arginin, lizin ve histinin gibi bazı amino asitlere bağlanması sonucunda ortam renginin kahverengiden maviye dönüşmesi

ve bu değişimin 592nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Absorbanstaki artış örnek içindeki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Çalışmamızda Bradford analizi NZY Bradford reaktifi (Cat No: MB19801) kullanılarak 24 ve 48 saat tedavi uygulanmış hücrelerin üzerinde bulunan besiyerlerinde çalışılmıştır. 10 µL besiyeri ile 200 µL Bradford reaktifi karıştırılarak ELISA okuyucusunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.8. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesinin Ölçümü

Alkalen fosfataz (ALP), alkalın tampondaki fosfat esterlerin hidrolizini katalize ederek organik bir radikal ve inorganik fosfat üretilmesini sağlayan enzimdir. Alkalın fosfataz seviyesindeki ve aktivitesindeki değişiklikler, karaciğer ve kemikteki çeşitli hastalık durumları hakkında bilgi verir.

ALP aktivitesinin ölçümü için kullanılan kit (BioVision Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit, Cat No: K412-500) içerisinde bulunan p-nitrofenil fosfat (pNPP) fosfataz substratı olarak reaksiyon ortamına eklenir ve numundeki ALP tarafından fosforile edildiğinde sarıya dönüşek 405 nm’de absorbans artışına neden olur.

Çalışmamızda 48 saat Tablo 1’de gösterilen tedaviler uygulanan MG-63 hücrelerinin besiyerlerindeki ALP aktivitesi değerlendirildi. Bunun için 0, 4, 8, 12, 16 ve 20 nmol/150µL konsantrasyonlarında pNPP standartları hazırlandı. Deney gruplarına ait her örnekten 80 µL alınıp 96 kuyucuklu plaklara eklendi. Üzerlerine 5 mM konsantrasyona sahip pNPP solüsyonundan 50 µL eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 60 dakika 25°C’de karanlık ortamda inkübe edildi. Süre sonunda tüm kuyucuklara 20 µL stop solüsyonu eklendi ve bekletilmeden ELISA okuyucusunda 405 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Medium protein absorbansları ile standardize edilerek sonuçlar verildi.

3.9. Akım Sitometre Analizi

Bu analiz için 6 kuyucuklu plaklara 3×10^5 hücre/kuyucuk/2 mL olacak şekilde MG63 hücresi ekilerek besiyeri içinde 24 saat boyunca tedavi gruplarına uygun şekilde kültüre edildi (Tablo 1).

3.9.1. Akım sitometre analizi için kullanılan çözeltiler:

1. Çözelti 1 (Fiksasyon Çözeltisi): 0,01 M PBS, %1 BSA, %0,05 NaN₃, %4 Formaldehit
2. Çözelti 2 (Permeabilizasyon Çözeltisi): 0,01 M PBS, %1 BSA, %0,05 NaN₃, %0,3 Saponin
3. Çözelti 3: 0,01 M PBS, %1 BSA, %0,05 NaN₃
4. Çözelti 4: 0,01 M PBS

3.9.2. Antikorların Hazırlanması:

Akım sitometre analizi için kullanılan antikor listesi ve analizde kullanılan antikor dilüsyon oranları Tablo 2’de verilmiştir. Bütün antikorlar Çözelti 2’de dilüe edilerek hazırlandı.

Tablo 2. Akım sitometre analizi için kullanılan antikorlar

Antikor	Marka	Katalog No	Klonalite	Dilüsyon
MAP1LC-3B	Elabscience	E-AB-33747	Poliklonal	1:100
ATG-4	Elabscience	E-AB-33805	Poliklonal	1:200
Beclin-1	Elabscience	E-AB-00827	Monoklonal	1:200
Bcl-2	Elabscience	E-AB- 359857	Poliklonal	1:200
GADD-45	Elabscience	E-AB-31496	Poliklonal	1:200
Anti-Phospho-CHOP (S30)	St John's Laboratories	STJ91075	Poliklonal	1:200
Goat Anti-Rabbit FITC	Elabscience	E-AB-1014		1:200

3.9.3. Hücre Fiksasyonu:

Tedavi grupları ile muamele edilen MG63 hücreleri 24. saatin sonunda tripsinize edilerek 1,5ml’lik eppendorf tüplere alındı. Örnekler 1500 rpm’de, 4°C’de, 5 dakika

santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı. Hücre pelletleri 500 µL Çözelti 1 ile re-süspanse edilip 15 dakika oda ısısında bırakılarak fikse edildi. Daha sonra 1500 rpm, 5 dakika, 4°C'de santrifüj edilerek süpernantantlar atıldı ve hücreler Çözelti 4 içinde yeniden süspanse edilerek yıkandı.

3.9.4. Hücrelerin Permeabilizasyonu:

Fikse edilip Çözelti 4 ile yıkanan hücreler yeniden 1500 rpm, 5 dakika, 4°C'de santrifüjlendi ve süpernantlar atıldıktan sonra hücre pelletleri 1mL Solüsyon 2 (permeabilizasyon solüsyonu) ile re-süspanse edildi ardından 1500 rpm, 5 dakika, 4 °C'de santrifüj edildi.

3.9.5. Hücrelerin İşaretlenmesi:

Santrifüj sonrasında süpernatantlar atıldı ve taze hazırlanmış primer antikor (MAP1 LC-3B, ATG-4A, beclin-1, Bcl-2, GADD-45 ve Phospho-CHOP) çözeltileri (100µL) pelletlerle ayrı ayrı karıştırıldı ve 15 dakika boyunca oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her örneğin üzerine 900 µL Çözelti 2'den eklenerek 1500 rpm, 5 dakika, 4°C'de santrifüj edildi. Süpernantantlar atıldı. Her eppendorfa 100 µL sekonder antikor eklenip pellet re-süspanse edildi. 15 dakika oda ısısında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda örneklere 900 µL Çözelti 3'ten eklendi ve 1500 rpm, 5 dakika, 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellet Çözelti 4 ile re-süspanse edildi ve analizler akım sitometre cihazında (NovoCyte 3000) bekletilmeden yapıldı.

3.10. Kantitatif Geri Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

3.10.1. RNA İzolasyonu

Bu analiz için 6 kuyucuklu plaklara 3×10^5 hücre/kuyucuk/2 mL olacak şekilde ekildi ve 24 saat boyunca belirlenmiş tedavi grupları ile muamele edildi (Tablo 1). Sürenin sonunda kuyu başına 1mL TRIzol reaktifi (Invitrogen, Cat No: 15596-026) eklenerek hücreler 5 dakika boyunca oda ısısında karıştırılıp lizat oluşturuldu. Lizatlar 1,5mL'lik RNAaz/DNAaz içermeyen eppendorf tüplere alındı ve 12000 g, 4°C, 10 dakika santrifüj edilerek süpernantantlar temiz eppendorf tüplere aktarıldı. Faz ayrımının sağlanması amacıyla her tüp içine 200 µL kloroform eklenip 15 saniye yavaşça karıştırıldı, oda ısısında 3 dakika bekletildikten sonra 12000 g, 4°C, 15 dakika santrifüj

edildi. Santrifüj sonrasında tüp içinde oluşan 3 fazın en üst kısmı temiz tüplere aktarıldı, üzerlerine 500 µL izopropil alkol eklendi. Eppendorflar 4-5 defa yavaşça alt üst edildikten sonra RNA'nın çökmesi için oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 12000 g, 4°C, 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar atıldı. Tüpün dibinde kalan RNA pelletleri, 1mL %75'lik etanol ile iyice süspanse edilerek yıkandı ve 7500g, 4°C, 5 dakika santrifüj edilip süpernatantlar atıldı. Bu işlem 4 defa tekrar edildi. Çökmüş olan RNA pelleti içerisindeki etanolün uçurulması için 10 dakika oda ısısında bırakıldı, daha sonra 50 µL DEPC-H₂O ile resüspanse edildi.

3.10.2. qPCR (qRT-PCR)

In vitro koşullar altında spesifik bir DNA sekansının primerler aracılığı ile yönlendirilerek enzimatik reaksiyonlar sonucu çoğaltılması ile 2ⁿ (n: her replikasyonda oluşan zincir sayısı) sayıda kopyasının oluşturulmasını sağlayan moleküler teknik, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) olarak tanımlanır. Bu yöntem 3 aşamadan oluşur: 1. Denatürasyon, 2. Bağlanma, 3. Uzama. Dublikasyon sürecinde, oligonükleotid primerler yüksek sıcaklıklarda meydana gelen DNA denatürasyonu sonucunda tek zincirli DNA molekülünde kendisi ile eşleşen bölgelerle birleşir. Birleşme (bağlanma) sonucunda çift zincirli kısa bir DNA dizisi meydana gelir ve uygun tampon ve adenin (A), timin (T), sitozin (C) ve guanin (G) bazlarının varlığında (dNTP'ler) DNA polimeraz enzimi ile 3'ucundan DNA uzamaya başlar. Bu işlem dNTP miktarına bağlı olarak belirlenen replikasyon döngü sayısı boyunca devam eder.

qPCR (Kantitatif Geri Transkripsiyon PCR) ise RNA'dan komplementer (tamamlayıcı) DNA (cDNA) oluşumunu ve sonrasında DNA'nın çoğaltılmasını içeren standart PCR aşamasını içeren 2 basamaktan oluşur. Burada belirli bir gen bölgesinin ekspresyonunun analiz edilmesi için o gen bölgesinin sentezini başlatan spesifik primerler kullanılır. Standart PCR'daki tüm basamaklar geçerlidir.

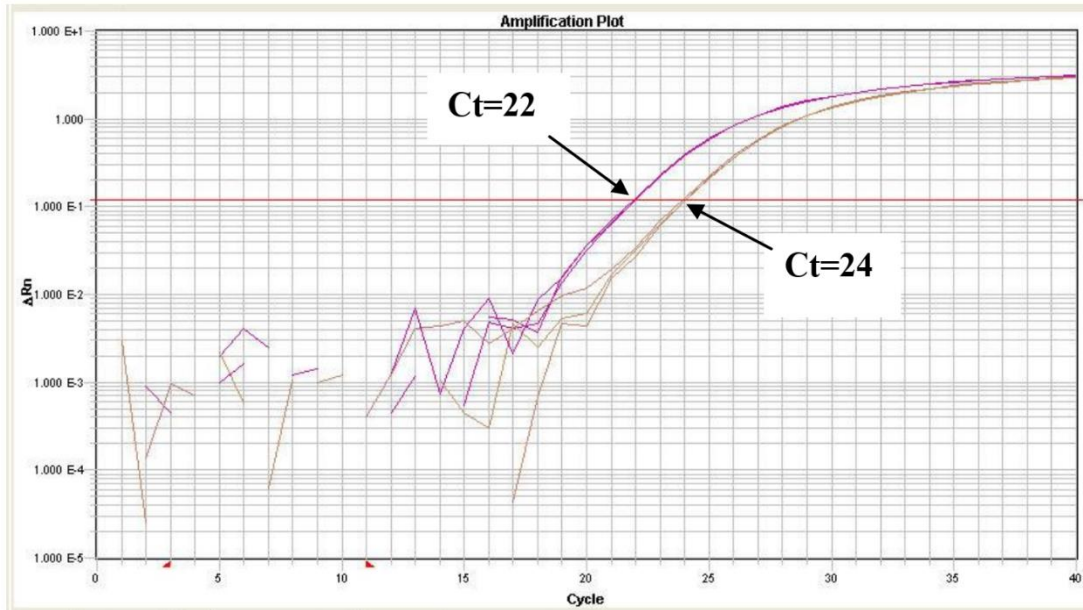
qPCR sonuçlarının karşılaştırmalı kantifikasyonu için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\text{Tedavi grubu } \Delta Ct - \text{Kontrol grubu } \Delta Ct)}$$

$$\Delta Ct = (\text{Gen Ct} - \text{Aktin } \beta \text{ Ct})$$

Karşılaştırmalı kantifikasyon, mRNA ekspresyon seviyelerindeki göreceli değişimi ölçer. Bir genin denge durumundaki mRNA seviyelerinin, farklı uygulamalar yapılan çoklu numunelerdeki mRNA düzeyleri ile karşılaştırılması sonucu bulunur. Bu esnada internal ya da endojen standart olarak ekspresyon düzeylerinin tüm hücrelerde aynı olduğu, hastalık durumundan veya herhangi bir uygulamadan etkilenmediği kabul edilen GAPDH, β -aktin, β 2-mikroglobulin gibi housekeeping genlerin mRNA düzeyleri de hedef genin uygulamalar sonucunda ekspresyonunun değişip değişmediğini anlamak ve her bir numuneyi kendi içinde normalize etmek için kullanılır.

Bir qPCR eğrisi tipik olarak üssel bir faza ve ardından bir plato fazına sahiptir. Döngü eşikdeğeri (Threshold cycle) olarak ifade edilen Ct değeri, Şekil 15'te gösterilen PCR eğrisinin linear faza geçtiği yerde çizilen eşikdeğerinde (kırmızı çizgi) ölçülür. Eşikdeğeri analiz edilen her gen için farklı, aynı genin farklı tedaviler uygulanmış tüm numunelerinde ise aynıdır.



Şekil 15. Döngü eşik değeri (Ct)'nin gösterilmesi

3.10.3. cDNA Sentezi

TRIZOL reaktifi yardımıyla izole edilen RNA örneklerinden cDNA eldesi için Easy Script Plus™ Reverse Transcriptase Easy Script Plus™ cDNA Synthesis Kit (Cat No:

G236, Applied Biological Materials Inc. Abm) kullanıldı. Reaktifler Basamak 1 ve 2’de olduğu şekilde eklenerek her örnek için ayrı cDNA elde edildi (Tablo 3).

Birinci basamak karışımını hazırladıktan sonra reaksiyon tüpleri gerçek zamanlı PCR analiz cihazında (Applied Biosciences Step One) 65°C, 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüpler daha sonra buz üstüne (4°C) alıp 5 dakika bekletildi. 5 dakikanın sonunda 2. basamakta hazırlanan reaksiyon karışımından 5,5 µL her tüpe eklendi ve son reaksiyon hacmi 20 µL olan örnekler 50°C, 15 dakika; 85°C, 5 dakika gerçek zamanlı PCR analiz cihazında inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra numuneler analiz zamanına kadar -20°C’de saklandı.

Tablo 3. cDNA sentez protokolü

1. Basamak		
	Reaksiyon Hacmi	Son Konsantrasyon
RNA	1 µL	1 ng - 2 µg/ reaksiyon
Oligo DT (10 µM)	1 µL	0,5 µM
dNTP miks (10 µM)	1 µL	500 µM
Nükleaz free H ₂ O	14,5 µL’ye tamamla	-

2. Basamak		
	Reaksiyon Hacmi	Son Konsantrasyon
5X RT (Reverse (Ters) Transkriptaz) tamponu	4 µL	1 X
RNaz inhibitörü (40 U/µL)	0,5 µL	20 U/reaksiyon
Easy Script Plus RTaz (200 U/µL)	1 µL	200 U/reaksiyon

3.10.4. qPCR Analizi

Farklı tedaviler uygulanan MG-63 hücrelerinde Tablo 4’te gösterilen genlerin ekspresyon düzeyleri qPCR yöntemi ile gerçek zamanlı PCR analiz cihazı kullanılarak saptandı. qPCR analizleri için Eva Green 2X qPCR Mastermix kiti (Cat No: MasterMix-R; Applied Biological Materials Inc. abm) firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı (Tablo 5).

Tablo 4. qPCR analizi yapılan genlere ait primerler

Primer	Yön	Dizilim
Beclin-1	İleri	ATTTCAGAGATACCGACTTGTTC
	Geri	AATCTTGCCTTTCTCCACATCC
ATG 4A	İleri	CACTGACTACCTAGAAGAATATCC
	Geri	TTCCTCCAGATCAAACCTCCT
MAP1LC3B	İleri	AGCGTCTCCACACCAATCTC
	Geri	TCCATCTTCATCTTTCTCACTCTC
Bcl-2	İleri	GACTGTCAGCTGCTGTCTGGGCAA
	Geri	GCCAAGACCTCTTCAGCTACTGC
TLR 2	İleri	CCTCCAATCAGGCTTCTCTG
	Geri	TGGAGGTTACACACCTCTG
TLR 4	İleri	CATATCAGAGCCTAAGCCACC
	Geri	TTGAATCTTGTTGCTGGAAAGG
RANKL	İleri	CCAAGATCTCCAACATGACT
	Geri	TACACCATTAGTTGAAGATACT
NFκB	İleri	GAGAGGAGCACAGATACCAC
	Geri	CACAGCATTCAGGTCGTAGTC
VDR	İleri	GTGAGACCTCACAGAAGAGCAC
	Geri	CATTGCCTCCATCCCTGA
GADD 45	İleri	ATCCACTTCACCCTGATCCA
	Geri	TTGATCCATGTAGCGACTTTCC
GADD 153	İleri	TAAGTCTAAGGCACTGAGCG
	Geri	TGATTCTTCTCTTCATTTCCAGG
Osteokalsin	İleri	CCATGAGAGCCCTCACACTCC
	Geri	GGTCAGCCAACTCGTCACAGTC
MMP-9	İleri	CTGGGCAGATTCCAAACCT
	Geri	TACACGCGAGTGAAGGTGAG
MMP-1	İleri	CTGGAATTGGCCACAAAGTT
	Geri	TCCTGCAGTTGAACCAGCTA
MMP-13	İleri	TCAGGAAACCAGGTCTGGAG
	Geri	TGACGCGAACAATACGGTTA
Aktin-β	İleri	AGTCCTGTGGCATCCACGAAA
	Geri	GTCATACTCCTGCTTGCTGA

Tablo 5. qPCR protokolü

	Reaksiyon Hacmi	Son Konsantrasyon
Eva Green 2X qPCR Mastermix	5 µL	1 X
Forward Primer (10 µM)	0,3 µL	300 nM
Reverse Primer (10 µM)	0,3 µL	300 nM
Kalıp DNA	1 µL	≤ 500 ng/reaksiyon
Nükleaz free H ₂ O	10 µL'ye tamamla	-

Örnekler gerçek zamanlı PCR analiz cihazında 95°C'de 10 dakika (1 döngü); 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 60 saniye (40 döngü) inkübe edildi.

3.11. İmmünohistokimya

Osteokalsin ve kollajen 1 varlığının protein düzeyinde semi-kantitatif olarak gösterilebilmesi için immünohistokimya analizi yapıldı. Bunun için 12 kuyuklu plaklar içerisine cover slipler (Nunc, Thermo Scientific) yerleştirildi. Hücreler 5×10^3 hücre/kuyucuk/300 µL besiyeri olacak şekilde ekildi ve 24 saat tutunmaları için hücre kültürü ortamında bekletildi. Hücreler yüzeye tutunduktan sonra Tablo 1'de gösterilen tedaviler 24 saat boyunca 37°C, %5 CO₂ ve %95 neme ayarlı inkübatörde uygulandı. Kültür süresinin sonunda besiyerleri toplandı ve hücreler %4'lük formalin ile 15 dakika oda ısısında muamele edilerek yüzeye fikse edildi. Sürenin sonunda fikse olmuş hücreler 2 defa PBS ile yıkandı ve üzerlerine Super Block (ScyTek Ref No: AA 125) solüsyonu tüm hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde eklendi ve 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler 2 defa PBS ile yıkandı. Osteokalsin (Osteocalcin Polyclonal Antibody, Bioss Antibodies, Cat No: bs -4917R) primer antikoru 1:350 oranında ve Kollajen 1 (Collagen 1 Polyclonal Antibody, Bioss Antibodies, Cat No: bs-10423R) primer antikoru 1:200 oranında PBS ile dilüe edilerek hücreler üzerine ayrı ayrı eklendi. Hücreler gece boyunca 4°C ve nemli ortamda primer antikolarla muamele edildi. Ertesi gün hücreler PBS ile 2 defa yıkandıktan sonra kuyucuklara tüm yüzey kaplanacak şekilde SensiTek Anti-Polyvalent Biotinated Antibody (ScyTek, Ref No: ABF) eklenerek 30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklar 2 defa PBS ile yıkandı. Yine kuyucukların tüm yüzeyi kaplanacak şekilde hücrelerin üzerine SensiTek HRP (ScyTek,

Ref No: ABG 125) eklenerek 20 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda kuyular 2 defa PBS ile yıkandı. AEC Chromogen/Substrate Kit (ScyTek Laboratories, Cat No: ACJ125) kiti yardımıyla hücrelerde reaksiyon geliştirildi ve sonra PBS ile yıkanarak reaksiyon sonlandırıldı. Hücrelerin üzerlerine 1:1 oranda distile su ile dilüe edilen Mayer's hematoksilen boyası (Merck, Cat No: 109249) eklendikten sonra kuyucuklar distile su ile iyice yıkandı. Yıkama işleminden sonra mikroskop görüntülerinin alınabilmesi için preparatlar Large Volume Vision Mount (ThermoFisher Scientific, Cat No: TA-060-UG) yapıştırıcısı ile lamla kapatıldı. Preparatlar renkli dijital kamera ataçmanlı Nikon Eclipse E400 marka ışık mikroskopunda (Nikon, Japan) incelenerek resimleri çekildi.

3.12. Hücrelerin Gerçek Zamanlı Görüntülerinin Alınması

Hücrelere Tablo 1'de gösterilen tedaviler uygulandıktan sonra 48 saat boyunca hücrelerin saat başı çekilen canlı görüntüleri alındı. Bunun için hücrelerin gerçek zamanlı mikroskopik görüntülerinin çekilmesi için tasarlanan 24 kanallı ZenCell Owl (Live Cell Imaging, InnoME GmbH, Almanya) cihazı kullanıldı. Bu sayede uygulamalar başladıktan sonra hücrelerin tedaviye karşı gösterdiği morfolojik değişikliklerin izlenmesinin yanı sıra konfluens yüzdesi, tutunan ve yüzeyden kalkan hücre miktarlarının bilgisi de elde edildi.

Bunun için cihaza spesifik 24 kuyucuklu plaklara, 3×10^4 hücre/kuyucuk/450 μ L ekildi ve 24 saat hücrelerin tutunması için beklendi. Hücreler tutunduktan sonra tüm tedavi dozları uygulandı ve hemen inkübatör içerisinde bulunan hücre kültürü için dizayn edilmiş ZenCell Owl mikroskobu içine yerleştirildi ve saat başı alınan gerçek zamanlı görüntüleri cihaz tarafından bilgisayara otomatik olarak aktarıldı. 48 saatin sonunda hücreler cihazdan çıkarılarak uygulama sonlandırıldı. Bilgisayara aktarılan veriler değerlendirildi.

4-BULGULAR

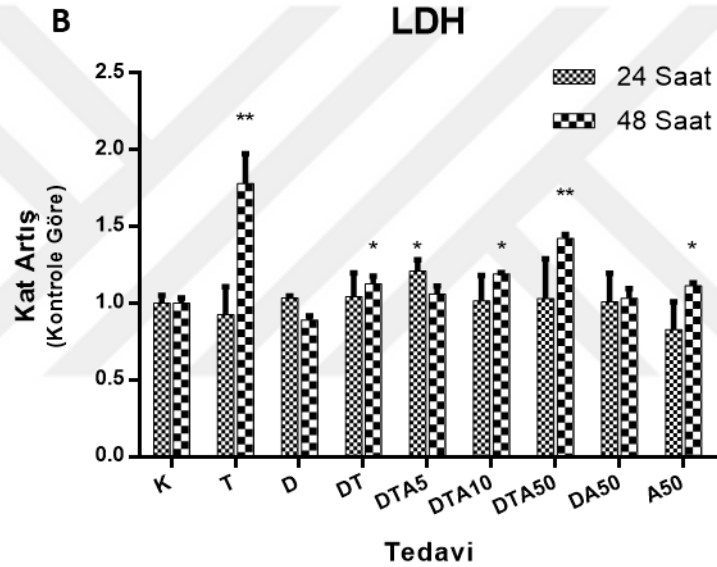
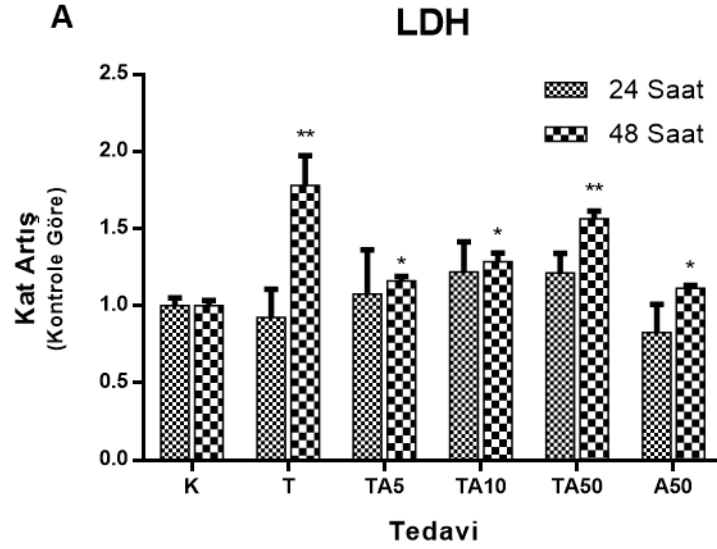
4.1. MG-63 Hücrelerinde Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesinin Değerlendirilmesi

TNF- α ve atorvastatinin MG-63 osteosarkom hücre hattı üzerinde olası toksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 96'lık plaklar içerisinde 5×10^3 hücre/200 μ L DMEM/kuyucuk ekildi. 24 saat sonra, önceden belirtildiği şekilde TNF- α (20 ng/mL) ve/veya atorvastatin (5 μ M, 10 μ M ve 50 μ M) farklı kombinasyonlarda uygulandı (Bkz Metod Bölüm 3.4). Tüm uygulamalardan sonraki 24. ve 48. saatlerde hücrelerin içinde buldukları medyumlardan 100'er μ L toplandı ve LDH aktivitesi piyasada mevcut bir kit yardımı ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (Bkz Metod Bölüm 3.6). Elde edilen sonuçlar kontrol grubuna (K) göre kat artış olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

24 saatlik uygulamalar sonrasında atorvastatin ve TNF- α 'nın beraber uygulandığı gruplarda LDH düzeylerinde bir artış izlenmesine rağmen tedavinin uygulandığı ilk 24 saatlik süre boyunca tüm deney gruplarında bu artış kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemsiz bulundu. Ne var ki, 48 saat sonunda tek başına TNF- α uygulamasında LDH aktivitesinde önemli bir artış izlendi. Ayrıca tek başına en yüksek doz olan 50 μ M atorvastatin ile de LDH aktivitesinde hafif bir artış mevcuttu. Atorvastatinin TNF- α 'nın LDH aktivitesinde artışa yol açan etkisini düşük dozlarda daha belirgin şekilde baskıladığı izlendi (Şekil 16A).

TNF- α ve atorvastatinin MG-63 hücrelerinin LDH aktivitesi üzerindeki etkisine vitamin D'nin katkısının değerlendirilmesi amacıyla, atorvastatin ve TNF- α 'nın tek başına ve farklı kombinasyonlarla eklenen düzeylerine ek olarak deney gruplarına 10^{-6} M $1\alpha,25$ -dihidroxyvitamin D₃ uygulaması yapıldı (Şekil 16 B).

Atorvastatin ve vitamin D ara stok solüsyonlarının hazırlanması için kullanılan etanol konsantrasyonunun (%0,25 ve %0,45) hücreler üzerindeki olası toksik etkisi araştırıldı. %100 konsantrasyondaki etanol, besiyeri olarak kullanılan DMEM ile sitotoksitesisi araştırılan konsantrasyonlara dilüe edildi ve diğer tedavi grupları ile aynı zamanda farklı kuyucuklara ekilen hücreler üzerine uygulandı. Bu dozlardaki etanol uygulamasının hücreler üzerinde toksik etkisi olmadığı izlendi (veri gösterilmemiştir).



Şekil 16. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde LDH aktivitesi. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinin besiyerlerinde 24. ve 48. saatlerde ölçülen LDH düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinin besiyerlerinde 24. ve 48. saatlerde ölçülen LDH düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$.

24 ve 48 saatlik uygulamalar sonrasında vitamin D'nin tek başına LDH düzeyleri üzerine etkisi kontrol grubuna (K) göre toksik etkisi izlenmedi. Ne var ki vitamin D TNF- α ile beraber kullanıldığında 48. saatte LDH aktivitesinde hafif bir artış olduğu

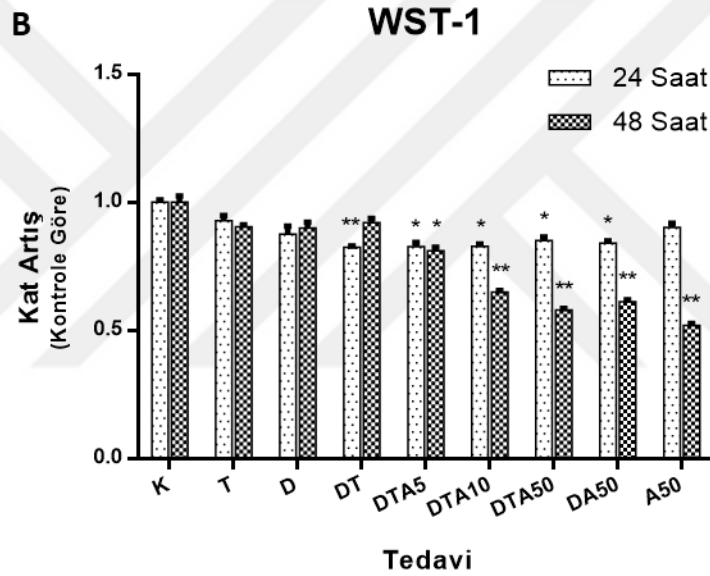
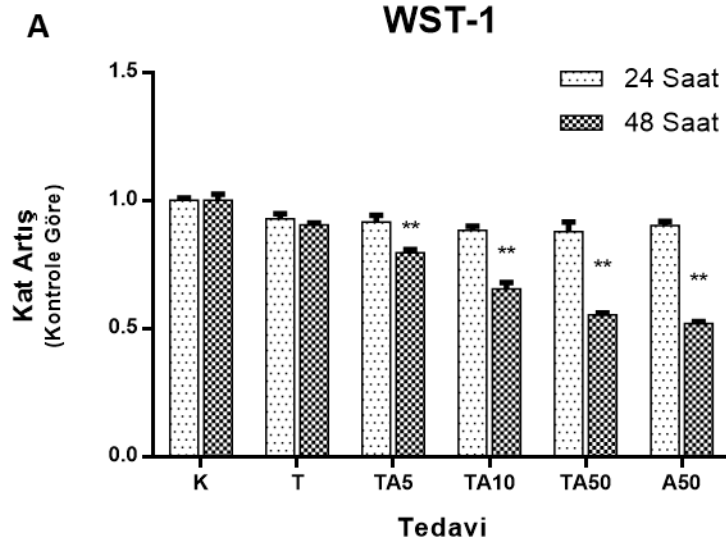
gözlendi. Yine vitamin D'nin TNF- α ve atorvastatin kombine uygulamalarındaki LDH aktivitesi üzerine toksik etkisi gözlenmedi (Şekil 16 A,B).

4.2. MG-63 Hücrelerinin Canlılığının WST-1 Testi ile Saptanması

TNF- α ve atorvastatinin MG-63 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 96'lık plaklar içerisine 5×10^3 hücre/200 μ L DMEM/kuyucuk ekildi. 8 saat sonra, önceden belirtildiği şekilde TNF- α (20 ng/mL) ve/veya atorvastatin (5 μ M, 10 μ M ve 50 μ M) farklı kombinasyonlarda uygulandı (Bkz Metod Bölüm 3.5). Uygulamalardan sonra 24. ve 48. saatlerde hücrelerin canlılığı WST-1 reaktifi eklenerek tespit edildi. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuna (K) göre kat artış olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

24 saat sonra MG-63 hücrelerindeki canlılık hafif düzeyde azalmasına rağmen istatistiksel olarak kontrol grubu ile deney grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi. Ancak, 48. saatte 50 μ M atorvastatin (A50) uygulanan grupta okumaların kontrole (K) kıyasla ~%50 oranında azaldığı, TNF- α ve atorvastatin kombinasyon uygulamaları incelendiğinde okumalardaki azalmanın atorvastatin dozu ile doğru orantılı olacak şekilde geliştiği ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Şekil 17 A).

Atorvastatin ve TNF- α ile muamele edilen MG-63 hücrelerinin canlılığı üzerine vitamin D (10^{-6} M) etkisi değerlendirildiğinde 24 saat uygulamalarda atorvastatin ve TNF- α kombine tedavisine bağlı gelişen canlılıktaki azalma üzerine vitamin D'nin katkı sağladığı ($p < 0,050$) ancak ve 48 saatte gelişen canlılıktaki azalma üzerine vitamin D'nin katkısının olmadığı izlendi (Şekil 17 B).

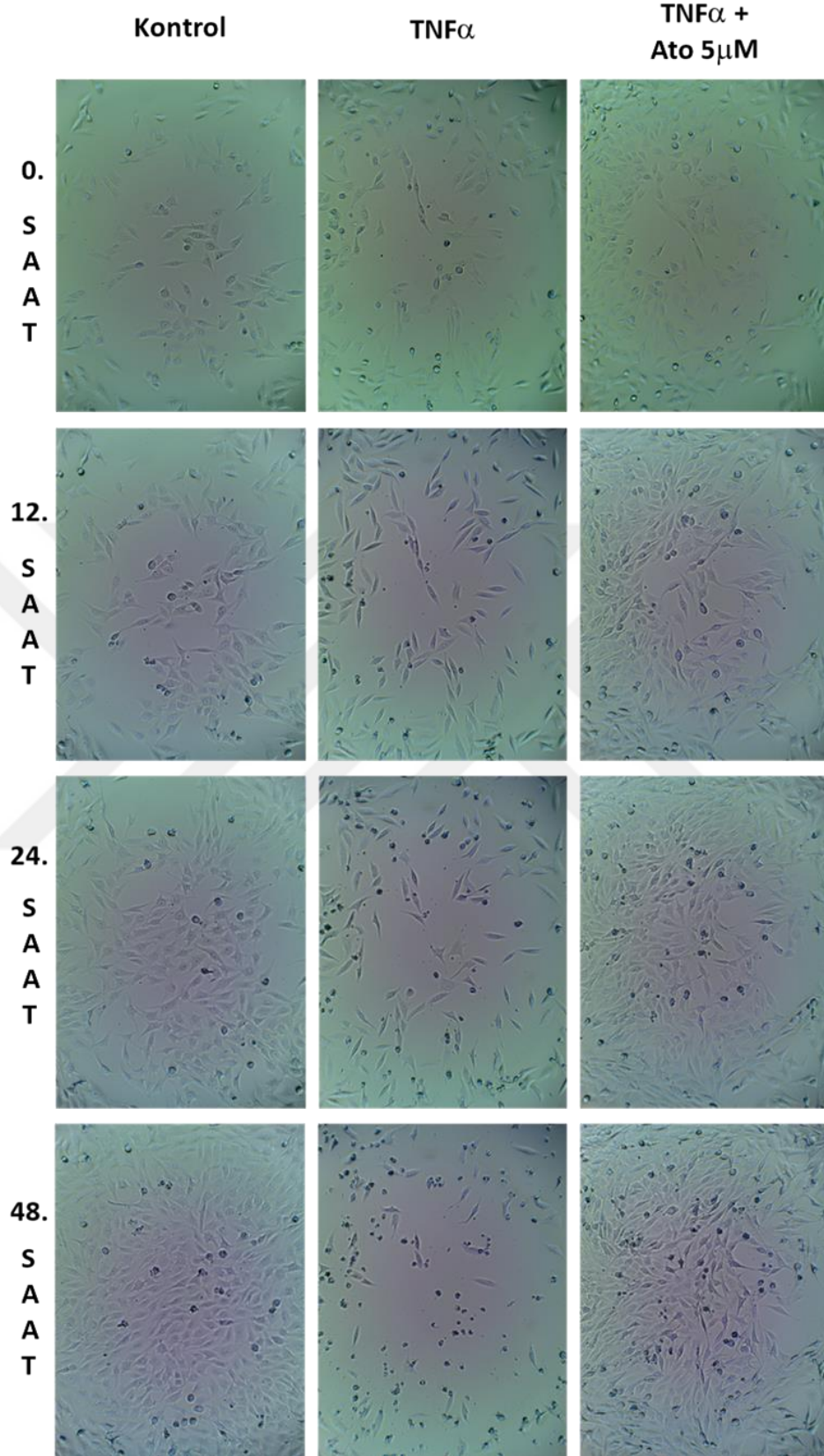


Şekil 17. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulamalarının MG-63 hücre canlılığı üzerine etkisi. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. ve 48. saatlerde ölçülen WST-1 düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. ve 48. saatlerde ölçülen WST-1 düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$.

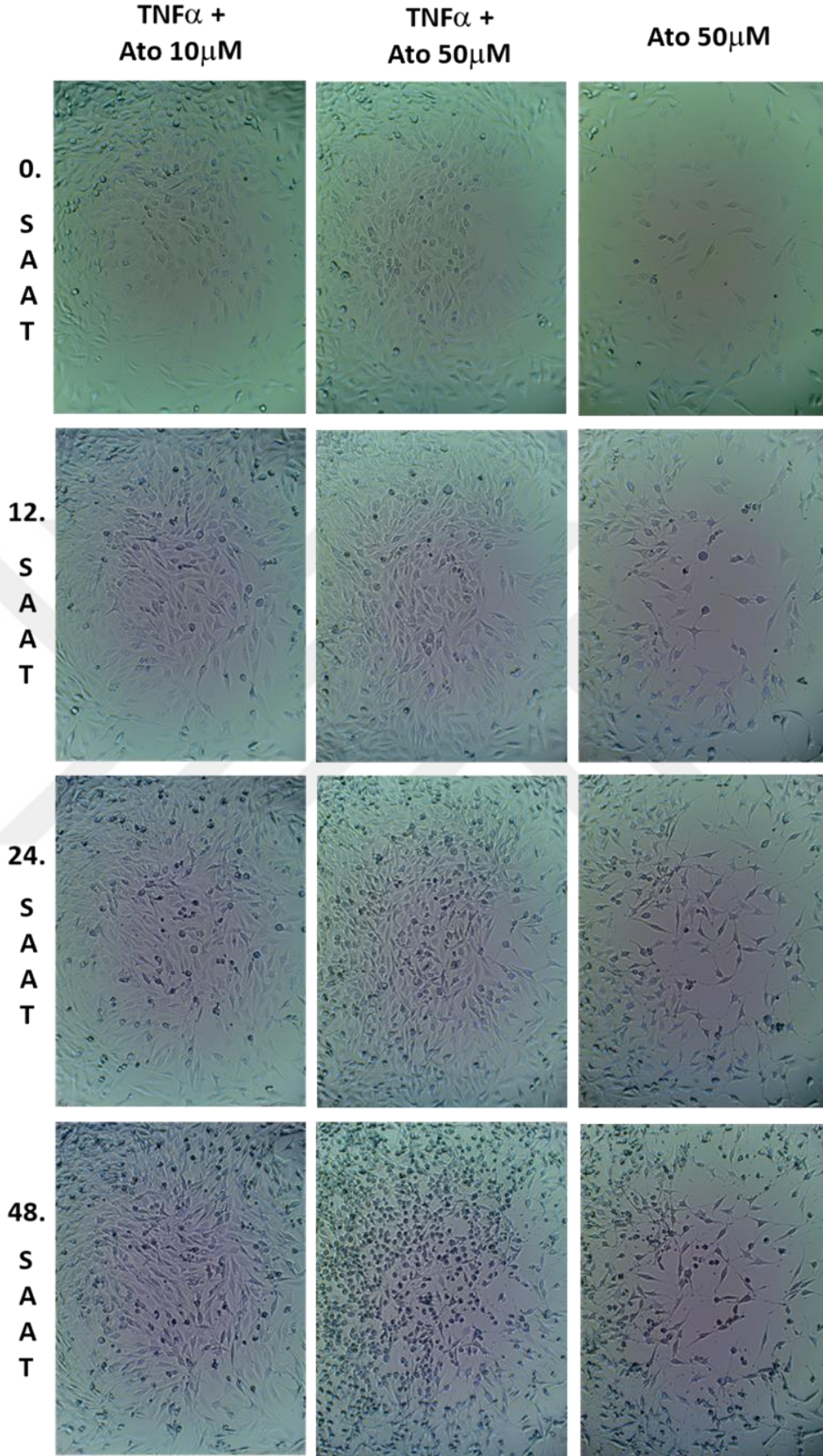
4.3. ZenCell Owl Cihazı Kullanılarak Gerçek Zamanlı Hücre Görüntüleme Analizleri

Vitamin D, atorvastatin ve TNF- α 'nın osteosarkom hücreleri üzerindeki morfolojik ve yüzeye tutunma yeteneklerindeki değişikliklerin incelenmesi amacıyla 24 kuyucuklu plaklar içine ekilen MG-63 hücrelerine (3×10^4 hücre/kuyucuk/450 μ L) Tablo 1'de gösterilen tedaviler uygulandı. 48 saat boyunca hücrelerin gerçek zamanlı görüntüleri 1 saatlik döngülerle ZenCell Owl mikroskobu ile izlenerek kaydedildi (Şekil 18-21).

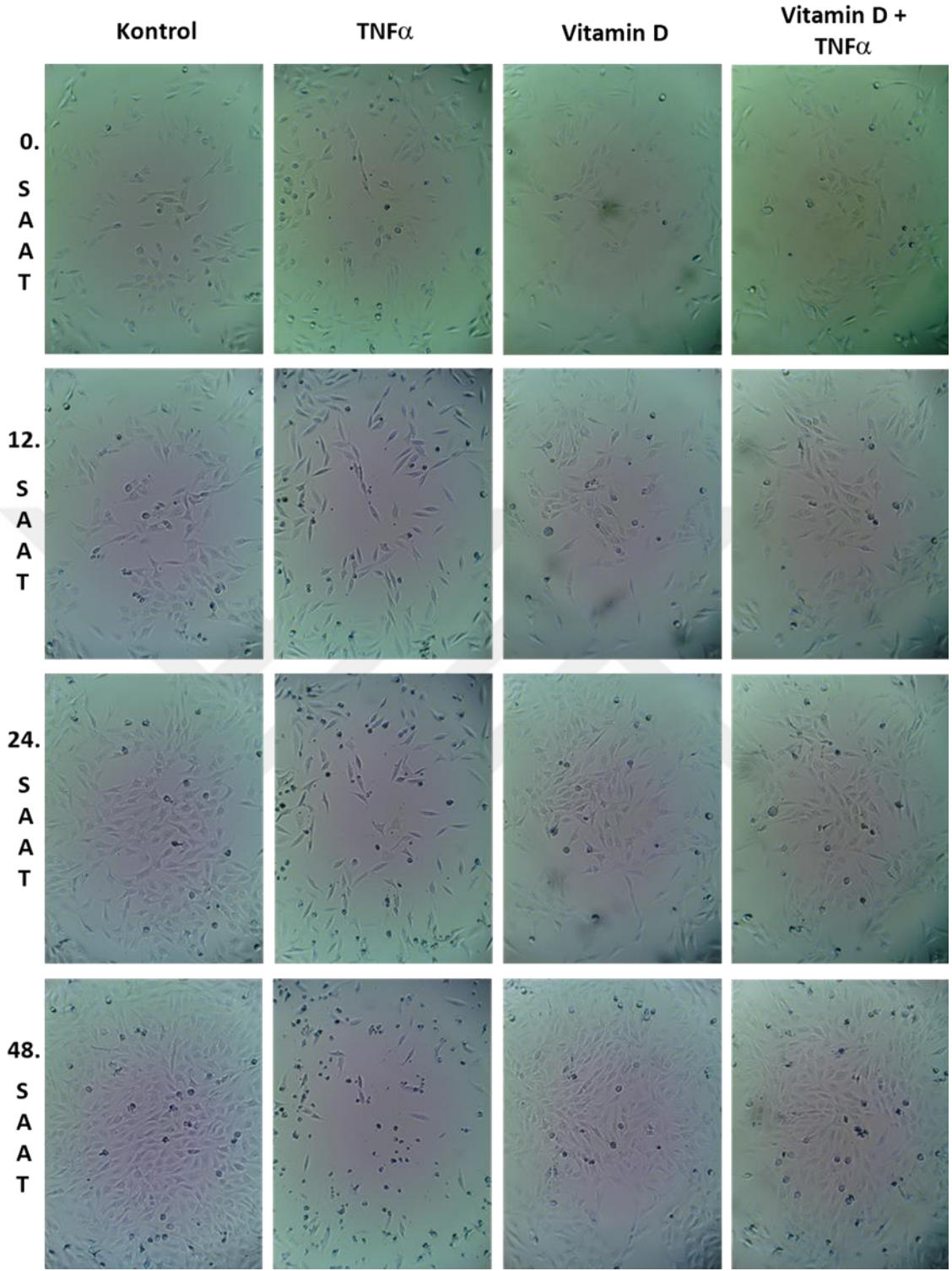




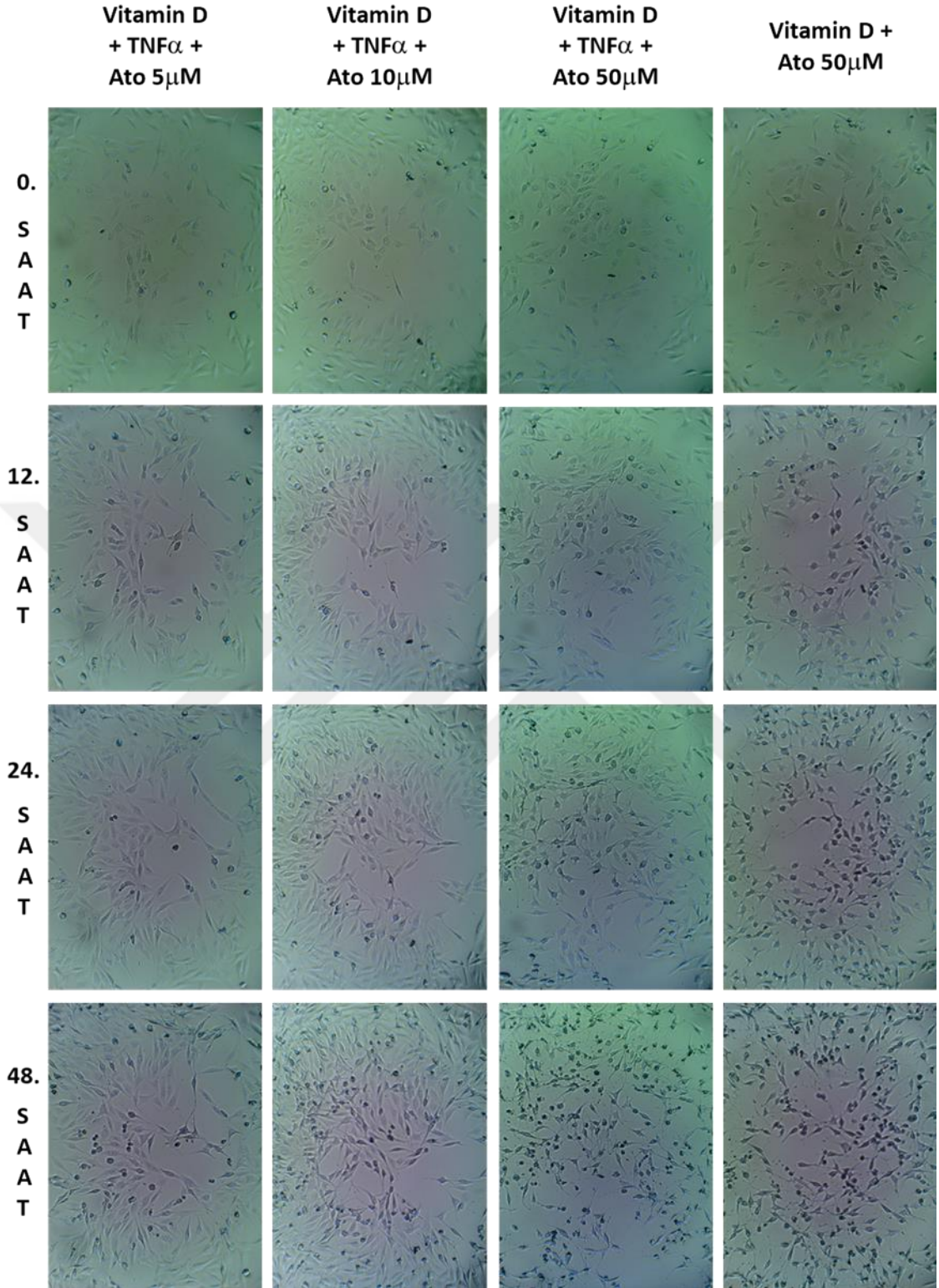
Şekil 18. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskobik görüntülemesi. Tedavi uygulanmayan (K), TNF- α (T) veya TNF- α ve 5 μ M atorvastatin (TA5) uygulanan MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntüleri.



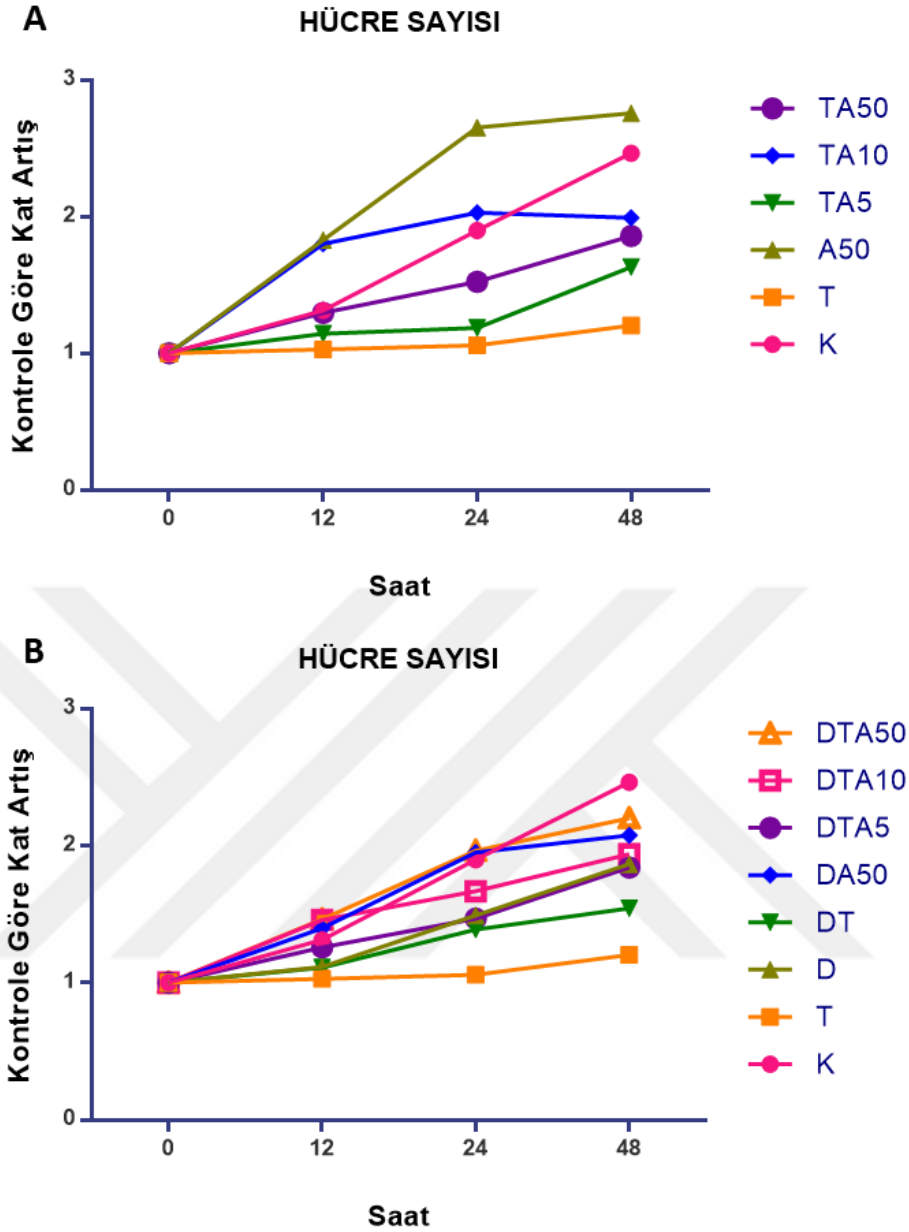
Şekil 19. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskobik görüntülemesi. 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntüleri.



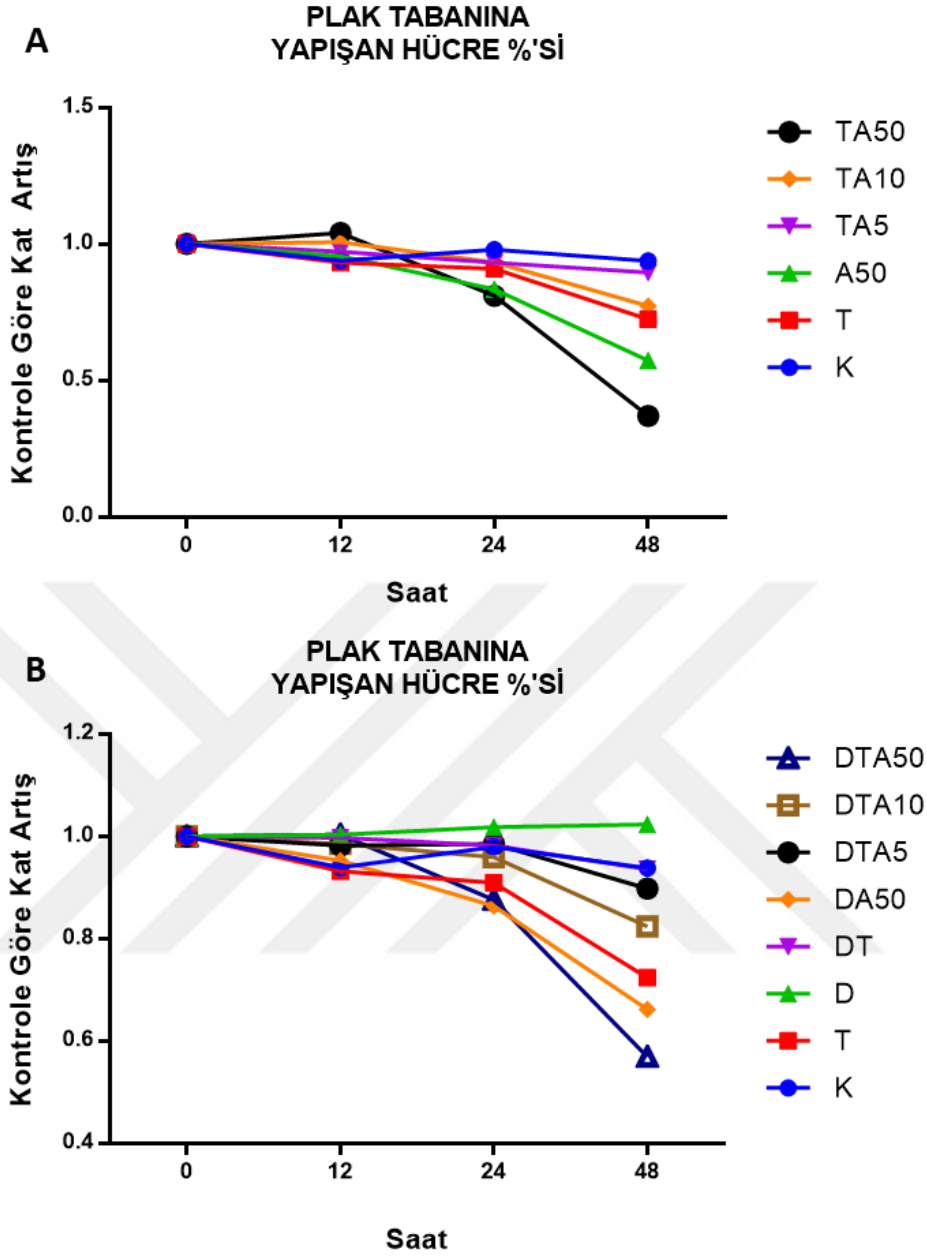
Şekil 20. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi. Tedavi uygulanmayan (K), TNF- α (T), vitamin D (D) veya vitamin D ve TNF- α (DT) uygulanan MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntüleri.



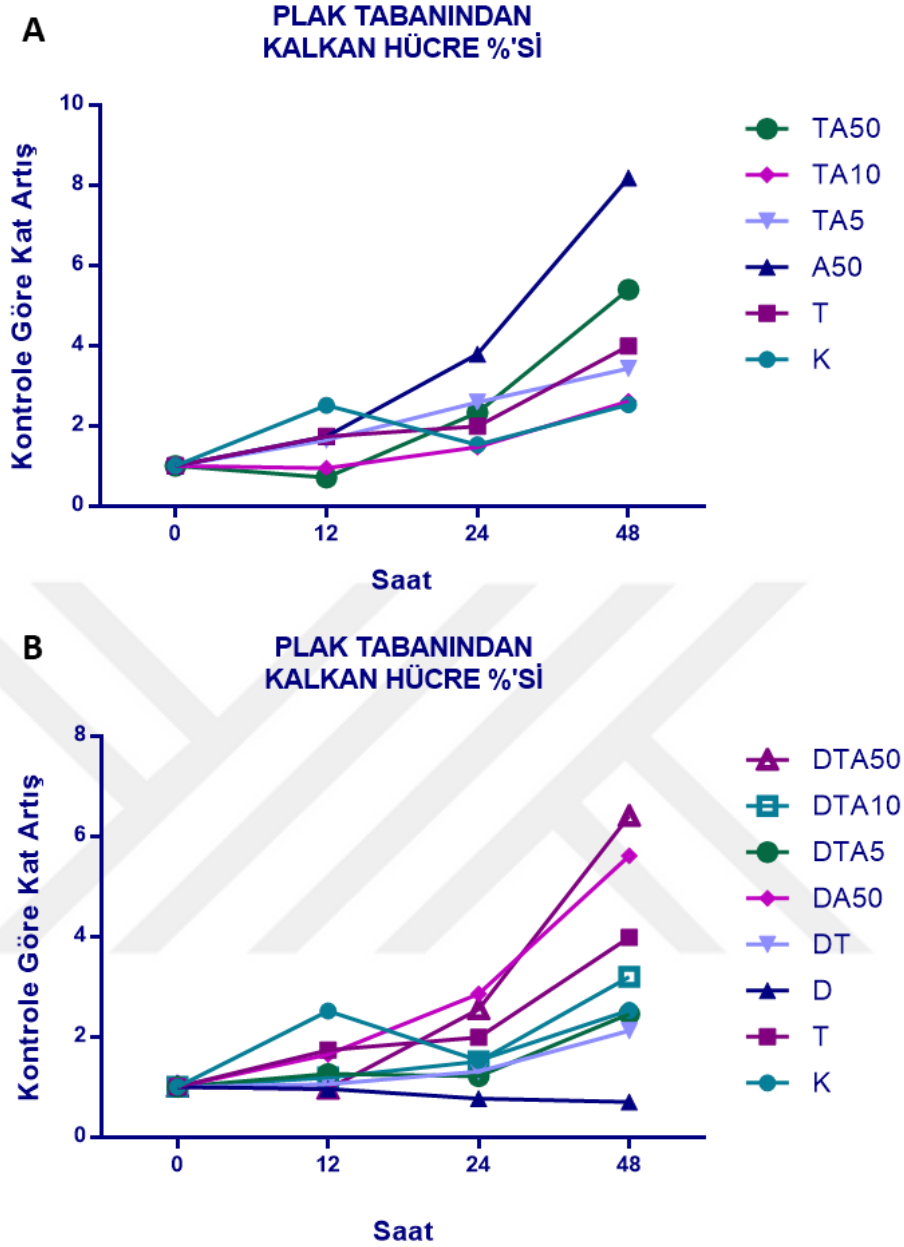
Şekil 21. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi. Vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntüleri.



Şekil 22. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi sonucu hesaplanan hücre sayıları. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntülemesi sonucu hesaplanan hücre sayılarının kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntülemesi sonucu hesaplanan hücre sayılarının kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları.



Şekil 23. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi sonucu hesaplanan plak tabanına yapışan hücre yüzdeleri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24., ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntülemesi sonucu plak tabanına yapışan hücre sayılarının kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24., ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntülemesi sonucu hesaplanan plak tabanına yapışan hücre sayılarının kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları.



Şekil 24. MG-63 hücrelerinin ZenCell Owl ile gerçek zamanlı mikroskopik görüntülemesi sonucu hesaplanan plak tabanından ayrılan hücre yüzdeleri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24., ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntülemesi sonucu plak tabanından ayrılan hücre sayılarının kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinin 0., 12., 24., ve 48. saatlerde ZenCell Owl ile elde edilen gerçek zamanlı görüntülemesi sonucu hesaplanan plak tabanından ayrılan hücre sayılarının kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları.

4.4. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Otofaji Yolağı Üzerine Etkileri

TNF- α ve atorvastatin, Tablo 1'de belirtildiğı gibi MG-63 hücreleri üzerine uygulandı. 24 saat sonunda uygulamaların otofajik yollarda rol alan ATG-4A, LC-3B ve Beclin-1 gen ekspresyonları üzerindeki etkileri incelendi.

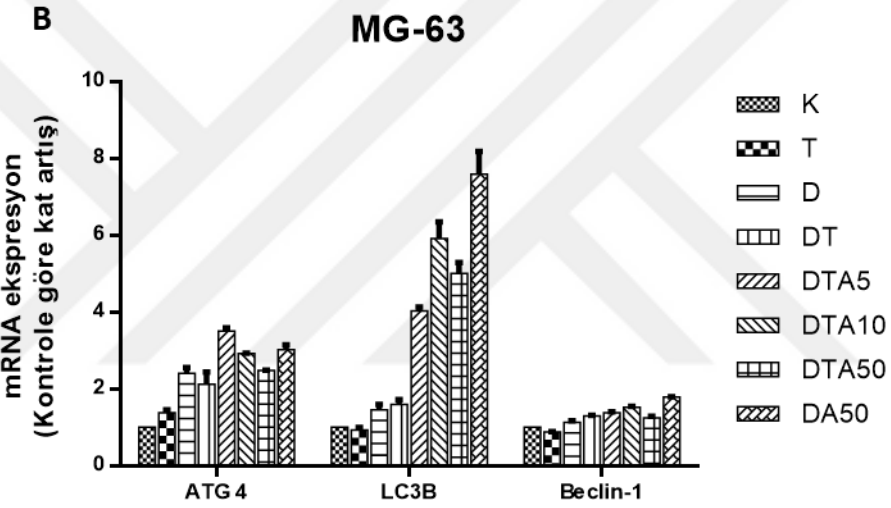
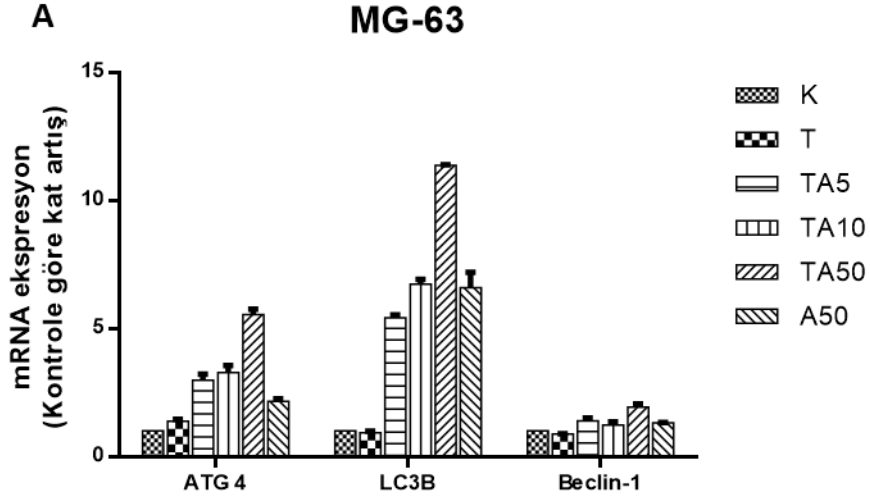
TNF- α 'nın ATG-4A ekspresyonu üzerinde tek başına etkisi izlenmedi. Ne var ki, tek başına ATG-4A ekspresyonunu anlamlı ölçüde arttıran yüksek doz atorvastatinin etkisini potansiyalize ederek iki kattan daha fazla yükselttiğı izlendi. Buna ek olarak, atorvastatinin diğere dozları ile birlikte verildiğinde ATG-4A miktarında önemli düzeyde artmaya neden olmuştur.

Benzer şekilde tek başına LC-3B ve Beclin-1 ekspresyonunu etkilemeyen TNF- α uygulaması, LC-3B ve Beclin-1 ekspresyonlarını anlamlı ölçüde arttıran yüksek doz atorvastatin etkisini daha da güçlendirmiştir. Düşük ve orta doz atorvastatinlerle birlikte uygulanan TNF- α , LC-3B ve Beclin-1 düzeylerinde anlamlı derecede yükselmeye neden olmuştur (Şekil 25A).

Vitamin D uygulaması TNF- α varlığında ATG-4A ve Beclin-1 düzeylerini arttırmış ($p < 0,005$) fakat LC-3B ekspresyonlarını etkilememiştir ($p = 1,000$).

Atorvastatin ve TNF- α 'nın birlikte uygulandığı tedavi grupları, ATG-4 ekspresyonunu doz ile doğru orantılı olarak arttırmasına rağmen bu gruplara D vitamini eklenmesiyle ATG-4 düzeyleri dozlarıyla ters orantılı olarak değışim göstermiştir. Vitamin D'nin TA5 kombinasyonuna eklenmesi, yalnız TA5 uygulamasıyla kıyaslandığında ATG-4 ekspresyonunda anlamlı artış sağlamış, ancak TA50 uygulamasının tek başına oluşturduğu ATG-4 artışını vitamin D uygulaması ciddi oranda azaltmıştır. Yüksek doz atorvastatinin tek başına oluşturduğu ATG-4 artışını, TNF- α (TA50) veya D vitamini (DA50) ilavesi daha da güçlendirirken, bu maddelerin hepsinin birden uygulanması (DTA50) tek başına A50 uygulanmasının oluşturduğu ATG-4A artışına neredeyse hiçbir katkı sağlamamıştır ($p = 1,000$).

TNF- α ve atorvastatin kombinasyonlarının (TA5, TA10 ve TA50) LC-3B üzerine olan etkisinin, bu gruplara D vitamini eklenmesiyle, düşük ve yüksek doz atorvastatinin bulunduğu gruplarda anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır ($p < 0,005$). Ancak kontrolle kıyaslandığına LC-3B ekspresyonlarındaki artış anlamlı ölçüde yüksektir.



Şekil 25. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki ATG-4, LC-3B ve Beclin-1 mRNA ekspresyonlarına etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte ATG-4, LC3B ve Beclin-1 genlerine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte ATG-4, LC3B ve Beclin-1 genlerine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

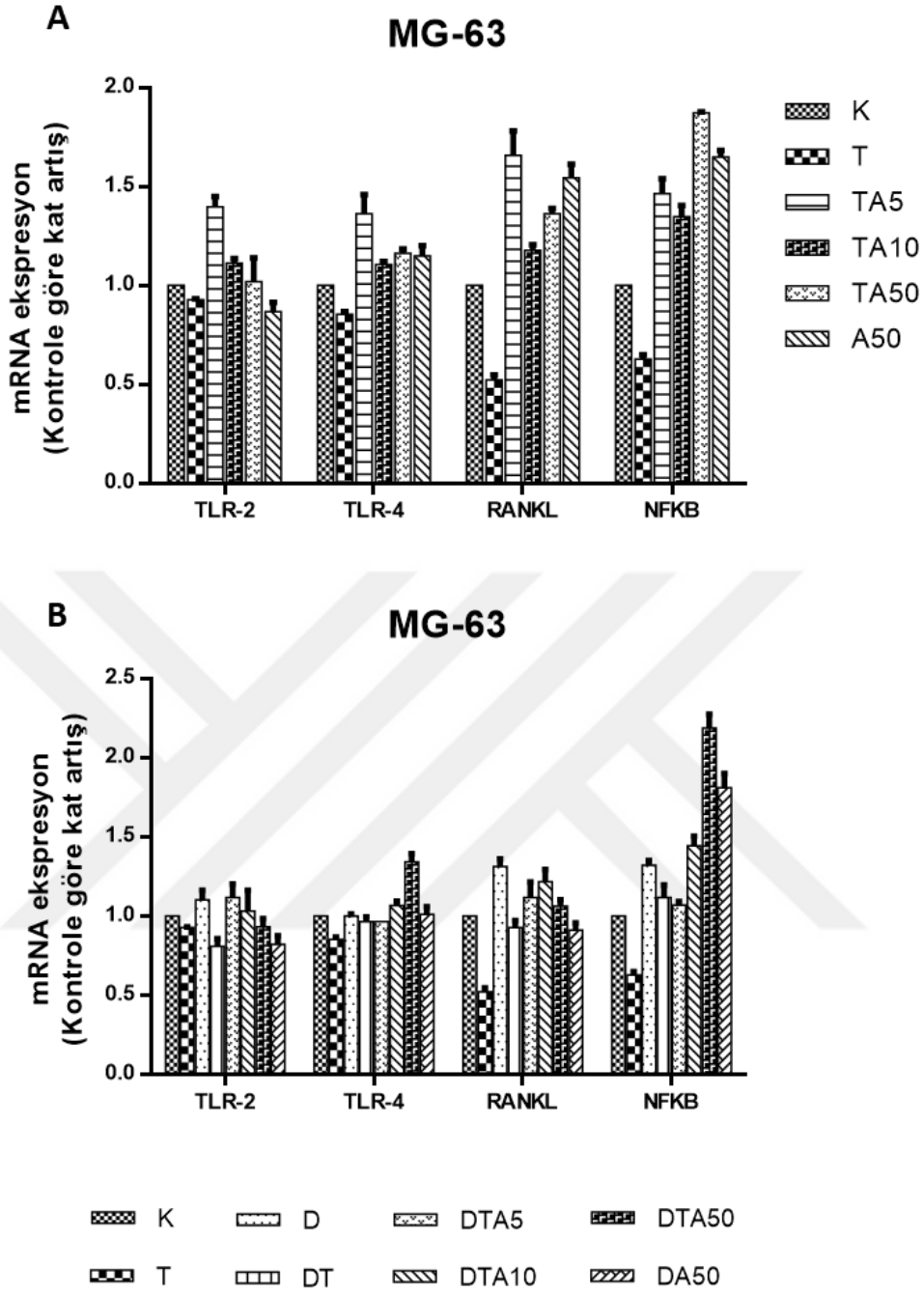
Yüksek doz atorvastatin ve TNF- α (TA50)'nın Beclin-1 ekspresyonunda oluşturduğu artış vitamin D ilavesi ile anlamlı ölçüde azalmıştır. Düşük doz atorvastatinin uygulandığı tedavi grubuna (TA5) D vitamini ilavesi Beclin-1 düzeylerinde değişime

neden olmazken, TA10 grubuna eklenmesi (DTA10) Beclin-1 ekspresyonlarının TA10'a kıyasla daha da artmasına neden olmuştur. Bunlara ek olarak, vitamin D, yüksek doz atorvastatinin tek başına oluşturduğu etkiyi arttırarak Beclin-1 seviyesini arttırmıştır (Şekil 25B).

4.5. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin TLR/ NF- κ B Sinyal Yolağı ve RANKL Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TLR-2 ekspresyon düzeylerinde sadece düşük doz atorvastatinin TNF- α ile kombinasyonunun (Tablo 1) anlamlı bir yükselmeye neden olmasına rağmen, atorvastatin dozlarının artması (TA10 ve TA50) TLR-2 seviyelerini düşürmüştür (Şekil26A). Tek başına TNF- α uygulaması TLR-4 ekspresyonunu anlamlı ölçüde azaltmış, tek başına yüksek doz atorvastatin bu genin anlamlı ölçüde artmasına neden olmuştur. 50 μ M atorvastatin TLR-4 ekspresyonunu arttırmış, TNF- α varlığından bu artış hafif ama anlamlı ölçüde azalmıştır. TNF- α uygulanmış hücrelere düşük doz atorvastatin eklenmesi TLR-4 düzeylerini kontrolle karşılaştırıldığında önemli seviyede arttırmıştır. TNF- α ile 10 μ M atorvastatinin kombinasyonu kontrolle farklılık göstermemiştir (Şekil 26A).

TNF- α uygulaması sonrasında RANKL ekspresyonunda azalma izlenmiştir. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tek başına yüksek doz atorvastatin uygulaması RANKL ekspresyonunu arttırmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yüksek doz atorvastatin ve TNF- α kombinasyonu, yüksek doz atorvastatinin tek başına oluşturduğu etkiyi azaltmış ancak kontrolle karşılaştırıldığında hala anlamlı düzeyde yüksek RANKL ekspresyonuna neden olduğu saptanmıştır. En yüksek RANKL düzeyleri, TNF- α ile 5 μ M atorvastatin (TA5) uygulamasından sonra izlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 26A).



Şekil 26. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki TLR-2, TLR-4, RANKL ve NF κ B mRNA ekspresyonlarına etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte TLR-2, TLR-4, RANKL ve NF κ B genlerine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte TLR-2, TLR-4, RANKL ve NF κ B genlerine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

TNF- α tek başına NF- κ B düşüşüne neden olurken, atorvastatin ile kombinasyonları NF- κ B gen ekspresyonunu kontrole göre arttırmıştır ($p<0,001$). Tek başına yüksek doz atorvastatin uygulaması, düşük ve orta düzey atorvastatin ile TNF- α kombinasyonlarının (TA5 ve TA10) oluşturduğu NF- κ B artışından anlamlı derecede daha yüksek etki göstermiştir. Yüksek doz atorvastatine TNF- α eklenmesi NF- κ B üretimini daha da güçlendirmiştir ($p=0,001$) (Şekil 26A).

TA5 uygulanan ortama vitamin D'nin eklenmesi, TA5'in arttırdığı TLR-2 düzeylerini anlamlı düzeyde azaltarak kontrole benzer seviyelere getirmiştir. Benzer şekilde, diğer TNF- α ve atorvastatin kombinasyonlarına ve tek başına TNF- α ve tek başına yüksek doz atorvastatin uygulanan gruplara D vitamini ilavesi TLR-2 ekspresyonlarını düşürmüştür ancak bu düşüş anlamlı bulunmamıştır.

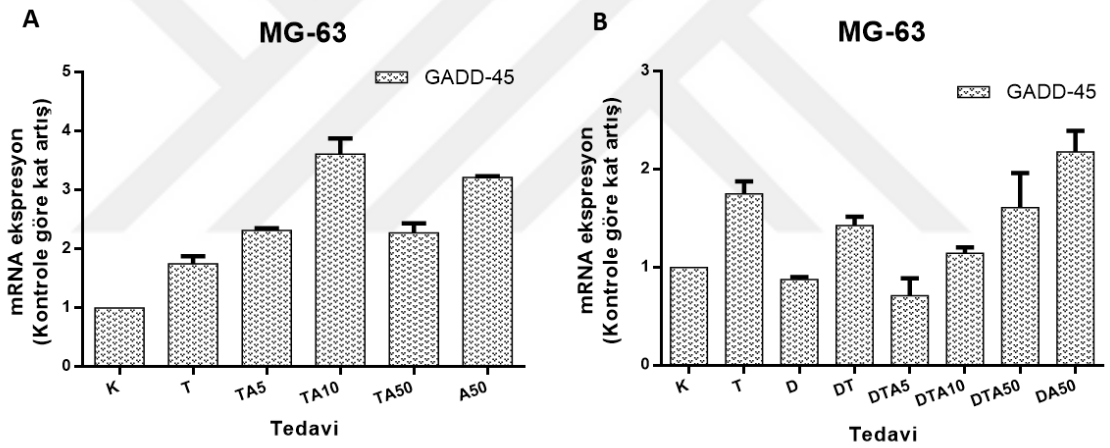
Tablo 1'de gösterildiği gibi deney gruplarına D vitamini ilavesi TLR-4 ekspresyonu açısından tüm grupları (DTA50 hariç) kontrole aynı seviyeye getirmiştir. İlginç şekilde DTA50 uygulanan hücrelerde TLR-4 ekspresyonu anlamlı ölçüde yükselmiştir.

Tek başına vitamin D'nin RANKL ekspresyonu üzerinde protein ekspresyonunun artışı yönünde anlamlı etkisinin olduğu görülmüştür. Ancak RANKL üzerinde anlamlı artışa neden olan A50, TA5 ve TA50 gruplarına vitamin D eklenmesi bu genin ekspresyonunu azaltarak kontrol grubu ile olan istatistiksel farkını ortadan kaldırmıştır. Tersine RANKL üretimini değiştirmeyen TA10 grubunda ise anlamlı artışa neden olmuştur.

Tek başına vitamin D uygulaması NF- κ B seviyelerinde artışa neden olurken, TNF- α ile birlikte verildiğinde bu etki ortadan kalkmıştır. D vitamini A50, TA10 ve TA50 gruplarına eklendiğinde bunların NF- κ B ekspresyonlarını yükseltmesi üzerindeki etkilerini arttırmıştır, ancak belirgin artış TA50 ile DTA50 grupları arasında gözlenmiştir. Düşük doz atorvastatinin TNF- α ile uygulandığı grupta kontrole kıyasla anlamlı NF- κ B artışı gözlenmesine rağmen bu kombinasyona vitamin D eklenmesi NF- κ B ekspresyonunu düşürerek kontrole aynı düzeylere getirmiştir (Şekil 26B).

4.6. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Apoptoz Üzerine Etkileri

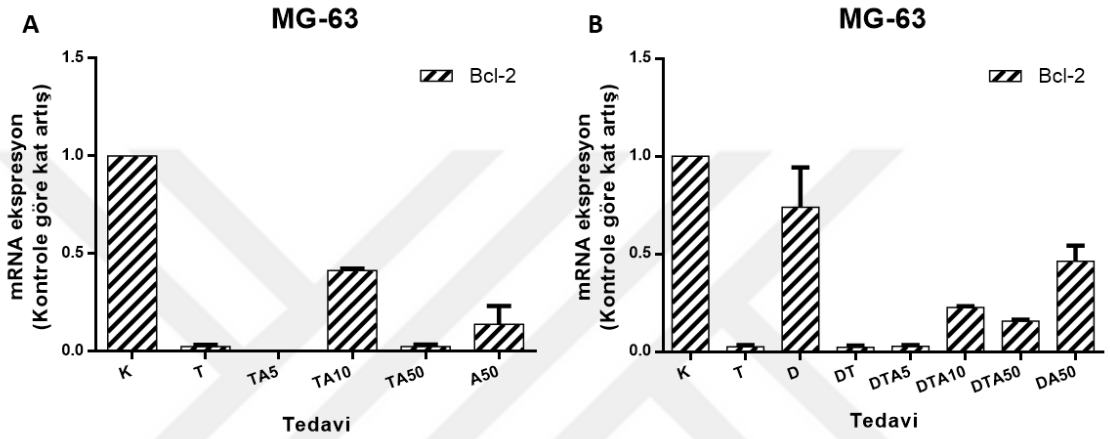
Kontrol grubu ile kıyaslandığında TNF- α ve yüksek doz atorvastatin tek başına uygulandığında GADD-45 ekspresyonunu anlamlı ölçüde arttırmış ancak, ikisinin bir arada verilmesi 50 μ M atorvastatinin tek başına oluşturduğu etkiyi anlamlı ölçüde azaltmıştır; yine de TA50 grubunun GADD-45 üzerindeki etkisi kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur. En yüksek ekspresyon, TA10 grubunda elde edilmiş ancak bu tedavinin GADD-45 üzerindeki etkisi A50 uygulanan deney grubu ile benzerlik göstermiştir. TNF- α 'nın düşük veya yüksek doz atorvastatin ile birlikte uygulanması GADD-45 seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir yükselmeye neden olmuş olsa da bu iki grubun GADD-45 ekspresyonu üzerinde oluşturduğu etkiler arasında fark bulunamamıştır (Şekil 27A).



Şekil 27. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki GADD-45 mRNA ekspresyonuna etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte GADD-45 genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte GADD-45 genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

Tablo 1'de gösterilen 2-6. deney gruplarına D vitamini ilavesi, bu grupların hepsinde daha önceden yüksek seyreden (\sim 2-4 kat artış) GADD-45 seviyelerinin

düşmesine (~1,5-2 kat artış) neden olmuştur. Tek başına vitamin D uygulaması GADD-45 düzeylerini kontrole göre değiştirmemiştir. T, TA5 ve TA10 deney gruplarına D vitamini eklenmesi bunların daha önce oluşturduğu anlamlı yüksek GADD-45 ekspresyonunu baskılayarak kontrol grubu ile benzer seviyelere düşürmüştür ($p=0,214$; $p=1,000$; $p=1,000$). Ancak vitamin D'nin A50 ve TA50 gruplarında GADD-45 ekspresyonları üzerine etkisi olmadığı izlenmektedir (Şekil 27B).



Şekil 28. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki Bcl-2 mRNA ekspresyonuna etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte Bcl-2 genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte Bcl-2 genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

TNF- α ve/veya atorvastatinin farklı dozları ile 24 saat muamele edilen MG-63 hücrelerinde Bcl-2 gen ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur ($p<0,005$) (Şekil 28A).

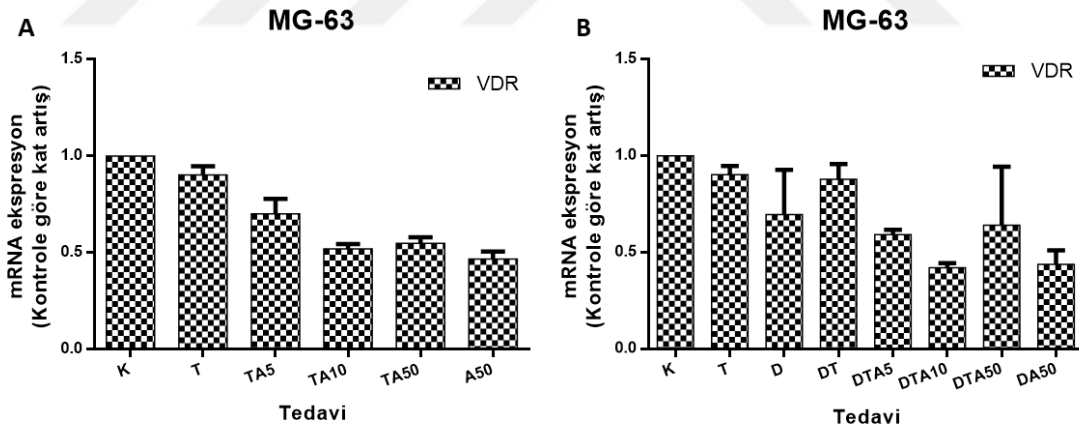
Vitamin D uygulaması MG-63 hücrelerindeki Bcl-2 ekspresyonlarına kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir değişikliğe neden olmamış ($p>0,05$), TNF- α ve/veya atorvastatinin bulunduğu ortamlara eklendiğinde ise bu uygulamaların vitamin D olmadan oluşturduğu etkiyi DTA50 ve DA50 grupları haricinde etkilememiştir. Vitamin

D ilavesinden sonra tüm tedavi gruplarında gözlemlenen Bcl-2 ekspresyonundaki azalma kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 28A).

4.7. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin VDR Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Tablo 1'de gösterilen 2-6. deney gruplarının hepsinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında VDR düzeylerinde anlamlı derecede azalma görülmüştür. TA10, TA50 ve A50 uygulaması VDR ekspresyonunu kontrole kıyaslandığında ~%50 oranında azaltmıştır (Şekil 29A).

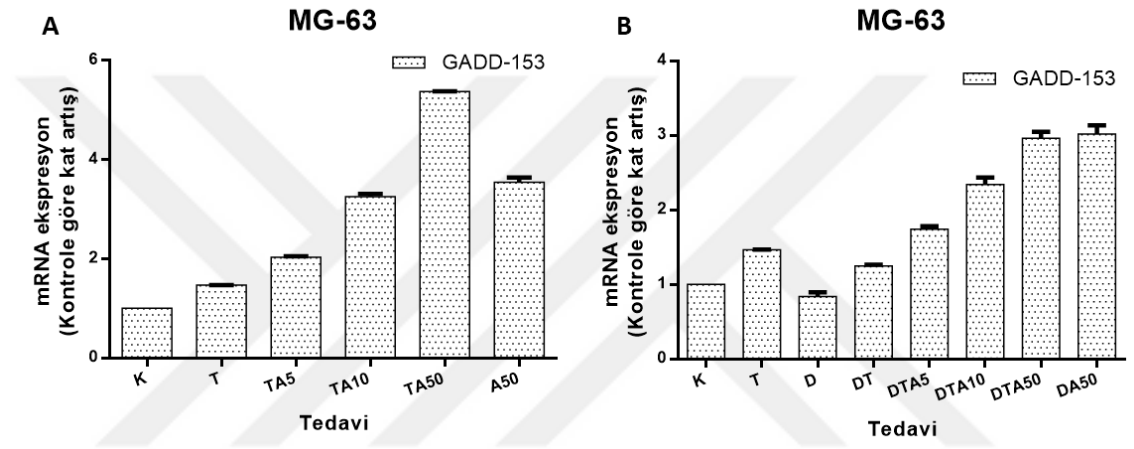
Tek başına vitamin D uygulaması MG-63 hücrelerindeki VDR ekspresyon düzeylerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. DTA50 grubu hariç tek başına yüksek doz atorvastatinin ve atorvastatinin düşük ve orta dozlarının TNF- α ile uygulandığı gruplara vitamin D ilavesi bu grupların daha önce düşürdüğü VDR ekspresyonunu daha da baskılamıştır ($p < 0,005$) (Şekil 29B).



Şekil 29. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki VDR mRNA ekspresyonuna etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte VDR genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte VDR genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

4.8. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Endoplazmik Retikulum Stres Oluşumu Üzerine Etkileri

TNF- α ve atorvastatinin farklı dozlarının birlikte uygulandığı tedavi gruplarında GADD-153 ekspresyonu atorvastatin dozuna bağımlı şekilde artmış ve bu artışlar kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). TNF- α , tek başına anlamlı düzeyde GADD-153 artışına neden olan yüksek doz atorvastatinin etkisini birlikte uygulandığında önemli ölçüde güçlendirmiştir (Şekil 30A).



Şekil 30. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki GADD-153 mRNA ekspresyonuna etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte GADD-153 genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte GADD-153 genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

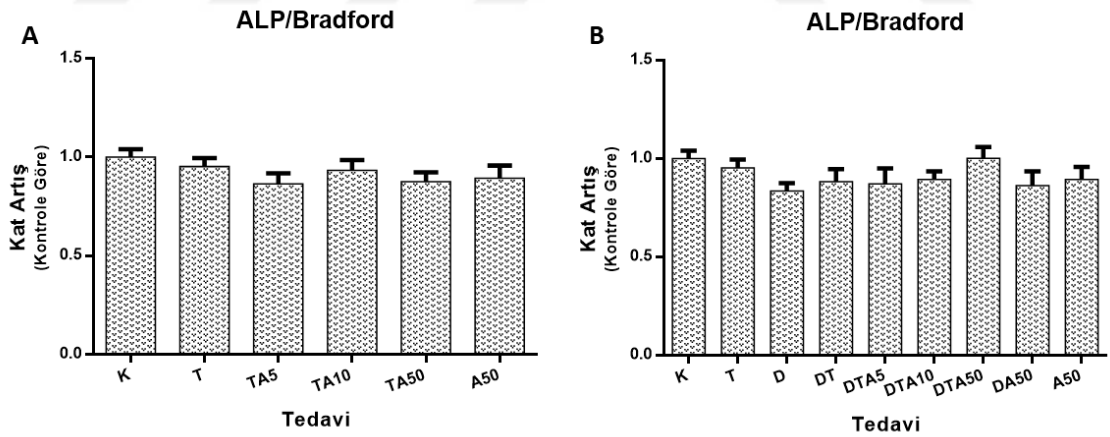
Tablo 1'de tanımlanan 2-6 numaralı tedavi grupları ile muamele edilen MG-63 hücrelerindeki GADD-153 ekspresyonları, bu gruplara vitamin D eklenmesiyle kendi içlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere uğramıştır. GADD-153 ekspresyonlarının genel olarak azalma göstermesine neden olan D vitamini ilavesi, TNF- α ve 50 μ M atorvastatinin GADD-153 üzerinde birlikte oluşturduğu etkiyi neredeyse yarı yarıya düşürmüştür. Yine de kontrolle kıyaslandığında DTA5, DTA10, DTA50 ve

DA50'nin GADD-153 ekspresyonu üzerindeki etkisi hala anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 30B).

4.9. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Matriks Proteinleri Üzerine Etkileri

Atorvastatin, TNF- α ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerinin ALP aktivitesi üzerine olan etkilerini değerlendirilmek için, 48 saat bu maddelerin farklı kombinasyonları ile muamele edilen MG-63 hücrelerinin besiyerlerinde ALP kiti ile spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Aktivitenin protein başına düşen miktarını değerlendirmek için aynı besiyerleri örneklerinden Bradford kiti ile total protein konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar kontrol grubuna göre kat artış olarak değerlendirildi.

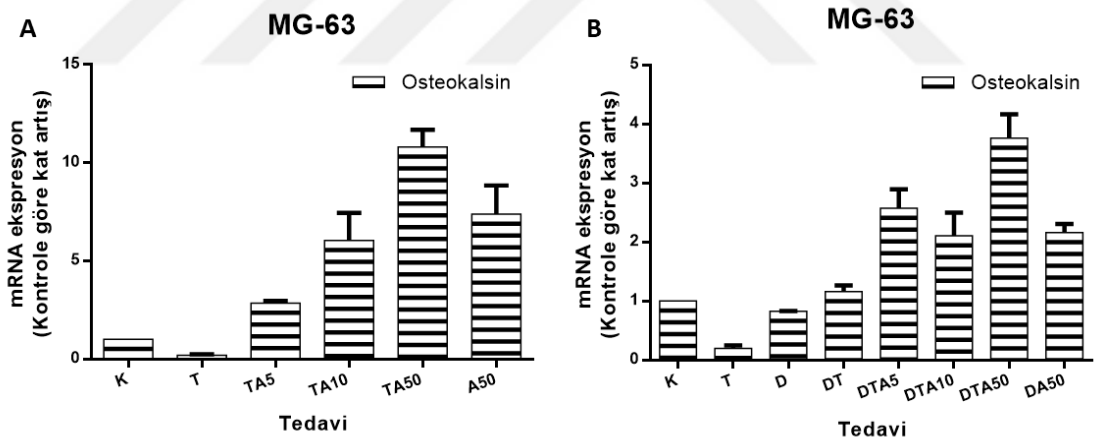
Elde edilen veriler doğrultusunda tedavi gruplarının ALP aktiviteleri arasında kontrol grubu kıyaslandığında hafif bir azalma izlense de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Benzer şekilde atorvastatinin tek başına ve TNF ve/veya D vitamini ile birlikte uygulandığı tedavi grupları da kendi aralarında istatistiksel olarak farklılık göstermedi (Şekil 31).



Şekil 31. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulamalarının MG-63 hücrelerinin ALP aktivitesi üzerine etkisi. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 48. saatte protein başına düşen ALP aktivite düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 48. saatte protein başına düşen ALP aktivite düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

A50, TA10 ve TA50 gruplarında osteokalsin ekspresyonlarındaki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). TNF- α ile birlikte uygulanan atorvastatin konsantrasyonlarının osteokalsin ekspresyonları üzerindeki etkisi doza bağımlı olarak artmaktadır. TNF- α ile 5 μ M atorvastatin uygulanan hücrelerdeki osteokalsin ekspresyonlarında kontrol grubu ile kıyaslandığında ~3 kat artış görülmüş, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlenmiştir ($p = 0,114$). Benzer şekilde osteokalsin ekspresyonunda azalmaya neden olan TNF- α uygulamasının etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 1,000$) (Şekil 32A).

D vitamini kontrol grubu ile karşılaştırdığında osteokalsin ekspresyonlarında anlamlı değişime neden olmamıştır. Ancak atorvastatinin yüksek dozunun ve TNF- α ile birlikte farklı konsantrasyonlarda uygulanan atorvastatinin osteokalsin ekspresyonları üzerinde oluşturduğu güçlü uyarıcı etkisini vitamin D uygulaması anlamlı ölçüde azaltmıştır. Vitamin D uygulamasından sonra, kontrol grubu ile kıyaslandığında osteokalsin ekspresyonları sadece DTA50 tedavisi uygulanan grupta anlamlı yükseklik göstermiştir ($p < 0,001$) (Şekil 32B).



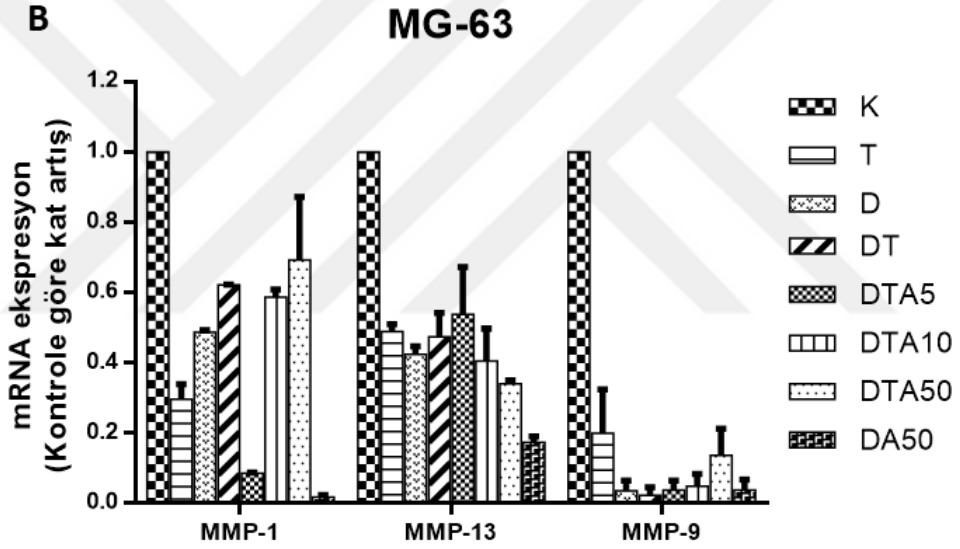
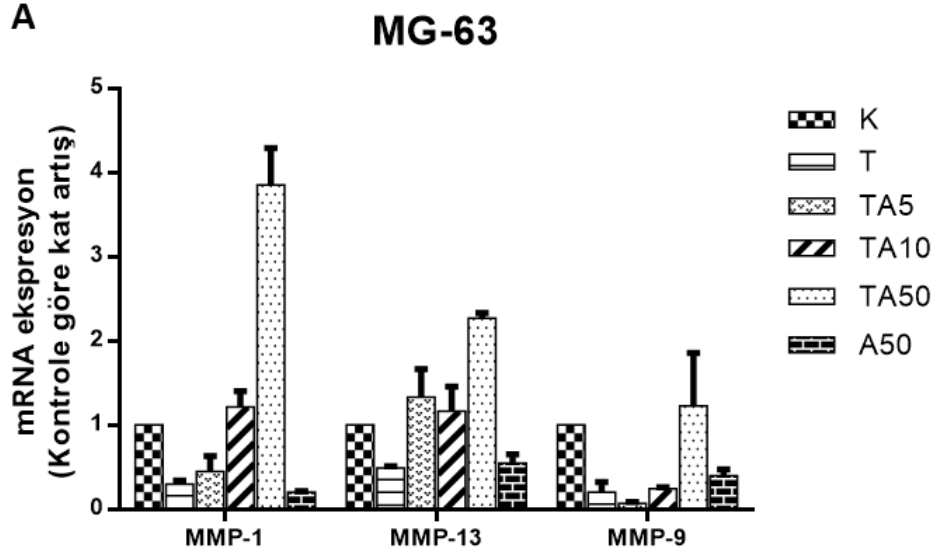
Şekil 32. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki osteokalsin mRNA ekspresyonuna etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte osteokalsin genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte osteokalsin genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

4.10. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Matriks Yıkımı Üzerine Etkileri

TNF- α ile birlikte uygulanan 5 μ M atorvastatin MG-63 hücrelerindeki MMP-1 ekspresyonlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında ~%50 oranında azaltmıştır ($p<0,001$). MMP-1 ekspresyonlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ~%80 oranında azalmasına ($p<0,001$) neden olan 50 μ M atorvastatin tedavisi, TNF- α ile birlikte uygulandığında MMP-1 ekspresyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ~4 kat artışına neden olmuştur ($p<0,001$) (Şekil 33A). Tedaviye vitamin D eklenmesi atorvastatin ve TNF- α ile oluşan ekspresyon artışını tersine çevirerek kontrol grubu ile kıyaslandığında azalmasına neden olmuştur (Şekil 33B).

MMP-1 ekspresyonlarında görülen etkiye benzer şekilde, kontrol grubu ile kıyaslandığında MMP-13 ekspresyonlarında ~%50 azalmaya neden olan ($p=0,024$) 50 μ M atorvastatin tedavisi, TNF- α ile birlikte uygulandığında MMP-13 ekspresyonlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ~2-2,5 kat artmasına neden olmuştur ($p<0,001$) (Şekil 33A). Tedavilere vitamin D eklenmesi, vitamin D'nin uygulandığı tüm çalışma gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MMP-13 ekspresyonlarını anlamlı derecede azaltmıştır ($p<0,050$) (Şekil 33B).

Atorvastatin ve/veya TNF- α uygulanan tedavi gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azalmış (TA50 hariç) MMP-9 ekspresyon düzeyleri ($p<0,050$), D vitamininin eklenmesiyle daha da düşmüştür (Şekil 33).

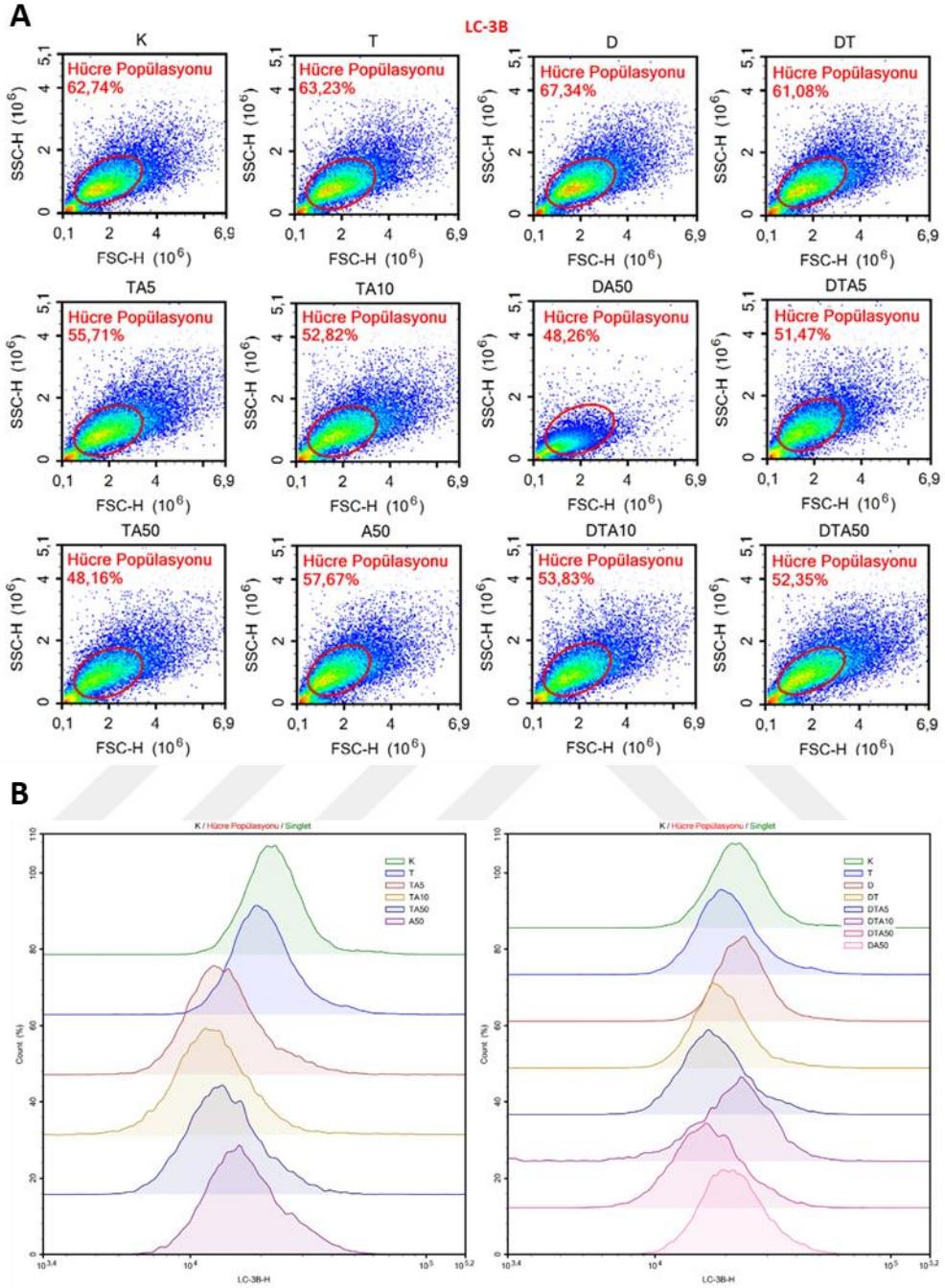


Şekil 33. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki MMP-1, MMP-13 ve MMP-9 mRNA ekspresyonuna etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte MMP-1, MMP-13 ve MMP-9 genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte MMP-1, MMP-13 ve MMP-9 genine ait mRNA ekspresyonlarının Aktin- β (internal kontrol geni) ile normalize edildikten sonraki düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

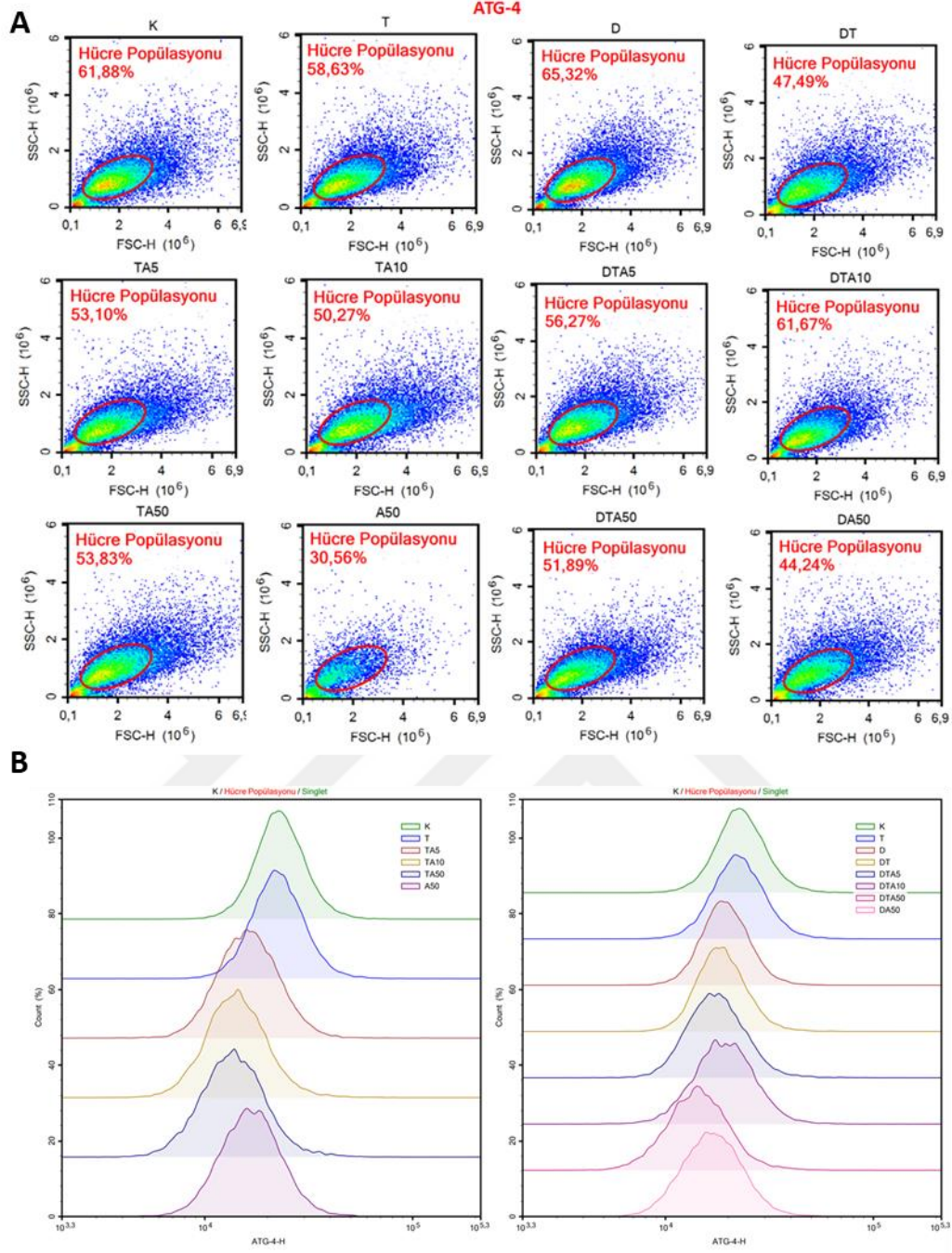
4.11. Akım Sitometre Analizleri

Tablo 1’de gösterilen tedavi grupları ile 24 saat muamele edilen MG-63 hücreleri, süre sonunda plaklardan kaldırılıp fikse edildikten sonra antikorlarla boyandı (Bkz Metod 3.9.2). Akım sitometre cihazında okutulan örnekler NovoExpress versiyon 1.3.0 programında analiz edildi. Her antikora spesifik olarak kontrol gruplarında FSC/SSC grafikleri çizilerek hücre popülasyonunun kapılması yapıldı (Şekil 34A-36A, 38A, 40A, 42A). Ardından FSC-H/FSC-A grafiği oluşturularak lazerden yapışarak geçen hücreler elimine edilmesi için ikinci bir kapılama işlemi uygulandı (Singlet Analizi). Antikora spesifik olarak kontrol gruplarında çizilmiş olan kapılar o antikora ait diğer tedavi gruplarına da uygulandı. MFI değerleri (Şekil 37, 39, 41, 43) ile birlikte histogram grafikleri (Şekil 34B-36B, 38B, 40B, 42B) çizilerek protein ekspresyon düzeyleri incelendi.

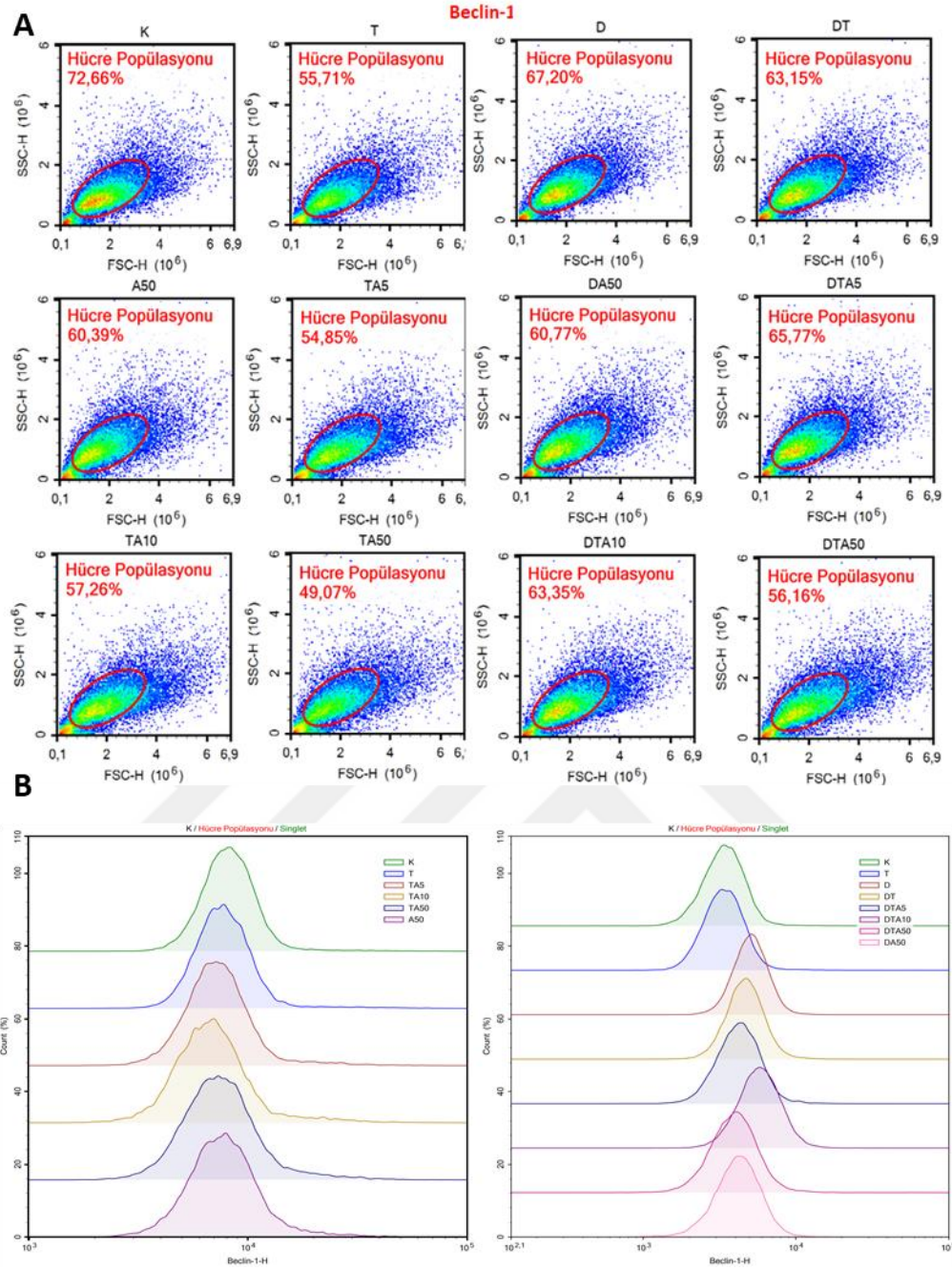
4.11.1. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Otofaji Yoluğı Üzerine Etkileri



Şekil 34. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde LC-3B protein ekspresyonu. TNF- α , vitamin D ve 5, 10 ve 50 μ M atorvastatinin farklı kombinasyonları ile muamele edilen MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analiziyle LC-3B protein ekspresyonunun gösterilmesi. **A:** Hücre popülasyonunun belirlenmesi. **B:** LC-3B proteininin MFI düzeylerindeki değişimin histogram grafiği.



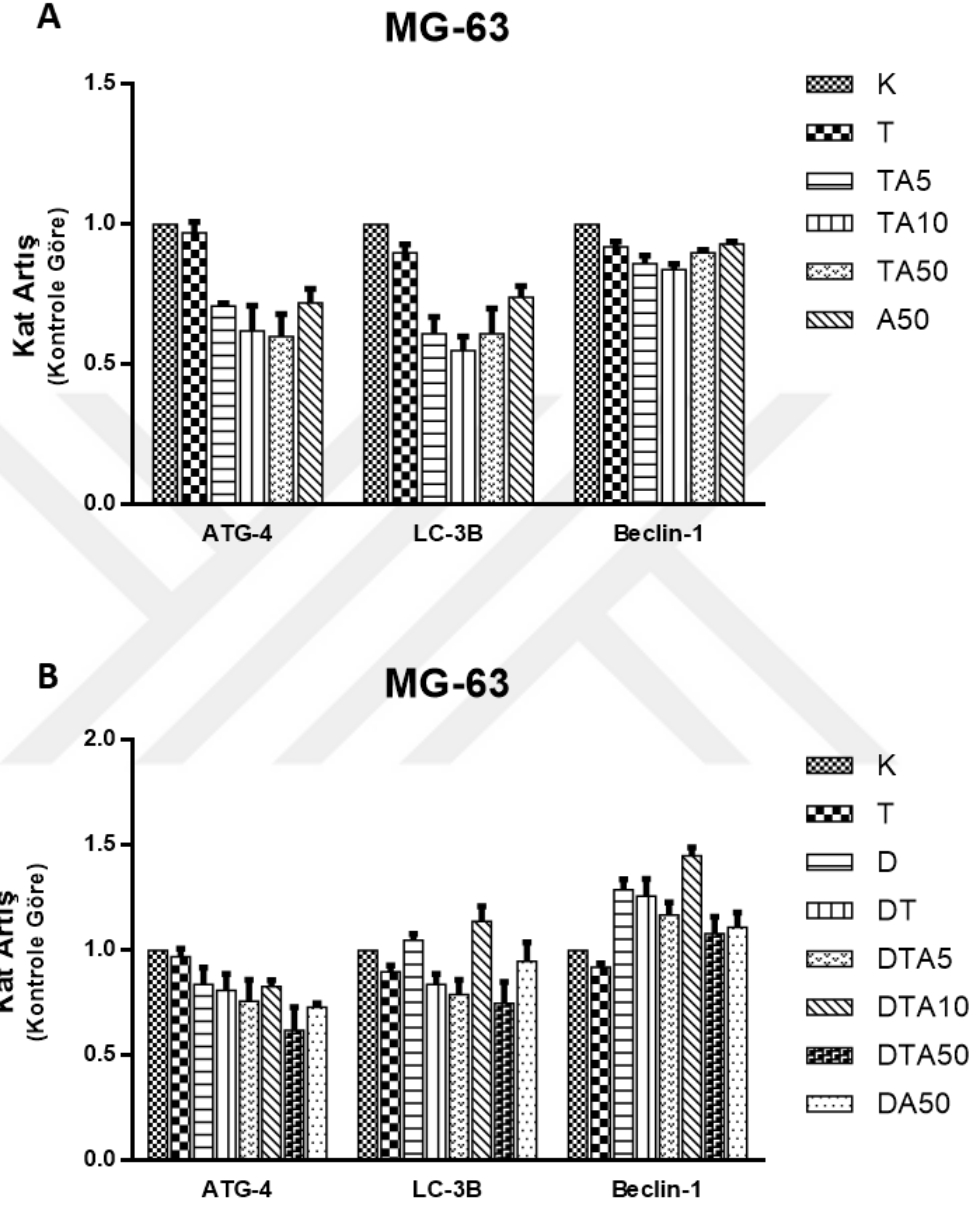
Şekil 35. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde ATG-4 protein ekspresyonu. TNF- α , vitamin D ve 5, 10 ve 50 μ M atorvastatinin farklı kombinasyonları ile muamele edilen MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analiziyle ATG-4 protein ekspresyonunun gösterilmesi. **A:** Hücre popülasyonunun belirlenmesi. **B:** ATG-4 proteininin MFI düzeylerindeki değişimin histogram grafiği.



Şekil 36. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde beclin-1 protein ekspresyonu. TNF- α , vitamin D ve 5, 10 ve 50 μ M atorvastatinin farklı kombinasyonları ile muamele edilen MG-63 hücrelerinde 24 saatte akım sitometre analiziyle beclin-1 protein ekspresyonunun gösterilmesi. **A:** Hücre popülasyonunun belirlenmesi. **B:** Beclin-1 proteininin MFI düzeylerindeki değişimin histogram grafiği.

TNF- α ve atorvastatinin MG-63 hücrelerindeki otofajik yollarda yer alan proteinler üzerindeki 24 saatlik etkisi akım sitometre analizleriyle incelendi. Elde edilen sonuçlara göre bu maddelerin tek başına ve beraber uygulanması ATG-4A, LC-3B ve

Beclin-1 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek oranda uyarılmasına rağmen, protein ekspresyon düzeylerini kısa dönemde arttırmadığı izlendi (Şekil 37A).



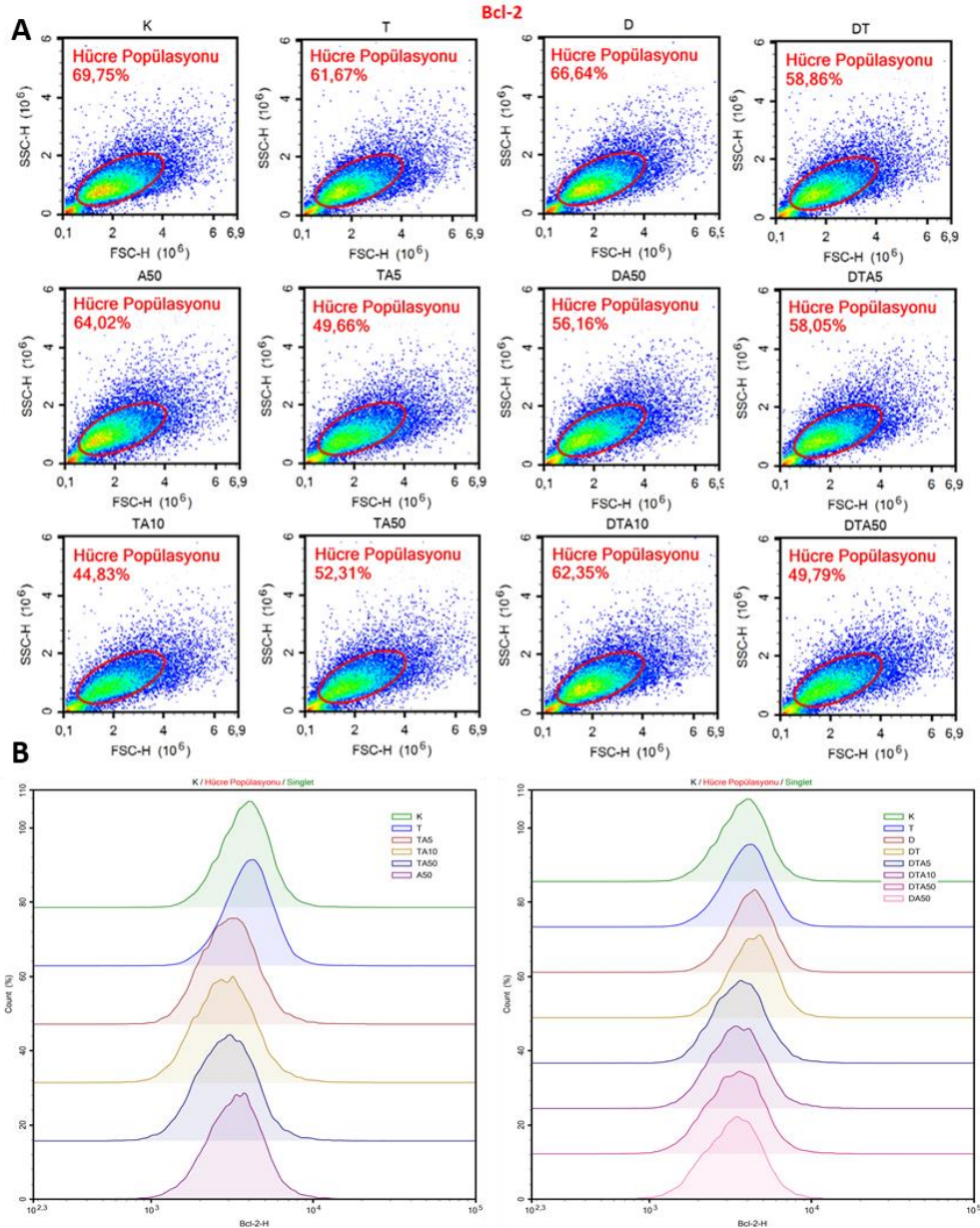
Şekil 37. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki ATG-4, LC-3B ve beclin-1 protein ekspresyonlarına etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analizi ile ATG-4, LC-3B ve beclin-1 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analizi ile ATG-4, LC-3B ve beclin-1 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna (K) göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

Deney gruplarına D vitamini eklenmesi ATG-4A protein ekspresyonları üzerinde farklılık oluşturmadi. Tek başına LC-3B ve Beclin-1 protein düzeylerinin artmasına neden olan vitamin D'nin, 10 µM atorvastatin ve TNF-α'nın beraber uygulandığı deney gruplarında ise kontrole göre daha önce düşük olan protein ekspresyon düzeylerini tek başına vitamin D'nin gösterdiği etkiden daha yüksek seviyelere çıkardığı gözlendi (Şekil 37B).



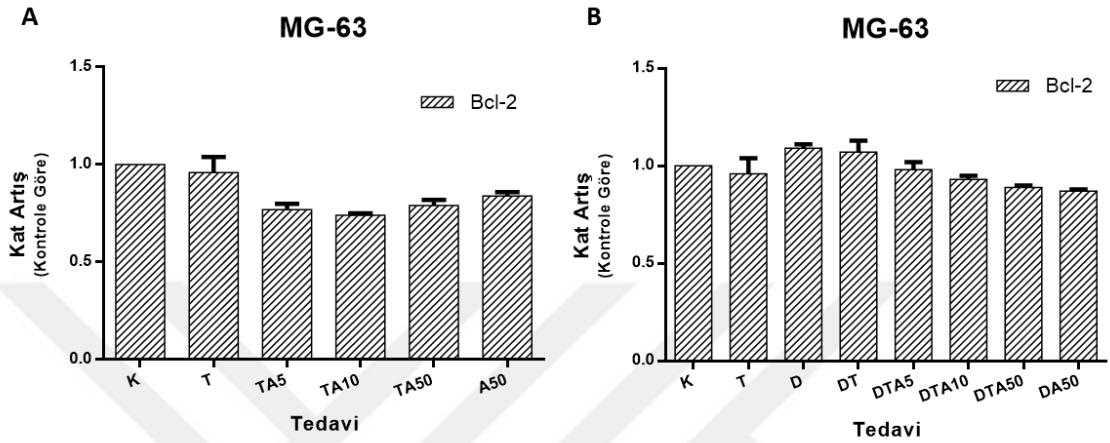
4.11.2. TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Apoptoz Yoluğ Üzerine Etkileri

TNF- α ve atorvastatinin tek başlarına ve birlikte uygulandığı 24 saatlik deney gruplarında, 50 μ M atorvastatin ve atorvastatinin farklı konsantrasyonlarının TNF- α ile kombinasyonu Bcl-2 protein ekspresyonlarını kısa dönemde kontrole kıyasla azaltmıştır (Şekil 39A).

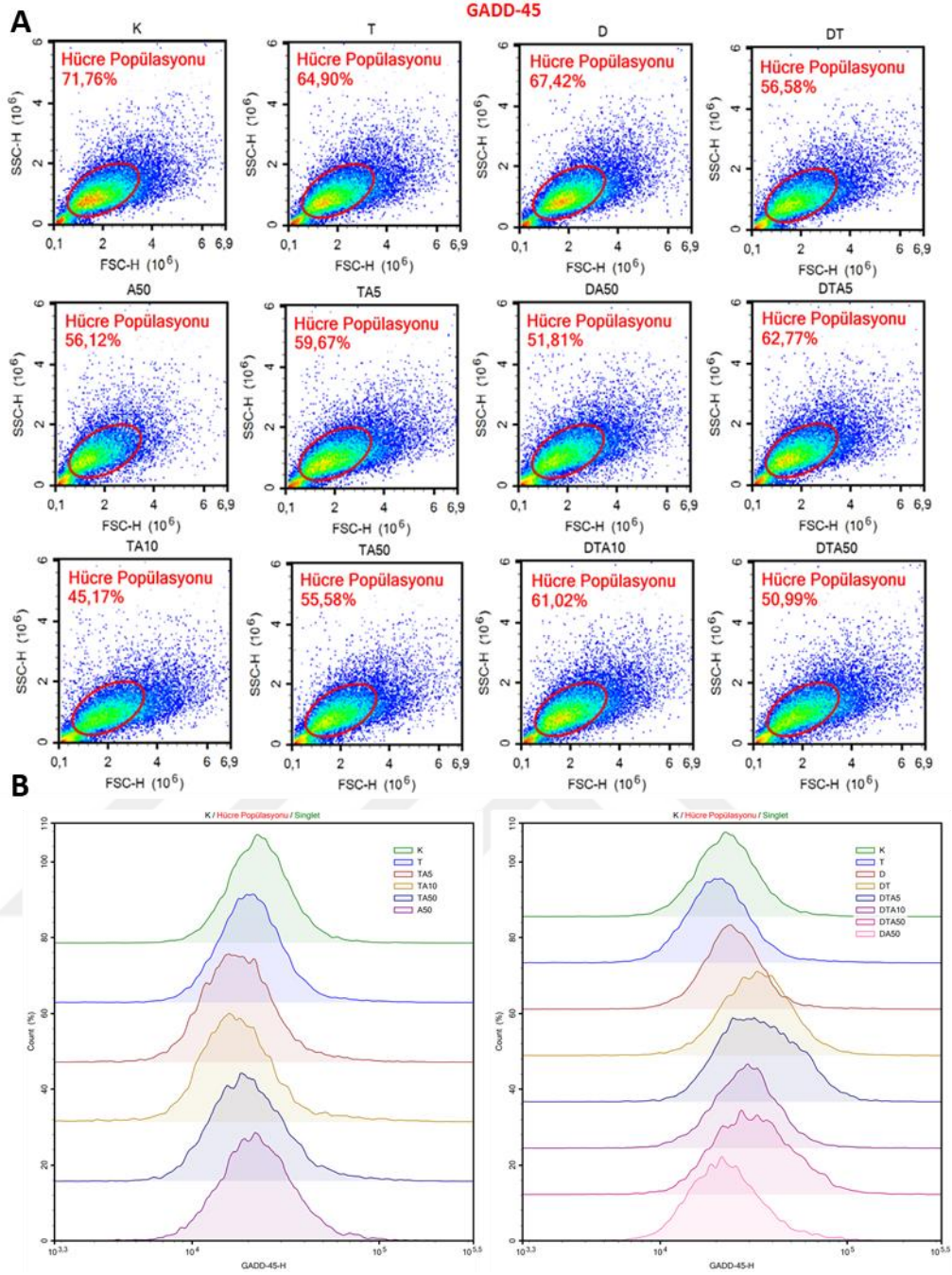


Şekil 38. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde Bcl-2 protein ekspresyonu. TNF- α , vitamin D ve 5, 10 ve 50 μ M atorvastatinin farklı kombinasyonları ile muamele edilen MG-63 hücrelerinde 24 saatte akım sitometre analiziyle Bcl-2 protein ekspresyonunun gösterilmesi. **A:** Hücre popülasyonunun belirlenmesi. **B:** Bcl-2 proteininin MFI düzeylerindeki değışimin histogram grafiğı.

Tedaviye D vitamininin eklenmesi, yüksek doz atorvastatinin ve atorvastatinin farklı konsantrasyonlarının TNF- α ile beraber uygulandığı deney gruplarında kontrole göre daha düşük seviyelerde seyreden Bcl-2 protein ekspresyonlarını arttırarak kontrol grubundaki sentez düzeylerine yükseltmiştir (Şekil 39B).



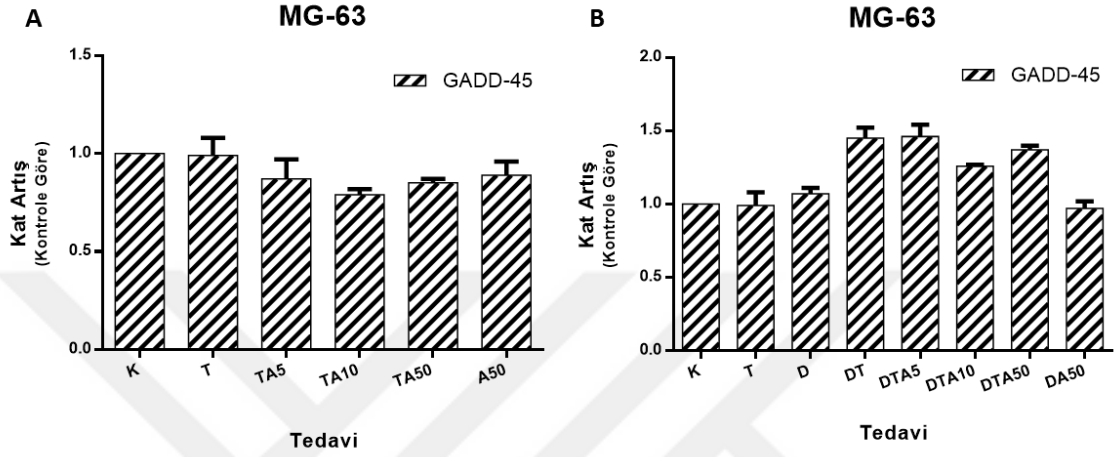
Şekil 39. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki Bcl-2 protein ekspresyonlarına etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analizi ile Bcl-2 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol (K) grubuna göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analizi ile Bcl-2 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol (K) grubuna göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.



Şekil 40. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde GADD-45 protein ekspresyonu. TNF- α , vitamin D ve 5, 10 ve 50 μ M atorvastatinin farklı kombinasyonları ile muamele edilen MG-63 hücrelerinde 24 saatte akım sitometre analiziyle GADD-45 protein ekspresyonunun gösterilmesi. **A:** Hücre popülasyonunun belirlenmesi. **B:** GADD-45 proteininin MFI düzeylerindeki değişimin histogram grafiği.

Tablo 1’de gösterilen 2-6. tedavi gruplarının MG-63 hücrelerindeki GADD-45 protein ekspresyonuna 24 saatlik etkisi sadece 5 ve 6. gruplarda saptanmış ve kontrolle kıyaslandığında daha düşük bulunmuştur (Şekil 41A).

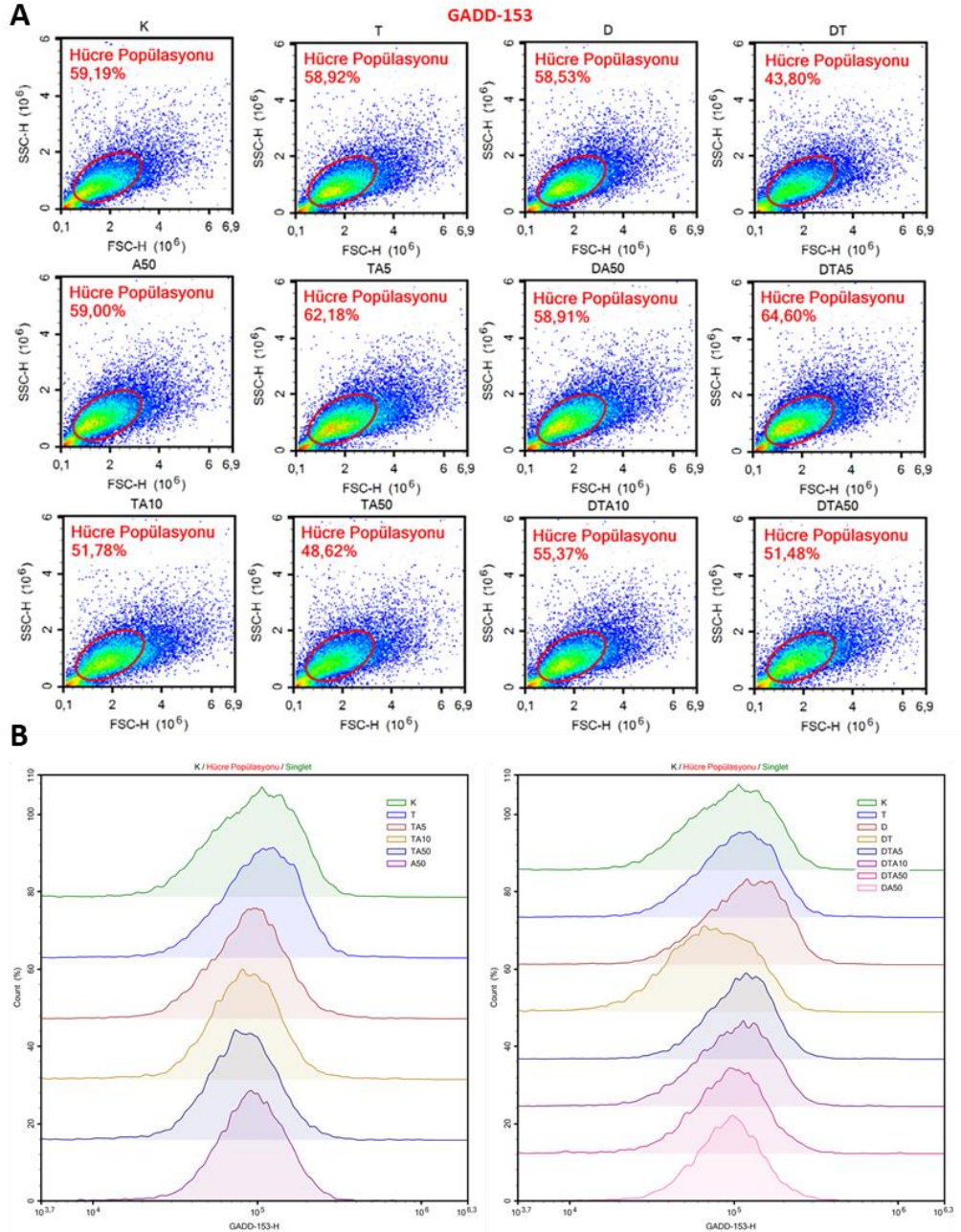
D vitamininin Tablo 1’de gösterilen 2-6. tedavi gruplarına eklenmesi TNF- α ve atorvastatin kombinasyonlarının GADD-45 protein ekspresyon düzeylerine olan etkisini anlamlı düzeyde arttırarak kontrole kıyasla daha yüksek seviyelere çıkardığı gözlemlendi (Şekil 41B).



Şekil 41. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D’nin MG-63 hücrelerindeki GADD-45 protein ekspresyonlarına etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analizi ile GADD-45 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol (K) grubuna göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analizi ile GADD-45 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol (K) grubuna göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

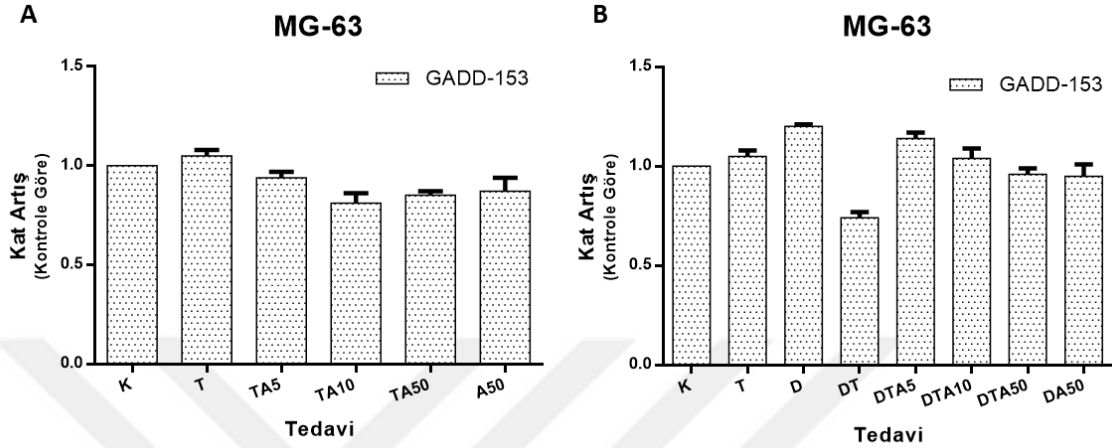
4.11.3 TNF- α , Atorvastatin ve Vitamin D'nin Endoplazmik Retikulum Stres Üzerine Etkileri

TNF- α ve atorvastatin tedavileri 24 saatlik tedavi süresi içinde GADD-153 protein ekspresyon düzeylerinin kontrolle kıyaslandığında TA10 ve TA50 gruplarında hafif düşmesine neden olmuştur (Şekil 43A).



Şekil 42. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D uygulanan MG-63 hücrelerinde GADD-153 protein ekspresyonu. TNF- α , vitamin D ve 5, 10 ve 50 μ M atorvastatinin farklı kombinasyonları ile muamele edilen MG-63 hücrelerinde 24 saatte akım sitometre analiziyle GADD-153 protein ekspresyonunun gösterilmesi. **A:** Hücre popülasyonunun belirlenmesi. **B:** GADD-153 proteininin MFI düzeylerindeki değişimin histogram grafiği.

Ancak ortama vitamin D ilave edilmesi DTA5 ve DTA10 gruplarında GADD-153 protein düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hafif artışına neden olmuştur (Şekil 43B).

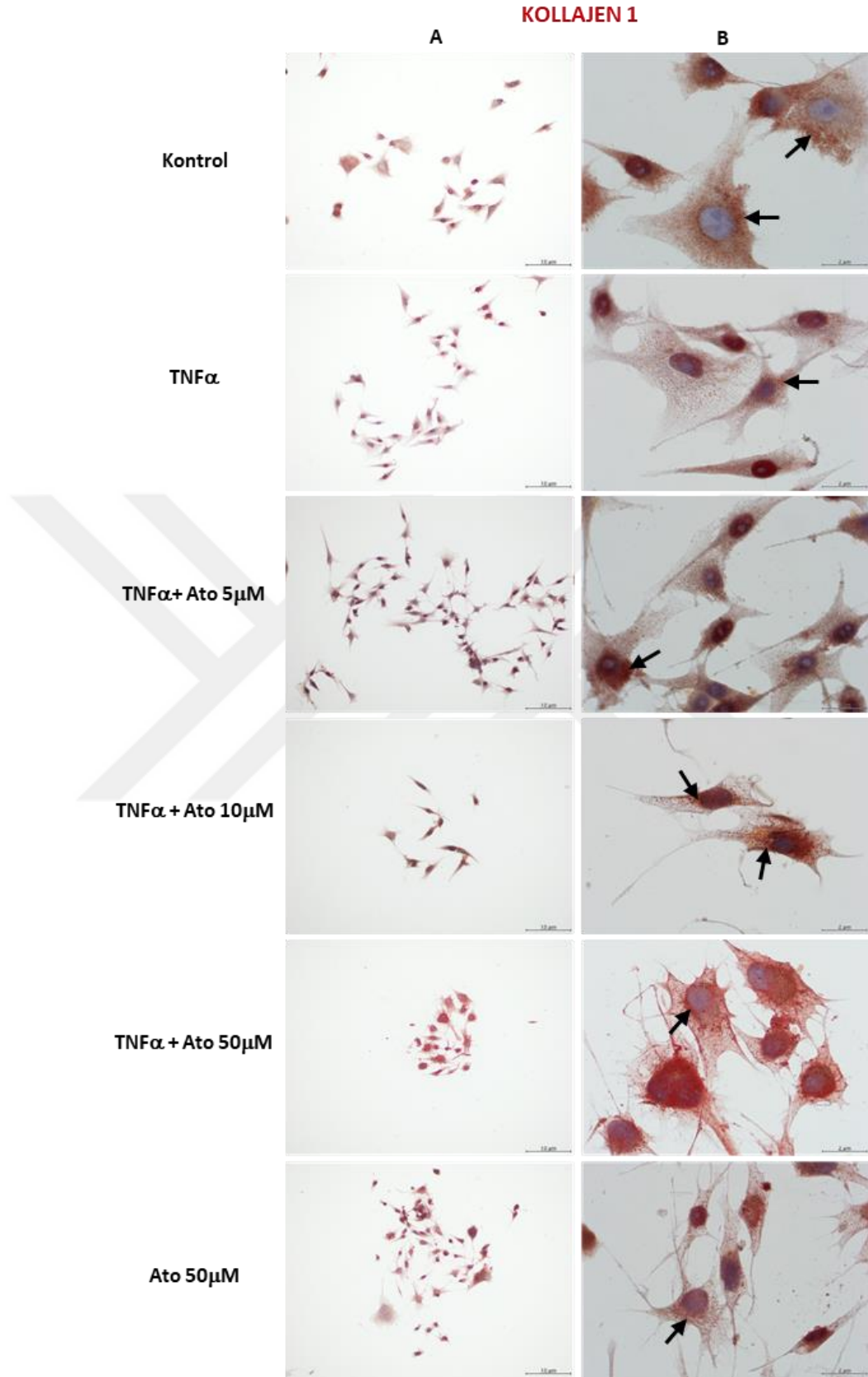


Şekil 43. TNF- α , atorvastatin ve vitamin D'nin MG-63 hücrelerindeki GADD-153 protein ekspresyonlarına etkileri. **A:** TNF- α (T), 50 μ M atorvastatin (A50) veya TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla TA5, TA10 ve TA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analizi ile GADD-153 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol (K) grubuna göre kat artış oranları. **B:** TNF- α (T), vitamin D (D), vitamin D ve TNF- α (DT), vitamin D ve 50 μ M atorvastatin (DA50) veya vitamin D, TNF- α ve atorvastatin (5, 10 ve 50 μ M) uygulanan (sırasıyla DTA5, DTA10 ve DTA50) MG-63 hücrelerinde 24. saatte akım sitometre analizi ile GADD-153 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol (K) grubuna göre kat artış oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

4.12. İmmunositokimyasal Bulgular

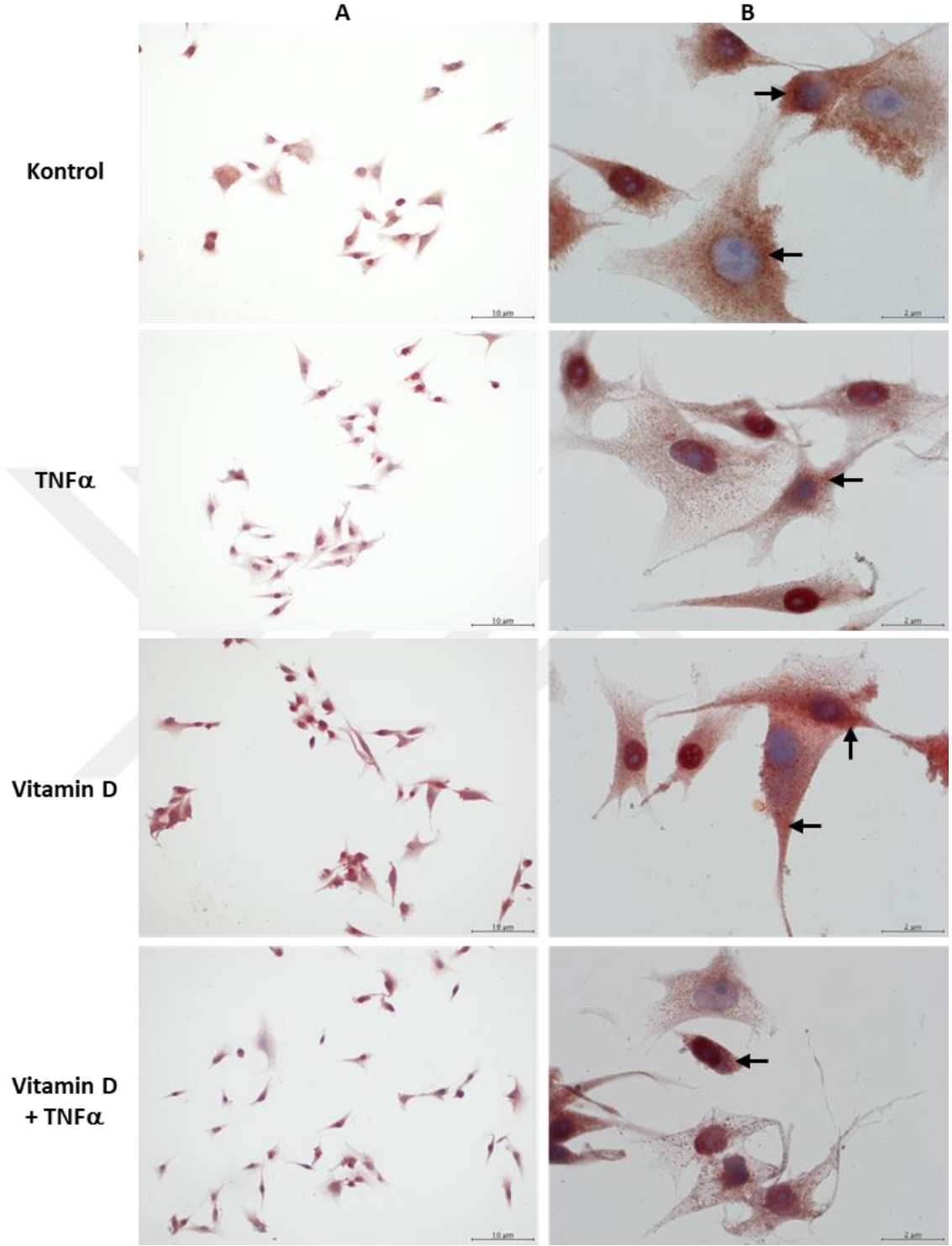
Hücre kültüründe hücreler çoğalmaya devam ederken, uygulanan maddelere bağlı olarak hücrelerin adezyon (yapışma) ve morfolojik özelliklerinde değişiklikler ortaya çıkabilir. Bu değişiklikler hücre canlılığındaki değişmeden kaynaklanabileceği gibi hücrel diferansiyasyona da işaret edebilir. Bu çalışmada MG-63 hücrelerine uygulanan tedavi protokollerinden özellikle atorvastatinin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre morfolojilerinin belirgin düzeyde değiştiği ve adezyon yeteneklerinin doz ile ters orantılı olarak azaldığı gözlemlendi. Bu durumda, osteosarkom hücresi olan MG-63 hücrelerinin başka hücrelere farklılaşp farklılaşmadığını saptamak için, osteoblastlar tarafından sentezlenen ve kemik dokusu matriksine özgü proteinler olan osteokalsin ve kollajen 1'in MG-63 hücrelerindeki sentez durumunu araştırmak amacıyla bu proteinlere spesifik antikorlarla immunositokimyasal boyamalar yapıldı ve intrasitoplazmik varlıkları gösterildi (Şekil 44-49).

Kontrolle kıyaslandığında TNF- α uygulanan hücrelerde osteokalsin immunpozitifliğinde azalma görüldü. Benzer şekilde yine TNF- α uygulanan hücrelerde osteokalsin düşük, TA10'da az, vitamin D uygulanan hücre gruplarında daha yüksek düzeyde immunpozitiflik saptandı (Şekil 47, 48). DTA10-DTA50-DA50 dozlarında apoptozun morfolojik ve karakteristik görüntüsü olan hücre membran blebilenmesi 24 saatlik ilaç uygulaması sonunda izlendi (Şekil 46).



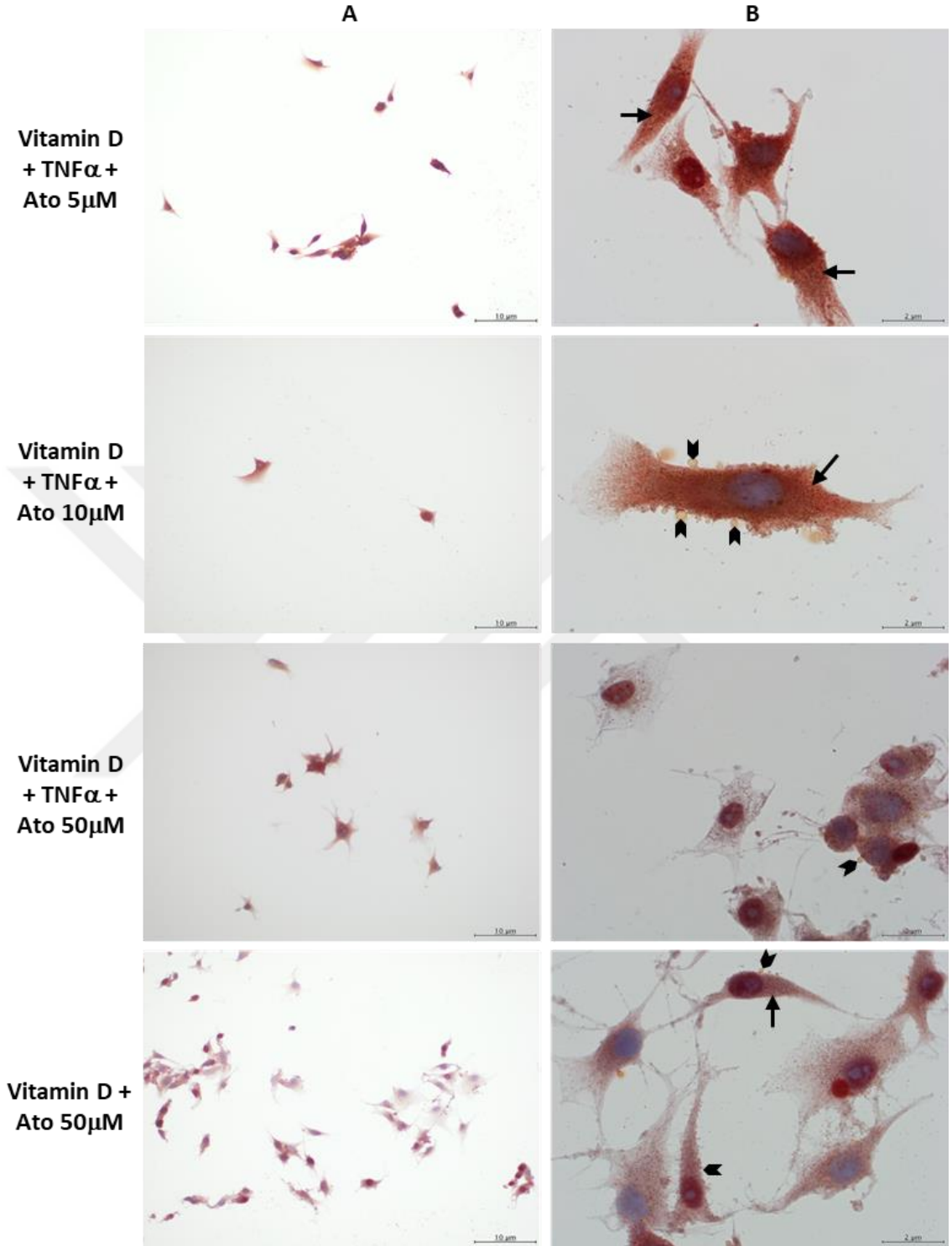
Şekil 44. TNF- α ve farklı dozlarda Atorvastatin uygulanan ve tedavi uygulanmayan (Kontrol) MG-63 hücrelerinde kollajen 1'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar. **Ok:** İmmünopozitif alanlar. **Boya:** İmmunoperoksidaz boyama. **Objektif büyütmesi:** 20x (A), 100x (B).

KOLLAJEN 1

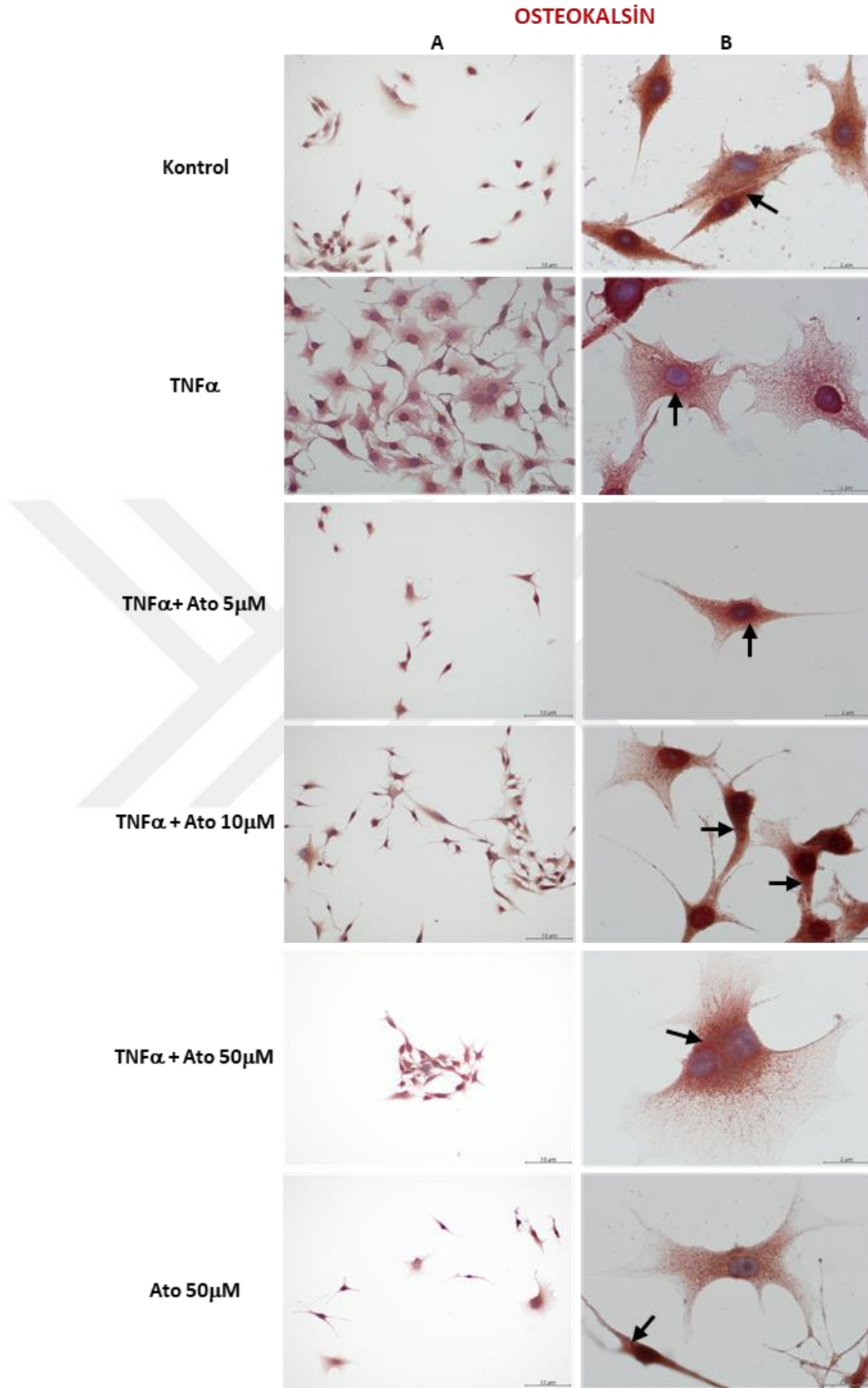


Şekil 45. Vitamin D ve TNF- α uygulanan ve tedavi uygulanmayan (Kontrol) MG-63 hücrelerinde kollajen 1'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar. **Ok:** İmmunopozitif alanlar. **Boya:** İmmunoperoksidaz boyama. **Objektif büyütmesi:** 20x (A), 100x (B).

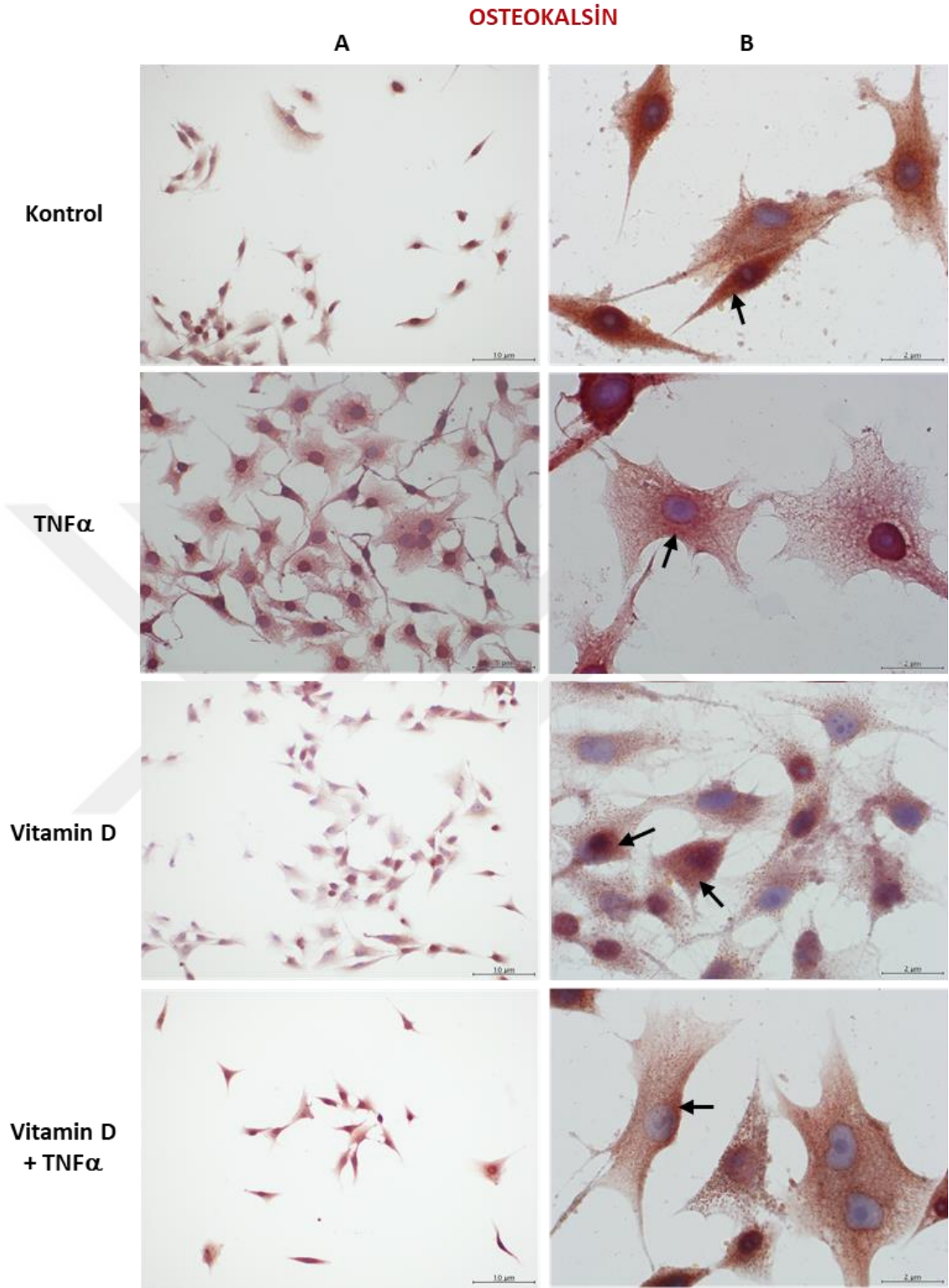
KOLLAJEN 1



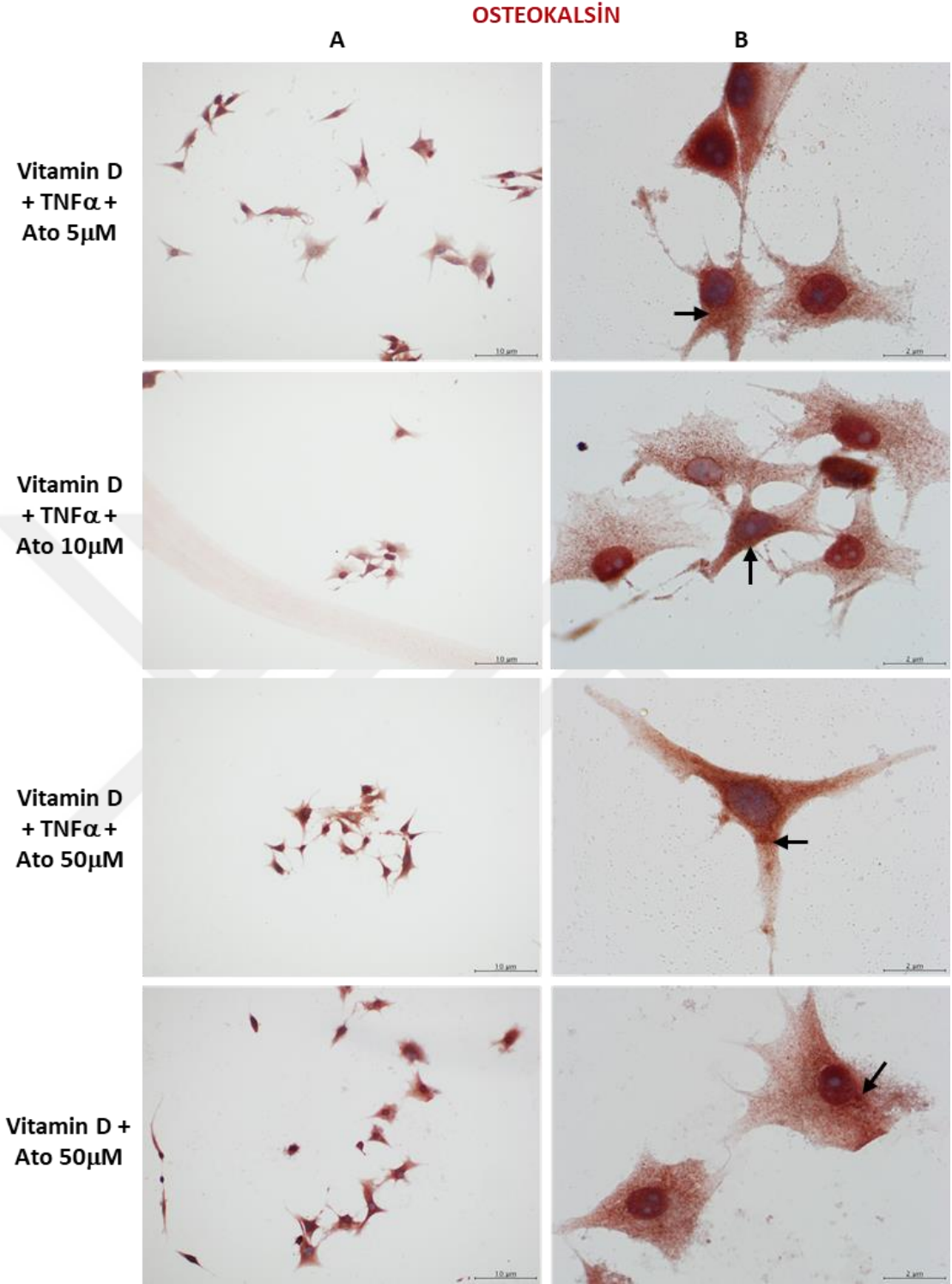
Şekil 46. Vitamin D, TNF- α ve farklı dozlarda Atorvastatin ile çeşitli tedavi protokolleri uygulanan MG-63 hücrelerinde kollajen 1'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar. **Ok:** İmmunopozitif alanlar; **ok başı:** membran blebbing. **Boya:** İmmunoperoksidaz boyama. **Objektif büyütmesi:** 20x (A), 100x (B).



Şekil 47. TNF- α ve farklı dozlarda Atorvastatin uygulanan ve tedavi uygulanmayan (Kontrol) MG-63 hücrelerinde osteokalsin'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrogramları. **Ok:** İmmünpozitif alanlar. **Boya:** İmmünopeksidaz boyama. **Objektif büyütmesi:** 20x (A), 100x (B).



Şekil 48. Vitamin D ve TNF- α uygulanan ve tedavi uygulanmayan (Kontrol) MG-63 hücrelerinde osteokalsin'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar. **Ok:** Osteokalsin'den zengin immunpozitif alanlar. **Boya:** Osteokalsin primer antikorunu kullanan immunoperoksidaz boyama. **Objektif büyütmesi:** 20x (A), 100x (B).



Şekil 49. Vitamin D, TNF- α ve farklı dozlarda Atorvastatin uygulanan MG-63 hücrelerinde osteokalsin'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı ışık mikrograflar. **Ok:** Osteokalsin'den zengin immunpozitif alanlar. **Boya:** Osteokalsin primer antikoru kullanılan immunoperoksidaz boyama. **Objektif büyütmesi:** 20x (A), 100x (B).

5-TARTIŞMA

Statinler, HMG-CoA redüktaz enzim inhibisyonu ile mevalonat oluşumunu engeller. Steroid hormonlar, kolesterol sentezi, farklılaşma ve proliferasyon gibi birçok hücrenel yolağa öncüllük enden FPP ve GGPP sentezini inhibe eden statinler (65), kolesterol düşürücü etkilerinden ve buna bağlı oluşan kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkilerinden dolayı dünya çapında çok büyük oranda kullanılan terapötik ajanlardır. Statin kullanımının kanser hastalarındaki etkilerinin incelendiği geniş çaplı retrospektif çalışmaların sonucunda iki farklı veri elde edilmiştir. Bunlardan birinci grup statinlerin koruyucu etkisinin olmadığı gösterirken ikinci grup ise bu ajanların kanser insidansını azaltmadığını ancak kanser kaynaklı oluşan mortalite düzeylerini, apoptoz indüksiyonu ve hücre büyümesini engellenmesi ile azalttığını göstermiştir (7, 38).

In-vitro ve *in-vivo* çalışmalarda, lipofilik statinler grubunda yer alan atorvastatinin 10 µM'lık konsantrasyonunun kolon, over, meme, akciğer, prostat, beyin kanserleri ve melanom hücrelerinde duyarlılığa neden olarak (7), apoptotik ve anti-metastatik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (6, 38). Benzer şekilde 10 µM atorvastatin uygulamasının Saos2 osteosarkom hücre hattında hücre göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir (66).

Statinlerin vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi hücre adezyon moleküllerinin üretimini inhibe ettiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (67). Bu çalışmada gerçek zamanlı hücre görüntülerinde MG-63 hücrelerinde, artan atorvastatin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak yüzeyden ayrılan hücre miktarında 48. saatin sonunda anlamlı bir artış olduğunu izledik. MG-63 hücreleri yüzeye tutunarak çoğalan ve fonksiyon gösteren hücrelerdir. Yüzeyden ayrılmaları ile canlılıklarını korumaları arasında ters orantı vardır. Burada yüzeyden kalkan hücrelerin ilk 24 saatte canlılıklarını kaybetmediklerini ancak 48 saatin sonunda hücre canlılığının azaldığını ise WST-1 analizi ile elde ettik. Lipofilik statinlerin özellikle atorvastatinin osteosarkom hücrelerinde hücre göçünü engellediği ve bunu hücre canlılığını azaltmasından bağımsız olarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir (66). Çalışmamızda ortama vitamin D ilave edildiğinde hücrelerin yüzeye daha yüksek oranda tutunduğunu ancak 24 saatin sonunda atorvastatin ve TNF-α ya bağlı olarak gelişen canlılıktaki azalmayı vitamin D'nin güçlendirdiğini izledik. Dikkat çekmek istediğimiz bir nokta anoikis olarak tanımlanan birçok tümör tipinde meydana gelen

apoptozise benzer bir hücre ölüm yolağıdır. MG-63 hücreleri gibi birçok hücre tipinin, matrikse tutunma özelliğini kaybetmesi sonucu süspanse ortamda bir araya gelip agregatlar oluşturarak intrasellüler sinyallerle hücre-matriks sinyal iletimini taklit eden sinyaller oluşturduğu böylece hücrelerin anoikisten kaçarak bulunduğu bölgeden farklı bir yere göç edip bu alana yeniden implante olarak çoğalmaya devam ettiği (metastaza uğrayabildiği) çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. MG-63 hücrelerinde ve çeşitli tümör hücrelerinde intrasellüler adezyon sinyalizasyonunun anoikisle ilişkili olduğu gösterilmiştir (68). MG-63 hücreleri ile yapılan bir çalışmada osteosarkom prognozunun ve metastazının E-cadherin ekspresyonları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (69). Kanser hücre metastazı ve invazyonundan sorumlu olan faktörlerin kalsitriol tarafından düzenlendiği, ekstraselüler matriks anjiyogenezi ve remodelingini uyararak metastaz mekanizmasında rol alan proteinlerin aktivitesinin vitamin D tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (70). Çalışmamızda gerçek zamanlı hücre görüntülerine ait yapışan hücre sayılarını göz önüne aldığımızda D vitamini uygulanan hücrelerin yüzeye kontrol ve diğer tedavi gruplarına kıyasla daha yüksek oranda yapıştığını gözlemledik. Bu sonuçlar doğrultusunda D vitamini tümör lokalizasyonunun stabilizasyonu için önemli olabilir. Kanser hücre metastazı ve invazyonundan sorumlu olan MMP'lerin kalsitriol tarafından düzenlendiği, ekstraselüler matriks anjiyogenezi ve remodelingini uyararak metastaz mekanizmasında rol alan MMP-9 aktivitesinin vitamin D tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (70). MG-63 osteosarkom hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada MMP-1 ekspresyonlarının kanser gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (71). Özellikle tip bir kollajen yıkımından ve kemik rezorpsiyonundan sorumlu olan MMP-13 (72) ekspresyonlarının meme baş boyun skuamöz hücreli kanserlerde yüksek miktarda eksprese edildi hatta prostat kanserli hastalarda metastaz sonrası MMP-13 ekspresyonlarının daha arttığı bildirilmiştir (73). Çalışmamızda atorvastatinin yüksek dozlarının kontrole göre her üç MMP düzeyini de baskıladığını izledik. Ek olarak TNF- α ile birlikte özellikle 10 ve 50 μ M atorvastatinin uygulandığı MG-63 hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edilen MMP 1, 9 ve 13'ün D vitamini ilavesiyle ciddi oranda düştüğünü gördük. MG-63 hücrelerinin kısa dönemde atorvastatin ile yüzeyden ayrılması ancak canlılıklarını sürdürmelerinin ve metastaza uğrama riskinin D vitamini ile önlenebileceği ve bu etkiyi adezyon moleküllerinin oluşturduğu sinyal yollarını inhibe ederek gerçekleştirip gerçekleştirmediği sonraki çalışmalarda araştırılması gereken bir konudur.

Otofaji olarak tanımlanan, ökaryot hücrelerde meydana gelen lizozoma bağlı protein yıkımı, hücre canlılığı, gelişimi ve homeostazisi için önemlidir. Bu süreç fagofor oluşumu ile başlar, protein agregatları, organeller veya ribozom gibi intrasellüler kargonun fagofor içine alınması sonucu fagofor genişlemesi, bu kargonun çift zarlı membranla çevrelenerek otofogozom oluşumunu takiben, otofogozomun lizozom ile birleşmesiyle (otolizozom) otofogozomal içerdiği lizozomal proteazlar ile yıkılarak hücrenin kullanabileceği yapı taşlarına ayrılmasıyla sonuçlanır. Otofaji proteinlerinden beclin-1 ile anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 arasında ilişki vardır (74).

Statinlerin otofajiyi uyarma gücü HMG-CoA redüktazı inhibe etme derecesi ile doğru orantılıdır. Bu maddelerin otofajiyi uyarma etkileri HMG-CoA redüktaz bağımlıdır ve buradaki otofajiyi aktive etme mekanizması hücrel FPP ve GGPP stoğunun tüketilmesi ile gerçekleşir (38). Atorvastatinin farklı hücre tiplerinde ROS artışına neden olduğu gösterilmiştir (75). ROS artışı proapoptotik yolların aktive olmasına neden olurken bir yandan da ATG4'ün proteolitik aktivitesini stimüle ederek otofajiyi uyandır (74). Çalışmamızda TNF- α ile birlikte uygulanan atorvastatinin MG-63 hücrelerinde doza bağımlı olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında ATG-4 ekspresyonlarında artışa neden olduğu görülmüştür. MCF-7 meme kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada 24 ve 48 saat atorvastatin ile muamele edilen hücrelerin özellikle 10 ve 20 μ M ilaç uygulananlarında kontrol grubu ile kıyaslandığında beclin-1 ve LC3B immunreaktifliğinde anlamlı artış izlenmiştir (76). İnsan atrial fibroblast hücrelerinde simvastatinin LC3B ve beclin-1 ekspresyonunu arttırarak otofajiyi uyardığı görülmüştür (39). Vitamin D'nin de LC3B ve beclin-1 ekspresyonlarını arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (22, 77, 78). Çalışmamızda atorvastatinin artan konsantrasyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artan LC-3B ve beclin-1 ekspresyonlarında artış izlememize rağmen akım sitometre sonuçlarımızda ATG-4 ve LC-3B'nin artan atorvastatin dozu ile azaldığını beclin-1'in ise değişmediğini gördük. Ortama D vitamini ilavesiyle ATG-4, beclin-1 ve LC-3B ekspresyonları kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik gösterse de atorvastatin ve/veya TNF- α tarafından uyarılan ekspresyon düzeylerinin altında kalmıştır. İlginç şekilde akım sitometre analizinde ise bu otofaji proteinlerinden beclin-1'in özellikle vitamin D, DT ve DTA10 gruplarında kontrol grubuna göre yüksek oranda sentezinin arttığı gördük. Protein düzeylerindeki azalmanın otofaji sürecinde otofogozom oluşumu için kullanıldığını ve bu nedenle azaldığını düşünüyoruz.

Osteosarkom gelişimi ve bağışıklık sisteminde yer alan hücreler ile kanser hücreleri arasındaki etkileşimi sağlayan genetik, epigenetik ve hücre mikro ortamını içeren çevresel faktörler yer almaktadır. Ayrıca kanser hücreleri ve bağışıklık yanıtları arasındaki etkileşim, uygulanan tedavinin etkinliği ve kanserin prognozu açısından oldukça kritik bir önem arz etmektedir (30). Doğal bağışıklığın aktive olmasında görev alan toll-benzeri reseptörler (TLR) immün yanıtta rol alan hücrelerin yanı sıra tümör hücreleri tarafından da salgılanarak pro veya anti-tümöral etkilerin oluşmasına neden olmaktadır (33). FDA tarafından onaylanmış TLR-2 ve TLR-4 agonisti ilaçların mesane kanserlerinde tedavi amaçlı kullanılmasının yanı sıra TLR'lerinin uyarılmasının proinflamatuvar sitokin ve anti-apoptotik proteinlerin üretimini tetikleyerek tümör gelişimi ve kanser hücre proliferasyonuna neden olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (30, 79). Osteoblast hücrelerinde yüksek TLR-4 ekspresyonlarının gösterildiği araştırmalar mevcuttur (80). Çalışmamızda atorvastatin ve/veya TNF- α ile uyarılmış osteoblast benzeri osteosarkom hücrelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında TLR-4 ekspresyonlarında TA5 grubu haricinde sonuçlar kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Ortama D vitaminin eklenmesi ise sonuçlarda farklılık yaratmamıştır. Benzer sonuçlar TLR-2 ekspresyonları için de elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda bu reseptörlerin ekspresyonlarının zamana bağlı olarak fluktuasyonlara uğrayabileceği düşünülebilir. Nitekim, MG-63 hücrelerinin *Enterococcus faecalis* ile enfekte edildikten sonra TLR-2 düzeylerinin değerlendirildiği bir çalışmada TLR-2 ekspresyonunun zamana bağlı olarak değiştiği 3. saatte ölçülen değerlerinin çok yüksek seyrederken 12. saatteki ekspresyonlarının düştüğü bildirilmiştir (81). Benzer şekilde Larousserie F. ve ark.'nın yapıdığı başka bir çalışmada TLR ekspresyonlarının 5, 15 ve 24. saatteki ekspresyon düzeylerinin değişken olduğu gösterilmiştir (80).

Vitamin D ve atorvastatinin etkinlik gösterdiği genlerin tayininde, bunların proliferasyon, farklılaşma üzerine olan etkilerinin incelenmesi sırasında analiz zamanı (yani deneyin hangi saat diliminde ölçüldüğü) kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda zaman dilimi olarak 24 saat seçilmiştir. Bunun nedeni kronik ve uzun bir süreç olan kanser patogenezinde bu ilaçların en az 24 saatlik etkilerine odaklanmak istememizdir. Daha erken saat dilimlerinin incelenmesi mekanizmayı anlamak açısından faydalı olacaksa da uzun vadeli ilaç etkisi yönünden sonuçlara katkı sağlamayacaktır. Bu yüzden 24 ve 48. saat dilimlerine odaklanılmıştır. Daha erken ve ileri zaman dilimlerinin incelenmesi ileriki çalışmalarla yapılacaktır.

Çalışmamızda 48 saat atorvastatin uygulaması yapılan MG-63 hücrelerinin gerçek zamanlı mikroskopik görüntüleri değerlendirildiğinde özellikle yüksek doz atorvastatin tedavisi uyguladığımız (50 µM) gruplardaki hücrelerin morfolojilerinin değiştiğini, sitoplazmalarının kontrol grubundaki hücrelere nazaran küçülerek daha koyu ve yoğun bir forma dönüştüğünü, sitoplazmaları içinde birçok vakuolün oluştuğunu, ek olarak poligonal şekle sahip olan MG-63 hücrelerinin membranında çoklu uzun iğsi yapıların meydana geldiğini gözlemledik. Benzer morfolojik değişiklikleri Magan-Fernandez A. ve ark.'ları MG-63 hücrelerine 72 saat süreyle 0,01 µM simvastatin uyguladıkları çalışmalarında göstermişler; çok sayıda yağ vakuolünün oluşmasını ve meydana gelen bu morfolojik değişiklikleri statin ile indüklenen lipoprotein yoksunluğundan ve bunun sonucunda hücrenin bu eksikliği normalize edebilmek için geliştirdiği fizyolojik yanıt şeklinde açıklamışlardır (82). Sterol sentezini güçlü oranda inhibe eden mevastatinin hücre büyümesini inhibe ettiğini ve hücre morfolojisini değiştirdiğini fakat bu değişimin az miktarda mevalonat eklenerek (kolesterol etkisiz) geri döndürülebildiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (38). Bunlara ek olarak, meydana gelen değişiklikler, MG-63 hücrelerinin statin kaynaklı diferansiyasyona uğrayabileceğini akla getirmektedir. Bu nedenle kemik dokusunun erken matriks mineralizasyon belirteçlerinden olan ALP ve kollajen-1 ile kemik farklılaşması ve olgunlaşmasını gösteren osteojenik matürasyon belirteçlerinden olan osteokalsin (83) düzeyleri bu çalışmada değerlendirildi. Osteokalsin, osteoblastik farklılaşmanın geç belitecidir ve kemik mineralizasyonu ve matürasyonunun önemli bir indikatörüdür. Osteosarkom hücrelerinde (SaOS-2 ve 143B) 10^{-6} M kalsitriolün osteokalsin mRNA ekspresyonunu anlamlı ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Osteoblastik farklılaşmanın erken belirteçlerinden olan ALP aktivitesi vitamin D ile uyarılmış osteosarkom hücrelerinde ölçülmüş ve kontrole kıyaslandığında doza bağlı olarak aktivitenin arttığı bildirilmiştir (84). Çalışma sonuçlarımızda D vitamini ile 24 saatlik tedavi sonrasında elde edilen ALP aktivite düzeyleri kontrol grubu ile benzerdi. Ek olarak deney gruplarının tamamında kontrol grubu ile kıyaslandığında ALP aktivitesinde anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Bu sonuçlarımız literatürdeki bazı çalışmaların aksine Lau C.P.Y. ile uyumlu bulunmuştur (85). Literatür ile elde ettiğimiz bu farklılığın Thompson L. ve ark.'nın yürüttüğü çalışmanın 96 saat sürmesinden ve farklı osteosarkom hücre hatlarında çalışmalarından kaynaklanabileceğini düşündük. MG-63 hücrelerinin 24 saat 10^{-9} M- 10^{-6} M simvastatin veya atorvastatinin ile muamele edildiği bir çalışmada osteokalsin ekspresyonlarının atorvastatin veya simvastatin dozları ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur (86). Benzer şekilde biz de artan atorvastatin

dozlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında osteokalsin ekspresyonlarını anlamlı derece arttırdığını bulduk. Ancak Thompson L. ve ark.'nın sonuçlarının aksine D vitamininin MG-63 hücrelerinde atorvastatin ve/veya TNF- α ile uyarılmış osteokalsin ekspresyonlarını kuvvetli şekilde azalttığını izledik. Osteokalsin knock-out fareler ile yapılan bir çalışmada farelerin kemik kalınlığının beklenilenin aksine arttığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemler doğrultusunda osteokalsinin kemik matriks yapımını bir negatif feed-back mekanizma ile düzenliyor olabileceği öne sürülmüştür (87). Biz çalışmamızda atorvastatinin osteokalsin ekspresyonunu arttırdığını ve vitamin D'nin atorvastatin etkisini baskıladığını izledik. Bahsi geçen çalışmadan yola çıkarak vitamin D'nin atorvastatinden kaynaklanabilecek kemik yıkımında gerilemeye yol açtığını düşünmekteyiz. Artmış osteokalsin ve ALP aktivitesi osteoblastik aktivitenin varlığını gösteren belirteçlerdir. Çalışma sonuçlarımıza göre atorvastatinin 24 saat tedavi sonrasında doza bağımlı olarak osteokalsin ekspresyonlarını arttırarak osteoblastik farklılaşmaya katkı sağladığı, D vitamininin ise antagonist etki göstererek bu etkiyi azalttığını izledik.

Osteoblastlar; epiteloid karakterde, kübik ya da prizmatik şekil alabilen iri hücrelerken, osteoblastların olgunlaşmış şekli olan osteositler; gövdeleri daha küçük, sitoplazmik uzantıları daha çok sayıda ve daha uzun olan hücrelerdir (88). İmmunositokimya verilerimize göre, farklı tedavi protokolleri uygulanan MG-63 hücrelerinin sitoplazmalarında kollajen 1 ve osteokalsin varlığına işaret eden immunpozitiflikler saptandığı için, bu hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin hücre matürasyonunun artmasından veya hücre ölümüyle sonuçlanabilecek sellüler dejenerasyondan kaynaklanabileceği düşünmekteyiz (86). Hücre ölümünü değerlendirmek amacıyla real-time PCR ve akım sitometre analizleri ile ölüm yolları araştırıldı.

Çalışma sonuçlarımıza göre D vitamini, Fathi N. ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada vitamin D ve NF κ B sinyalizasyonu arasındaki ilişkide (70) bahsedilenin aksine, NF κ B ekspresyonunu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek oranda uyarmıştır ($p < 0,050$). Yine, statinlerin NF κ B aktivasyonuna bağlı aşırı inflamatuvar sitokin salınımını engelleyerek ortaya çıkan metastaz riskini engellemede faydalı olduğunu bildiren çalışmalar vardır (6, 38). Ancak bu sonuçlardan farklı olarak çalışmamızda, atorvastatin ve/veya TNF- α ile muamele edilmiş MG-63 hücrelerinde

NFκB ekspresyonlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında arttığını ve bu tedavi gruplarına vitamin D eklenmesinin özellikle yüksek doz atorvastatin (50 μM) uygulanan hücrelerin NFκB ekspresyonlarının daha da yükseldiğini gördük. Literatürde TNF-α varlığının NFκB aktivite artışına neden olduğundan bahsedilmektedir (89). Biz çalışmamızda 20 ng/mL TNF-α ile 24 saat uyardığımız MG-63 hücrelerinde NFκB ekspresyonlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük miktarlarda oluştuğunu gördük. Ortamdaki atorvastatin varlığının ise NFκB ekspresyonlarını arttırdığını ve bu artışın TNF-α varlığından bağımsız olarak meydana geldiğini izledik. Literatürde NFκB aktivasyonunun klasik ve alternatif olarak adlandırılan iki majör sinyal yolu üzerinden yürüdüğü söylenilmektedir. Klasik yolak esas olarak IKKβ ile indüklenmiş IκBα bozulmasını ve ardından RelA/p50 aktivasyonunu içerirken, alternatif yolak NIK ile indüklenmiş p100'ün p52'ye dönüşümünü ve RelB/p52 aktivasyonunu kapsar (90). TNF-α'nın buradaki rolü NFκB'nin inhibitörü olan IκBα'nın NFκB ile oluşturduğu kompleksten ayırarak, NFκB'nin aktif hale gelmesini sağlamaktır. Elde ettiğimiz ekspresyon sonuçları başlangıçta literatür ile bir tezat oluşturuyormuş gibi gözükse de aslında TNF-α aracılı NFκB aktivite artışı olarak vurgulanan durum, TNF-α ile inhibitör etkiye sahip IκBα'nın NFκB bağlanma bölgesine olan afinitesinin ortadan kaldırılması ve NFκB'nin serbestleşmesidir. Ancak bizim burada gösterdiğimiz ekspresyondur.

GADD-45 protein ailesi DNA hasarına cevaben hücre döngüsünde G2/M kontrol noktasında yer alan, genomik stabiliteyi koruyup tümör süpresör genlerle etkileşerek hücre büyümesini baskılayan ve apoptozun indüklenmesinde rol alan mediyatörlerdir (91). Hücrelerin malignite kazanmamaları için GADD-45 ekspresyonunun varlığı çok önemlidir ve GADD-45 ekspresyonu NFκB sinyalleri ile inhibe edilir (48, 92). Çalışmamız sonuçlarında, atorvastatin uygulanan deney gruplarında GADD-45 ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır ki bu tümör gelişiminin gerilemesi açısından olumludur. Ancak ortama D vitamininin eklenmesi atorvastatin ve bunun TNF-α ile birlikte uygulanmasının oluşturduğu olumlu etkiyi azaltmış hatta etkisiz hale getirmiştir. Vitamin D apoptotik yollarda etki gösteren GADD-45'in ekspresyonlarında azalmaya neden olarak atorvastatin ile elde edilen kanser hücrelerindeki apoptozun uyarılması gibi olumlu etkilerin azalmasına sebep olmuştur. Vitamin D ile birlikte yüksek doz atorvastatin ve/veya TNF-α uygulanan hücrelerde

GADD-45 ekspresyonu kontrole kıyasla anlamlı düzeyde yüksek çıkarsa da D vitamini uygulanmayan tedavide ekspresyon düzeyleri çok daha yüksek bulunmuştur.

Vitamin D'nin apoptotik yollar üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Apoptozu inhibe ettiğini veya apoptoz üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını söyleyen çalışmalar mevcuttur. Vitamin D'nin birçok kanser türünde apoptozu hücre tipine-spesifik yollar aracılığı ile daha çok da içsel yollar üzerinden Bcl-2 ekspresyonunun inhibisyonu ve BAX indüksiyonu yaparak stimüle ettiği gösterilmiştir (70). Çalışma sonuçlarımıza göre vitamin D uygulaması MG-63 hücrelerindeki Bcl-2 ekspresyon düzeylerine istatistiksel anlamda bir azalmaya neden olmamıştır. Lipofilik statinlerin osteosarkom hücrelerinde doza bağımlı olarak apoptozu indüklediği ve bunu ERK1/2-Bcl2 anti-apoptotik yollarının inhibisyonu ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir (66). Fromigue ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, Saos2 osteosarkom hücrelerinin 24 saat 10 µM atorvastatin ile tedavi edilmesi sonrasında anti-apoptotik özellik gösteren Bcl-2 geninin ekspresyon düzeylerinin azaldığı göstermiştir (93). Biz de çalışmamızda TNF-α ile birlikte uygulanan atorvastatinin farklı konsantrasyonlarının Bcl-2 ekspresyonu üzerinde güçlü bir inhibisyona neden olduğunu izledik. Atorvastatinin Bcl-2 ekspresyonu üzerinde oluşturduğu etkilerin Fromigue ve ark.'ların yaptığı çalışmadaki gibi doza bağımlı bir azalma paterni göstermemesine rağmen kuvvetli bir baskılanmaya neden olduğunu gördük. Vitamin D'nin atorvastatinin yüksek dozunun TNF-α veya TNF-α'sız uygulandığı tedavi gruplarında ise Bcl-2 üzerinde oluşturduğu baskılayıcı özelliğini zayıflatarak ekspresyonlarda artışa neden olduğunu ancak yine de kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda hala anlamlı bir Bcl-2 azalması gösterdiğini izledik. Çalışmamızda 24 saatlik deney süresinde TNF-α ile beraber uygulanan atorvastatin dozlarının Bcl-2 protein düzeylerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hafif azalmaya neden olduğunu ancak bu etkinin vitamin D uygulamasıyla ortadan kalktığını gördük.

Organizmadaki tüm proteinlerin olgun forma sahip olabilmeleri için katlanmaları gerekir. Endoplazmik retikulum (ER); protein sentezi, protein katlanması ve olgunlaşmasının yanı sıra hatalı katlanmış proteinlerin tespit edilmesi ve posttranslasyonel modifikasyonların stabilize edilmesi gibi çok önemli fonksiyonlara sahiptir (94). Hipoksi, besin yokluğu, nokta mutasyonlar veya okside lipid varlığı ER'ün protein katlama aktivitesi bozarak hatalı katlanmış veya katlanmamış proteinlerin

birikmesine ve sonuç olarak ER stresin meydana gelmesine neden olur. ER stresin olduğu durumda hücrenin problemi ortadan kaldırmak için oluşturduğu katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan mekanizmada ER lümeninde yer alan IRE1 α , PERK ve ATF6 gibi sensör proteinleri hücrenin yeniden fonksiyon göstermesinde ve sağkalımında büyük öneme sahiptir (Şekil 12). Güçlü veya kronik ER stres varlığında UPR hücre ölümünü uyarır. Kronik stres durumunda PERK sinyalizasyonu CHOP miktarının artırılması ve Bcl-2 ekspresyonunun azaltılması üzerinden hücre ölümüne neden olur. Ek olarak, inflamatuvar süreçlerin ER stresi uyarması gibi (95), UPR ve şiddetli ER stres de proinflamatuvar proteinlerin aktivitesinde artışa neden olur (64). Biz de çalışmamızda atorvastatin ve/veya TNF- α ile uyarılmış hücrelerde kontrol grubu ile kıyaslandığında GADD-153 (CHOP) ekspresyonlarının doza bağımlı olarak arttığını gördük. Atorvastatin dozu ile artan GADD-153 seviyelerinin, atorvastatinin intrasellüler ve hücre döngüsünde veya sağkalımında rol alan küçük G proteinlerin prenilasyonunu inhibe ederek enerji yokluğuna ve non-fonksiyonel protein üretimine (66) bağlı olarak ER stresi arttırdığını düşünmekteyiz. D vitaminin MG-63 hücrelerinde GADD-153 ekspresyonlarında anlamlı bir etkisi izlenmemiş olsa da sonuçlarımızda atorvastatin dozu ile artan GADD-153 ekspresyonlarının D vitamini ile birlikte uygulandığı gruplarda önceki seviyelerine nazaran azaldığını ancak yine de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit ettik. D vitamini, MG-63 hücrelerinde 24 saatte atorvastatine bağlı artan GADD-153 ekspresyon seviyelerinde hafif azalmaya neden olmuştur. Burada önemli olan diğer bir nokta da kronik veya güçlü ER strese neden olan durumlarda artmış PERK sinyalizasyonu sonucunda hücrede azalmış protein sentezi meydana gelir (64). Çalışmamız neticesinde 24 saatte ölçtüğümüz mRNA ekspresyon düzeyleri ile korelasyon göstermeyen protein ekspresyonlarının nedenleri arasında artan ER stres kaynaklı protein sentezinin inhibisyonu yer alabilir. Buna ek olarak artmış ER stresin NF κ B aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (64). Yüksek dozlardaki atorvastatinin ER stresi arttırması ve NF κ B ekspresyon artışı arasında buna bağlı bir ilişki olabilir.

Vitamin D'nin hücre döngüsünün durdurulması, farklılaşma, antianjiyojenik ve immünmodülasyon gibi biyolojik fonksiyonlarının birçoğunu nükleer vitamin D reseptörü (VDR) üzerinden gerçekleştirmektedir. VDR, kalsitriolün biyolojik etkilerinin çoğuna aracılık eden ligandla düzenlenen transkripsiyon faktörüdür (4, 96). Vitamin D seviyeleri ve VDR varyasyonları rekürren enfeksiyonlar, osteoartrit,

osteoporoz ve birçok otoimmün hastalıkla ilişkilendirilmiştir. VDR genindeki değişiklikler kanser ile ilişkilendirilmiştir (70). Malign kemik tümörleri ve VDR gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen çok az sayıda çalışma mevcuttur (4). VDR geninde küçük bir varyasyona neden olabilecek tek nükleotid polimorfizmleri, protein sentezini ve nükleer DNA'ya bağlanma ve reseptör afinitesini değiştirerek, hücrelerin vitamin D'ye gösterdiği cevabı, vitamin D'nin biyolojik fonksiyonlarını ve VDR-aracılı yönetilen sinyal yollarının tamamını etkileyebilir (4). Hatta VDR'deki polimorfizmler kanser prognozu ve kanser görülme riskini etkileyebilir. Prostat, meme, deri, mesane ve renal karsinomlarda VDR genindeki *FokI*, *BsmI*, *Apa I* ve *TaqI* bölgelerinde homozigot veya heterozigot polimorfizm varlıkları gösterilmiş, bu çalışmaların bir kısmında ortaya çıkan polimorfizmler ile malignite gelişimi arasında ilişki bulunmuştur (70). Osteosarkom hastalarında yapılan klinik bir çalışmada, VDR genindeki *Cdx2* allelindeki polimorfizmlere sahip bireylerin kanser prognozunun daha kötü seyrettiği ve bu polimorfizmlerin prognostik açısından önemli olduğu ifade edilmiştir (4). Başka bir çalışmada da Fok I bölgesindeki mutasyonun sağlıklı bireylere kıyasla osteosarkomlu hastalarda daha yüksek olduğu ve bu polimorfizme sahip kişilerde kanser riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (97). Vitamin D'nin VDR sayısını hem transkripsiyonel hem posttranslasyonel olarak arttırdığı gösterilmiştir (70). Ancak araştırmamızda tek başına D vitamini uygulaması VDR ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir değişiklik yaratmamıştır. Atorvastatin ve TNF α ile beraber vitamin D uygulaması osteosarkom hücrelerinde istatistiksel olmamakla beraber VDR ekspresyonunda azalmaya yol açmıştır. Bu etki vitamin D eklenmesi ile geri çevrilememiştir. Vitamin D reseptöründe olası bir mutasyon vitamin D etkisinin oluşmasını sınırlayacaktır (4). Biz çalışmamızda MG63 hücrelerinde böyle bir mutasyon olup olmadığını bilmiyoruz. Diğer yandan osteosarkom hücrelerinde (SaOS₂) yapılan başka bir çalışmaya göre, VDR ekspresyonlarının mRNA düzeyinde azalmasının VDR aktivitesinin inhibe olmasına neden olan Snail-1 geninin aşırı artmasından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (96). Çalışmamızda vitamin D etkisi çeşitli basamaklarda izlenmektedir. Yine net olarak söyleyebileceğimiz diğer bir sonuç atorvastatinin vitamin D reseptörü ekspresyonunun vitamin D varlığından bağımsız olarak azaltmasıdır. Bu durumda oluşan vitamin D etkisinde VDR'den bağımsız gelişmesi bir olasılıktır. Dikkate alınması gereken bir durum 1,25 vitamin D'nin fizyolojik veya moleküler düzeyde yanıt oluşturabilmesi sadece VDR üzerinden gerçekleşmemektedir (4). Gerçekten de vitamin D'nin birçok dokudaki biyolojik

yanıtları düzenlerken, bu bölgelerde oluşan etkinin özgüllüğü ve duyarlılığı, transkripsiyonel kompleks elementlerinin gösterdiği yanıtların tamamı ile ilişkilidir. Şimdiye kadar vitamin D'nin etkilerine katkı sağlayan transkripsiyonel kompleksin dört elementinin katkısını tanımlanmıştır. Nükleer reseptör ligandı olan 1,25 D vitamini cevabın fizyolojik özgüllüğünü belirler. VDRE, yanıtın genetik özgüllüğünü tanımlar. VDRE'ye bağlanan, VDR-RXR (VDR- retinoid X reseptörü) heterodimeri ile kompleks oluşturan çeşitli ko-aktivatörler ve diğer proteinler, hücre özgüllüğünü belirler ve son olarak, D vitamini duyarlı gen ürünü biyolojik cevabı tanımlar (98).

Vitamin D'nin 10^{-6} M konsantrasyonunun kondrosarkom hücrelerinde en etkili doz olduğu (29), yine SaOS₂ osteosarkom hücrelerinde proliferasyonun inhibe edilmesi ve apoptozun uyarılması için gerekli olan etkin doz olduğu gösterilmiştir (96). Bu nedenle biz de vitamin D konsantrasyonu olarak bu dozu belirledik. Thompson L. ve arkadaşlarının insan osteosarkom hücrelerinde yaptığı bir çalışmaya göre bu hücrelerin 96 saat boyunca 1,25 vitamin D₃ ile muamele edilmesinin vitamin D'nin antiproliferatif yollar üzerindeki etkisinin aktive olması için yeterli bulunmadığını göstermiştir (84). Ancak literatürde vitamin D'nin antiproliferatif etkisinin varlığını gösteren birçok çalışmada da mevcuttur (4, 96). Biz de çalışmamızda WST-1 analizlerimizden elde ettiğimiz sonuçlara göre, 24 saatin sonunda MG-63 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkiler göstermeyen atorvastatin ve/veya TNF- α tedavilerinin, vitamin D ilavesi ile antiproliferatif etkiler gösterdiğini bulduk.

Çalışmalar, D vitaminin, osteoklast farklılaşmasının kilit bir düzenleyicisi olan nükleer faktör kappa-B ligandının (RANKL) protein reseptör aktivatörünü kodlayan genin ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir (98). RANKL, TNF- α ve vitamin D gibi faktörler ile transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel seviyelerde düzenlenen, osteoblast hücrelerinden salgılanıp kemik rezorpsiyonu üzerine etkili olan bir peptittir. RANKL'ın kemikteki ana görevi osteoklast farklılaşması, olgunlaşması ve apoptozun inhibisyonunu sağlayarak kemik kaybı ve rezorpsiyonunu arttırmaktır (5). Bizim çalışmamızın sonuçları vitamin D uygulamasının MG-63 hücrelerinde RANKL ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde arttırdığını göstermektedir. TNF- α Kurban S. ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre RANKL düzeylerinde artışa neden olmaktadır (34). Ancak çalışmamızda RANKL ekspresyonlarını TNF- α uygulanmış MG-63 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %50 oranında azalmış olarak

izledik. Çeşitli çalışmalar, RANKL'in RANK'a bağlanması sonucunda NFκB gibi alt sinyal yollarının uyarıldığından bahsetmektedir (34). Literatürde POS-1, MOTO veya osteoblast benzeri Saos-2 gibi osteosarkom hücrelerinde RANK ekspresyonunun varlığını gösteren çalışmalar mevcut (5) olsa da MG-63 hücrelerinde böyle bir bulgu yoktur. Bundan dolayı biz de MG-63 hücrelerindeki RANKL ekspresyonlarındaki artışın NFκB ekspresyon artışı ile ilişkilendirilemeyeceğini düşünmekteyiz. Kemik defekt modeli oluşturulmuş sıçanlarda 5 günlük lokal simvastatin uygulamasından sonra RANKL ekspresyonlarında azalma saptanmıştır (41). Başka bir hayvan çalışmasında 10^{-8} M vitamin D uyarılmış osteoklast aktivitesinin simvastatin ve mevastatin ile antagonize edilerek, 7 günün sonunda RANKL ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (99). Literatürden farklı olarak 24 saat atorvastatin ve/veya TNF-α ile muamele ettiğimiz MG-63 hücrelerinde RANKL ekspresyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik. 10^{-6} M vitamin D ile uyarılan MG-63 hücrelerinde literatür ile uyumlu olarak RANKL ekspresyonlarında anlamlı bir artış izlerken atorvastatin ve/veya TNF-α ile artış gösteren RANKL ekspresyonlarında vitamin D'nin antagonist bir etki oluşturduğunu gördük. Sonuçlarımız ile diğer çalışma sonuçları arasındaki farklılığın zaman dilimlerinin farklılığından kaynaklanması olasıdır. Çalışmamızda RANKL ekspresyonları 24 saatin sonunda analiz edilirken, literatür çalışmalarında kemik hücrelerinin atorvastatin tedavisine gösterdiği yanıtın 5-7. günlerde izlendiği görülmektedir.

Statinlerin sistemik olarak anti-kanser tedavi amaçlı yardımcı veya ana ajan olarak kullanılması bazı organ disfonksiyonlarına neden olabilir. Örneğin yapılan bazı çalışmalarda statinlerin genel olarak sitokrom enzimlerini kullanarak metabolize edildiği ve buna bağlı atorvastatin gibi bazı lipofilik ajanların karaciğer hasarlarına neden olduğu bildirilmiştir. Yine statinlerin karaciğerde ilk geçiş etkisine uğrayarak bazılarının aktif bazılarının inaktif metabolitlerine dönmesi sonucu ilaç etkinliğinin azalması veya toksisitenin artması gözlemlenebilir. Ek olarak, fluvastatin hariç diğer statinlerin proteinlere bağlanarak taşınmasından kaynaklı ilaç-ilaç etkileşimlerine ve buna bağlı rabdomyoliz ve diğer toksisitelerin meydana gelebileceği önemli bir sorundur (38). Statinlerin bu tür yan etkilerinden kaçınmak amacıyla lokalize statin tedavisi (örn: biyolojik hedefleme kullanılarak) uygulanması hasta konforunu yükseltebileceği gibi, ilaç etkinliğinin de artmasını sağlayabilir.

6-SONUÇ VE ÖNERİLER

Atorvastatin ve/veya vitamin D MG-63 osteosarkom hücrelerinde 48 saat sonunda sitotoksik etkiler oluşturarak hücre canlılığını azaltmıştır.

Atorvastatin tedavisi MG-63 hücrelerinin yüzeye tutunma özelliklerini azaltmış, hücrelerde morfolojik değişiklikler meydana getirmiş ve kemik farklılaşma belirteçlerinden olan osteokalsin ekspresyonlarında yükselmelere neden olmuştur. Vitamin D atorvastatin tarafından oluşturulan bu etkileri ortamda TNF α varlığından bağımsız olarak azaltmış, hücrelerin yüzeye tutunma oranını arttırmış ve osteokalsin ekspresyonlarında azalmaya neden olmuştur.

Otofajik yolda yer alan ATG-4, LC-3B ve beclin-1, apoptotik süreçte görev alan GADD-45 ve ER stres ile ilişkili GADD-153 (CHOP) ekspresyonları atorvastatin konsantrasyonları ile artmış, vitamin D ilavesi ile bu artış baskılanmıştır. Ancak atorvastatin konsantrasyonunun yüksek olduğu gruplarda bu baskılanma çoğu gende (GADD-45, DTA5 grubu hariç) kontrol grubuna ait ekspresyon düzeylerine gerilememiştir. Atorvastatinin söz konusu genlere ait protein ekspresyonlarını azalttığı, atorvastatin ile birlikte uygulanan D vitamininin ise bu yollardaki protein sentezinde hafif artışa neden olduğu görülmüştür.

Anti-apoptotik yolda rol oynayan Bcl-2 ekspresyonları atorvastatin ile güçlü şekilde baskılanmış, ortama D vitamini ilavesi ile atorvastatinin etkisi zayıflamıştır. Ancak yine de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında atorvastatin ve vitamin D'nin birlikte uygulanması Bcl-2 ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalmaya yol açmıştır. Bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri mRNA ekspresyonları ile uyumlu olarak atorvastatin ile azalmış ancak vitamin D'nin uygulandığı gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturmamıştır.

Bu çalışmada atorvastatinin yüksek dozları kontrol grubuna göre her üç MMP (1-9-13) ekspresyon düzeyinde azalmaya neden oldu. Ek olarak matriks yıkımına neden olan MMP ekspresyonları TNF- α ile birlikte özellikle 10 ve 50 μ M atorvastatinin uygulandığı MG-63 hücrelerinde D vitamini ilavesiyle ciddi oranda düştü.

Kemik yıkımının uyarılmasından sorumlu RANKL, inflamatuvar sürecin başlaması ile uyarılan NFκB ekspresyonları atorvastatin ile artmıştır. Doğal bağışıklığın kilit reseptörlerinden TLR ekspresyonları ise düşük dozdaki atorvastatin ile uyarılmıştır. Bu uyarılar vitamin D ilavesi ile baskılanmıştır.

Vitamin D'nin atorvastatin ile oluşan VDR ekspresyonundaki azalma üzerine etkisi izlenmemiştir.

Çalışmamızın limitasyonları,

1. Hücre kültürü çalışması olduğu için homojen bir hücre ortamı mevcuttur. Buna bağlı olarak tümör mikro ortamında heterojen hücre gruplarının oluşturduğu farklı yolaklarla etkileşimi gözlemlemek mümkün olmamıştır.
2. Apoptoz yolaklarında rol alan genler araştırılmış fakat annexin-V boyaması yapılarak hücre döngüsünün hangi aşamasında olduğu incelenememiştir.
3. Atorvastatinin TNFα ve vitamin D ile olan kombinasyonlarında düşük atorvastatin dozlarının bu ilaçlarla gösterdiği etkiler ayrı ayrı incelenememiştir.
4. Atorvastatin ve vitamin D tarafından oluşturulan etkilerin sağlıklı osteoblast hücreleri üzerindeki yansımaları incelenememiştir.
5. İlaç uygulamalarına bağlı gelişen mRNA ve protein ekspresyonları arasındaki değişkenliğin daha iyi anlaşılabilmesi için deneyin kısa ve uzun dönemi kapsayan zaman dilimlerinde incelenmesi araştırılması gereken bir konudur.

7- KAYNAKLAR

1. Durfee RA, Mohammed M, Luu HH. Review of Osteosarcoma and Current Management. *Rheumatology and therapy*. 2016;3(2):221-43.
2. OSTEOSARCOMA. Union for International Cancer Control 2014 Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines. 2014.
3. Kantar M. Osteosarkom.
4. Kurucu N, Sahin G, Sari N, Ceylaner S, Ilhan IE. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with osteosarcoma risk and prognosis. *Journal of bone oncology*. 2019;14:100208.
5. Cote GM. Rank ligand as a target in musculoskeletal neoplasms. *Current reviews in musculoskeletal medicine*. 2015;8(4):339-43.
6. Zhang J, Yang Z, Xie L, Xu L, Xu D, Liu X. Statins, autophagy and cancer metastasis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(3):745-52.
7. Raghu VK, Beckwitt CH, Warita K, Wells A, Benos PV, Oltvai ZN. Biomarker identification for statin sensitivity of cancer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;495(1):659-65.
8. Kidd PM. Vitamins D and K as pleiotropic nutrients: clinical importance to the skeletal and cardiovascular systems and preliminary evidence for synergy. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2010;15(3):199-222.
9. Taşoğlu Ö. Miyaljide D Vitamini ve Statin İlişkisi: Statin Kullanılan Hastalarda D Vitamini Eksikliği Miyalji Gelişimi İçin Bir Risk Faktörü Müdür? 2012.
10. NIH. <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/>. National Cancer Institute, SEER Training Modules.
11. Ömeroğlu H. Composition, function, healing of the basic anatomic structures in the musculoskeletal system and the bone metabolism. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*. 2010;9(2):78-84.
12. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international*. 2015;2015:421746.
13. Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho JC, Vaziri A, Nazarian A. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review. *Journal of biomechanical engineering*. 2015;137(1).

14. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55(12):1531-46.
15. K. Henriksen MAK. Type 1 Collagen. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* 2019;Second Edition.
16. Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y, et al. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;287(2):337-42.
17. Rossi M, Battafarano G, Pepe J, Minisola S, Del Fattore A. The Endocrine Function of Osteocalcin Regulated by Bone Resorption: A Lesson from Reduced and Increased Bone Mass Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18).
18. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical biochemistry*. 2018;59:17-24.
19. Hao C, Cui Y, Owen S, Li W, Cheng S, Jiang WG. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review). *International journal of molecular medicine*. 2017;39(6):1327-37.
20. Castello LM, Raineri D, Salmi L, Clemente N, Vaschetto R, Quaglia M, et al. Osteopontin at the Crossroads of Inflammation and Tumor Progression. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:4049098.
21. Agustina H, Asyifa I, Aziz A, Hernowo BS. The Role of Osteocalcin and Alkaline Phosphatase Immunohistochemistry in Osteosarcoma Diagnosis. *Pathology research international*. 2018;2018:6346409.
22. Wu S, Sun J. Vitamin D, vitamin D receptor, and macroautophagy in inflammation and infection. *Discovery medicine*. 2011;11(59):325-35.
23. Shalpour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(9):3347-55.
24. Simpson S, Kaislasuo J, Guller S, Pal L. Thermal stability of cytokines: A review. *Cytokine*. 2019;125:154829.
25. Wang K, Karin M. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Advances in cancer research*. 2015;128:173-96.
26. Salvatore V, Teti G, Focaroli S, Mazzotti MC, Mazzotti A, Falconi M. The tumor microenvironment promotes cancer progression and cell migration. *Oncotarget*. 2017;8(6):9608-16.

27. Annibaldi A, Meier P. Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. *Trends in molecular medicine*. 2018;24(1):49-65.
28. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2006;25(3):409-16.
29. Avcioglu G, Ozbek Iptec B, Akcan G, Gorgun B, Fidan K, Carhan A, et al. Effects of 1,25-Dihydroxy vitamin D3 on TNF-alpha induced inflammation in human chondrocytes and SW1353 cells: a possible role for toll-like receptors. *Molecular and cellular biochemistry*. 2019.
30. Jing Y, Liang H, Zhang Y, Cleveland J, Yan J, Zhang D. Up-regulation of Toll-like Receptor 9 in Osteosarcoma. *Anticancer research*. 2015;35(11):5839-43.
31. Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(1):a011247.
32. Chen JQ, Szodoray P, Zeher M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2016;50(1):1-17.
33. Dajon M, Iribarren K, Cremer I. Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology*. 2017;222(1):89-100.
34. Kurban S, Mehmetoğlu İ. Osteoprotegerin, Rank ve Rank Ligandı. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2007;32(4):178-84.
35. Hanikoğlu F. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) ve Epoksomisin'in Osteosarkom Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkileri. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. 2014.
36. Clinic M. Cancer. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/symptoms-causes/syc-20370588>.
37. Yiallourous M, Tallen G. Osteosarcoma (Brief information). *Paediatric Oncology and Haematology*. 2009.
38. Corcos L, Le Jossic-Corcos C. Statins: perspectives in cancer therapeutics. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2013;45(10):795-802.
39. Ghavami S, Yeganeh B, Stelmack GL, Kashani HH, Sharma P, Cunnington R, et al. Apoptosis, autophagy and ER stress in mevalonate cascade inhibition-induced cell death of human atrial fibroblasts. *Cell death & disease*. 2012;3:e330.

40. Mansourian PG, Yoneda M, Krishna Rao M, Martinez FJ, Thomas E, Schiff ER. Effects of statins on the risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology & hepatology*. 2014;10(7):417-26.
41. Oryan A, Kamali A, Moshiri A. Potential mechanisms and applications of statins on osteogenesis: Current modalities, conflicts and future directions. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;215:12-24.
42. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(9):684-700.
43. Mathiasen IS, Sergeev IN, Bastholm L, Elling F, Norman AW, Jaattela M. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(34):30738-45.
44. Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Molecular cell*. 2007;25(2):193-205.
45. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological reviews*. 2016;96(1):365-408.
46. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(12).
47. Suvarna V, Singh V, Murahari M. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *European journal of pharmacology*. 2019;862:172655.
48. Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB, Zerbini LF. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Current molecular medicine*. 2012;12(5):634-51.
49. Arslan DÖ, Korkmaz G, Gözüaçık D. Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2011;2(4):184-94.
50. Wilde L, Tanson K, Curry J, Martinez-Outschoorn U. Autophagy in cancer: a complex relationship. *The Biochemical journal*. 2018;475(11):1939-54.
51. Fu Y, Huang Z, Hong L, Lu JH, Feng D, Yin XM, et al. Targeting ATG4 in Cancer Therapy. *Cancers*. 2019;11(5).
52. Hurley JH, Schulman BA. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion. *Cell*. 2014;157(2):300-11.

53. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
54. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
55. Li M, Fu Y, Yang Z, Yin XM. Measurement of the Activity of the Atg4 Cysteine Proteases. *Methods in enzymology*. 2017;587:207-25.
56. Satoo K, Noda NN, Kumeta H, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, et al. The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *The EMBO journal*. 2009;28(9):1341-50.
57. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007;3(6):542-5.
58. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
59. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(1):79-94.
60. Haddur E, Ozkaya AB, Ak H, Aydin HH. The effect of calcitriol on endoplasmic reticulum stress response. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2015;93(3):268-71.
61. Feng LJ, Jiang TC, Zhou CY, Yu CL, Shen YJ, Li J, et al. Activated macrophage-like synoviocytes are resistant to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in antigen-induced arthritis. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2014;63(5):335-46.
62. Wang S, Zhang M, Liu Z, Yang W, Shi J, Dean V, et al. Relationship between CHOP/GADD153 and unstable human carotid atherosclerotic plaque. *British journal of neurosurgery*. 2017;31(6):648-52.
63. Shen T, Li Y, Chen Z, Liang S, Guo Z, Wang P, et al. CHOP negatively regulates Polo-like kinase 2 expression via recruiting C/EBPalpha to the upstream-promoter in human osteosarcoma cell line during ER stress. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2017;89:207-15.
64. Mollazadeh H, Atkin SL, Butler AE, Ruscica M, Sirtori CR, Sahebkar A. The effect of statin therapy on endoplasmic reticulum stress. *Pharmacological research*. 2018;137:150-8.

65. Sheikholeslami K, Ali Sher A, Lockman S, Kroft D, Ganjibakhsh M, Nejati-Koshki K, et al. Simvastatin Induces Apoptosis in Medulloblastoma Brain Tumor Cells via Mevalonate Cascade Prenylation Substrates. *Cancers*. 2019;11(7).
66. Fromigue O, Hamidouche Z, Marie PJ. Blockade of the RhoA-JNK-c-Jun-MMP2 cascade by atorvastatin reduces osteosarcoma cell invasion. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(45):30549-56.
67. Jung JY, Woo SM, Kim WJ, Lee BN, Nor JE, Min KS, et al. Simvastatin inhibits the expression of inflammatory cytokines and cell adhesion molecules induced by LPS in human dental pulp cells. *International endodontic journal*. 2017;50(4):377-86.
68. Lin DS, Cai LY, Ding J, Gao WY. Correlation between E-cadherin-regulated cell adhesion and human osteosarcoma MG-63 cell anoikis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(19):8203-7.
69. Lu MH, Fan MF, Yu XD. NSD2 promotes osteosarcoma cell proliferation and metastasis by inhibiting E-cadherin expression. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017;21(5):928-36.
70. Fathi N, Ahmadian E, Shahi S, Roshangar L, Khan H, Kouhsoltani M, et al. Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2019;109:391-401.
71. Tang ML, Bai XJ, Li Y, Dai XJ, Yang F. MMP-1 Over-expression Promotes Malignancy and Stem-Like Properties of Human Osteosarcoma MG-63 Cells In Vitro. *Current medical science*. 2018;38(5):809-17.
72. Korpi JT, Hagstrom J, Lehtonen N, Parkkinen J, Sorsa T, Salo T, et al. Expression of matrix metalloproteinases-2, -8, -13, -26, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in human osteosarcoma. *Surgical oncology*. 2011;20(1):e18-22.
73. Chang HJ, Yang MJ, Yang YH, Hou MF, Hsueh EJ, Lin SR. MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. *Oncology reports*. 2009;22(5):1119-27.
74. Zhang D, Zhang W, Li D, Fu M, Chen R, Zhan Q. GADD45A inhibits autophagy by regulating the interaction between BECN1 and PIK3C3. *Autophagy*. 2015;11(12):2247-58.
75. Urbano F, Bugliani M, Filippello A, Scamporrino A, Di Mauro S, Di Pino A, et al. Atorvastatin but Not Pravastatin Impairs Mitochondrial Function in Human Pancreatic Islets and Rat beta-Cells. Direct Effect of Oxidative Stress. *Scientific reports*. 2017;7(1):11863.

76. Alarcon Martinez T, Zeybek ND, Muftuoglu S. Evaluation of the Cytotoxic and Autophagic Effects of Atorvastatin on MCF-7 Breast Cancer Cells. *Balkan medical journal*. 2018;35(3):256-62.
77. Yuk JM, Shin DM, Lee HM, Yang CS, Jin HS, Kim KK, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell host & microbe*. 2009;6(3):231-43.
78. Wang J, Lian H, Zhao Y, Kauss MA, Spindel S. Vitamin D3 induces autophagy of human myeloid leukemia cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(37):25596-605.
79. Ohadian Moghadam S, Nowroozi MR. Toll-like receptors: The role in bladder cancer development, progression and immunotherapy. *Scandinavian journal of immunology*. 2019:e12818.
80. Larousserie F, Bsiri L, Dumaine V, Dietrich C, Audebourg A, Radenen-Bussiere B, et al. Frontline Science: Human bone cells as a source of IL-27 under inflammatory conditions: role of TLRs and cytokines. *Journal of leukocyte biology*. 2017;101(6):1289-300.
81. Bachtiar BM, Bachtiar EW. Proinflammatory MG-63 cells response infection with *Enterococcus faecalis* cps2 evaluated by the expression of TLR-2, IL-1beta, and iNOS mRNA. *BMC research notes*. 2017;10(1):401.
82. Magan-Fernandez A, Fernandez-Barbero JE, F OV, Ortiz R, Galindo-Moreno P, Mesa F. Simvastatin exerts antiproliferative and differentiating effects on MG63 osteoblast-like cells: Morphological and immunocytochemical study. *Journal of periodontal research*. 2018;53(1):91-7.
83. Melguizo-Rodriguez L, Manzano-Moreno FJ, Illescas-Montes R, Ramos-Torrecillas J, Luna-Bertos E, Ruiz C, et al. Bone Protective Effect of Extra-Virgin Olive Oil Phenolic Compounds by Modulating Osteoblast Gene Expression. *Nutrients*. 2019;11(8).
84. Thompson L, Wang S, Tawfik O, Templeton K, Tancabelic J, Pinson D, et al. Effect of 25-hydroxyvitamin D3 and 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 on differentiation and apoptosis of human osteosarcoma cell lines. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2012;30(5):831-44.
85. Lau CPY, Fung CSH, Wong KC, Wang YH, Huang L, Tsui SKW, et al. Simvastatin Possesses Antitumor and Differentiation-Promoting Properties That Affect

Stromal Cells in Giant Cell Tumor of Bone. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2019.

86. Ruiz-Gaspa S, Nogues X, Enjuanes A, Monllau JC, Blanch J, Carreras R, et al. Simvastatin and atorvastatin enhance gene expression of collagen type 1 and osteocalcin in primary human osteoblasts and MG-63 cultures. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;101(6):1430-8.

87. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *The Clinical biochemist Reviews*. 2005;26(4):97-122.

88. Roeder E, Matthews BG, Kalajzic I. Visual reporters for study of the osteoblast lineage. *Bone*. 2016;92:189-95.

89. Zhang C, Chen B, Jiang K, Lao L, Shen H, Chen Z. Activation of TNF-alpha/NF-kappaB axis enhances CRL4B(DCAF)(11) E3 ligase activity and regulates cell cycle progression in human osteosarcoma cells. *Molecular oncology*. 2018;12(4):476-94.

90. Zhao B. Does TNF Promote or Restrain Osteoclastogenesis and Inflammatory Bone Resorption? *Critical reviews in immunology*. 2018;38(4):253-61.

91. Zhu N, Shao Y, Xu L, Yu L, Sun L. Gadd45-alpha and Gadd45-gamma utilize p38 and JNK signaling pathways to induce cell cycle G2/M arrest in Hep-G2 hepatoma cells. *Molecular biology reports*. 2009;36(8):2075-85.

92. Yang Z, Song L, Huang C. Gadd45 proteins as critical signal transducers linking NF-kappaB to MAPK cascades. *Current cancer drug targets*. 2009;9(8):915-30.

93. Fromiguet O, Hay E, Modrowski D, Bouvet S, Jacquelin A, Auberger P, et al. RhoA GTPase inactivation by statins induces osteosarcoma cell apoptosis by inhibiting p42/p44-MAPKs-Bcl-2 signaling independently of BMP-2 and cell differentiation. *Cell death and differentiation*. 2006;13(11):1845-56.

94. Nam SM, Jeon YJ. Proteostasis In The Endoplasmic Reticulum: Road to Cure. *Cancers*. 2019;11(11).

95. Selimovic D, Wahl RU, Ruiz E, Aslam R, Flanagan TW, Hassan SY, et al. Tumor necrosis factor-alpha triggers opposing signals in head and neck squamous cell carcinoma and induces apoptosis via mitochondrial- and non-mitochondrial-dependent pathways. *International journal of oncology*. 2019.

96. Yang H, Zhang Y, Zhou Z, Jiang X, Shen A. Snail-1 regulates VDR signaling and inhibits 1,25(OH)-D(3) action in osteosarcoma. *European journal of pharmacology*. 2011;670(2-3):341-6.

97. Ruza E, Sotillo E, Sierrasesumaga L, Azcona C, Patino-Garcia A. Analysis of polymorphisms of the vitamin D receptor, estrogen receptor, and collagen Ialpha1 genes and their relationship with height in children with bone cancer. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2003;25(10):780-6.
98. Ryan JW, Anderson PH, Morris HA. Pleiotropic Activities of Vitamin D Receptors - Adequate Activation for Multiple Health Outcomes. *The Clinical biochemist Reviews*. 2015;36(2):53-61.
99. Kaji H, Kanatani M, Sugimoto T, Chihara K. Statins modulate the levels of osteoprotegerin/receptor activator of NFkappaB ligand mRNA in mouse bone-cell cultures. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2005;37(10):589-92.



8- EKLER

EK-1: ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

Betül ÖZBEK İPTEÇ 1991 yılında Erzurum ilinde doğdu. İlkokul 4.sınıfa kadar Erzurum Özel Güneş İlköğretim Okulu'nda eğitim gördükten sonra Wooster Township Elementary School'da eğitim almaya devam etti. Altıncı sınıfta yeniden Türkiye'ye döndükten sonra ilköğrenimini Özel Güneş'te tamamladı. Lise öğrenimini Erzurum İbrahim Hakkı Fen Lisesi'de aldı. 2009 yılında girdiği Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesin'den 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılından bu yana Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak görev yapmakta olan Betül ÖZBEK İPTEÇ'in ulusal ve uluslararası dergilerde makaleleri, uluslararası kongrelerde sözlü bildirimleri ve posterleri ve bir adet kitap çevirisi bulunmaktadır.