



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Yüksek Lisans Tezi

**İNSAN A549 HÜCRE HATTINDA SİĞARA DUMANI ÖZÜTÜNÜN
OLUMSUZ ETKİLERİ**

Ezgi SARI

Biyoloji Anabilim Dalı

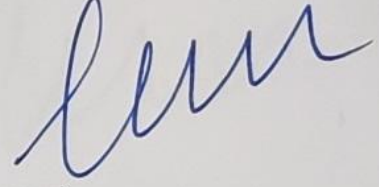
Moleküler Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Füsun ÖZTAY

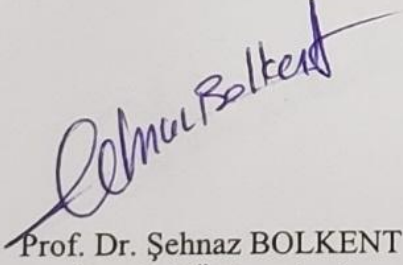
Ekim, 2019

Bu çalışma, 4.10.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

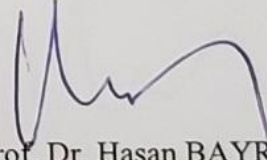
Tez Jürisi



Prof. Dr. Füsun ÖZTAY (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Hasan BAYRAM
Koç Üniversitesi
Tıp Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 29855 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Go anywhere without leaving your chair and let your thoughts run free!

Living within all the dreams you can spin, there is so much to see!

We'll journey to Mars and visit the stars, finding our Breakfast on Pluto."

– Don Partridge

Çocukluk hayallerimde hep Plüton'da kahvaltı etmek, Satürn'ün halkasında bisiklet sürmek, laboratuvarı hayatin temellerini keşfetmek vardı. Satürn'e gidemesem de kahvaltıyı Beşiktaş'ta yapsam da laboratuvarı bilim üzerine kurulu bir hayata adım atmayı başardığım için kendimi inanılmaz huzurlu hissediyorum.

Adım attığım bu yolda öncelikle en büyük teşekkürü, beni hiçbir zaman kırmayan, hep benim için mücadele eden ve karşılaştığım her sorunda koşa koşa yanlarına gittiğim canım ailem; okumayı ve öğrenmeyi bana sevdiren biricik annem Nurlan SARI, okumayı öğreten ve bir öğretmenin nasıl olması gerektiğini bana göstererek örnek olan tatlı babam Nadir SARI hak ediyor. Bana sundukları fırsatlar için ve onlardan sürekli uzak kalmak zorunda olsam da kendilerini hep benim yanımda hissettirdikleri için ikisini de sonsuz seviyor ve kalpten teşekkür ediyorum.

Akademik hayatımın şekillenmesinde bana bilgi birikimi ve yönlendirmeleri ile destek olup, nasıl bir araştırmacı olmam gerektiğini öğreten sevgili danışmanım Prof. Dr. Füsün ÖZTAY'a çok teşekkür ediyorum. Onun sayesinde bilimde nasıl bir rolüm olması gerektiğini öğrenip, ilerleyeceğim yolu belirledim ve bu yolda bana sunduğu imkânlardan ve bilgilerden çok değerli şeyler öğrendim. Ayrıca bu yolda çalışma azmi ve vizyonu ile bana örnek olan Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e de büyük teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma ortamımda ne zaman başım sıkışsa "Hocaam!" diyerek yanına koştuğumda bana hep gülümseyerek destek olan Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Karatug KAÇAR'a, anlamadığım yöntemleri sorduğumda hemen bana yardımcı olan sevgili ekip arkadaşım Dr. Özgecan KAYALAR'a ve tüm dertlerimi dinleyip her zor zamanımda yanımda olan, sadece ekip arkadaşım değil aynı zamanda dostum olan canım Uzm. Biyolog Merve YILDIRIM'a, yardımlarıyla ve tatlı arkadaşlıklarıyla hep yanımda olan Uzm. Biyolog Ertan ÇELİK ve Uzm. Biyolog Merve ERÇİN'e teşekkür etmeyi borç bilirim.

Kişisel hayatımda ise omuzlarında ağlayarak dertlerimi paylaşacak kadar sevdiğim ve artık ev arkadaşlarım değil kardeşlerim olan canımdan öte Dr. Dilara MAT ve Gülara MAT cici kardeşlerine ve hayatımın şekillenmesinde en büyük etkisi olan, diğer yarım, örnek aldığım bilim insanı, Dr. Serdar AKKOL'a kalbimden gelen en büyük teşekkürlerimi sunarım.

Carl Sagan'ın da dediği gibi, karanlık bir dünyada bilimin mum ışığında kalalım!

Ekim 2019

Ezgi SARI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. SİĞARA KULLANIMI VE AKCİĞER HASTALIKLARI.....	6
2.2. EPİTELİYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ	10
2.3. D VİTAMİNİ	13
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	18
3.1. SİĞARA DUMANI ÖZÜTÜNÜN (CSE) HAZIRLANMASI.....	18
3.2. D VİTAMİNİNİN HAZIRLANMASI.....	18
3.3. <i>IN VITRO</i> DENEYLER	18
3.4. HÜCRE CANLILIK TESTİ	19
3.5. PROTEİN İZOLASYONU VE ELEKTROFOREZ	20
3.6. WESTERN EMDİRİMİ.....	20
3.7. İMMUNFLORESAN YÖNTEMİ	22
3.8. FİBROTİK VE FİBROTİK OLMAYAN İNSAN AKCİĞER ÖRNEKLERİNDEN PROTEİN İZOLASYONU VE KO- İMMÜNPRESİPİTASYON	23
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. MTT CANLILIK TESTİ BULGULARI	24
4.2. FAZ-KONTRAST MİKROSKOBU BULGULARI.....	26
4.3. WESTERN EMDİRİMİ BULGULARI.....	29
4.3.1. D Vitamini Uygulamaları CSE ve CSE+TGF- β ile uyarılan A549 Hücrelerinde p-VDR Sinyallemenin Azaltılmasını Önledi	29

4.3.2. D Vitamini Uygulamaları, CSE ve CSE+TGF- β ile uyarılan A549 Hücrelerinde EMT Uyarımını Azaltır	31
4.3.3. CSE ve CSE TGF- β uygulamaları TGF- β sinyalini uyarır, D Vitamini uygulamaları bu uyarımı azaltır	35
4.3.4. CSE ve CSE TGF- β uygulamaları Wnt sinyalini uyarır, D Vitamini uygulamaları bu uyarıyı azaltır	40
4.3.5. CSE ve CSE TGF- β uygulamaları E-kaderin stabilizasyonunda ve yıkımında etkili proteinlerin sentezini arttırır, D Vitamini bu artışa engel olur	43
4.4. IMMÜNFLORESAN BULGULARI	47
4.5. FİBROTİK VE FİBROTİK OLMAYAN İNSAN AKCİĞER ÖRNEKLERİNDE P-VDR MİKTARI VE İLİŞKİLİ OLDUĞU PROTEİNLER	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere farklılaşması gösterilmektedir. Şekil, Kalluri ve Weinberg, 2009'dan Türkçe'ye çevrilmiştir. 11
- Şekil 2.2:** D vitamini türlerinin dönüşümü gösterilmektedir. Şekil von Essen ve Geisler (2018)'den Türkçeleştirilmiştir. 14
- Şekil 2.3:** D Vitaminin hücre içerisindeki sinyalleşmesi gösterilmektedir. Şekil von Essen ve Geisler (2018)'den Türkçeleştirilmiştir. 15
- Şekil 4.1:** %5 CSE ve 5 ng/ml TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Anlamlılık p değeri: $p < 0,001$ 24
- Şekil 4.2:** D vitamini (VitD) **(a)**, VitD+%5 CSE **(b)** ve VitD+%5CSE+TGF- β **(c)** uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Anlamlılık p değerleri: $p < 0,001$ ve $p < 0,0001$ 25
- Şekil 4.3:** %5 CSE ve 50 nM D vitamini (VitD) ile uyarılan A549 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü. Oklar birbirinden uzaklaşan ve iğsi şekil alan hücreleri göstermektedir. 40X büyütme; Bar: 100 μ m. 27
- Şekil 4.4:** %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile uyarılan A549 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü. Oklar birbirinden uzaklaşan ve iğsi şekil alan hücreleri göstermektedir. 40X büyütme; Bar: 100 μ m. 28
- Şekil 4.5:** %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p-VDR protein miktarlarındaki değişiklikler ve p-VDR proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırinci saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ 30
- Şekil 4.6:** %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde E-kaderin protein miktarlarındaki değişiklikler ve E-kaderin proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırinci saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ 33
- Şekil 4.7:** %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde α -SMA protein miktarlarındaki değişiklikler ve α -SMA proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırinci saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ 34
- Şekil 4.8:** %5 CSE ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p-SMAD2/3, SMAD4 ve SMAD7 protein miktarlarındaki değişiklikler ve bu proteinlerin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırinci saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ 37

Şekil 4.9: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p-SMAD2/3, SMAD4 ve SMAD7 protein miktarlarındaki değişiklikler ve bu proteinlerin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$	38
Şekil 4.10: D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p-SMAD 2/3, SMAD4 ve SMAD7 protein miktarlarındaki değişiklikler ve bu proteinlerin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$	39
Şekil 4.11: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde aktif β -katenin protein miktarlarındaki değişiklikler ve aktif β -katenin proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$	41
Şekil 4.12: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde DKK1 protein miktarlarındaki değişiklikler ve DKK1 proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$	42
Şekil 4.13: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p120ctn protein miktarlarındaki değişiklikler ve p120ctn proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$	44
Şekil 4.14: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde Kaiso protein miktarlarındaki değişiklikler ve Kaiso proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değeri: * $p<0,05$	45
Şekil 4.15: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde NEDD9 protein miktarlarındaki değişiklikler ve NEDD9 proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$	46
Şekil 4.16: A549 hücrelerine yapılan %5 CSE ve 50 nM VitD uygulamaları sonrası p-SMAD2/3(Cy3) ve p-VDR (FITC) proteinlerinin immünfloresan işaretlemesi gösterilmektedir. Bar büyüklüğü: 100 μ m	48
Şekil 4.17: A549 hücrelerine yapılan %5 CSE, TGF- β ve 50 nM VitD uygulamaları sonrası p-SMAD2/3(Cy3) ve p-VDR (FITC) proteinlerinin immünfloresan işaretlemesi gösterilmektedir. Bar büyüklüğü: 100 μ m	49
Şekil 4.18: A549 hücrelerine yapılan 50 nM VitD uygulamaları sonrası p-SMAD2/3(Cy3) ve p-VDR (FITC) proteinlerinin immünfloresan işaretlemesi gösterilmektedir. Bar büyüklüğü: 100 μ m	50
Şekil 4.19: A549 hücrelerine yapılan %5 CSE, TGF- β ve 50 nM VitD uygulamaları sonrası Kaiso (Cy3) ve p-VDR (FITC) proteinlerinin immünfloresan işaretlemesi gösterilmektedir. Bar büyüklüğü: 100 μ m	51

Şekil 4.20: Fibrotik ve fibrotik olmayan insan akciğer örneklerine ait p-VDR protein miktarları, p-VDR proteinin bantları **(a)** ve bu örneklerde p-VDR ile etkileşime giren aktif β -katenin ve Kaiso protein bantları **(b)** gösterilmektedir. Membranlarda p120ctn bandı belirlenemedi.....52



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Western emdirim (WB) ve immufloresan (IF) işaretlemede kullanılan antikorlar.....	21
---	----



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
μg	: Mikrogram
μm	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
A	: Amper
G	: Santrifüj kuvveti
IU	: Ünite
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
N	: Normal
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
ng	: Nanogram
OD	: Optik yoğunluk
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
U	: Ünite
WB	: Western emdirimi
V	: Voltaj

Kısaltmalar	Açıklama
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	: 1,25 dihidroksikolekalsiferol
$25(\text{OH})\text{D}_3$	: 25-dihidroksikolekalsiferol
$\alpha\text{-SMA}$	: Alfa-düz kas aktin
A549	: İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı
BSA	: Sığır serumu
BMP	: Kemik morfogolik protein

CSE	: Sigara dumanı özütü
CTGF	: Bağ dokusu büyüme faktörü
CYP24A1	: 25-hidroksivitaminD ₃ -24 hidroksilaz enzimi
CYP27B1	: 25-hidroksivitaminD ₃ -1 α -hidroksilaz
ECM	: Ekstrasellular matriks
EGF	: Epitelial büyüme faktörü
EMT	: Epitelial-mezenkimal geçiş
DMEM/F12	: Dulbeco'nun modifiye edilmiş medyum ve Ham'ın F12 medyum
FBS	: Fötal sığır serumu
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
HBE	: İnsan bronşiyal epitelyum hücreleri
HDAC	: Histon deasetilaz
IF	: İmmünfloresan
IFNγ	: İnterferon-gama
IL-1β	: İnterlökin 1-beta
IPF	: İdiyopatik pulmoner fibrozis
KOAH	: Kronik obstruktif akciğer hastalığı
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid
nAChR	: Nikotik asetilkolin reseptörü
NEDD9	: Nöral prekürsör hücrelerde gelişimsel olarak aşağı regüle edilen protein
NNK	: Nikotin türevli nitrosamin keton
p-SMAD2/3	: Fosforillenmiş SMAD2/3
p120ctn	: p120-Katenin
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PBS	: Fosfatla tamponlanmış tuzlu su
PBST	: Tween-20 içeren fosfatla tamponlanmış tuzlu su

PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PTH	: Paratiroid hormon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RXR	: Retinoid X reseptörü
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü- β
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
VDR	: Vitamin D reseptörü
VDRE	: Vitamin D reseptörü elementleri
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
VitD	: D Vitamini

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN A549 HÜCRE HATTINDA SİGARA DUMANI ÖZÜTÜNÜN OLUMSUZ ETKİLERİ

Ezgi SARI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Füsun ÖZTAY

Sigara kullanımı kronik akciğer hastalıklarının patogenezi ile doğrudan ilişkilidir. Sigara içeriğindeki 7000'den fazla zararlı madde, epiteliyal-mezenkimal geçiş (EMT)'i uyarabilir. EMT, idiyopatik pulmoner fibrozis (IPF), kronik obstruktif akciğer hastalığı ve akciğer kanserinin patogeneziinde etkilidir. Yapılan çalışmalar, D vitamininin fibrotik dokularda anti-fibrotik ve kanserde ise EMT'yi geriletici etkileri olduğunu göstermektedir. Ayrıca IPF hastalarında D vitamini eksikliği olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda (The present study), sigara ekstraktı özütü (CSE) ve TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasının, eksojen D vitamini (kolekalsiferol) ile önlenip önlenemeyeceği test edildi ve D vitamininin EMT ile ilişkili transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) ve Wnt/ β -katenin sinyal yolları ve çeşitli proteinlerle olan muhtemel etkileşimi araştırıldı.

İnsan A549 hücrelerinin bir kısmı, %5 CSE ve %5CSE+ 5ng/ml TGF- β ile uyarıldılar. Diğer bir grup hücre ise 50 nM D vitamini ile muamele edildikten yarım saat sonra %5 CSE ve %5CSE+TGF- β uyarıldı. Tüm hücreler, %5 CSE ve TGF- β uygulamalarını takip eden 24., 48. ve 72. saatlerde toplandılar. D vitaminin toksik olmayan dozu, MTT analizleri ile belirlendi. Hücre lizatlarında Western emdirimi yöntemi ile E-kaderin, α -SMA, p-VDR, p-SMAD2/3,

SMAD4, SMAD7, aktif β -katenin, DKK1, p120ctn, Kaiso ve NEDD9 proteinlerinin seviyelerindeki değişiklikler belirlendi. İmmü floresan yöntemi ile p-VDR/Kaiso ve p-VDR/p-SMAD2/3 proteinlerinin hücre içerisindeki konumları belirlendi. Fibrotik (IPF'li, n=3) ve fibrotik olmayan (n=4) insan akciğer örneklerinde, ko-immünpresipitasyon ile p-VDR ve aktif β -katenin, Kaiso ve p120ctn proteinleri ilişkilerine bakılarak, aralarındaki fiziksel etkileşim incelendi.

%5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde zamana bağlı olarak, p-VDR ve E-kaderin protein seviyelerinin azalıp, α -SMA seviyelerinin arttığı; TGF- β sinyal yolu elemanlarından p-SMAD2/3 ve SMAD4 seviyelerinin artarken, SMAD7 seviyelerinin azaldığı; Wnt sinyal yolu elemanlarından aktif β -katenin seviyelerinin artıp, DKK1 seviyelerinin azaldığı tespit edildi. Ayrıca bu hücrelerde, E-kaderin stabilizasyonunda görevli olan Kaiso ve p120ctn seviyelerinin ve E-kaderinin yıkımından sorumlu olan NEDD9 seviyelerinin de zamana bağlı olarak arttığı saptandı. CSE ve TGF- β uygulamalarından yarım saat önce A549 hücreleri 50 nM D vitamini ile muamele edildiklerinde, uyarılan p-VDR sinyalleme, E-kaderin seviyelerini arttırıp, α -SMA seviyelerini azaltarak EMT'nin gerilemesine sebep oldu. Ayrıca, p-SMAD2/3 ve SMAD4 protein seviyelerini azalması, SMAD7 seviyelerinin artması nedeniyle TGF- β sinyal yolu aktivasyonun; aktif β -katenin protein seviyelerini azaltılması ve DKK1 seviyelerini arttırılması yolları ile de Wnt sinyal yolu aktivasyonunun azaldığı belirlendi. Ayrıca, D vitamini uygulamaları, %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde p120ctn, Kaiso ve NEDD9 protein seviyelerini azaltarak E-kaderin yıkımını önlediği saptandı. İmmü floresan analizler, CSE ve TGF- β uygulanan gruplarda hücrelerin sitoplazma ve nukleusunda görülen p-VDR immunoreaktivitesinin (IR) azaldığını göstermektedir. Bu gruplarda ayrıca nuklear p-SMAD2/3-IR'nin arttığı, Kaiso-IR'nin ise sitoplazmada artarak nukleus periferinde yoğunlaştığı belirlendi. D vitamini uygulanan gruplarda ise sitoplazmik ve nuklear p-VDR-IR artarken; p-SMAD2/3-IR'nin çoğunlukla sitoplazmada, Kaiso-IR'nin ise nukleus ve nukleus periferinde yoğunlaştığı tespit edildi. Yapılan ko-immünopresipitasyon analizler, IPF'li insan akciğerlerinde p-VDR proteinin Kaiso ve aktif β -katenin ile fiziksel olarak etkileşebileceğini, p-VDR'nin p120ctn ile bağlantı kurmadığını ortaya koydu.

%5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uygulamaları, A549 hücrelerinde p-VDR sinyallemenin azalmasına bağlı olarak TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarının aktivasyonunu, E-kaderin stabilizasyonunu ve yıkımını düzenleyen p120ctn ve NEDD9 proteinlerin ekspresyonunun uyarır. Bu durum, A549 hücrelerinin E-kaderin protein miktarını azaltıp, α -SMA proteinini üretmeye başlamalarına neden olarak hücreleri EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasına yönlendirmektedir. Bu sonuçlar, sigara içiciliği, sigara içiciliğine eşlik eden TGF- β sinyal yolunun aşırı aktivasyonu ve azalan VDR sinyallemenin, IPF gelişiminde önemli risk faktörleri olabileceğini açıkça göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızın verileri, CSE ve TGF- β uygulamalarından yarım saat önce A549 hücrelerinin 50 nM D vitamini ile muamele edildiklerinde, bu hücrelerde VDR sinyallemenin artmasının DKK1, aktif β -katenin ve Kaiso proteinleri aracılığı ile TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarının aktivasyonunun azalmasını sağlayarak A549 hücrelerini EMT'ye karşı koruduğunu ortaya koymaktadır. İlâveten, VDR sinyalleme β -katenin ve Kaisonun transkripsiyonel aktivitesini kontrol ederek hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonunu düzenler. Sigara içiciliği, sigara içiciliğine eşlik eden TGF- β sinyal yolunun aşırı aktivasyonu ve azalan VDR sinyalleme, EMT'ye neden olduğu için IPF gelişimine sebep olabilirler. D vitamini eksikliği olan IPF hastalarının

tedavisinde kullanılan terapötiklerin yanında ek destek olarak D vitamini kullanımı önerilebilir.
Ekim, 2019, 106 sayfa.

Anahtar kelimeler: Sigara dumanı özütü, TGF- β , D vitamini, IPF, EMT, Wnt sinyal yolu



SUMMARY

M.Sc. THESIS

ADVERSE EFFECTS OF CIGARETTE SMOKE EXTRACT ON THE HUMAN A549 CELL LINE

Ezgi SARI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Füsün ÖZTAY

Smoking is directly related to the pathogenesis of chronic lung diseases. Cigarette with more than 7000 harmful substances in its content can stimulate epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT has a role in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. Studies have shown that vitamin D has anti-fibrotic effects in fibrotic tissues and EMT regressive effects in cancer. It is also known that IPF patients have vitamin D deficiency. In the present study, we tested EMT-mediated myofibroblast differentiation whether or not could be prevented by exogenous vitamin D (cholecalciferol) in cigarette extract (CSE) and TGF- β -stimulated A549 cells. Additionally, interactions of EMT-associated transforming growth factor beta (TGF- β), Wnt / β -catenin signaling pathways and various proteins with vitamin D were investigated.

One group of human A549 cells was stimulated with 5% CSE and 5% CSE + 5ng / ml TGF- β . Second group was treated with 50 nM vitamin D half an hour before stimulating with 5% CSE and 5% CSE + TGF- β . All cells were collected at 24, 48 and 72 hours following 5% CSE and TGF- β stimulation. The nontoxic dose of vitamin D was determined by MTT analysis. Changes

in levels of E-cadherin, α -SMA, p-VDR, p-SMAD2/3, SMAD4, SMAD7, active β -catenin, DKK1, p120ctn, Kaiso, and NEDD9 proteins were determined by Western impregnation method from cell lysates. Cellular localizations of P-VDR/Kaiso and p-VDR/p-SMAD2/3 proteins were determined by immunofluorescence method. The physical interactions between p-VDR and active β -catenin, Kaiso and p120ctn proteins were examined by co-immunoprecipitation in fibrotic (IPF, n = 3) and non-fibrotic (n = 4) human lung samples.

In the A549 cells that were stimulated with 5% CSE and 5% CSE + TGF- β , p-VDR and E-cadherin protein levels decreased and α -SMA levels increased; TGF- β signaling pathway elements that p-SMAD2/3 and SMAD4 levels increased while SMAD7 levels decreased when time progresses. It was found that active β -catenin levels increased and DKK1 levels decreased from Wnt signaling pathway elements. In addition, the levels of Kaiso and p120ctn, which are involved in the stabilization of E-cadherin and NEDD9 levels which is responsible for the destruction of E-cadherin were also increased in these cells when time progresses. When the A549 cells were treated with 50 nM vitamin D half an hour before CSE and TGF- β stimulation, induced p-VDR signaling increased the levels of E-cadherin and reduced α -SMA levels, causing EMT regression. In addition, TGF- β signaling pathway activation decreased due to reduced levels of p-SMAD2/3 and SMAD4 protein with elevated levels of SMAD7 protein; Wnt signaling pathway activation was also decreased by reduced levels of active β -catenin protein and elevated DKK1 levels. In addition, vitamin D applications prevented the destruction of E-cadherin by reduced p120ctn, Kaiso and NEDD9 protein levels in A549 cells that were stimulated with 5% CSE and 5% CSE+TGF- β . Immunofluorescence analysis showed that in CSE and TGF- β treated groups, the p-VDR immunoreactivity (IR) in the cytoplasm and nucleus of the cell is decreased; furthermore, it was seen that p-SMAD2/3-IR was increased in nucleus but Kaiso-IR was increased in cytoplasm, mostly around nucleus periphery. In vitamin D treated groups, while cytoplasmic and nuclear p-VDR-IR was increased, p-SMAD2/3-IR was increased in cytoplasm but Kaiso-IR concentrated in the nucleus and nucleus periphery. Co-immunoprecipitation analysis revealed that in human lungs with IPF, the p-VDR protein could physically interact with Kaiso and active β -catenin and also that p-VDR did not interact with p120ctn.

Due to decreased p-VDR signaling in A549 cells, applications of 5% CSE and 5% CSE+TGF- β stimulated the activation of TGF- β and Wnt/ β -catenin signaling pathways along with expression of p120ctn and NEDD9 proteins which regulate the E-cadherin stabilization and degradation. This lead the A549 cells to decrease the amount of E-cadherin protein and start to produce α -SMA protein, which then caused EMT-mediated myofibroblast differentiation. These results clearly show that smoking and excessive activation of TGF- β signaling pathway associated with smoking, together with decreased VDR signaling might be important risk factors for IPF development. In addition, the results of the current study showed that, when treated with 50 nM vitamin D of A549 cells half an hour before CSE and TGF- β administration, the increase in VDR signaling in these cells was mediated by DKK1, active β -catenin and Kaiso proteins, and the increase of vitamin D signalling reduced the activation of TGF- β and Wnt/ β -catenin pathways thus protecting the A549 cells against EMT. In addition, VDR signaling regulated the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cells by controlling the transcriptional activity of β -catenin and Kaiso. Smoking, overactivation of the TGF- β signaling pathway associated with smoking, and decreased VDR signaling may lead to IPF development,

leading to EMT. In addition to the therapeutics used in the treatment of IPF patients with vitamin D deficiency, the use of vitamin D as additional support may be recommended.

October 2019, 106 pages.

Keywords: Cigarette smoke extract, TGF- β , Vitamin D, IPF, EMT, Wnt signalling pathway



1. GİRİŞ

İdiyopatik pulmoner fibrozis (**IPF**), diffüz parankimal bir akciğer hastalığıdır ve hastalığa neden olan etmenler kesin olarak bilinmemektedir (Wilson ve Wynn, 2009). IPF, özellikle orta- ileri yaşlarda ortaya çıkar ve sıklıkla erkeklerde görülür. Sigara kullanımı, hava kirliliği, gastroözofageal reflü ile uzun süreli talaşa, kömüre, pestisite ve kuma maruz kalma (çeşitli mesleki maruziyetler) IPF'e neden olabilir (Ley ve Collard, 2013). IPF'in yıllık insidansı Amerika için 6,8-8,8/100.000, Japonya için 2,95/100.000 ve Avrupa için 0,22-74/100.000 olarak gösterilmektedir (Çetinoğlu, 2014). Türkiye'de ise hastalığın insidansı erkeklerde 10,7/100.000, kadınlarda 7,4/100.000 olarak belirlenmiştir (Okutan ve Çalışkan, 2011). IPF, interstisiyel akciğer hastalıkları arasında düşük oranda görülmesine karşın, oldukça agresif seyreden bir hastalıktır. Tanı konulduktan 5 yıl sonra, % 30 civarına düşük bir sağ kalım oranı gösterebilmektedir (Perez ve diğ., 2003). Bugün için IPF tedavisinde pirfenidon ve nintedanib isimli iki ilaç klinikte kullanılmaktadır. Anti-fibrotik etkili her iki ilacın, üçüncü aşamadaki IPF hastalarında 52. haftanın sonunda hastalığın seyrini geriletebildiği bildirilmiştir (Barratt ve diğ., 2018). Ancak, bu iki ilacın anti-fibrotik etkilerinin yanı sıra yan etkilerinin de bulunması nedeniyle IPF tedavisi sınırlanmaktadır (Mayo Clinic, 2018).

Pulmoner fibrozis oluşumunda, başlangıçta, IPF'e sebep olan etmenler tarafından oluşturulan doku hasarı ve onu takip eden bir inflamatuvar süreç görülür. Hasar etmenleri, pulmoner epitel ve endotel hücreleri ile akciğer parenşiminde yaralanmalara neden olur. Hasar sonrası yara bölgesine diffüz eden nötrofil ve makrofajlar, salgıladıkları tümör nekrozis faktör-alfa (**TNF- α**), transforme edici büyüme faktörü- β (**TGF- β**), interlökin 1-beta (**IL-1 β**), IL-2, interferon-gama (**IFN γ**) gibi proinflamatuvar ve inflamatuvar sitokinlerle, pulmoner epitel, endotel ve mezenşim hücrelerinden epitelial büyüme faktörü (**EGF**), fibroblast büyüme faktörü (**FGF**), platelet kaynaklı büyüme faktörü (**PDGF**), bağ dokusu büyüme faktörü (**CTGF**), vasküler endotel büyüme faktörü (**VEGF**) gibi çeşitli büyüme faktörlerinin salgılanmasına neden olurlar (Crosby ve Walters, 2010; Kendall ve Feghali-Bostwick, 2014; Kolahian ve diğ., 2016). Ardından, hücreler, oluşan bu hasarı giderebilmek için onarım sürecine yölenirler. Hücrelerden salgılanan büyüme faktörleri, hasarlı dokuda onarımı başlatabilmek için epitel hücrelerinin, fibroblastların ve miyofibroblastların çoğalmalarını uyarır (Yılmaz ve diğ., 2015). Sayıca artan mezenkimal hücreler, fibronektin, kollagen gibi

ekstrasellular matriks (**ECM**) elemanlarını üretip hücreler arası alana salgırlar. Fibrotik sinyallerin devamı söz konusu ise, özellikle fibroblast/miyofibroblast sayısı artmaya devam eder. Hücreler arası alanda ECM elemanlarının birikimi hızla artar ve bu yığınlar proteazlarca sindirilip, yeterince dokudan uzaklaştırılmazlar (Övet ve Öztay, 2014). Sonuçta, pek çok fibrotik odağa sahip, özellikle interstisiyel alanda biriken kollagen nedeniyle sertleşen, gaz değişimin yapıldığı pulmoner epitel hasar gören ve tüm bunlara bağlı olarak solunum fonksiyonu azalan bir fibrotik akciğer oluşumu gözlenir (Raghu ve diğ., 2011; Cooper ve diğ., 2016).

TGF- β , alveolar makrofajlar, nötrofiller, pulmoner epitel ve mezenkimal hücrelerden salgılanan güçlü bir fibrotik sinyal moleküldür (Biernacka ve diğ., 2011). IPF hastalarının akciğerlerinden alınan kesitlerde, TGF- β immünoreaktivitesi oldukça yüksek pnömositler ve alveolar makrofajlar gözlemlenmiştir. Bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, TGF- β 'nın miyofibroblast farklılaşmasını ve kollagen genlerinin transkripsiyonunu uyararak, ayrıca ECM devinimini düzenleyen çeşitli proteazların üretimini ve aktivitesini kontrol ederek pulmoner fibrozis oluşumuna neden olduğu ortaya konmuştur (Fernandez ve Eickelberg, 2012; Ovet ve Oztay, 2014; Oruç ve diğ., 2015). Diğer yandan, TGF- β , IPF'li hastaların akciğerlerinde, pulmoner epitel hücrelerinden tip 2 pnömositlerin mezenkimal bir hücre olan miyofibroblastlara farklılaşmalarına neden olmaktadır (Kim ve diğ., 2009). Epitel hücrelerin epitel fenotiplerini kaybedip, mezenkimal hücre özellikleri kazanmaları olarak bilinen epitelial-mezenkimal geçiş (**EMT**), pulmoner fibrozisli kemirgen akciğerlerinde de rapor edilmiştir (Zhou ve diğ., 2017). Sıçan akciğerinden izole edilen primer tip 2 pnömositler TGF- β ile uyarıldıklarında, bu hücrelerin epitel hücre proteinlerini üretmeyi bırakıp, vimentin, alfa-düz kas aktin (**α -SMA**, miyofibroblast belirteci), kollagen ve fibronektin gibi proteinleri üretmeye başladıkları ve miyofibroblastlara farklılaştıkları saptanmıştır (Yao ve diğ., 2004). İnsan A549 hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, TGF- β uyarımı sonrasında hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyal yolunun uyarıldığı ve hücrelerdeki EMT sürecinin bu iki güçlü sinyal yolu ile kontrol edildiği ortaya çıkarılmıştır (Yıldırım, 2018; Kayalar, 2019). Bu veriler, TGF- β 'nın akciğerlerde EMT aracılığı ile de tip 2 pnömositlerin miyofibroblastlara farklılaşmalarını sağladığını ve böylece yeni fibrotik odak gelişimine neden olabileceğini açıkça göstermektedir.

Sigara, IPF dahil olmak üzere diğer akut ve kronik akciğer hastalıklarının patogeneğinde ön plana çıkan kuvvetli bir hastalık etmenidir. Dünya genelinde her gün yaklaşık olarak 2300'den fazla 18 yaşının altında olan gençlerin sigaraya başladığı ve yaklaşık olarak 400'dan fazla 18 yaşının altındaki gencin de uzun süreli tütün kullanıcısı olduğu bildirilmektedir (SAMHSA, 2016). Türkiye İstatistik Kurumu'nun 26 Nisan 2018'de yayınladığı verilere göre, Türkiye'de 2017 yılında gerçekleşen 420 bin 189 ölümün %12'si tütün ve tütün ürünlerinin kullanımına bağlı solunum sistemi hastalıkları nedeniyle (TÜİK, 2018). Sigara dumanında katran ve gaz fazlarından oluşur, içeriğinde çeşitli serbest radikaller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (**PAH**), nikotin türevli nitrosamin keton (**NNK**), N-nitrozaminler, aromatik aminler, benzopren, aldehitler, uçucu organik hidrokarbonlar ve metaller dahil pek çok toksik ve kanserojen maddeler bulunur (IARC, 2004). Sigara dumanının içindeki moleküller, dokunun DNA başta olmak üzere, protein, lipid ve karbohidratları ile kolayca etkileşerek onların yapılarını ve aktivitelerini değiştirir (Mossina ve diğ., 2016). Bunun sonucunda hücrede apoptoz, inflamatuvar yanıt, hücre yaşlanması, dokuda fibrotik yanıt gibi olaylar gelişebilmektedir (Öztay ve diğ., 2019). Sigara kullanıyor olmak IPF olma olasılığını %60 oranında arttırabilmektedir (Baumgartner ve diğ., 1997). Sigara içen ve içmeyen IPF hastaları kıyaslandığında, sigara içen hastaların, içmeyen hastalara göre IPF'e daha genç yaşta yakalandığı bildirilmiştir (Kärkkäinen ve diğ., 2017). Sigara kullanımının IPF ile ilişkisini ortaya koymak için yapılan bir *in vivo* çalışmada, fareler 40 gün boyunca her gün yaklaşık 1 saat sigara dumanına maruz bırakıldıklarında (haftada 5 gün, günde 12 sigara), fare akciğerlerinde doku hasarı, çökmüş alveoller, pulmoner inflamasyon ve kollagen miktarında artışlar gözlemlenmiştir. Yapılan *in vitro* deneylerde ise, %2, %5 ve %10 sigara dumanı özütü (**CSE**) ile uyarılan akciğer fibroblastlarında ve A549 hücrelerinde hücre proliferasyonunun uyarıldığı, TGF- β sinyal yolunun aktive olduğu, fosforillenmiş SMAD2/3 (**p-SMAD2/3**) ve Akt protein miktarlarının arttığı, ayrıca kollagen-1 üretiminin de uyarıldığı bulunmuştur (Liao ve diğ., 2018; Zhou ve diğ., 2018). Sigara dumanında bulunan nikotin, reaktif oksijen türleri (**ROS**), PAH ve NKK gibi maddelerin TGF- β sinyal yolunu, EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini ve pro-fibrotik genleri aktive ederek çeşitli hücre hatlarında EMT'yi uyarabileceği tespit edilmiştir (Vu ve diğ., 2016; Kim ve diğ., 2018). A549 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, 1, 3 ve 5 haftalık CSE maruziyetinin bu hücrelerde fibronektin, TGF- β 1, TGF- β 2, matriks metalloproteinaz (**MMP**)-2, MMP-7, IL-8, gibi 1000'den fazla pro-fibrotik gen ve proteinin ekspresyon düzeyinde önemli bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar bu

bulgulara dayanarak, sigaranın TGF- β ve Wnt sinyal yolları ile çok sayıda profibrotik gen transkripsiyonunu uyardığını, bu nedenle sigara kullanan insanlarda IPF gelişiminin görülebileceğini ileri sürmüşlerdir (Checa ve diğ., 2016).

D vitamini, steroid türevli bir prohormondur. Etkisini retinoid X reseptörü (**RXR**) aracılığıyla sitoplazmik vitamin D reseptörüne (**VDR**) bağlanarak gösterir. VDR'ye bağlanan D vitamini nükleusa geçer ve hedef genleri üzerinde etkisini gösterir (Murray ve diğ., 2012). Esas olarak, vücutta kalsiyum-fosfat dengesinden sorumlu olsa da, yapılan çalışmalarda D vitamininin inflamasyon, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşması ile ilgili 200'e yakın geni kontrol edebildiği ortaya konmuştur (Hollick ve Garabedian, 2006). D vitamini eksikliği olan insanlarda, özellikle çocuklarda, astım ve alerji gibi inflamatuvar hastalıkların görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir (Majak ve diğ., 2011). Kronik obstruktif akciğer hastalarında (**KOAH**) ise D vitamini seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir (Huges ve Norton, 2009). IPF hastalarında serumda D vitamini eksikliği olduğu bilinmektedir (Tzilas ve diğ., 2019). D vitamini eksikliği, pulmoner fibrozis ve bozulmuş akciğer fonksiyonu ile ilişkilidir, ancak altta yatan mekanizma henüz tam olarak açıklanamamıştır. Kronik D vitamini eksikliği, farelerde akciğer yapılarını tahrip eder, akciğer gelişimini bozar ve aşırı ECM birikimini uyatabilmektedir (Mirković ve de Borst, 2012; Shi ve diğ., 2017b). D vitamini uygulamalarının, farelerde bleomisin tarafından indüklenen pulmoner fibrozisi azalttığı bildirilmiştir. Bleomisinle uyarılan pulmoner fibrozis esnasında artan TGF- β ve α -SMA protein seviyelerinin, bu hayvanlara D vitamini verilmesinden sonra önemli miktarlarda azaldığı gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2015a). Diğer yandan, farelerle yapılan bir başka çalışmada, VDR sinyallemeinin TGF- β /SMAD3 tarafından regüle edilen profibrotik genlerin transkripsiyonunu önleyerek (SMAD3'ün bağlanacağı bölgelere VDR bağlanması suretiyle) karaciğer fibrozisini engelleyebildiği bulunmuştur (Ding ve diğ., 2013). Ayrıca, VDR geni çıkarılan deri kanserli farelerde, normal sağlıklı farelere göre β -katenin gen ekspresyonunun önemli miktarda arttığı, bu nedenle VDR sinyallemeinin Wnt/ β -katenin sinyalini inhibe ederek deride tümör gelişimini durdurabileceği saptanmıştır (Bikle, 2011). Bu veriler, D vitaminin anti-fibrotik etki yanı sıra, Wnt sinyalini de azaltarak anti-kanserojen etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Sigara kullanımı, D vitaminin vücuttaki seviyesini ve etkilerini sınırlayabilmektedir. Sigara kullanan nazal polipli kronik rinisinüzit hastalarının kan seviyelerinde D vitamini miktarının kontrol grubuna göre az olduğu bildirilerek, rinisinüzit hastalarında sigara kullanımının D vitamini seviyesini etkilediğini ve tedavi olarak ekzojen D

vitamini alımının bu etkiyi azaltabileceği sonucuna varılmıştır. Yine aynı çalışmada CSE'ye maruz kalan insan sinonazal epitel hücrelerinde, D vitamininin aktif formunu kazanmasını sağlayan bir enzim olan 25-hidroksivitaminD₃-1 α - hidroksilaz'ı (**CYP27B1**) azaldığı ortaya çıkarılmıştır (Mulligan ve diğ., 2014).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarla, CSE'ye maruz kalan fare akciğerlerinde fibrozis gelişebildiği, ilaveten CSE ile muamele edilen akciğer fibroblastlarında kollagen üretiminin, A549 hücrelerinde ise EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasının uyarıldığı ortaya çıkarılmıştır (Yan ve diğ., 2015; Checa ve diğ., 2016). Anti-fibrotik ajan olarak D vitaminin kullanıldığı bir çalışmada da TGF- β ve α -SMA seviyelerinin azaltılması yolu ile bleomisin ile uyarılan pulmoner fibrozisin geriletilebildiği gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2015a). A549 hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada da, kısa süreli (5 dk) CSE maruziyetinin bu hücrelerde VDR sinyallemeği azalttığı tespit edilmiştir (Uh ve diğ., 2012). Mevcut çalışmamızda, CSE ve TGF- β ile muamele edilen A549 hücrelerinde uyarılması beklenen EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasının, eksojen D vitamini (kolekalsiferol) ile önlenip önlenemeyeceği test edildi. Daha önce yapılan çalışmalar içerisinde CSE ve TGF- β uygulamalarının birlikte uygulanarak EMT'nin uyarıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu deneysel model, sigara içen ve TGF- β aktivasyonu olan IPF hastalarındaki durumu temsil etmektedir. Çalışmada, D vitaminin EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasını önlemede TGF- β ve Wnt sinyalleri ile olan karşılıklı etkileşimi ilk kez ele alınacaktır. D vitaminin ilgili sinyal yolları ile olan karşılıklı etkileşiminde ve EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasının geriletmesinde VDR sinyalinin hedef gen ve proteinlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca, bu çalışmada D vitamini ile EMT'nin gerletildiği durumlarda E-kaderin proteininin hücre membranında stabilizasyonu ve hücrede lizozomal yıkımını düzenleyen p120-katenin (**p120ctn**) ve nöral prekürsör hücrelerde gelişimsel olarak aşağı regüle edilen protein-9 (**NEDD9**) proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimler ilk kez değerlendirilecektir. Elde edilecek olan veriler, özellikle sigara kullanımı sonucu gelişebilen fibrozis ve EMT'nin görüldüğü akciğer hastalıklarının tedavisinde, D vitamininin kullanımının önerilmesine yardımcı olabilir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SİĞARA KULLANIMI VE AKCİĞER HASTALIKLARI

Bir tütün ürünü olan sigara, tek bir nefeste bile 7000'den fazla kimyasal ve karsinojenin vücuda alınmasına sebep olur. İçerisinde vücuttaki doku ve organlara zarar verebilecek maddeler arasında nikotin, katran, kadmiyum, amonyak, asetaldehit, karbon monoksit, nikel, fosil yakıtların da dahil olduğu PAH'lar, uçucu organik bileşikler (benzen, tolüen, akrolein, ksilen vb.) aromatik ve heterosiklik aminler (ortho-toluidine, 1-naphthylamine), sigaraya özgü nitrozaminler (nitrosamine ketone, N-nitrosornicotine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone vb.) ve benzo(a)pren gibi birçok kimyasal maddeler bulunur (Harris, 1996; USDHHS, 2010; Chang ve diğ., 2017). Sigara kullanımı, genel olarak, akciğer kanseri, IPF, amfizem, KOAH, kronik bronşit ve astım gibi çeşitli akciğer hastalıklarının patogenezi ile direkt olarak ilgilidir. Ayrıca, diyabet, iskemik inme, kardiyovasküler hastalıklar, infertilite, motor reflekslerde kalıcı hasar, uzun süreli/kısa süreli hafızada hasar sonucu öğrenme bozukluğu vb. gibi birçok hastalığa da sebep olabilmektedir (Hritcu ve diğ., 2009; USDHHS, 2010; Markidan ve diğ., 2018).

Sigaranın hem gaz hem de katran fazının zararları oldukça fazladır ve birçok kanser türüne sebep olduğu bilinmektedir. Surgeon General, sigaranın kansere sebep olduğunun ilk kanıtı olan makalesini 1964'te yayınladığı zaman, tütün sektörü ile ilgilenen birçok firma bu bildiriye görmezden gelerek satışlarını arttırmaya yönelik politikalar geliştirmiş ve bu raporu yalanlamaya çalışmıştır. Sigaranın kansere sebep olabileceğini gösteren araştırmalar birbiri ardı sıra yayınlanmaya başlayınca, tütün sektöründe yeni arayışlara başlanmış ve sigaranın zararlı etkilerinin azaltıldığı düşünülen farklı tütün ürünleri piyasaya sürülmüştür. Filtreli sigaralar, nikotin ve katranı azaltılmış "light" sigaralar, içimi kolaylaştırmaya yönelik mentollü sigaralar piyasayada satılmaya başlanmıştır. Ancak, bu yeni ürünlerde kullanılan filtrelerden asbest ve karbon gibi yeni toksik maddelerin de salındığı ortaya çıkarılmıştır (USDHHS, 2010). Yapılan bir *in vivo* çalışmada, nikotinli sigaraların yanı sıra nikotinsiz sigara dumanına maruz kalan fare gruplarının akciğerlerinde alerjik yanıtı sebep olan alerjen spesifik immünglobulin E'nin, inflamasyon belirteçlerinden IL-4 ve IL-5'in ve kollagen-1 seviyelerinin artarak astıma sebep olduğu bildirilmiştir (Tilp ve diğ., 2016). Hâlâ günümüzde

sigara kadar zararlı etkilerinin olmadığı düşünölen sigara benzeri elektronik sigara, tütünü yakmayan sigara, filtresi geliştirilmiş sigara başlığı altında insan sağlığı için zararlı olabilen alternatif tütün ürünleri piyasada bulunmaktadır. Ancak yapılan son çalışmalarda özellikle çeşitli aromalara sahip elektronik sigaraların da benzaltheit gibi birçok iritan ve toksik madde içermesi nedeniyle birçok akciğer hastalığına sebep olduğu bilinmektedir (USDHHS, 2010). Ayrıca elektronik sigara cihazı, yüksek voltajda kullanıldığında meydana gelen farklı ısıtma koşullarında, içerdigi aerosol miktarı ve toksik bileşen seviyeleri büyük ölçüde artabilir. Örneğin, artan sıcaklık, toplam aerosol miktarının yanı sıra, aldehitleri, formaldehit, aetaldehit ve akroleini ve iltihaplı sitokinlerin salınımını 10 kat kadar arttırabilmektedir (Shields ve diğ., 2017). A549 hücre hattında yapılan bir çalışmada, elektronik sigaradan salınan sıvılar (e-sıvılar) veya aerosol sebebiyle EMT belirteçlerinden MMP-9, vimentin, N-kaderin miktarlarının arttığı, E-kaderin miktarının ise azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, elektronik sigara kullanımının EMT üzerinden birçok akciğer hastalığına sebep olabileceğinin göstergesidir (Zahedi ve diğ., 2018). Buna rağmen, dünyada hâlâ 1,3 milyar sigara içicisi bulunmaktadır. Zengin ve çok uluslu tütün şirketleri ise gençleri yaşam boyu nikotin bağımlılığına sokmak için tasarlanan ürünleri ortaya çıkarmaya devam etmektedir. Sigara içenlerin %70'i ise her yıl sigarayı bırakmaya çalışırken, % 5'inden azı başarılı olmaktadır (Gilpin ve Pierce, 2002).

Sigaraya direkt maruz kalmanın yanı sıra pasif içiciliğın (second hand smoking) ve üçüncü dereceden içiciliğın (third hand smoking) çeşitli hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. Pasif içicilikte sigara dumanına maruz kalan insanlarda, özellikle çocuklarda immün yanıtın ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda pasif içiciliğe bağılı olarak sinüzit, astım, KOAH, akut özonofilik pnömoni, solunum yolları enfeksiyonu gibi hastalıklar gelişebilmektedir (Crotty Alexander ve diğ., 2015). Üçüncü dereceden içilik, sigara içilmiş olan bir ortamda bulunarak, üzerine sigara dumanı sinmesiyle ya bir sigara kullanıcısıyla temas hâlinde olarak sigara kontaminantlarına maruz kalınmasıyla meydana gelir (Darlow ve diğ., 2016). Özellikle ebeveyni sigara içen çocuk ve anne karnındaki bebeklerin, sigara içilen odada, arabada bulunmalarının bile sağlıkları açısından zararlı olduğu bildirilmiştir (Drehmer ve diğ., 2012). Üçüncü dereceden içiciliğın neden olduğu hastalıklar henüz tam olarak bilinmese de, yapılan bir çalışmada insan karaciğer kanser hücrelerinde DNA hasarına sebep olduğu bildirilmiştir (Hang ve diğ., 2013).

Sigara içeriğindeki birçok toksik ve kanserojen maddenin vücuda ayrı ayrı zararları bulunmaktadır. Örneğin halk arasında en çok bilinen ve etkisi en fazla araştırılan nikotin, beyin nörotransmitteri olan asetilkolin ile benzer yapıda olduğu için insanlar üzerinde bağımlılık yapıcı bir etkiye sahiptir (Brody ve ark. 2006). Nikotinin sigara içerisinde bulunan tüm formları suda çözünebilir bir yapıya sahip olduğu için, sigaradan alınan tek bir nefeste bile tüm solunum yoluna, akciğer sıvısına ve kana kolaylıkla geçer ve solunum yolunda ne kadar sık bulunursa, o kadar fazla birikime sebep olarak solunum yollarını döşeyen epitele hasar verir (Pankow 2001; Henningfield ve diğ., 2004). Yüksek alkaloid içeriği yüzünden de nikotin, birçok böcek türü için toksik bir yapıya sahip olduğundan, uzun yıllar boyunca ticari bir pestisit olarak kullanılmıştır (Domino, 1999).

Epidemiyolojik çalışmalar, çoğu akciğer kanseri vakasının (%85-%90) doğrudan tütün kullanımına bağlı olduğunu göstermiştir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki tüm kanser ölümlerinin yaklaşık % 30'unu sigara kullanımı sonucu oluşturmaktadır ve bu sigara sonucu oluşan kanser ölümlerinin% 80'i akciğer kanserini içermektedir (Jemal ve diğ., 2008). Yapılan güncel çalışmalarda ise DNA'nın tütün dumanı ile epigenetik modifikasyona uğrayarak KOAH ve IPF'de gözlenen büyük ölçekli gen ekspresyonlarına sebep olabileceği gösterilmiştir. Sigara içmek, özellikle promoter hipermetilasyonu gibi bir dizi epigenetik değişime neden olur (Talikka ve diğ., 2012).

Sigaradan salınan heterosiklik aminler ve PAH, akciğer hücrelerinde DNA hasarına, kardeş kromatidler arasında mutasyona ve kromozom aberasyonuna sebep olur (DeMarini, 2004; Haveric ve diğ., 2016). CSE maruziyetinin DNA kırıklarına, oksidatif strese ve sitotoksositeye sebep olduğu, birçok memeli hücre hattı üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarla kanıtlanmıştır (Hoshino ve diğ., 2001; IARC, 2004; Zuo ve diğ., 2014; Kim ve diğ., 2019). Ayrıca sigaranın içerisindeki karsinojenler, DNA üzerinde O⁶-mutasyonlarına; örneğin, bir metilguan eklentisi ile G → A geçişlerine neden olur (IARC, 2004; USDHHS, 2010). Bu mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler, sigara kullanımı bırakılsa bile yıllar sonra hastalıkların ortaya çıkmasına, gecikmeli bir şekilde akciğer fibrozuna neden olarak hastalıkların gelişmesine sebep olabilir (Yang, 2012).

Sigara içinde bulunan aldehit ve oksidanlar yüzünden hücrelerde hidrojen peroksit oranının arttığı, buna bağlı olarak hücre ölümlerinin görüldüğü saptanmıştır. Sigara kullanımının apoptoza neden olduğu ile ilgili Türkiye'de yapılan bir çalışmada, sigara içen ve içmeyen

hastaların ağız içi mukozasından alınan örnekler karşılaştırıldığında, sigara kullanan hastaların ağız içi epitel hücrelerinde FAS-ligand yolunun uyarılarak, hücrelerin apoptoza yönlendirildiği bulunmuştur (İmirzalıoğlu ve diğ., 2007). A549 hücreleri ile yapılan bir çalışmada CSE'nin konsantrasyona bağlı olarak hücrelerde apoptozu ya da nekrozu uyurabildiği tespit edilmiştir (Hoshino ve diğ., 2001). Bir diğer hücre ölüm tipi olan otofaji, hasarlı organellerin uzaklaştırılması yoluyla hayatta kalmak için hücreler bir girişim olarak görülebilmektedir. A549 ve İnsan Bronşiyal Hücreleri (**HBE**) ile yapılan bir çalışmada %5 CSE maruziyeti sonrası hücrelerde otofaji sürecinin başlamasını sağlayan Beclin-1 ve LC3I ve LCII gibi proteinlerin ekspresyonunda artış olduğu gözlemlenmiştir (Qin ve diğ., 2019). Hücre, CSE ile karşılaştığı anda apoptoza yönelmemek için kendisini kurtarmaya çalıştığı düşünülmektedir (Kim ve diğ., 2016). Ancak uzun süreli CSE maruziyeti sonucunda otofaji yerini apoptoza bırakmaktadır. Örneğin otofajik hücrelerde otofajiye neden olan protein seviyeleri azalırken, apoptoza sebep olan Bax, Bim, Bik gibi genlerinin ekspresyonun arttığı ve bu hücrelerde DNA hasarı ve kromatin yoğunlaşması gibi tipik apoptotik hücre özelliklerin görüldüğü belirlenmiştir (Chen ve diğ., 2008; Nyunoya ve diğ., 2014).

Sigara, özellikle solunum yolu hastalıklarının gelişmesinde en büyük etkidir. Tütün içiminin hem doğuştan hem de adaptif bağışıklık üzerinde ciddi etkileri vardır. Alerjik ve otoimmün reaksiyonları destekleyen çoklu proinflamatuvar etkilerle ve ayrıca immün sistemin enfeksiyonlara karşı daha düşük bir aktivitesine neden olan immün baskılayıcı etkilerle ilişkilidir (Arnson ve diğ., 2010). Sigara kullanımı sonucunda solunum yolu elemanlarının çoğu etkilenir ve inflamasyon, DNA hasarı, hücre yaşlanması, hücre farklılaşması, otofaji ve apoptoz gibi olayların gerçekleşmesine sebep olan hücrelerel sinyalleşme elemanlarının miktarı artar. Bunun sonucunda birçok akciğer hastalığının seyri başlar (Lu ve diğ., 2017; Nyunoya ve diğ., 2017). Uzun süreli sigara kullanımı, havayollarında oluşan değişiklikler sebebiyle kronik öksürüğe sebep olur (Cerveri ve diğ., 2003; Chung ve Pavort, 2008).

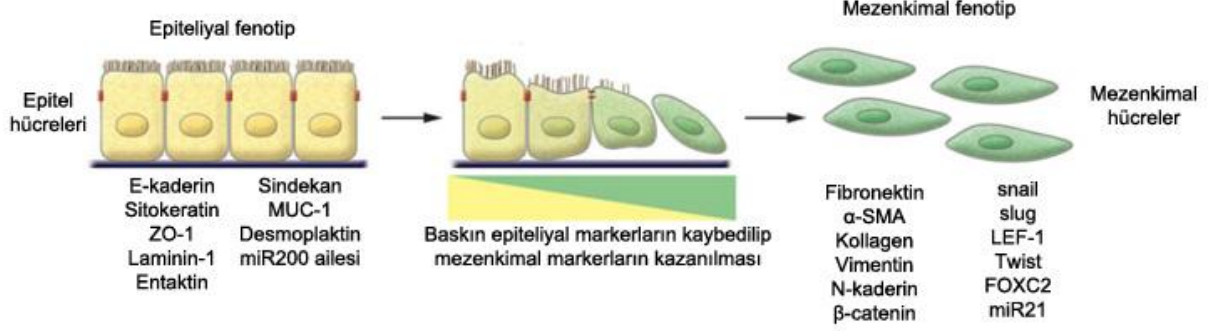
Sigara içimi solunum yollarındaki yapısal değişikliklere katkıda bulunduğu için, IPF, KOAH ve interstitiyel akciğer hastalıklarının başlamasında ve ilerlemesinde ana risk faktörü olarak kabul edilir (Hogg ve diğ., 2004; Morse ve Rosas, 2014). Yapılan *in vivo* çalışmalarda, 6 ay boyunca sigara dumanına maruz bırakılan farelerde nitrik oksit salınımını takiben amfizem ve pulmoner hipertansiyon gelişimi gözlenmiştir (Seimetz ve diğ., 2015). Ayrıca, sigara kullanım süresi ve yıl içerisinde tüketilen paket sayısı, amfizemin eşlik ettiği IPF ile ilişkili olduğu

rapor edilmiştir ve bu hastalarda karbon monoksit difüzyon kapasitesi daha yüksek olduğu için pulmoner hipertansiyon prevalansının yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Ye ve diğ., 2014). CSE, direkt olarak epiteli aktive eder ve zarar verirken, KOAH'lı ve sigara içmeyenlerde sıklıkla ortaya çıkan viral enfeksiyonlar epitel fenotipi ve fonksiyonunu da etkiler. Ayrıca, viral kaynaklı alevlenmeler hastalığın ilerlemesine, akciğer fonksiyonlarındaki düşüşe, hastalık morbidite ve mortalitesine hız vermede önemli katkı sağlar (Vareille ve diğ., 2011). Sigara içen ve içmeyen KOAH hastaları karşılaştırıldığında, sigara içen hastalarda goblet hücreleri miktarının daha az olduğu ve submukozal bezlerde hiperplazinin arttığı gözlemlenmiştir (Kirkham ve diğ., 2008). Sigara kullanmayan, sigara kullanan ve KOAH hastalarından alınan bronşiyal hücrelerde yapılan başka bir çalışmada ise, sigara kullanan ve KOAH hastası olan kişilerden alınan bronşiyal hücrelerde α -SMA, vimentin, kollagen-1 gibi EMT belirteçlerinin protein ve mRNA düzeyinde arttığı gözlemlenmiştir. Sigara kullanmayan insanlardan alınan hücrelerde E-kaderin, ZO-1 gibi hücre bağlantı proteinlerinin miktarlarının bazal seviyede olduğu gözlemlenirken; sigara kullanan ve KOAH hastası olan insanlardan alınan hücrelerde bu proteinlerin seviyelerinde azalma olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda sigara kullanan ve KOAH hastası olan örnekler, sigara kullanmayanlarla kıyaslandığında SMAD3'ün arttığı, β -katenin miktarının ise sitoplazmada azalırken nükleusta arttığı gözlemlenmiştir (Milara ve diğ., 2013). Sigara dumanının başta TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu olmak üzere EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini ve pro-fibrotik genleri aktive etmesi nedeniyle sigara kullanan insanlarda IPF gelişiminin görülebileceğini ileri sürülmektedir (Checa ve diğ., 2016).

2.2. EPİTELİYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ

EMT sürecinde, bazal membran üzerine oturan epitel hücrelerin bazal membran ve diğer komşu epitel hücreleriyle teması kesilir, hücreler polaritelerini kaybeder, epitel hücre proteinleri yerine mezenkimal hücre proteinlerini sentezlemeye başlarlar ve sonunda mezenkimal bir fenotip kazanırlar (**Şekil 2.1**). EMT uyarımı ve kontrolü pek çok faktör tarafından gerçekleştirilmektedir. Hücrede artan hipoksi, ROS ve endoplazmik retikulum stresi EMT'ye neden olabilir. Ayrıca, TGF- β , kemik morfogenezik protein (**BMP**); Wnt/ β -katenin, Notch, Hedgehog sinyal yolları, büyüme faktörleri, kemokinler EMT uyarımına sebep olur (Higgins, 2007; Walters ve diğ., 2009). TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yolunun

EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonuna yol açabildiği hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda kanıtlanmıştır (Novak ve diğ., 1998; Yue ve diğ., 2010).



Şekil 2.1: Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere farklılaşması gösterilmektedir. Şekil, Kalluri ve Weinberg, 2009'dan Türkçe'ye çevrilmiştir.

EMT, normal embriyonik gelişimde, yara iyileşmesinde, kanser oluşumunda ve organ fibrozusunda etkin rol oynar. Embriyonik gelişim sırasında hücreler epitel ve mezenkimal durumlar arasında oldukça dinamik bir şekilde geçişler yapabilir. Mezenkimal duruma doğru kayma, hücre tarafından ifade edilen hücre bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu değiştirerek, hücrenin göçmen ve istilacı bir davranış benimsemesine izin verir. Normal gelişim esnasında açığa çıkan EMT ile hastalıkta ortaya çıkan EMT'nin benzer sinyal yolları üzerinden ilerlemesine rağmen, mikroçevre şartları açısından bazı farklılıklar taşırlar.

EMT'ler, üç farklı biyolojik alt tipte sınıflandırılabilir. Tip 1 EMT, implantasyon, embriyo oluşumu ve organ gelişimi sırasında görülür; hedef, aynı mezenkimal fenotipleri paylaşan çeşitli hücre tiplerini üretmektir. Tip 2 EMT'de, daha önce genetik ve epigenetik değişiklikler geçirmiş neoplastik hücrelerde özellikle klonal büyümeyi ve sınırlandırılmış tümörlerin gelişimini destekleyen genlerin ekspresyonu değişir. Tip 2 EMT, kanser hücrelerinin istilası ve metastazına neden olabilir ve böylece kanserin ilerleyişini destekleyebilir. Birçok kanser durumunda, tümörle ilişkili stroma, özellikle hepatosit büyüme faktörü (**HGF**), EGF, PDGF ve TGF- β gibi EMT indükleyici sinyaller etkinlik gösterir (Kalluri ve Weinberg, 2009). Tip 3 sınıftaki EMT ise yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve organ fibrozu ile ilişkilidir. Bu EMT türünde epitelde oluşan travma ve inflamatuvar hasarı takiben, dokuları yeniden oluşturmak için fibroblastlar ve diğer ilgili hücreler ile gerçekleşen bir süreçtir. Bu EMT sürecinde, inflamatuvar yanıtı cevap vermeye devam edilirse, organ fibrozunun oluşumu

gözlenebilir. EMT oluşumu esnasında, TGF- β aracılığıyla epitel hücreleri miyofibroblastlara dönüştüğü için, dokuda bir miyofibroblast belirteci olan α -SMA miktarı artar. Smad yoluna bağlı EMT gelişiminde, α -SMA'nın aktivasyonu esastır, çünkü α -SMA promotöründeki SMAD3 bağlama elemanı, TGF- β ile transkripsiyonel aktivasyon için gereklidir (Hu ve diğ., 2003). Hem nuklear β -kateninin artması hem de fosforillenmiş Smad proteinlerinin nukleusa geçmesini takiben EMT'ye sebep olan hedef genler indüklenir. Snail, twist, zeb1 gibi EMT'yi uyaran transkripsiyon faktörleri artar ve E-kaderin ve ZO-1 proteinlerinin sentezi azaldığından hücre-hücre bağlantıları kaybedilir. Epitel hücrelerinden farklılaşan miyofibroblastlardan kollagen üretimi başlar. Kollagenin ECM'de birikimi gözlenir ve fibroz oluşumu ile sonuçlanır (Kalluri ve Weinberg, 2009).

CSE uygulamalarının A549 hücrelerinde EMT'yi uyardığı bilinmektedir (Checa ve diğ., 2016). CSE ile muamele edilen A549 hücrelerinde, histon deasetilaz (**HDAC**), slug ve LEF-1 aracılığı ile E-kaderin geninin ekspresyonunun baskılandığı ortaya çıkarılmıştır. Yine aynı çalışmada hiç sigara içmeyen hastalardan alınan örneklerle, sigara içen hastalardan alınan örnekler karşılaştırıldığında, sigara içen hastalarda E-kaderin miktarının daha az, HDAC miktarının ise daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, E-kaderinin ekspresyonunun azalmasının, sigara kullanımı miktarı (paket/yıl sayısı) ile ilişkili olduğu, uzun süreli sigara içiminin E-kaderin miktarını azaltıp, mezenkimal hücre belirteçlerinin ekspresyonunu uyararak EMT'yi indüklediği belirtilmektedir (Nagathihalli ve diğ., 2012). E-kaderin ve epitelial bariyer fonksiyonunun kaybı, EMT gelişimi için önemli bir aşamadır (Hackett, 2012). Sigara, EMT gelişiminde anahtar rol oynayan TGF- β 'nin salınımını artırır (Takizawa ve diğ., 2001) Sigara uyarımı ile artan TGF- β aktivasyonu sonucunda epitel hücreleri miyofibroblastlara farklılaşır ve ortamda miyofibroblastların belirteci olan α -SMA miktarı artar (Zhou ve diğ., 2019). Sigara kullanımı ile, β -kateninin nukleusa taşınmasını uyarılır (Tian ve diğ., 2009). Kanonik ve kanonik olmayan Wnt sinyal yollarının aktivasyonu gözlemlenir (Heijink ve diğ., 2013). Sigara kullanmayan, sigara kullanan ve sigara kullanmaya devam eden KOAH hastalarından alınan bronşiyal epitel hücrelerinde yapılan çalışmalarda, TGF- β /SMAD3 yolu ile etkileşime girerek EMT'nin ilerlemesine sebep olan WNT5B proteininin sigara içen hastalarda yüksek oranda eksprese edildiği rapor edilmiştir. Ek olarak yapılan *in vitro* çalışmalarla da, CSE uygulamalarının bronşiyal epitel hücrelerinde WNT5B aracılığı ile EMT'yi uyardığı bulunmuştur (Heijink ve diğ., 2016). A549'larda yapılan bir çalışmada ise, sigaranın, konsantrasyona bağlı olarak, TGF- β , α -SMA, vimentin

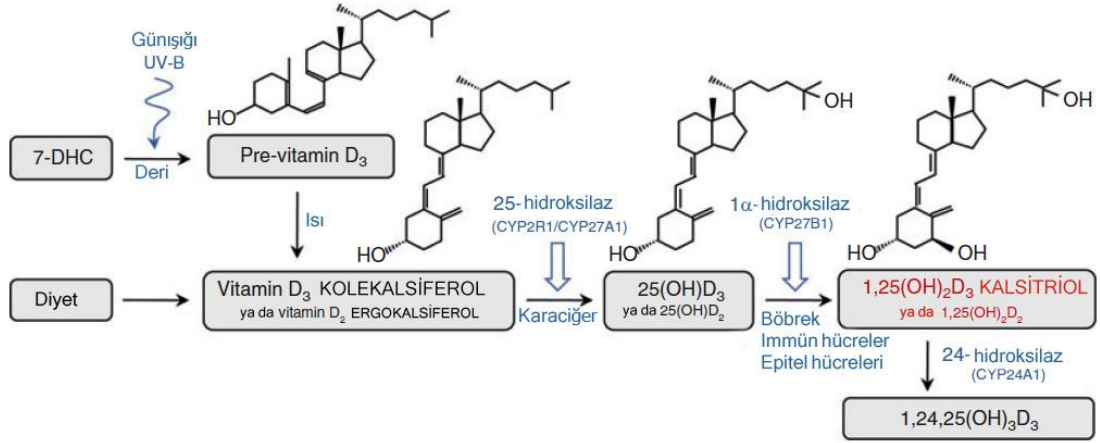
miktarını arttırıp, E-kaderin seviyelerini düşürerek EMT'yi uyardığı rapor edilmiştir (Shen ve diğ., 2014; Guan ve diğ., 2017).

2.3. D VİTAMİNİ

D vitamini, sterol türevli bir prohormondur (Murray ve diğ., 2012). Vücutta çeşitli değişikliklerle kalsitriol olarak bilinen kalsiyum ve fosfat metabolizmasında etkili olan bir hormona dönüşür. D vitamini vücutta üç şekilde sağlanır: Güneş ışığına maruz kalınca vücutta kolesterol üzerinden sentezlenir, besinlerle vücutta alınır ya da gıda takviyesi ile alınan vitamin supplementlerinden sağlanır. D vitamini daha çok somon, tuna, sardalya balığı, yumurta sarısı, süt, portakal suyu, yoğurt, tereyağı, peynir, gibi genelde hayvansal gıdalarda bulunurken, çeşitli sebzeler, shiitake mantarı, kültür mantarı ve kakao da D vitaminince zengindir (Deluca, 2004; Holick 2007; Kalaras ve diğ., 2012; Kühn ve diğ., 2018).

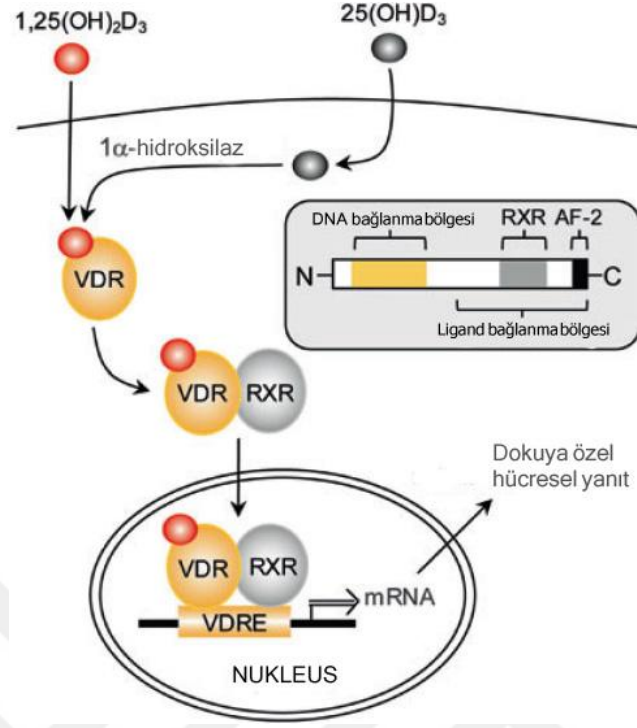
Cilt altında depo edilen 7-dehidroksikolesterol (pre-D vitamini), solar ultraviyole B radyasyonu (Güneş ışığı- 290-315 nm dalgaboyunda) maruziyeti sonrası enzimatik olmayan bir reaksiyon sonucu kolekalsiferol olarak bilinen D₃ vitamini formuna dönüşür. Vücutta üretilen D vitamini formu kolekalsiferol olarak da bilinen D₃ formudur. Vücutta üretilen D₃ vitamini direkt kana geçerken, bağırsaklardan emilen D₃ ve D₂ vitamini şilomikronlar ile önce lenf dolaşıma sonra da kan dolaşımına geçer ve her iki D vitamini formu karaciğere taşınır (Holick 2007; Donma ve diğ., 2012).

Karaciğere gelen D₂ ve D₃ vitamin formları, hepatositlerin mitokondrisi içerisinde, 25-hidroksilaz enzimi aracılığıyla kalsidiol olarak da bilinen 25-hidroksivitamin D₃'e (25(OH)D₃) metabolize olurlar. Bu form, inaktif bir yapıda olduğu için, etkinliğini göstermeden önce aktif forma dönüşmesi gerekmektedir. Bu yüzden D vitamini taşıyıcısı olan α -globulinler eşliğinde böbreğe iletilirler. Böbreklerde, CYP27B1 enzimi aracılığıyla, 25(OH)D₃'nin aktivasyonu gerçekleşir ve sonucunda kalsitriol adıyla da bilinen, D vitaminin aktif formu olan 1,25-dihidroksikolekalsiferol (1,25(OH)₂D₃) üretilir. CYP27B1 enzimi her ne kadar böbreklerde esas aktivasyonunu gösterse de, böbrekler haricinde akciğer başta olmak üzere karaciğer ve beyin gibi birçok organda da etkin olduğu bildirilmiştir (Cannel ve diğ., 2008; Norton ve O'Connell, 2012). Aktif formunu kazanmış olan işlevsel D vitamini, sistemik dolaşım aracılığıyla hedef organlara yönlendirilir (Deluca, 2004; Donma ve diğ., 2012).



Şekil 2.2: D vitamini türlerinin dönüşümü gösterilmektedir. Şekil von Essen ve Geisler (2018)'den Türkçeleştirilmiştir.

Aktif D₃ vitamini bir steroid hormon gibi davranır (Donma ve diğ., 2012). Hedef hücreleri üzerindeki etkisini sitoplazmik reseptörleri olan VDR'ler aracılığı ile gösterir (Jones ve diğ., 1998). VDR, akciğer, deri, karaciğer, böbrek, beyin, intestinal sistem, kolon, pankreas, plasenta, adrenal bezler, kemik ve kemik iliği, özefagus, kalp, testis ve tiroid gibi daha birçok organda bulunur (Anon., 2018). VDR, 1,25(OH)₂D₃ bağlar; ardından etkinliğini gösterebilmek için, ko-faktör olarak RXR ile bağlanır. Oluşan bu dimerik yapı, sitoplazmadan nukleusa geçer ve nuklear reseptör koaktivatör proteinlerle (steroid reseptör koaktivatör proteinler ve VDR ile ilişki kuran proteinler) heteromerik kompleks oluşturur. Bu kompleks, D vitamininin hedef genlerinin promotör bölgelerindeki yanıt elementlerine (VDRE) bağlanarak DNA üzerinde etkinliğini gösterir (Jones ve diğ., 1998). Bunun sonucunda D vitamini, hücrelerde gen ekspresyonundan sorumlu hâle gelir. DNA ile heterodimer olarak bağlandıktan sonra transkripsiyonu arttırıcı veya durdurucu yönde etki gösterebilir (Larriba ve diğ., 2014).



Şekil 2.3: D Vitaminin hücre içerisindeki sinyalleşmesi gösterilmektedir. Şekil von Essen ve Geisler (2018)'den Türkçeleştirilmiştir.

Vücuttaki D vitamini seviyesi, güneşten gelen UVB ışınlarının bölgesel ve saat düzeyindeki etkileri, cilt pigmentasyonu, hava durumu, hava kirliliği, güneşe ne kadar maruz kalındığı gibi çevresel faktörlerin yanı sıra, kandaki D vitamini seviyesini etkileyen diğer metabolik faktörlerden de etkilenebilir. Kanda kalsiyum miktarı azaldığı zaman paratiroid bezlerinden parathormon (**PTH**) salgılanır. PTH, CYP27B1 enziminin aktivasyonunu uyarır ve kanda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ miktarını artırır. Kanda artan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ miktarı ile kemik rezorpsiyonu uyarılır, böbreklerden kalsiyum inhibe edilir (Donma ve diğ., 2012; Gürdöl, 2016). Serumda kalsiyum miktarı arttığında ise PTH salınımı durdurulur. Kanda seviyesi düşen PTH etkisiyle kandaki D vitamini miktarı azalır. Kanda yüksek miktarda D vitamini bulunması, toksik etki yaratır. Bu nedenle D vitamini vücuttan uzaklaştırılır. D vitamini formları, mitokondriyal bir enzim olan-25-dihidroksivitaminD(3)-24 hidroksilaz enzimi (**CYP24A1**) aracılığıyla $25(\text{OH})\text{D}_3$ 'ye indirgenerek böbreklerde yıkılır ve idrar ile vücuttan atılır (Thomas, 1998; DeLuca, 2004; Holick, 2007; Donma ve diğ., 2012).

Aktif D vitamini formu, kalsiyum emiliminden, fosfat dengesinin sağlanmasından ve kemik yenilenmesinin/düzenlenmesinin regülasyonundan sorumludur (Murray ve diğ., 2012; Dusso

ve Brown, 1998). Vücutta kemik kalsiyumunun mobilizasyonunu ve kalsiyumun renal geri emilimini uyarır (Chambers ve Magnus, 1982). D vitamininin bilinen bu görevlerine ilaveten, D vitamininin hücre büyümesi, hücre proliferasyonunun sürdürülebilmesi, hücre farklılaşması, hücre ölümü, inflamasyon ve angiogenez ile ilgili 200'e yakın geni kontrol edebildiği gözlemlenmiştir. D vitamininin deri, meme, kolon ve prostat gibi çoğu kanser türünde antiproliferatif ve pro-diferansiyatif etkisi olduğu ve apoptoz uyarımını arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca anti-onkogenik, anti-inflamatuvar ve anti-metastatik yapısı ile birçok kanser türünde iyileştirme yönünde avantajı olduğu düşünülmektedir (Norton ve O'Connell, 2012). Nüksüz sağ kalım üzerine yapılan bir çalışmada, erken evrede olan küçük olmayan hücreli akciğer kanseri hastalarında, D vitamini seviyesi yüksek olan hastalarda sağ kalımın daha çok olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sağ kalımı yüksek olan hastalar dönemsel olarak karşılaştırıldığında, yaz dönemlerinde ameliyat olan hastaların daha sağlıklı olduğu ve nüks oranının diğer hastalara göre azaldığı gözlemlenmiştir (Zhou ve diğ., 2005). Küçük hücreli olan akciğer kanseri hastalarında, D vitamini eksikliğinin giderilmemesi, erken ölüm için bir sebep olarak gözlemlenebilir. D vitamininin anti-kanser mekanizması, yani hücre proliferasyonunu azaltması, farklılaşmanın indüklenmesi, apoptozun uyarılıp angiogenezin engellenmesi göze alındığında; erken evrelerdeki kanser hastalarına D vitamini uygulamalarının öneminin büyük olduğu düşünülmektedir. Kanser hücrelerinin de VDR reseptörü bulundurduğu ve D vitamininin aktive ettiği sinyal yollarının aktivasyonunu muhafaza ettiği gerçeğine dayanarak bu düşüncenin temelleri güçlendirilmektedir (Cannell ve diğ., 2008).

D vitamini eksikliğinde kardiyovasküler hastalıklar, multiple sklerozis, kas-iskelet ağrıları ve zayıflığı, dizlerde ağırlı hissi, osteoporoz, hipertansiyon, inme, osteopeni, mental hastalıklar, depresyon, diyabet, deri hastalıkları, periodontal hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, romatoid artrit gibi birçok hastalığa yakalanma riski artmaktadır (Bloom ve diğ., 2004; Hollick, 2007; Cannell ve diğ., 2008; Donma ve diğ., 2012). Hastalar üzerinde randomize yapılan kontrollü deneylerde, günlük 2000 IU D vitamini alımının, soğuk algınlığı ve gribe karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir (Aloia ve Li-Ng, 2007). Epidemiyolojik olarak yapılan çalışmalarda ise serumdaki 25(OH)D₃ seviyesinin birçok doku ve organdaki fibrozis ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Petta ve diğ., 2010). IPF hastalarından alınan serum örneklerinde ise, sağlıklı insanlara oranla serumlarında daha az 25(OH)D₃ seviyelerinin olduğu gözlemlenmiştir (Tzilas ve diğ., 2019). Mevcut çalışmalar, D vitamini eksikliği ile

bazı akciğer hastalıkları arasında bir ilişki olduğuna dair bazı veriler sunmaktadır. D vitamini eksikliğinde kistik fibroz ve KOAH gibi çeşitli akciğer hastalıkları gelişebilmektedir (Bloom ve diğ., 2004; Hollick, 2007; Cannell ve diğ., 2008; Donma ve diğ., 2012). Ayrıca D vitamini eksikliği olan insanlarda, özellikle çocuklarda, astım ve alerji gibi inflamatuvar hastalıkların görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir (Majak ve diğ., 2011). Bir ömür boyu süren D vitamini eksikliğinde, akciğer fonksiyonunda, somatik hücre büyümesinde ve akciğer hacminde anomaliler oluşmaktadır. D vitamini eksikliği olan annelerin bebeklerinde trake çapında daralma, trakeal kıkırdak kalınlığında artış ve düzensiz alveolar yapı, hava yolu direncinde artış gelişebilmektedir. Postnatal dönemde görülen D vitamini eksikliği de az da olsa trakeal morfoloji ve akciğer fonksiyonları etkileyebilmektedir. Doğum sonrası yeni doğanlara yapılan D vitamini desteği akciğer fonksiyonlarını iyileştirebilmekte, ancak trakeal anormallikleri normalleştirememektedir (Shi ve diğ., 2017a).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. SİĞARA DUMANI ÖZÜTÜNÜN (CSE) HAZIRLANMASI

Sigara dumanı özütü, Aoishba ve ekibinin kullandığı yöntemden uyarlanılarak hazırlanmıştır (Aoshiba ve diğ., 2001). Bu yönteme göre, 10 mg zifir, 0,8 mg nikotin, 10 mg karbon monoksit içeren ticari bir sigara, filtresi çıkarılarak aspirasyon makinesi yardımıyla 3 dakika tütürüldü ve dumanı, 37°C sıcaklıktaki 10 ml steril fosfatla tamponlanmış tuzlu su (**PBS**, 0,01 M) içerisinde hapsedildi. Hazırlanan özütün pH'sı 1N NaOH ile 7,4'e ayarlanıp, özüt 0,22µm millipore süzgeçten geçirildi. Elde edilen özüt, stok %100 CSE olarak kabul edildi. Spektrofotometrik ölçümde 290 nm'de OD değeri 2-2,4 arasında absorbsiyon yapan özütler deneyde kullanıldı. Her deney için sigara dumanı özütü taze hazırlandı.

3.2. D VİTAMİNİNİN HAZIRLANMASI

Wellcare markasına ait 10000 IU D₃ vitamini içeren karışım, 1µl/ml olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO)-PBS karışımı (1:9) ile seyreltili. Seyreltilen bu karışım stok olarak kabul edildi ve bu karışımdan 10 nM, 50 nM ve 100 nM D vitamini solüsyonları hazırlandı.

3.3. *IN VITRO* DENEYLER

İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı (A549), Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den satın alındı. Hücreler, içerisine %10 fetal sığır serumu (**FBS**), 50 U/ml penisilin ve 50 µg/ml streptomisin (Gibco) eklenerek hazırlanan Dulbeco'nun modifiye edilmiş medyumunu ve Ham'ın F12 (**DMEM/F12**) büyüme medyumunu içerisinde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren etüv içerisinde inkübe edildi. Hücreler T75 flaskı doldurana kadar etüvde bırakıldı ve iki günde bir büyüme medyumları değiştirildi. Çoğalan hücreler 6 kuyulu kültür kaplarına, her kuyuda 400.000 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücreler, %80 oranında kuyuları kaplayınca, büyüme medyumunu %1 FBS 50 U/ml penisilin ve 50 µg/ml streptomisin içeren açlık medyumunu ile değiştirildi. Hücrelerin bir gün serumu azaltılmış ortama alışması beklendi. Ardından hücreler, 5 deney grubuna ayrıldı:

1. CSE ile muamele edilen hücrelerden oluşan grup: Kültür medyumuna %5 CSE eklenen hücreler, uygulamayı takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde toplandılar.

2. CSE+TGF- β ile uyarılan hücrelerden oluşan grup: Aynı anda %5 CSE ve 5 ng/ml TGF- β ile uyarılan hücreler, uyarımı takip eden 24., 48. ve 72.saatlerde toplandılar.
3. D vitamini uygulanan hücrelerden oluşan grup: 50 nM D vitamini uygulanan hücreler, uygulamayı takip eden 24., 48. ve 72. saatlerde toplandılar.
4. D vitamini+CSE uygulanan hücrelerden oluşan grup: Hücreler %5 CSE uygulamalarından yarım saat önce 50 nM D vitamini ile muamele edildiler. CSE uygulamalarından sonraki 24., 48. ve 72. saatlerde hücreler toplandı.
5. D vitamini+CSE+TGF- β uygulanan hücrelerden oluşan grup: Hücreler %5 CSE+TGF- β (5ng/ml) uygulamalarından yarım saat önce D vitamini ile muamele edildiler. CSE+TGF- β uygulamalarından sonraki 24., 48. ve 72. saatlerde hücreler toplandı.

Her bir deney grubunun herhangi bir uygulama yapılmayan hücreleri, kontrol deney grubu olarak (deneyin 0. saati) kullanıldı.

3.4. HÜCRE CANLILIK TESTİ

Hücre canlılığını belirlemek için 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid (**MTT**) testi kullanıldı. MTT, hücre canlılığı, sitotoksosite ve çoğalmasını ölçmek için kullanılan bir testtir. Canlı hücrelerin mitokondrisinde meydana gelen dehidrojenazlar ile, MTT bileşiğinin suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgenmesiyle oluşan renkli reaksiyonun spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır (Mosmann, 1983; Stockert ve diğ., 2012).

A549 hücreleri, 100 μ l DMEM/F12 büyüme medyumunu içerisinde 10.000 hücre bulunacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β (5 ng/ml) ile uyarılan ve uyarılmayan hücreler, uyarımdan yarım saat önce 10 nM, 50 nM ve 100 nM D vitamini ile muamele edildiler. Daha sonra hücreler, 24, 48 ve 72 saat süresince inkübasyona bırakıldılar. Hücre canlılık testi, iNtRON Biotechnology firmasından satın alınan MTT test kiti için önerilen protokole göre yapıldı ve formazan kristallerinin miktarları mikropilaya okuyucuda (Biotek μ Quant) 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.5. PROTEİN İZOLASYONU VE ELEKTROFOREZ

In vitro deneylerin sonunda kültür kaplarından medyumlar uzaklaştırıldı ve hücreler birer kez PBS ile yıkandı. Ardından her kuyuya 100µl liziz tamponu eklendi. Hücreler, hücre kazıyıcı aracılığıyla dikkatli bir şekilde kültür kaplarından kazındıktan sonra toplandı ve ultrasonikatör aracılığıyla parçalanarak hücre içeriğinin açığa çıkması sağlandı. Ardından oluşan lizatlar, +4°C, 13.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar deneylerde kullanılmak üzere toplandı. Örnekler -20°C'de muhafaza edildi.

Örneklerdeki total protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak ölçüldü (Bradford, 1976). Ardından denatüre edilen proteinlerden alınan 40µg'lık her bir protein örneği, %5-10 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid (**SDS**) jele yüklendi. Örnekler jelde, kademeli olarak 70 ve 100 Volt'ta ortalama 3 saat yürütüldü ve proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrımı sağlandı.

3.6. WESTERN EMDİRİMİ

Proteinler elektroforezde SDS-poliakrilamid jel üzerinde yürütüldükten sonra ıslak aktarım ile 100V, 80A'de 12 saat süresince jel üzerindeki proteinler nitroselüloz membrana aktarıldı. Aktarımın gerçekleştiğinden emin olmak için nitroselüloz membran Ponceau S ile boyandı. Ardından membranlara antikor uygulamalarından önce oda sıcaklığında 1 saat yağsız süt tozu ile bloklama işlemi yapıldı. Daha sonra membranlar, uygun dilisyonlarda hazırlanmış olan primer antikorlar (**Tablo 3.1**) ile +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldılar. Ertesi gün primer antikorlar toplandı ve membranlar Tween-20 deterjanı eklenmiş Tris tamponu ile (pH:7,6; 0,5 M) yıkandı. Seri yıkamaların ardından membranlar sekonder antikorla 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Sekonder antikorların uzaklaştırılmasının ardından membranlar Tween-20 içeren ve içermeyen Tris tamponları ile yıkandı. Yıkamaların ardından membranlara beşer dakika kemilüminesan solüsyonları uygulandı. Görünür hale gelen protein bantların yoğunluk analizleri Kodak GL 1500 jel görüntüleme programında yapıldı. Çıkan protein bantlarının yoğunlukları, gliseralehit-3-fosfat dehidrogenaz (**GAPDH**) proteininin yoğunluğu ile normalize edildi ve gruplar arasındaki protein miktarı farklılıkları belirlendi.

Tablo 3.1: Western emdirim (WB) ve immufloresan (IF) işaretlemede kullanılan antikoklar

Antikoklar	Dilüsyon Oranları/Yöntem	İnkübasyon süresi ve Koşul	Firma
Fare anti α -SMA	1:100 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Thermo Fisher
Tavşan anti-E kaderin	1:200 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz
Tavşan anti-pVDR	1:500 (WB, IF)	Gece boyunca, +4°C	Thermo Fisher
Taşvan anti-pSMAD2/3	1:200 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz
	1:500 (IF)	Gece boyunca, +4°C	Thermo Fisher
Fare anti-SMAD4	1:500 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Santra Cruz
Fare anti-SMAD7	1:500 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz
Tavşan aktif β -katenin	1:1000 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Millipore
Tavşan anti-DKK1	1:500 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz
Fare anti-Kaiso	1:200 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz
	1:100 (IF)	Gece boyunca, +4°C	
Fare anti-p120ctn	1:200 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz
Tavşan anti-NEDD9	1:200 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Abcam

3.7. İMMUNFLORESAN YÖNTEMİ

24 kuyulu hücre kültürü kaplarının içine yerleştirilen lameller üzerine, her kuyuya 1 ml büyüme medyumunu içerisinde 60.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ertesi gün, deneyin başlamasından 24 saat önce büyüme medyumunu ortamdan uzaklaştırılıp, yerine, serumu azaltılmış açlık medyumunu eklendi. Bir sonraki gün hücrelere serumu azaltılmış açlık medyumunun içerisinde D vitamini, %5 CSE ve TGF- β uygulamaları yapıldı. Deneyi takip eden 24., 48. ve 72. saatlerde ortamdan medyum uzaklaştırıldı ve 1:1 oranında soğuk (+4°C) aseton-metanol karışımı ile hücreler 10 dakika fiks edildi. Fiksasyonun ardından hücreler %0.1 fetal sığır serumu (**BSA**) içeren PBS ile 3 kez yıkandı. Tween-20 detarjanı ile hazırlanan ve %5 BSA içeren PBS ile (**PBST**) yarım saatlik bloklama aşamasından sonra hücreler %0.1 BSA içeren PBST ile 1:500 oranında tavşan anti-p-VDR primer antikoru ile gece boyu +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler üç kez %0.1 BSA içeren PBST ile yıkandı. Daha sonra hücreler oda sıcaklığında 1:500 konsantrasyonunda Millipore markasına ait keçi anti-tavşan IgG-FITC-fab sekonder antikoru ile 1 saat boyunca karanlıkta muamele edildi. 1 saatin sonunda karanlıkta %0.1 BSA içeren PBST ile üç kez yıkandı ve yarım saat %5 BSA içeren PBST ile yarım saat bloklama yapıldı. Yarım saatin ardından hücreler, %0.1 BSA içeren PBST ile 1:200 ikinci primer antikor olan tavşan anti p-SMAD2/3 ile primer antikoru ile gece boyu +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler üç kez %0.1 BSA içeren PBST ile yıkandı. Daha sonra hücreler oda sıcaklığında 1:500 konsantrasyonunda Millipore firmasına ait olan keçi anti-tavşan IgG Cy3 sekonder antikoru ile 1 saat boyunca karanlıkta muamele edildi. 1 saatin sonunda karanlıkta %0.1 BSA içeren PBST ile üç kez yıkandı. Yıkamaların ardından hücreler, 10 dakika karanlıkta DAPI (4'-diamino-2-fenilindol, 1 μ M) ile muamele edilerek nükleusları işaretlendi. İşaretlemenin ardından hücreler üç kez %0.1 BSA içeren PBST ile yıkandı ve karanlıkta 10 dakika boyunca %4 paraformaldehit ile postfiksasyon işlemleri gerçekleştirildi. Son kez hücreler üç kez %0.1 BSA içeren PBST ile yıkandıktan sonra lameller immünfloresan kapatıcı ile kapatıldı ve preparatlar kuruduktan sonra görüntülemeler immünfloresan mikroskopta görüntülemeler yapıldı, hücrelerin fotoğrafları Nikon'un NIS Elements adlı floresan programından çekildi.

Kaiso ve p-VDR'nin birlikte işaretlendiği yöntemde tavşan anti-p-VDR ve fare anti-Kaiso primer antikoru ile Millipore markasına ait keçi anti-tavşan IgG FITC-Fab ve keçi anti-fare IgG TexasRed Conjugated sekonder antikoru kullanıldı.

3.8. FİBROTİK VE FİBROTİK OLMAYAN İNSAN AKCİĞER ÖRNEKLERİNDEN PROTEİN İZOLASYONU VE KO-İMMÜNPRESİPİTASYON

Daha önceki çalışmada IPF hastalarından alınan fibrotik (n=3) ve fibrotik olmadığı (n=4) saptanan insan akciğer örnekleri bu çalışmada da kullanıldı (Oztay ve diğ.; basılmamış veri). Akciğer biyopsilerinden eşit miktarda (0.2 gram) doku örnekleri tartıldı. Örnekler, Roche-MagNA Lyser kullanılarak lizis tamponu içerisinde homojenize edildi. Daha sonra lizatlar 10 dakika 15.000 rpm’de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardaki protein miktarı Bradford yöntemi kullanarak ölçüldü. Her örnekten 100 µg miktarda protein, ependorflara alındı ve her örnek 10 µl anti-p-VDR primer antikoru ile 1 saat +4°C’de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, her örneğe 20 µl Santa Cruz markasının Agaroze plus A/G immünpresipitasyon agaroz boncukları eklendi ve gece boyunca +4°C’de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün örnekler 2.500 G’de, +4°C’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı, pelet kısmı ise 4 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Son yıkamanın ardından p-VDR ile bağlanarak pelete çöken proteinler, elektroforezin ardından Western emdirimi yöntemi ile saptandı. Bu yöntem ile aktif β-katenin, Kaiso ve p120ctn proteinlerinin p-VDR proteini ile olan etkileşimleri incelendi.

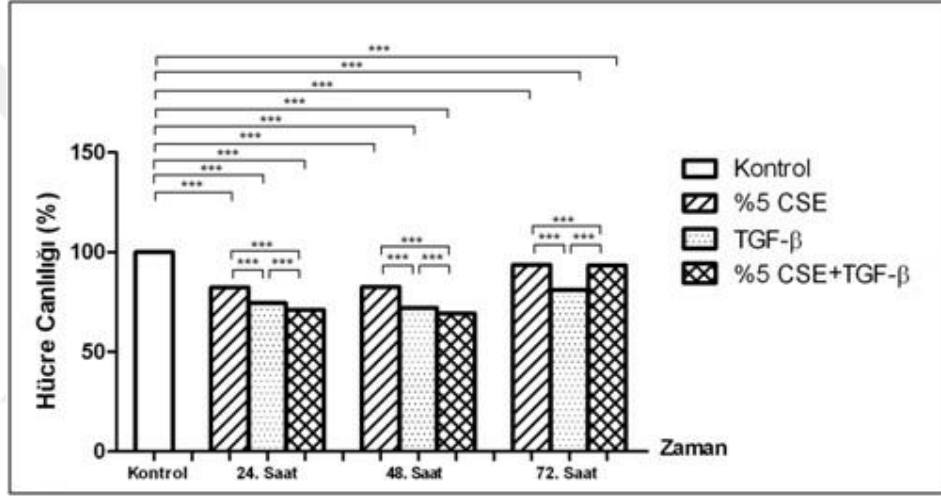
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

MTT ve Western emdirimi bulguları, Graphpad Prism 5.0 adlı programda, One-Way Anova ve Student T-testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi, gruplar arasında karşılaştırmalar yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilecek değerler, 0,05’ten küçük olan farklılıklar kabul edildi ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,0001$)

4. BULGULAR

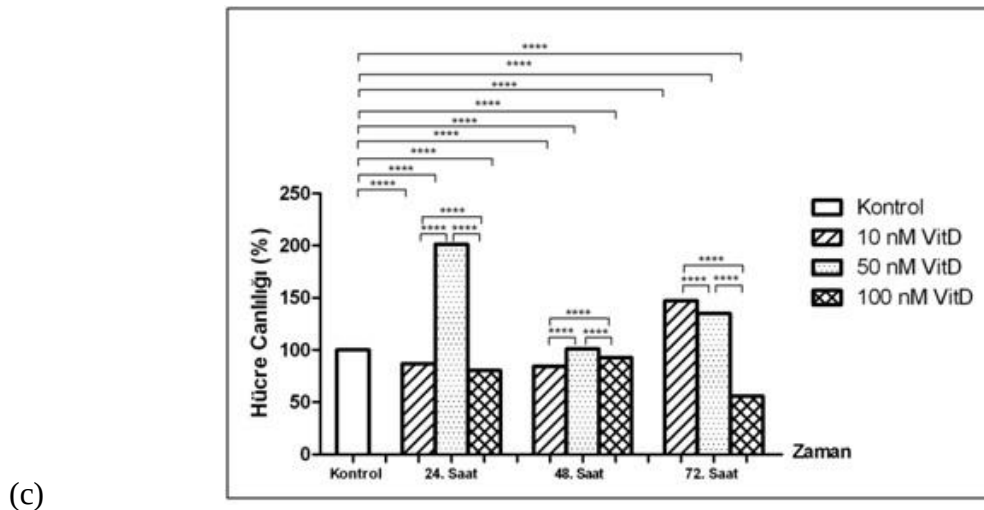
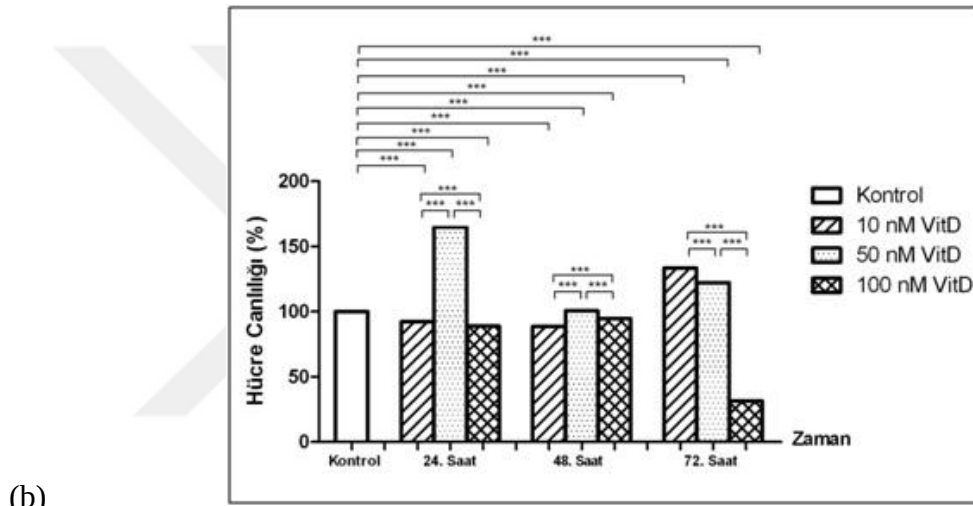
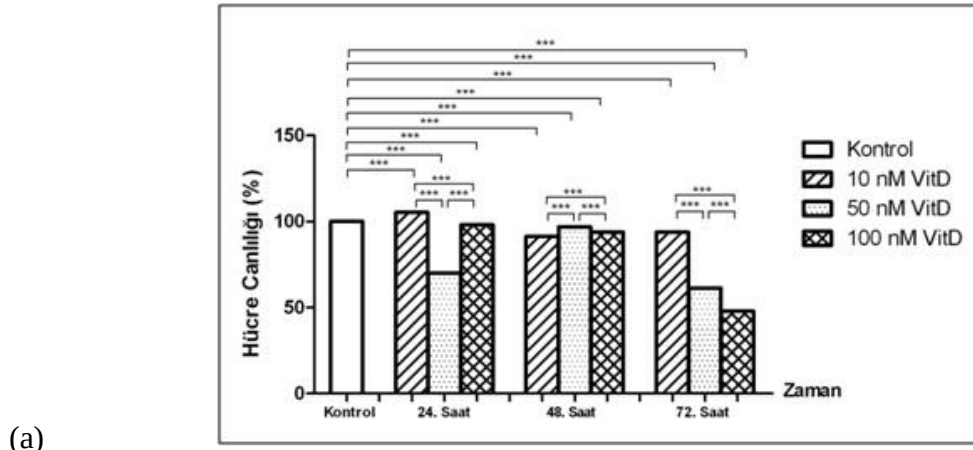
4.1. MTT CANLILIK TESTİ BULGULARI

Yapılan MTT testinin sonucuna göre, %5 CSE, TGF- β ve %5 CSE+TGF- β uygulamaları A549 hücrelerinin canlılığını deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde kontrole göre bir miktar azaltsa da, hücre canlılığı ortalama olarak %78 oranındaydı, hücre canlılığı %50'nin altına düşmedi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: %5 CSE ve 5 ng/ml TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Anlamlılık p değeri: $p < 0,001$.

Farklı konsantrasyonlarda D vitamini (10, 50 ve 100 nM) ile uyarılan A549 hücrelerinde 10 ve 50 nM D vitamini uygulamaları hücre canlılığını etkilemezken, 100 nM D vitamini uygulması 72. saatte hücre canlılığını %30'lara kadar düşürdü ($p < 0,001$)(Şekil 4.2a). A549 hücreleri %5 CSE ve %5 CSE+ TGF- β ile uyarılmadan yarım saat önce 10, 50 ve 100 nM D vitamini ile uyarıldıklarında, benzer bir şekilde, 10 ve 50 nM D vitamini+%5 CSE veya %5 CSE+TGF- β ile muamele edilen hücrelerde hücre canlılığının %5CSE ve TGF- β uygulamalarını takip eden 24 ve 48. saatlerde olumsuz yönde etkilenmediği, ancak deneyin 72. saatinde D vitamini+%5 CSE ve D vitamini +%5 CSE+TGF- β gruplarında hücre canlılığının sırasıyla %47 ($p < 0,001$) ve %55 oranına ($p < 0,0001$) düştüğü belirlendi (Şekil 4.2b,c).

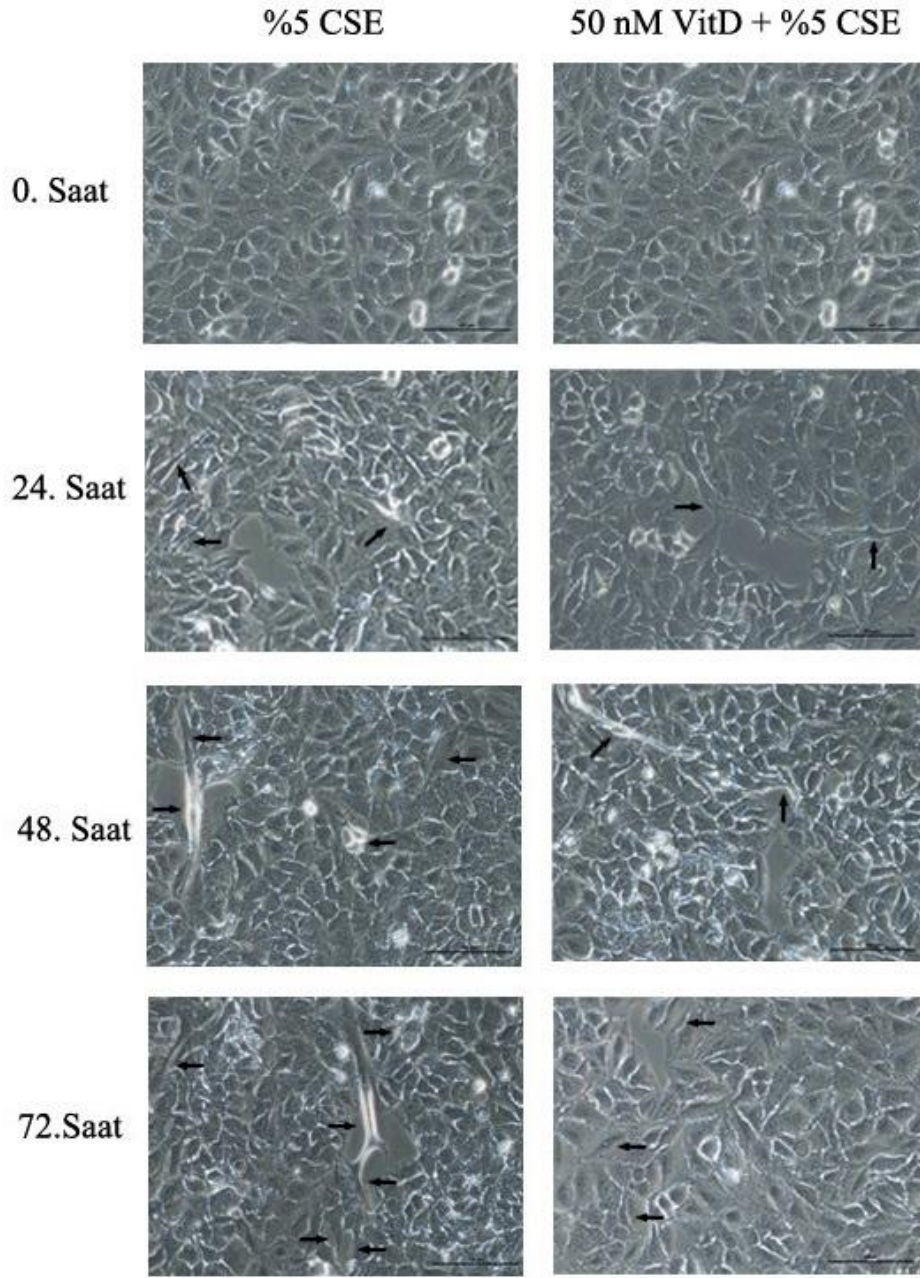


Şekil 4.2: D vitamini (VitD) (a), VitD+%5 CSE (b) ve VitD+%5CSE+TGF- β (c) uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Anlamlılık p değerleri: $p < 0,001$ ve $p < 0,0001$

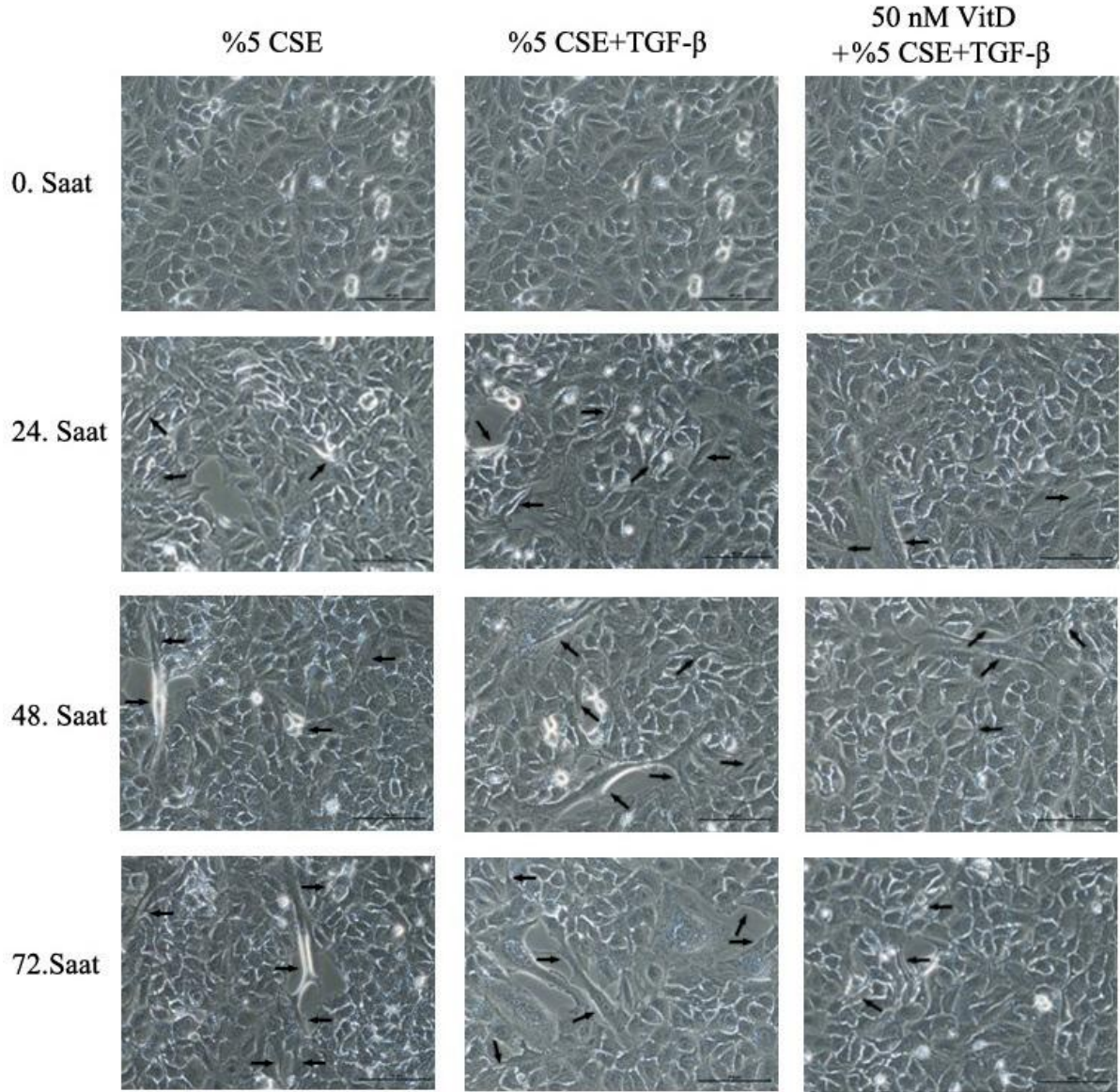
Tüm MTT verileri dikkate alındığında, deneyde kullanılması gereken uygun D vitamini dozunun 10 ve 50 nM olduğu görüldü. %5 CSE ve %5CSE+TGF- β ile uyarılan hücrelerde 10 ve 50 nM D vitamini uygulamalarının EMT'yi geriletip geriletmediği E-kaderin ve α -SMA protein miktarı belirlenerek değerlendirildi. 10 nM D vitamininin, %5 CSE ve TGF- β maruziyeti sonucu A549 hücrelerinde gerçekleşen EMT'yi yeteri kadar geriletemediği, 50 nM D vitamininin ise geriletebildiği tesbit edildi. Bunun sonucunda çalışmada 50 nM D vitamini dozunun kullanımına karar verildi.

4.2. FAZ-KONTRAST MİKROSKOBU BULGULARI

A549 hücreleri herhangi bir uyarana maruz kalmadığı durumlarda, deneyin sıfırıncı saatinde, birbirine yakın konumlanan poligonal şekilli hücreler olarak mikroskop altında ayırt edildiler. %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinin uyarımı takip eden zaman dilimlerinde zamana bağlı olarak (deneyin 24 saatinden 72. saatine doğru) birbirlerinden uzaklaştıkları, hücre şekillerinin poligonalden iğsi şekle değiştiği ve çok sayıda sitoplazmik uzantılara sahip oldukları gözlemlendi (**Şekil 4.3 ve 4.4**). %5 CSE ile %5 CSE+TGF- β grupları kıyaslandığında, %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, özellikle deneyin 48. saatinden itibaren bu değişimlere daha sık rastlandığı görüldü. Deneyin başlamasından yarım saat önce 50 nM D vitamini uygulamaları, %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde gözlenen bu değişikliklerin azalmasına neden oldu (**Şekil 4.3 ve 4.4**).



Şekil 4.3: %5 CSE ve 50 nM D vitamini (VitD) ile uyarılan A549 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü. Oklar birbirinden uzaklaşan ve içi şekil alan hücreleri göstermektedir. 40X büyütme; Bar: 100µm.

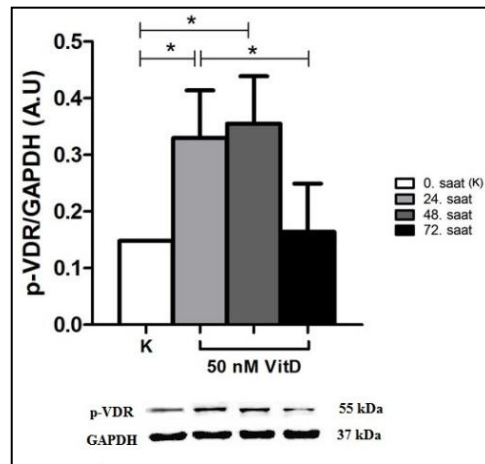
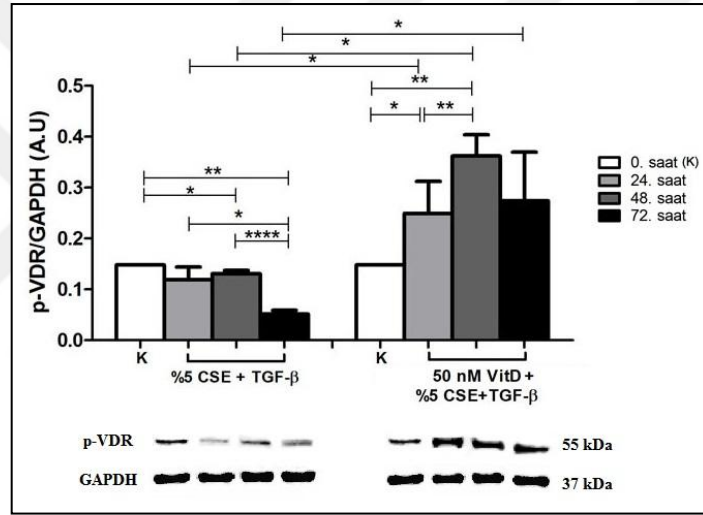
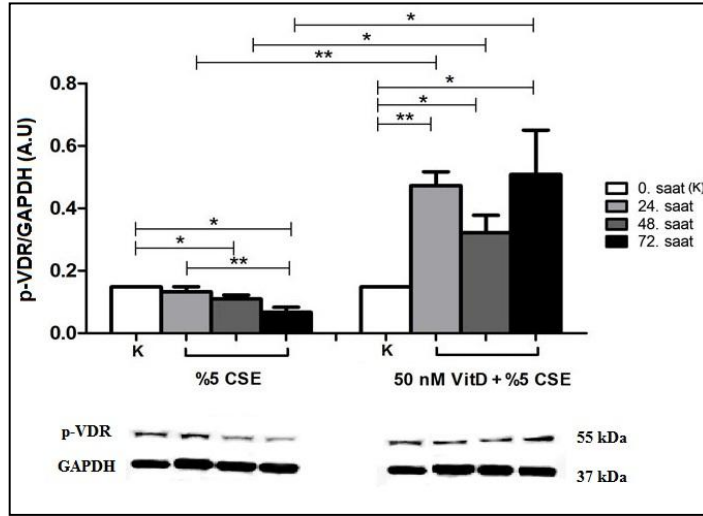


Şekil 4.4: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile uyarılan A549 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü. Oklar birbirinden uzaklaşan ve iğsi şekil alan hücreleri göstermektedir. 40X büyütme; Bar: 100 μ m

4.3. WESTERN EMDİRİMİ BULGULARI

4.3.1. D Vitamini Uygulamaları CSE ve CSE+TGF- β ile uyarılan A549 Hücrelerinde p-VDR Sinyalleme Azalmasını Önledi

%5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan hücrelerde deneyin 48. ve 72. saatlerinde, 0. saate kıyasla p-VDR protein miktarlarında anlamlı bir azalma gözlemlendi (%5 CSE 48. ve 72. saatler için $p<0,05$; %5 CSE+TGF- β 48. saat için $p<0,05$ ve 72. saat için $p<0,01$). Koruyucu D vitamini uygulamaları, %5 CSE ile uyarılan A549 hücrelerinde p-VDR miktarını 24. ($p<0,01$), 48. ve 72. saatlerde ($p<0,05$) 0. saate kıyasla arttırdı. %5 CSE ve VitD+%5 CSE grupları kıyaslandığında, D vitamininin sigaranın etkisini azaltarak deneyin 24. ($p<0,01$), 48. ve 72. saatlerinde ($p<0,05$) p-VDR protein miktarını önemli ölçüde arttırdığı gözlemlendi (**Şekil 4.5**). D vitamini uygulamaları, CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde de p-VDR miktarını 0. saate kıyasla deneyin sadece 24. ($p<0,05$) ve 48. ($p<0,01$) saatlerinde anlamlı miktarda arttırdı. %5 CSE+TGF- β ve VitD+%5 CSE+TGF- β grupları karşılaştırıldığında, D vitamininin, benzer bir şekilde, sigaranın ve TGF- β 'nın etkilerini azaltarak deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde p-VDR protein miktarını anlamlı ölçüde arttırdığı gözlemlendi ($p<0,05$) (**Şekil 4.5**). D vitamininin tek başına uygulandığı A549 hücrelerinde, p-VDR protein miktarında 0. saate kıyasla deneyin 24. ve 48. saatte anlamlı bir artış gözlemlenirken ($p<0,05$); deneyin 72. saatinde p-VDR protein miktarının azaldığı belirlendi (**Şekil 4.5**).



Şekil 4.5: %5 CSE, TGF-β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p-VDR protein miktarlarındaki değişiklikler ve p-VDR proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.

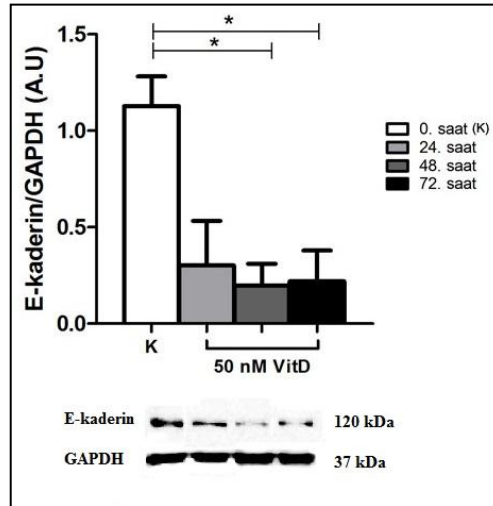
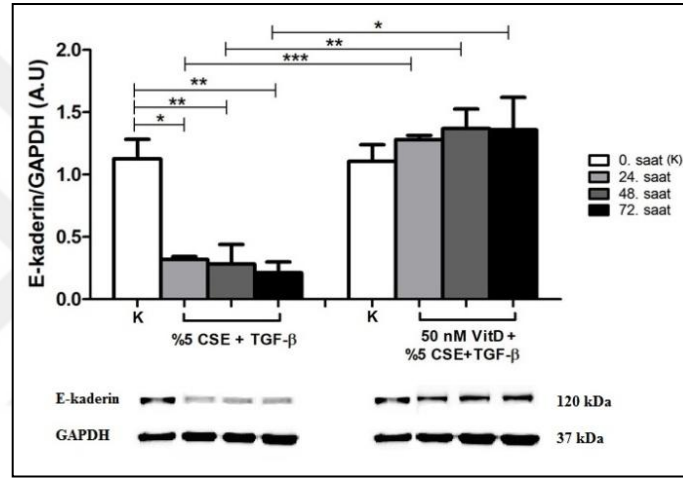
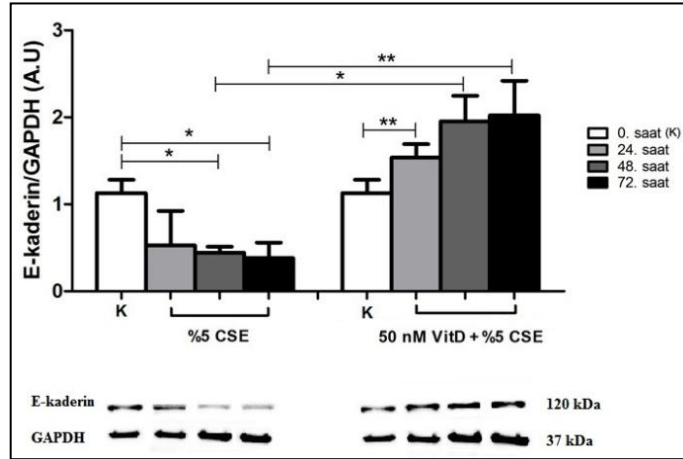
4.3.2. D Vitamini Uygulamaları, CSE ve CSE+TGF- β ile uyarılan A549 Hücrelerinde EMT Uyarımını Azaltır

%5 CSE ile uyarılan hücrelerde 48. ve 72. saatlerinde ($p<0,05$), %5 CSE+TGF- β ile uyarılan hücrelerde ise deneyin 24. saatinden itibaren (24. saat için $p<0,05$; 48 ve 72. saatler için $p<0,01$) 0. saatle kıyasla E-kaderin protein miktarlarında anlamlı bir azalma belirlendi (**Şekil 4.6**). Koruyucu D vitamini uygulamaları, sadece %5 CSE ile uyarılan A549 hücrelerinde deneyin 24. Saatinde E-kaderin protein miktarını deneyin 0. saati ile kıyaslandığında anlamlı miktarda arttırdı ($p<0,01$). D vitamininin koruyucu etkisini analiz etmek için, %5 CSE ve VitD + %5 CSE grupları kıyaslandığında, D vitamininin sigaranın etkisini azaltarak deneyin 48. ($p<0,05$) ve 72. saatlerinde ($p<0,01$), E-kaderin miktarını arttırdığı gözlemlendi (**Şekil 4.6**). %5 CSE+TGF- β ve VitD+%5 CSE+TGF- β grupları karşılaştırıldığında da, D vitamininin benzer bir şekilde, sigaranın ve TGF- β 'nın etkilerini azaltarak deneyin 24. ($p<0,001$), 48. ($p<0,01$) ve 72. saatlerinde ($p<0,05$) E-kaderin protein miktarını arttırarak normal E-kaderin protein miktarını normal seviyeye ulaştırdığı gtespit edildi (**Şekil 4.6**). D vitamininin tek başına uygulandığı A549 hücrelerinde, E-kaderin protein miktarı 0. saate kıyasla deneyin 48. ve 72. saatlerinde anlamlı azalma gösterdi ($p<0,05$) (**Şekil 4.6**).

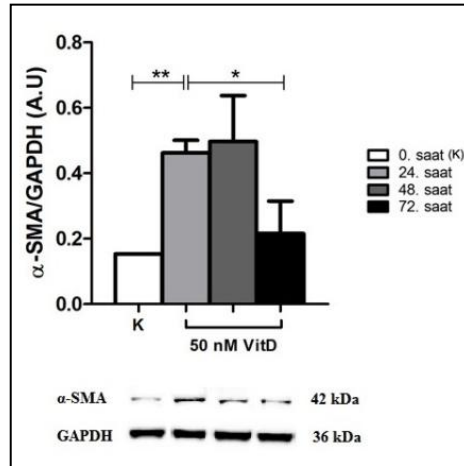
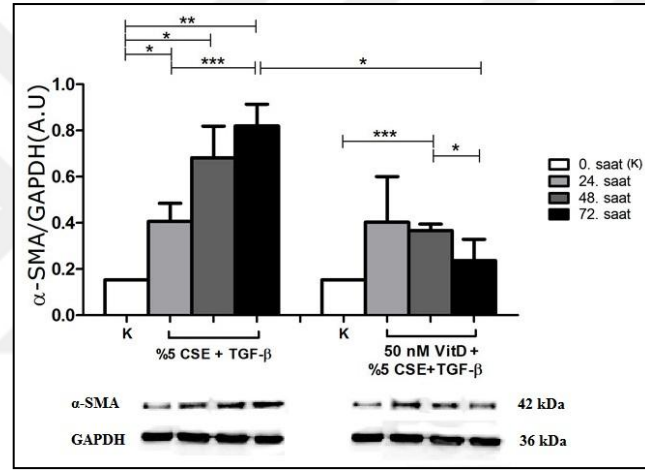
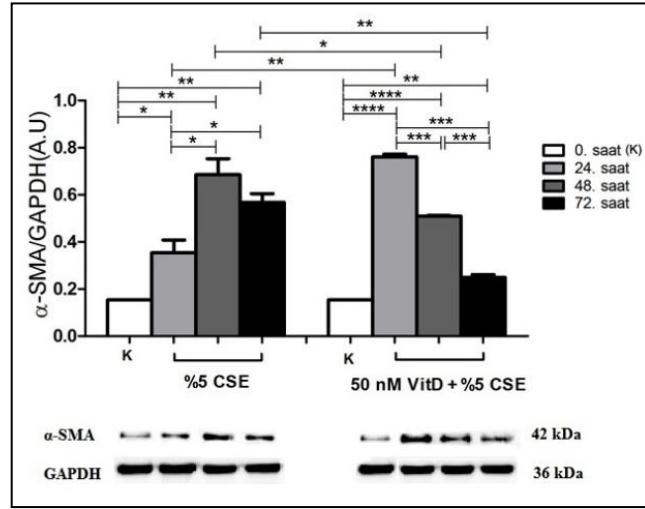
%5 CSE ile uyarılan hücrelerde 24. ($p<0,05$), 48. ve 72. saatlerde ($p<0,01$), 0. saate kıyasla α -SMA protein miktarlarında anlamlı bir artış gözlemlenirken, D vitamini uygulamaları %5 CSE ile uyarılan A549 hücrelerinde artan α -SMA protein miktarını deneyin 24. ve 48. saatlerine göre deneyin 72. saatinde azalttı ($p<0,001$), ancak normal değerine yaklaştıramadı. %5 CSE ve VitD+%5 CSE grupları karşılaştırıldığında, D vitamininin sigaranın etkisini azaltarak deneyin 24. saatinde arttırdığı ($p<0,01$), 48. ($p<0,05$) ve 72. saatlerinde ($p<0,01$) α -SMA miktarını azalttığı saptandı (**Şekil 4.7**). %5 CSE+TGF- β uygulamaları A549 hücrelerinde deneyin 24., 48. ($p<0,05$) ve 72. saatlerinde ($p<0,01$) 0. saate kıyasla α -SMA miktarının anlamlı bir şekilde arttırdı. D vitamini uygulamaları %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde artan α -SMA protein miktarını deneyin 48. saatinden itibaren azaltarak ($p<0,05$) normal değerine yaklaştırdı. %5 CSE+TGF- β ve VitD+%5 CSE+TGF- β grupları karşılaştırıldığında, D vitamininin sigara ve TGF- β 'nın etkisini azaltarak A549 hücrelerinde, deneyin 72. saatinde α -SMA protein miktarında anlamlı ölçüde azalttığı belirlendi ($p<0,05$) (**Şekil 4.7**).

D vitamininin tek başına uygulandığı A549 hücrelerinde, α -SMA protein miktarında 0. saate kıyasla 24. saatte anlamlı bir artış gözlemlenirken ($p<0,01$); 72. saatte 24. saate kıyasla α -SMA protein miktarının azalarak normal değerine yaklaştığı görüldü ($p<0,05$) (**Şekil 4.7**).





Şekil 4.6: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde E-kaderin protein miktarlarındaki değişiklikler ve E-kaderin proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.



Şekil 4.7: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde α -SMA protein miktarlarındaki değişiklikler ve α -SMA proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.

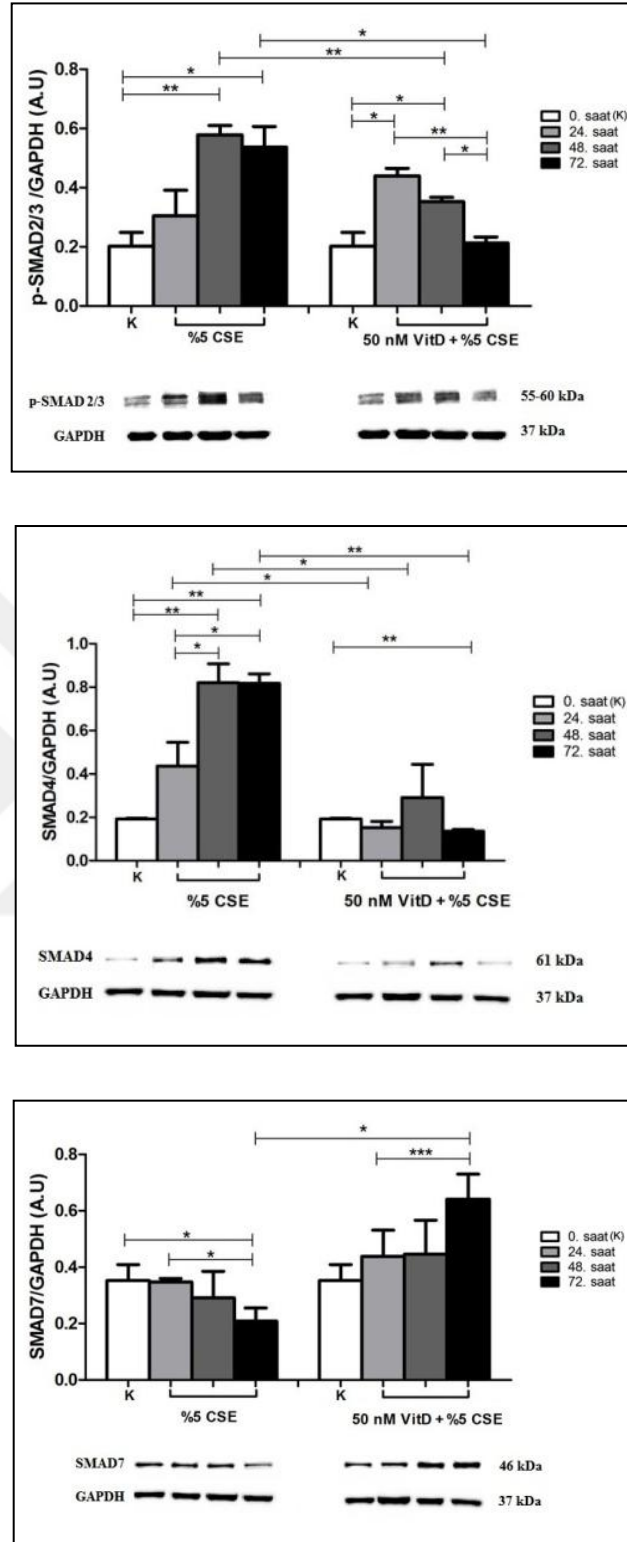
4.3.3. CSE ve CSE TGF- β uygulamaları TGF- β sinyali uyarır, D Vitamini uygulamaları bu uyarımı azaltır

%5 CSE ile uyarılan hücrelerde p-SMAD2/3 ve SMAD4 protein miktarları, deneyin 0. saatine kıyasla deneyin 48. (her iki protein için $p<0,01$) ve 72. saatlerinde (p-SMAD2/3 için $p<0,05$ ve SMAD4 için $p<0,01$) artarken, SMAD7 protein miktarı deneyin 72. saatinde azaldı ($p<0,05$) (**Şekil 4.8**). %5 CSE ve D vitamini uygulanan grupta, deneyin 0. saatine kıyasla deneyin 24. ve 48. saatlerinde p-SMAD2/3 miktarında anlamlı bir artış ($p<0,05$) olmasına rağmen, deneyin 72. saatinde p-SMAD2/3 protein miktarının azalarak 0. saatteki değerine yaklaştığı görüldü. %5 CSE ve VitD+%5 CSE grupları karşılaştırıldığında, D vitamininin sigaranın etkisini azaltarak, deneyin 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,05$) saatlerinde, p-SMAD2/3 protein miktarını azalttığı saptandı. %5 CSE ve D vitamini uygulanan grupta SMAD4 protein miktarının da deneyin 72. saatinde anlamlı ölçüde azaldığı ($p<0,01$), SMAD7 miktarının ise deneyin 24. saatine kıyasla 72. saatte arttığı ($p<0,001$) bulundu. CSE ve VitD+%5 CSE grupları karşılaştırıldığında, D vitamininin sigaranın etkisini azaltarak, SMAD4 miktarını azaltma (24. ve 48.saat için $p<0,05$, 72.saat için $p<0,01$), SMAD7 miktarını artırma yönünde (72.saat için $p<0,05$) etki gösterdiği belirlendi (**Şekil 4.8**).

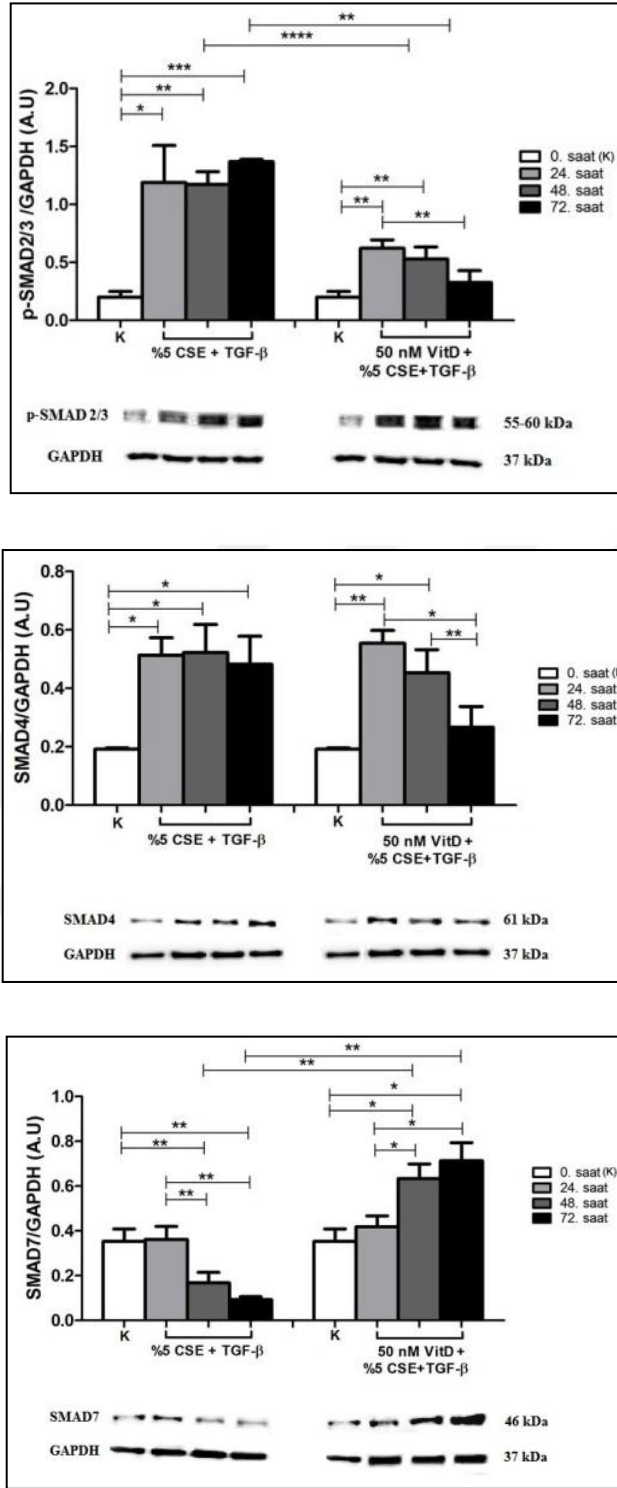
%5 CSE+TGF- β uygulanan grupta, p-SMAD2/3 proteinindeki zamana bağlı değişimler %5 CSE uygulanan gruptakilerle benzerdi. Ancak, %5 CSE+TGF- β uygulamaları, daha erken bir zaman diliminde, deneyin 24. saatinde, p-SMAD2/3 proteinini arttırmaya başladı ($p<0,05$), VitD+ %5 CSE+TGF- β uygulanan grupta da deneyin 48. saatinden itibaren azalan p-SMAD2/3 proteinin 72. saate 0. saatteki değerine yaklaştığı görüldü. D vitamininin koruyucu etkisini analiz etmek için %5 CSE+TGF- β ve VitD+%5 CSE+TGF- β grubu kıyaslandığında, D vitamini uygulamalarının A549 hücrelerinde, deneyin 48. ($p<0,001$) ve 72. ($p<0,01$) saatlerinde, p-SMAD2/3 protein miktarında anlamlı bir azalma meydana getirdiği belirlendi (**Şekil 4.9**). %5 CSE + TGF- β birlikte uygulanan hücrelerde 0. saate kıyasla 24., 48. ve 72. saatlerde SMAD4 miktarının anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0,05$). VitD+%5 CSE+ TGF- β 'nin birlikte uygulandığı grupta ise 0. saate kıyasla 24. ($p<0,01$) ve 48. saatte ($p<0,05$) SMAD4 protein miktarında anlamlı bir artış varken, D vitamini SMAD4 protein miktarını azaltarak 0. saatteki değerine yaklaştırdı (**Şekil 4.9**). %5 CSE+TGF- β ve VitD+%5 CSE+TGF- β grupları kıyaslandığında, D vitamini deneyin 48. ve 72. saatlerindeki SMAD4 protein miktarında gözle görülür bir azalmaya neden olmasına rağmen, %5 CSE+TGF- β grubunda aynı zaman dilimindeki SMAD4 protein miktarına göre bu azalma anlamlı değildi

(Şekil 4.9). %5 CSE+TGF- β birlikte uygulanan hücrelerde deneyin 0. saatine kıyasla 48. ve 72. saatlerde SMAD7 miktarının anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı ($p<0,01$). VitD+%5 CSE+TGF- β 'nin birlikte uygulandığı grupta ise 0. saate kıyasla 48. ve 72. saatlerde ise anlamlı bir artış bulundu ($p<0,05$). %5 CSE+ TGF- β ve VitD %5 CSE+TGF- β grupları karşılaştırıldığında bu zaman dilimlerindeki artışın anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,01$)(**Şekil 4.9**).



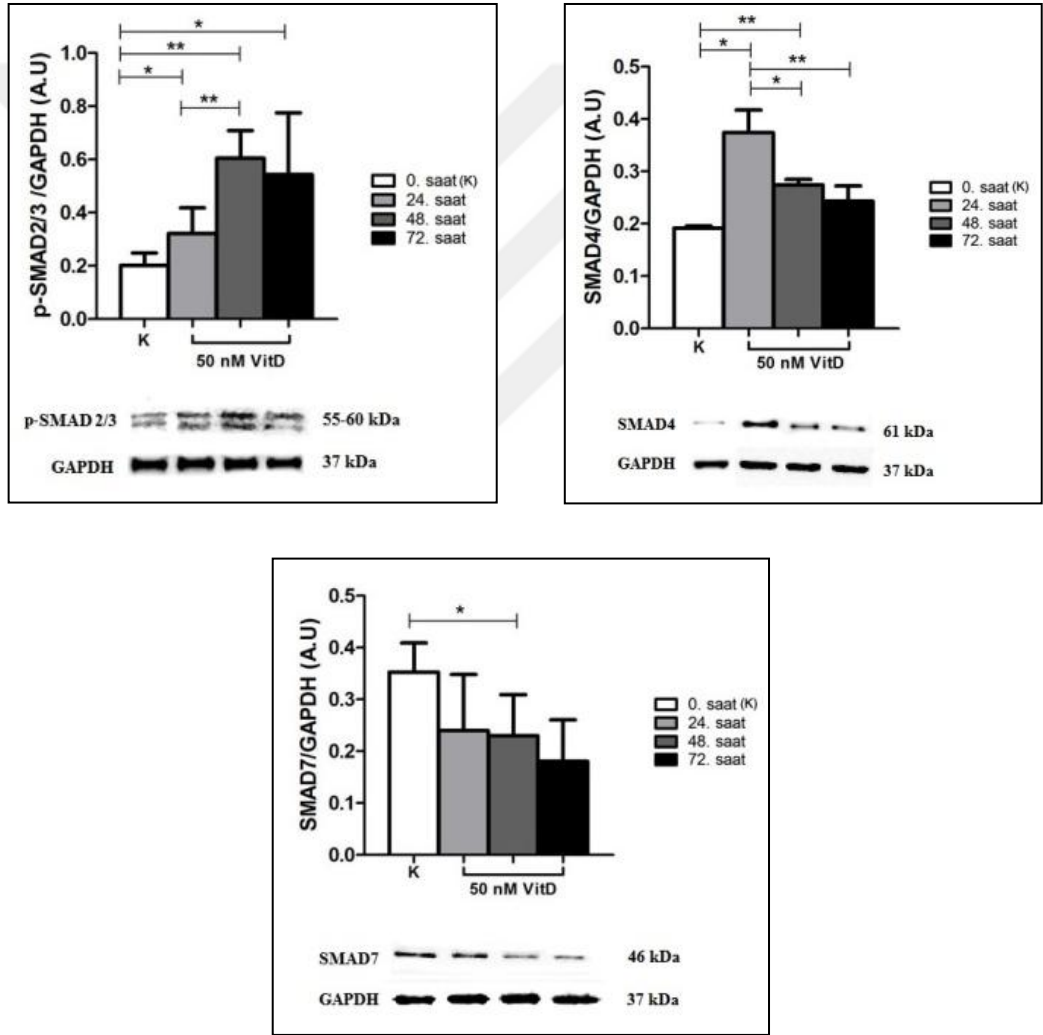


Şekil 4.8: %5 CSE ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p-SMAD2/3, SMAD4 ve SMAD7 protein miktarlarındaki değişiklikler ve bu proteinlerin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.



Şekil 4.9: %5 CSE, TGF-β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p-SMAD2/3, SMAD4 ve SMAD7 protein miktarlarındaki değişiklikler ve bu proteinlerin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * p<0,05, **p<0,01 ve ***p< 0,001.

Sadece D vitamini ile uyarılan A549 hücrelerinde, p-SMAD2/3 protein miktarında 0. saate kıyasla 24. ($p<0,05$), 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,05$) saatlerde anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 4.10). SMAD4 protein miktarı ise 24. ($p<0,05$) ve 48. saatlerde ($p<0,01$) anlamlı bir artış tespit edilirken, SMAD7 protein miktarı 0. saate kıyasla 48. saatte anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0,05$)(Şekil 4.10).

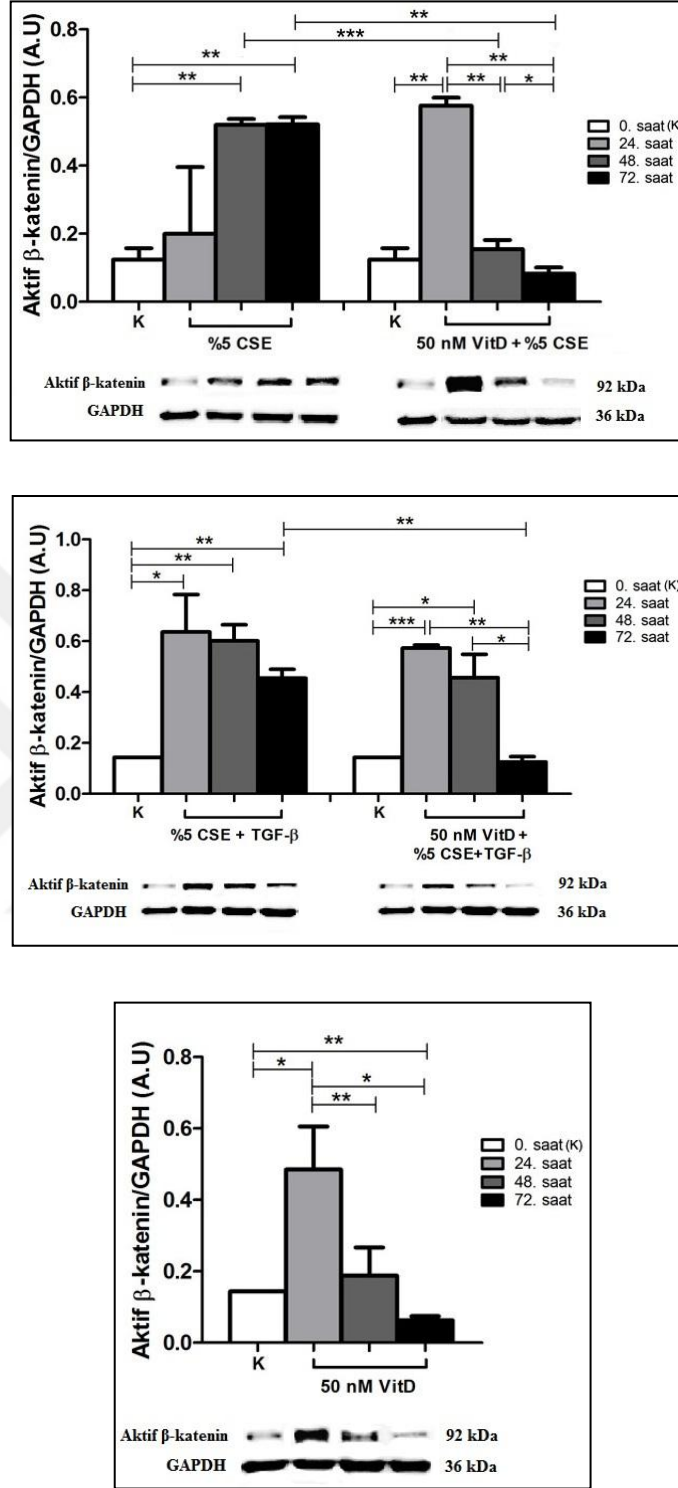


Şekil 4.10: D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p-SMAD 2/3, SMAD4 ve SMAD7 protein miktarlarındaki değişiklikler ve bu proteinlerin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırcı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$.

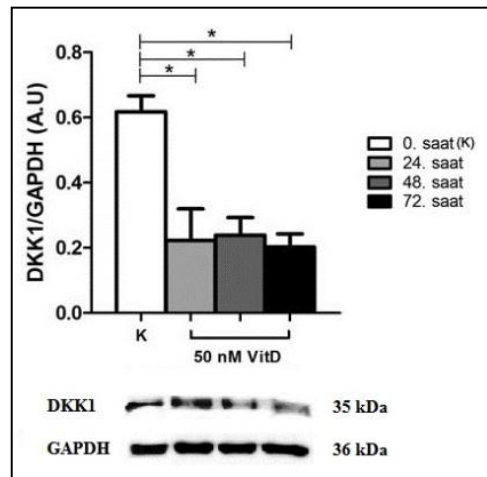
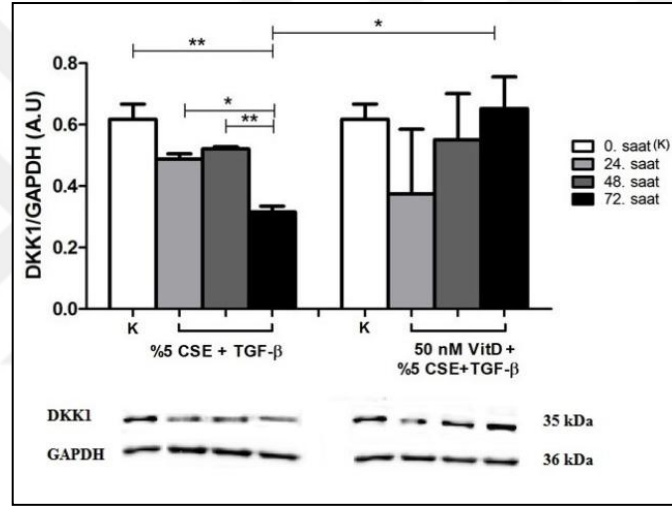
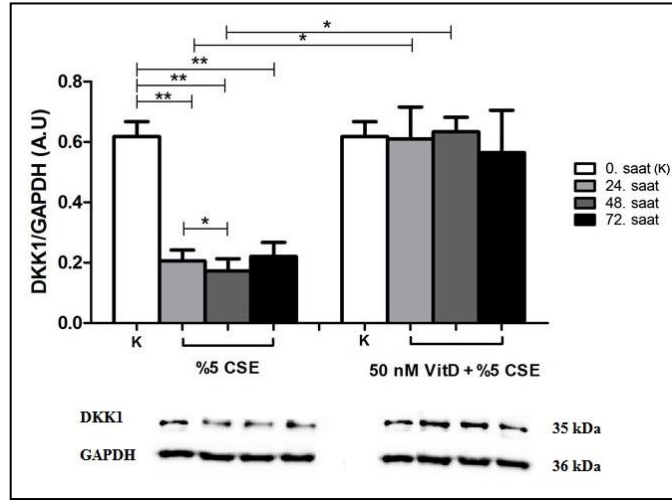
4.3.4. CSE ve CSE TGF- β uygulamaları Wnt sinyalini uyarır, D Vitamini uygulamaları bu uyarıyı azaltır

%5 CSE ile uyarılan hücrelerde 48. ve 72. saatlerde ($p<0,01$), %5 CSE+TGF- β ile uyarılan hücrelerde 24. satten itibaren 24. ($p<0,05$), 48 ve 72. saatlerde ($p<0,01$) 0. saate kıyasla aktif β -katenin protein miktarlarında anlamlı bir artış gözlemlendi. %5 CSE ve D vitamini uygulanan grupta, 24. saatte 0. saate kıyasla anlamlı miktarda artan ($p<0,01$) aktif β -katenin protein miktarı 48. ($p<0,01$) ve 72. saatlerinde ($p<0,05$) 24. saate kıyasla anlamlı miktarda azalarak 0. saatteki miktarına yaklaştı. VitD+%5 CSE+TGF- β ile uyarılan hücrelerde ise aktif β -katenin miktarı ilk 48 satte artarken (24 saat için $p<0,001$; 48 saat için $p<0,05$) , 72. satte azalarak 0. satteki değerine yaklaştı. %5 CSE ve VitD+%5 CSE grupları karşılaştırıldığında, D vitamininin sigaranın etkisini azaltarak deneyin 48. ($p<0,001$) ve 72. ($p<0,01$) saatlerinde aktif β -katenin protein miktarını azalttığı gözlemlendi (**Şekil 4.11**). %5 CSE+TGF- β ve VitD+%5 CSE+TGF- β grubu kıyaslandığında, A549 hücrelerinde, deneyin 72. saatinde aktif β -katenin protein miktarında anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,01$) (**Şekil 4.11**). D vitaminin tek başına uygulandığı A549 hücrelerinde, aktif β -katenin protein miktarında 0. saate kıyasla 24. saatte anlamlı bir artış varken ($p<0,05$), 72. saatte anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p<0,01$). 24. saatteki artışa kıyasla, 48. ($p<0,01$) ve 72. saatlerde ($p<0,05$) anlamlı bir azalma ile artan aktif β -katenin miktarının normalize edildiği bulundu (**Şekil 4.11**).

%5 CSE uygulamaları A549 hücrelerinde DKK1 miktarını deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde anlamlı ölçüde azaltırken ($p<0,01$), %5 CSE+TGF- β uygulamaları deneyin 72. saatinde DKK1 protein miktarını azaltabildi ($p<0,01$). D vitamini uygulamaları bu deney gruplarında DKK1 seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. %5 CSE ve VitD+%5 CSE grubu kıyaslandığında, D vitaminin sigaranın etkisini azaltarak 24. ve 48. saatlerde, DKK1 protein miktarını arttırdığı ($p<0,05$), %5 CSE+TGF- β ve VitD+%5 CSE+TGF- β grubu kıyaslandığında ise, D vitaminin sigara ve TGF- β 'nın etkisini azaltarak DKK1 seviyesini deneyin 72. saatinde arttırdığı saptandı ($p<0,05$). D vitamininin tek başına uygulandığı A549 hücrelerinde, DKK1 protein miktarında 0. saate kıyasla 24., 48. ve 72. saatlerde anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$) (**Şekil 4. 12**).



Şekil 4.11: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde aktif β -katenin protein miktarlarındaki değişiklikler ve aktif β -katenin proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.



Şekil 4.12: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde DKK1 protein miktarlarındaki değişiklikler ve DKK1 proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,01$.

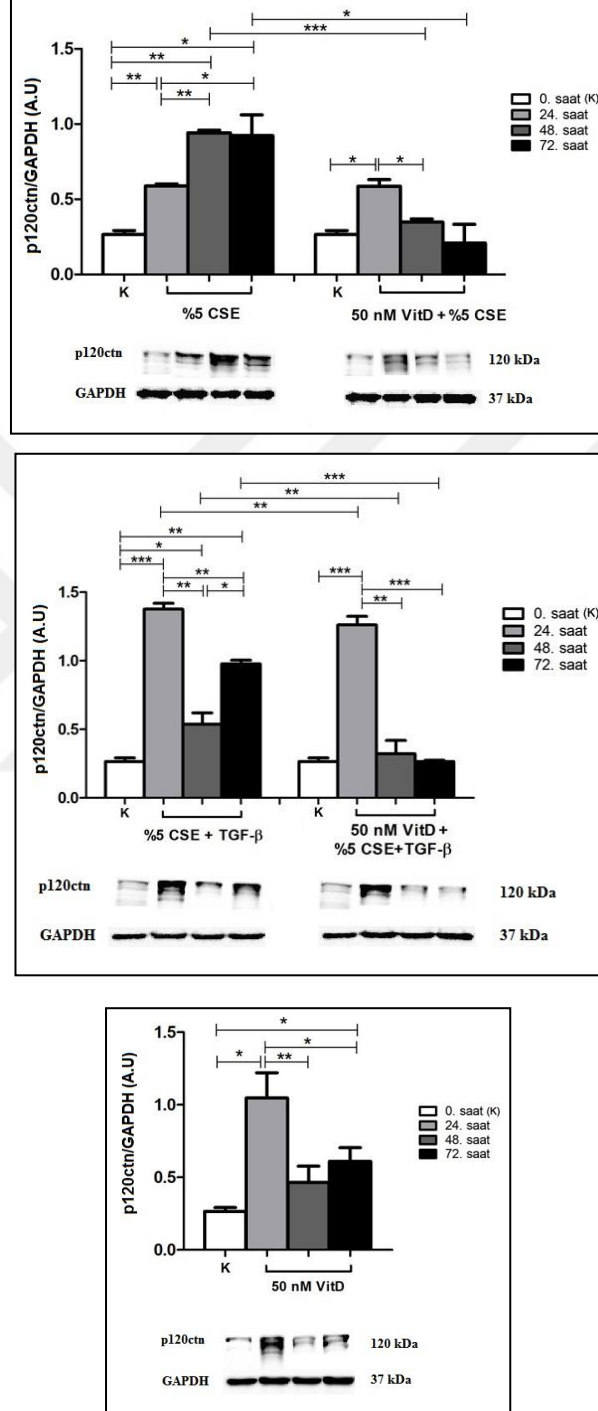
4.3.5. CSE ve CSE TGF- β uygulamaları E-kaderin stabilizasyonunda ve yıkımında etkili proteinlerin sentezini artırır, D Vitamini bu artışa engel olur

%5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uygulamaları A459 hücrelerinde p120ctn miktarını 24. satten itibaren arttırdı (%5 CSE 24, 48 saatler için $p<0,01$ ve 72 saat için $p<0,05$; %5CSE+TGF- β 24 saat için $p<0,001$, 48 saat için $p<0,05$, 72 saat için $p<0,01$). D vitamini bu hücre gruplarında p120ctn miktarını ilk 24 satte arttırırken (VitD+%5 CSE için $p<0,05$; VitD+%5 CSE+TGF- β için $p<0,001$), 48 ve 72 saatlerde azaltarak 0. saatteki seviyesine yaklaştırdı (**Şekil 4.13**). %5 CSE ve VitD+%5 CSE grubu kıyaslandığında, 48. ($p<0,001$) ve 72. ($p<0,05$) saatlerde, D vitamininin sigaranın etkisini azaltarak p120ctn protein miktarını azalttığı gözlemlendi. %5 CSE+TGF- β ve VitD+%5 CSE+TGF- β grubu kıyaslandığında gruplar arasında 24., 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,001$) saatlerde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (**Şekil 4.13**). D vitamininin tek başına uygulandığı A549 hücrelerinde, p120ctn protein miktarında 0. saate kıyasla 24. ve 72. saatlerde anlamlı bir artış gözlemlenirken ($p<0,05$); 24. saate kıyasla 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,05$) saatlerde anlamlı bir azalma gözlemlendi. Ancak 0. saatle karşılaştırıldığında 72. satte p120ctn miktarı fazlaydı ($p<0,05$) (**Şekil 4.13**).

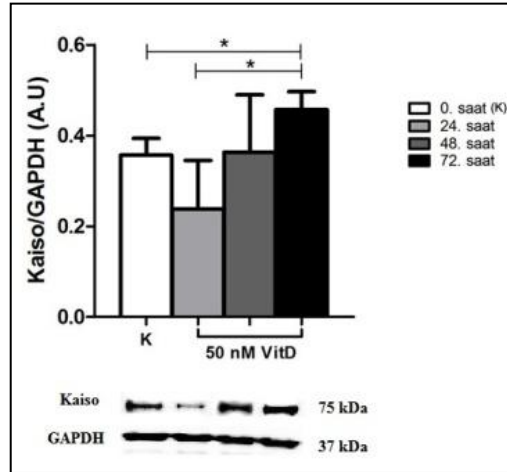
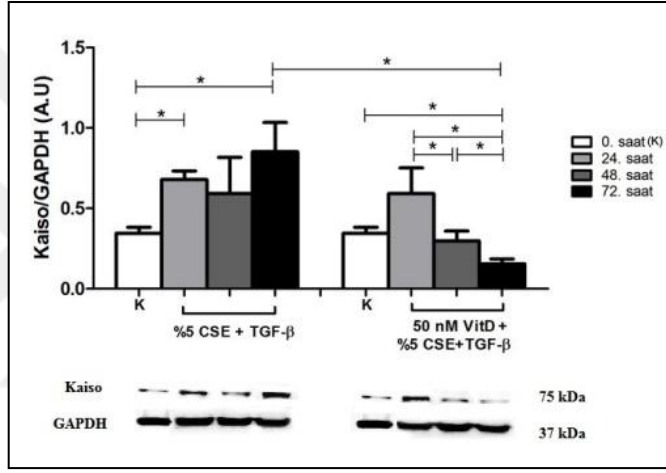
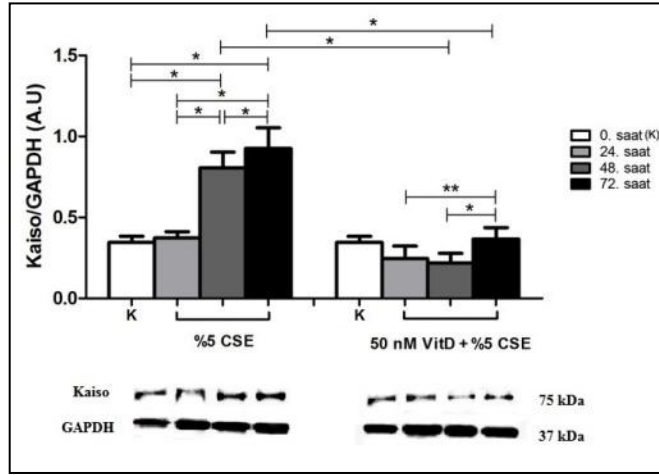
%5 CSE uygulamaları A459 hücrelerinde Kalso miktarını 48. ve 72.. satten itibaren arttırırken ($p<0,05$), %5CSE+TGF- β uygulamaları 24 . ve 72. saatlerde arttırdı ($p<0,05$). D vitamini bu hücre gruplarında Kalso miktarını %5 CSE grubunda anlamlı miktarda değiştirmezken, %5 CSE+TGF- β grubunda 72. satte azalttı ve 0. saatteki değerine yaklaştırdı ($p<0,05$). %5 CSE ve VitD+%5 CSE grubu kıyaslandığında, 48. ve 72. saatlerde, D vitamini sigaranın etkisini azaltarak Kalso protein miktarını azalttığı gözlemlendi ($p<0,01$) (**Şekil 4.14**). %5 CSE+TGF- β ve VitD+%5 CSE+TGF- β grubu kıyaslandığında gruplar arasında 72. saatte anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$). D vitamininin tek başına uygulandığı A549 hücrelerinde, Kalso protein miktarında 0. saate kıyasla 72. saatte anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$) (**Şekil 4.14**).

%5 CSE ile uyarılan hücrelerde 0. saate kıyasla 48. saatte, NEDD9 protein miktarlarında anlamlı bir artış gözlemlenirken ($p<0,01$), %5CSE +TGF- β uygulamaları NEDD9 miktarını deneyin 72. saatinde arttırdı ($p<0,05$). D vitamini bu hücre gruplarında NEDD9 miktarını anlamlı miktarda değiştirmede. %5 CSE ile VitD+%5 CSE kıyaslandığında deneyin 48. saatte ve %5 CSE+TGF- β ile VitD+%5 CSE+TGF- β grubu grupları karşılaştırıldığında ise 72. saatte, D vitamininin sigaranın etkisini azaltarak NEDD9 protein miktarını düşürdüğü

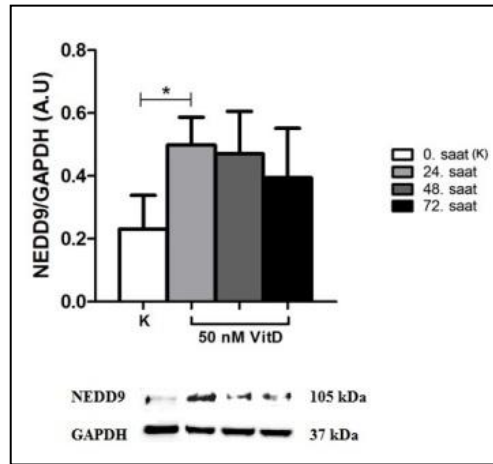
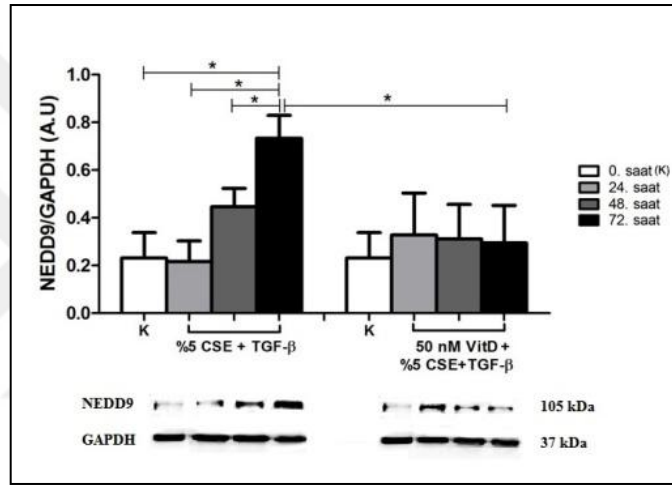
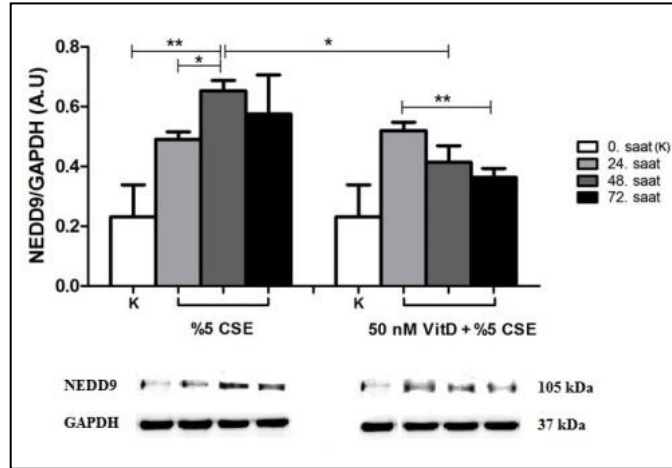
saptandı ($p<0,05$). D vitamini tek başına uygulandığı A549 hücrelerinde, NEDD9 protein miktarında 0. saate kıyasla 24. saatte anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.13: %5 CSE, TGF- β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde p120ctn protein miktarlarındaki değişiklikler ve p120ctn proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.



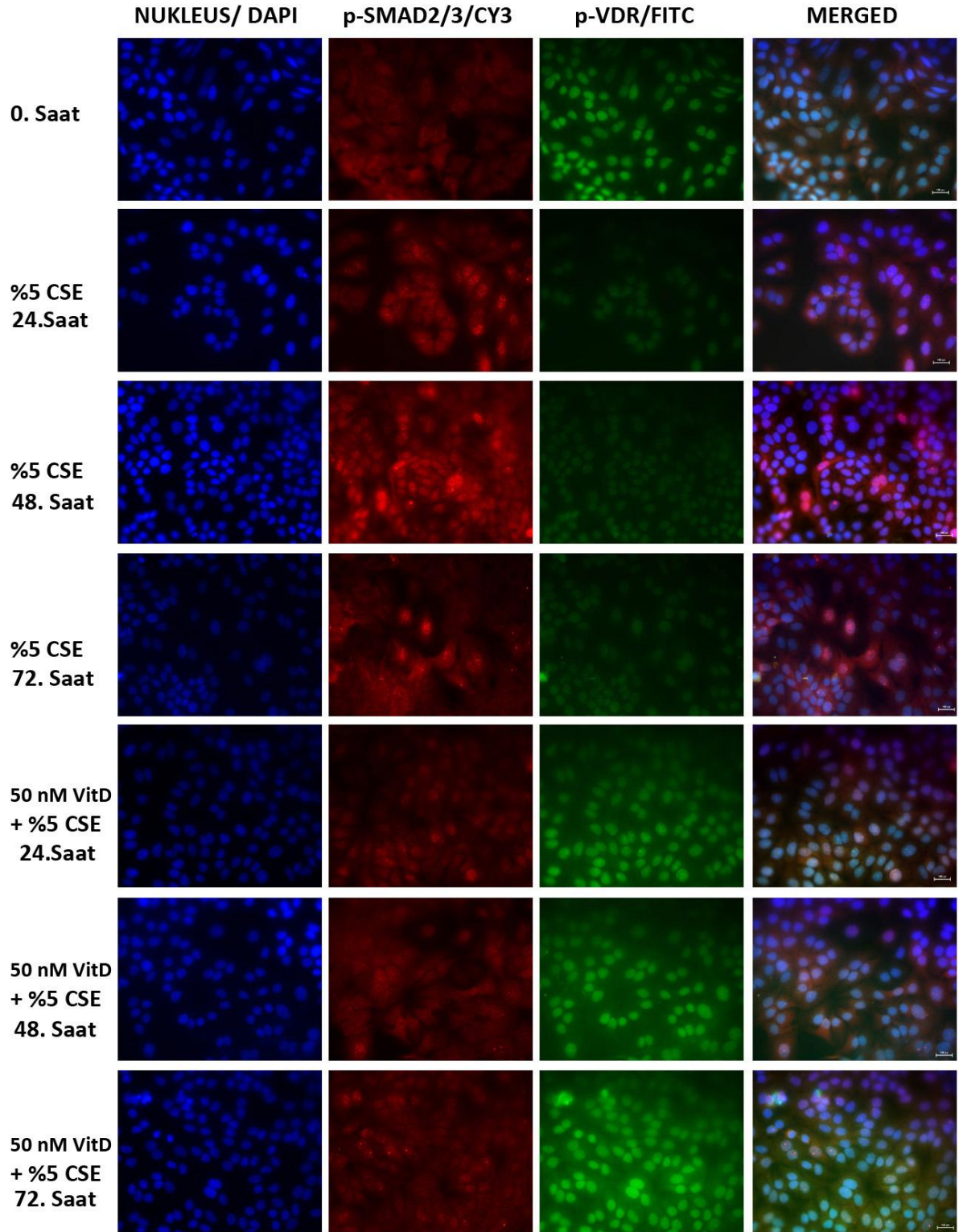
Şekil 4.14: %5 CSE, TGF-β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde Kaiso protein miktarlarındaki değişiklikler ve Kaiso proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değeri: * p<0,05.



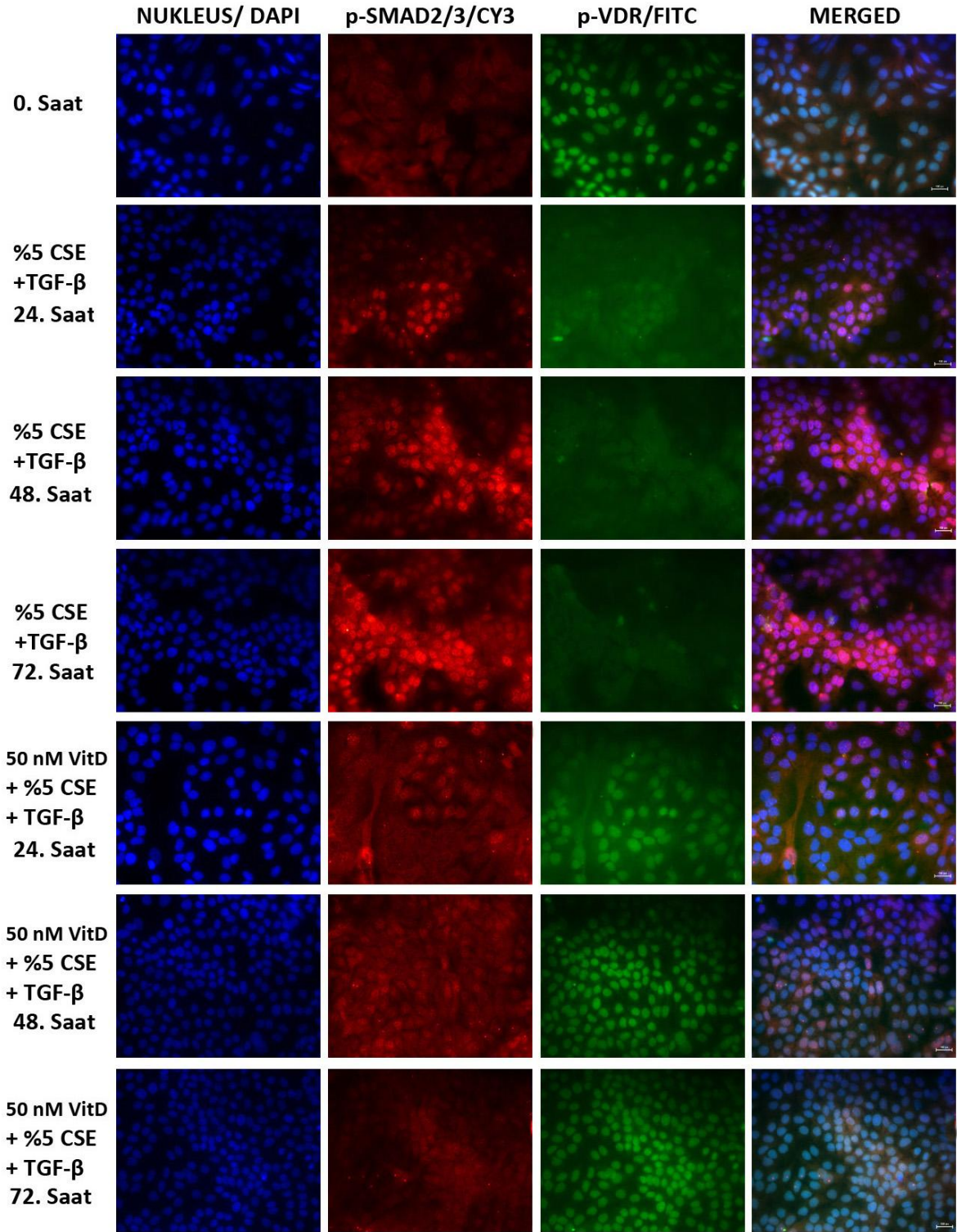
Şekil 4.15: %5 CSE, TGF-β ve D vitamini (VitD) ile muamele edilen A549 hücrelerinde NEDD9 protein miktarlarındaki değişiklikler ve NEDD9 proteinin bantları gösterilmiştir. K: Deneyin sıfırıncı saatini ifade etmektedir. Anlamlılık p değerleri: * p<0,05 ve **p<0,01.

4.4. IMMÜNFLORESAN BULGULARI

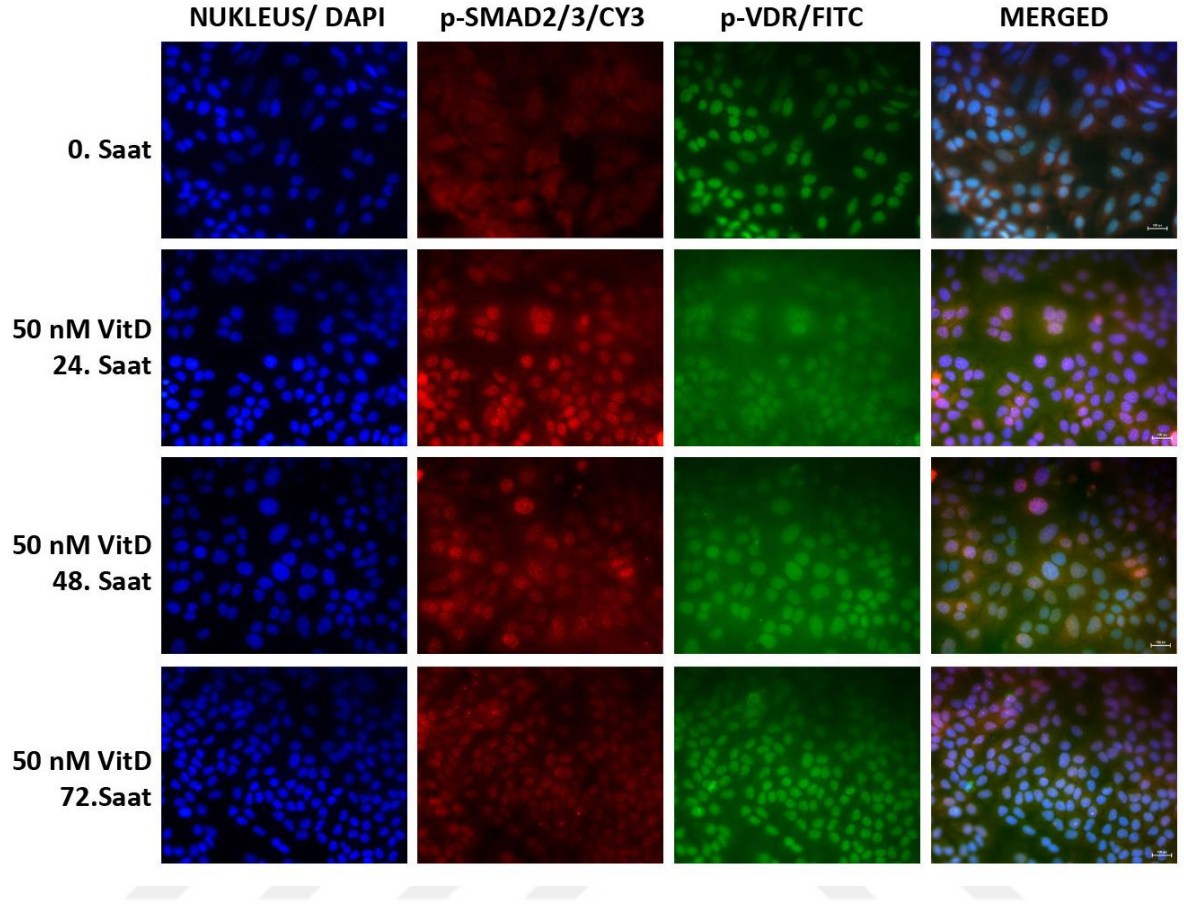
p-VDR/p-SMAD2/3 ve pVDR-Kaiso ikili işaretleme analizleri ile p-VDR, p-SMAD2/3 ve Kaiso immunoreaktivitesi A549 hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de nukleusunda belirlendi. %5 CSE ve % 5CSE+TGF- β ile muamele edilen hücrelerde zamana bağlı olarak p-VDR immunoreaktivitesinde bir azalmanın olduğu immunoreaktivitenin daha çok sitoplazmik olduğu, p-SMAD2/3 immunoreaktivitesinin ise arttığı ve özellikle hücre nukleuslarında yoğun p-SMAD2/3 immunoreaktivitesi bulunduğu tespit edildi. Kaiso immunoreaktivitesinin ise %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uygulamalarını takiben zamanla birlikte arttığı ve immunoreaktivitenin daha çok sitoplazmik olduğu gözlemlendi. D vitamini uygulamaları %5CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan hücrelerde azalan p-VDR immunoreaktivitesinde artışa sebep oldu. p-VDR immunoreaktivitesinin özellikle tekrardan hücre nukleusunda belirginleştiği tespit edildi. Bu hücrelerdeki p-SMAD2/3 ve Kaiso immunoreaktivitesi ise azaldı; kaiso immunoreaktivitesi daha çok nukleus etrafındaki sitoplazmik bölgede ve nukleusta gözlemlendi (Şekil 4.16-4.19).



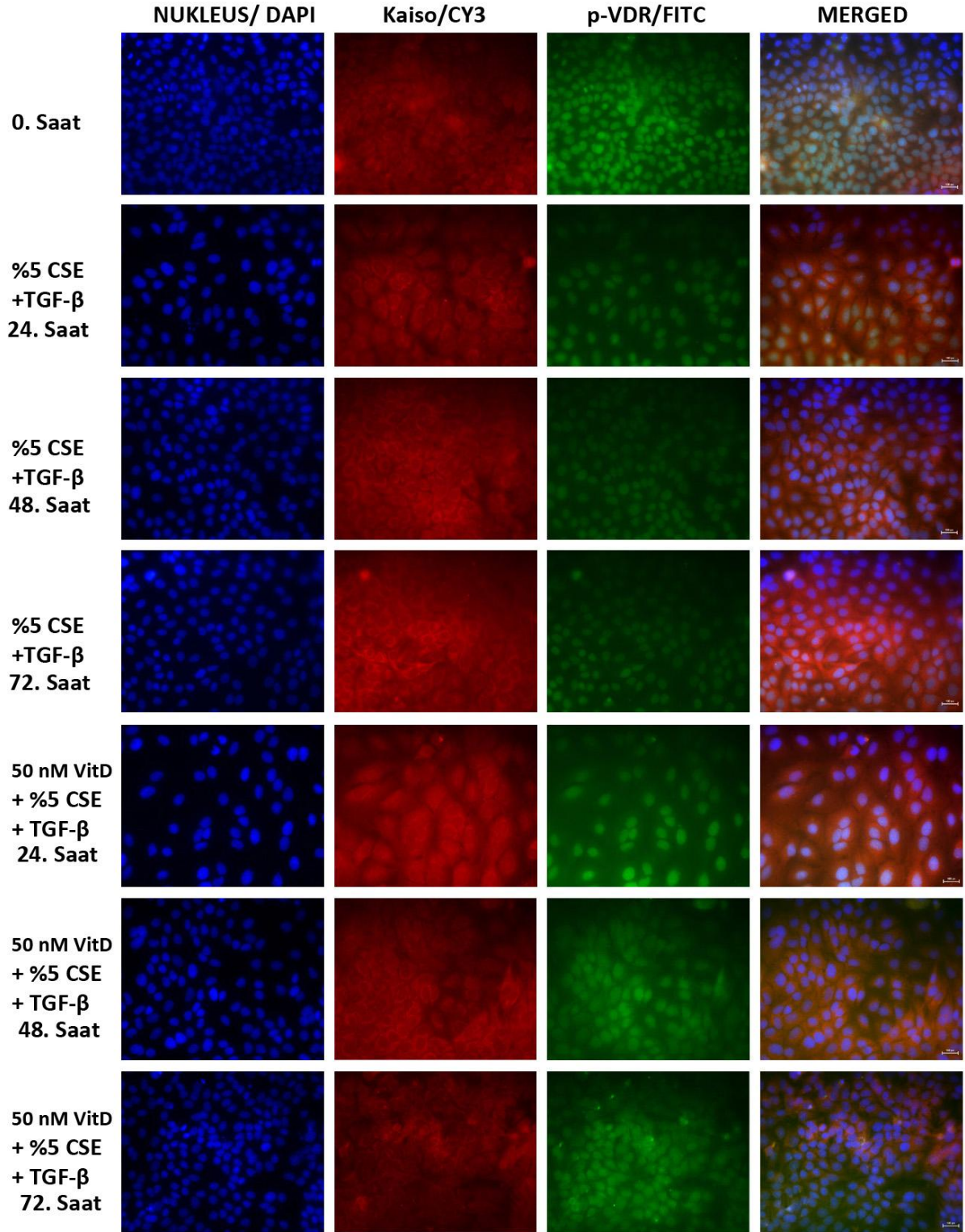
Şekil 4.16: A549 hücrelerine yapılan %5 CSE ve 50 nM VitD uygulamaları sonrası p-SMAD2/3(Cy3) ve p-VDR (FITC) proteinlerinin immünfloresan işaretlemesi gösterilmektedir. Bar büyüklüğü: 100µm



Şekil 4.17: A549 hücrelerine yapılan %5 CSE, TGF- β ve 50 nM VitD uygulamaları sonrası p-SMAD2/3(Cy3) ve p-VDR (FITC) proteinlerinin immünfloresan işaretlemesi gösterilmektedir. Bar büyüklüğü: 100 μ m



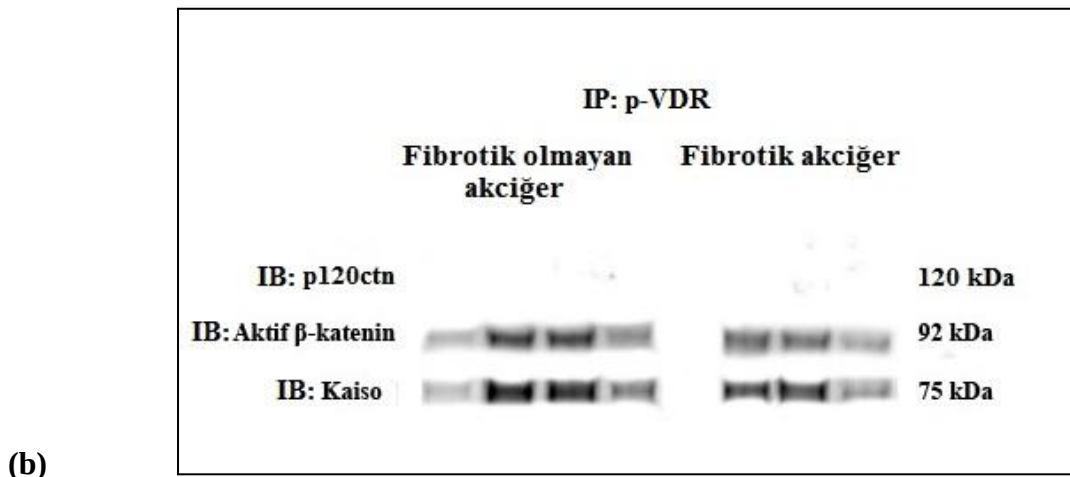
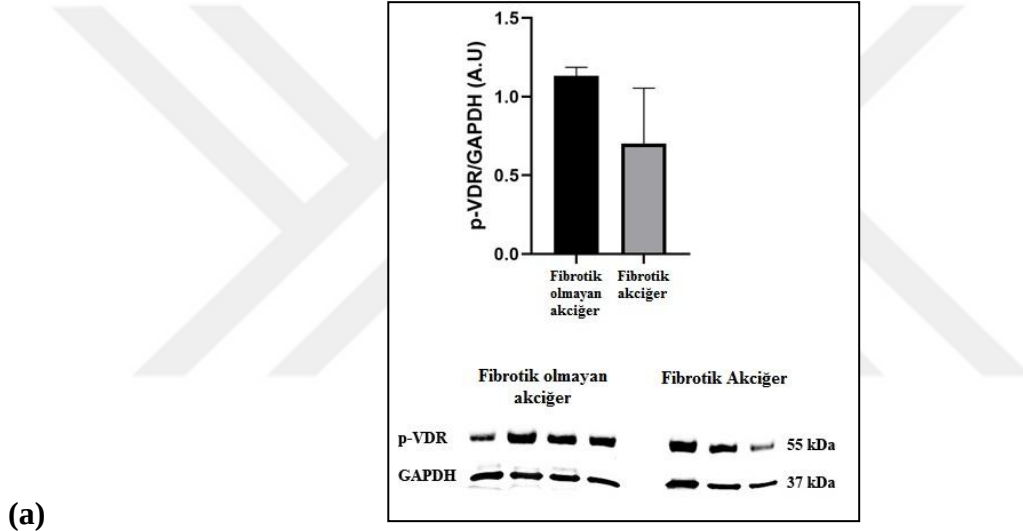
Şekil 4.18: A549 hücrelerine yapılan 50 nM VitD uygulamaları sonrası p-SMAD2/3(Cy3) ve p-VDR (FITC) proteinlerinin immünfloresan işaretlemesi gösterilmektedir. Bar büyüklüğü: 100µm



Şekil 4.19: A549 hücrelerine yapılan %5 CSE, TGF- β ve 50 nM VitD uygulamaları sonrası Kaiso (Cy3) ve p-VDR (FITC) proteinlerinin immünfloresan işaretlemesi gösterilmektedir. Bar büyüklüğü: 100 μ m

4.5. FİBROTİK VE FİBROTİK OLMAYAN İNSAN AKCİĞER ÖRNEKLERİNDE P-VDR MİKTARI VE İLİŞKİLİ OLDUĞU PROTEİNLER

Fibrotik akciğer örneğinde p-VDR miktarı, fibrotik olmayan akciğer örneği ile karşılaştırıldığında daha az miktarda bulunmasına rağmen, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (**Şekil 4.20**). Ko-imunopresipitasyon deneyleri ile p-VDR ve onunla etkileşime giren proteinler çöktürüldüğünde, aktif β -katenin ve Kaiso'nun p-VDR ile etkileşime girdiği, p120ctn'nin ise p-VDR ile etkileşime girmediği tespit edildi (**Şekil 4.20**).



Şekil 4.20: Fibrotik ve fibrotik olmayan insan akciğer örneklerine ait p-VDR protein miktarları, p-VDR proteinin bantları (a) ve bu örneklerde p-VDR ile etkileşime giren aktif β -katenin ve Kaiso protein bantları (b) gösterilmektedir. Membranlarda p120ctn bandı belirlenemedi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Avrupa’da her yıl en az altı milyon kişi solunum hastalıklarına bağlı olarak hastanede tedavi görmekte ve bir yıl içinde görülen ölümlerin sekizde biri solunum hastalıkları sebebiyle gerçekleşmektedir. Ölen kişilerin yarısından fazlasında, ölüm nedeni olarak sigara kullanımına bağlı olarak gelişen akciğer hastalıkları gösterilmektedir. Yirminci yüzyılda dünya genelinde tütüne bağlı ölümlerin on milyonu bulduğu, yirmibirinci yüzyılda ise tütün kullanımına bağlı ölümlerin bir milyara kadar yükselebileceği öngörülmektedir (ELF ve ERS, 2010). Uzun süreli sigara kullanımı, IPF, KOAH, amfizem ve akciğer kanseri gibi birçok akciğer hastalığı için önemli ölçüde bir risk faktörüdür (Nyunoya ve diğ., 2014; Silva ve diğ., 2008). Sigara, IPF’in en önemli tetikleyicilerinden biridir (Baumgartner ve diğ., 1997). Öyle ki, sigara tüketimi, IPF’in başlaması ve ilerlemesi ile doğru orantılıdır. Düzenli sigara kullananların ise sigara içmeyen ve sigarayı bırakan insanlara kıyasla IPF’e daha genç yaşta yakalandıkları tespit edilmiştir (Kärkkäinen ve diğ., 2017). Sigara dumanına maruz kalan farelerin akciğerlerinde, TGF- β sinyal yolu aktivasyonunun uyarıldığı, fibrotik alanların geliştiği ve kollagen miktarında artış meydana geldiği gözlenmiştir. Ayrıca, CSE’ye maruz kalan fare akciğer fibroblastlarında hücre çoğalmasının uyarıldığı ve bu hücrelerde kollagen sentezinin arttığı rapor edilmiştir (Zhou ve diğ., 2019). EMT, IPF patogenezinin katkı sağlayan önemli bir süreçtir. IPF’li hastalarda alveolar epitel hücrelerinin EMT aracılığı ile miyofibroblastlara farklılaşabildikleri bilinmektedir (Kim ve diğ., 2009). IPF’li hastaların akciğerlerindeki fibrotik alanlardan izole edilen epitel hücrelerinde α -SMA, kollagen ve kalponin1 mRNA ekspresyonunun uyarıldığı saptanmıştır (Marmai ve diğ., 2011). TGF- β ile uyarılan sıçan ve insan primer alveolar epitel hücreleri ile insan A549 hücrelerinin, epitel fenotiplerini mezenkimal fenotiplere dönüştürdükleri gösterilmiştir (Kasai ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2009). Sigaranın TGF- β sinyal yolu aktivasyonunu ve EMT’yi uyarabildiği bilinmektedir (Vu ve diğ., 2016; Kim ve diğ., 2018). Çalışmamızın sonuçları %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde p-VDR sinyallemeinin azalmasına bağlı olarak TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarının aktivasyonunun uyarıldığını, ayrıca E-kaderin stabilizasyonunu ve yıkımını düzenleyen p120ctn ve NEDD9 proteinlerin ekspresyonunun arttığını ve bu değişimlere bağlı olarak da A549 hücrelerinin EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasına yönlendiklerini göstermektedir. Bu sonuçlar, sigara içiciliği, sigara içiciliğine

eşlik eden TGF- β sinyal yolunun aşırı aktivasyonu ve azalan VDR sinyallemeinin, IPF gelişiminde önemli risk faktörleri olabileceğini açıkça göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızın verileri, CSE ve TGF- β uygulamalarından yarım saat önce A549 hücrelerinin 50 nM D vitamini ile muamele edildiklerinde, bu hücrelerde VDR sinyallemeinin artmasının DKK1, aktif β -katenin ve Kaiso proteinleri aracılığı ile TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarının aktivasyonunun azalmasını sağlayarak A549 hücrelerini EMT'ye karşı koruduğunu ortaya koymaktadır.

Sigara dumanında bulunan nikotin, ROS, PAH ve NKK gibi maddeler çeşitli kanser hücrelerinde, TGF- β sinyal yolunu, EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini ve pro-fibrotik genleri aktive ederek EMT'yi uyarabilirler (Vu ve diğ., 2016; Kim ve diğ., 2018). Nikotin, nikotinik asetilkolin reseptörleri aktivasyonu aracılığıyla mezenkimal hücre moleküllerinin ekspresyonunu destekleyerek EMT'ye neden olabilmektedir. Örneğin, nikotin aracılı nAChR'lerin aşırı ekspresyonu periostin üzerinden vimentin ekspresyonunu artırır. Ayrıca nikotin, TGF- β aracılığıyla miR-21'in ekspresyonunu uyararak snail miktarının artmasına sebep olur. Artan snail, E-kaderin gen ekspresyonunu baskılayarak EMT'yi indükleyebilir. PAH direkt olarak snail ve twist transkripsiyon faktörlerinin miktarının artmasına neden olarak E-kaderin gen ekspresyonunu azaltır ve böylece EMT'ye aracılık edebilir. NNK, siklooksijenaz-2 (COX-2) aracılığı ile fibronektin ekspresyonunu uyarabilmektedir (Vu ve diğ., 2016). Sigara içicisi olan KOAH hastalarında β -katenin, snail ve twist gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının ve nukleusa geçişlerinin arttığı ve bunun sonucunda EMT'nin uyarıldığı tespit edilmiştir (Mahmood ve diğ., 2017). Sigara dumanı, insan H358 akciğer kanser hücre hattında E-kaderin ekspresyonunun baskılanmasına, N-kaderin ve vimentin ekspresyonunun artmasına neden olarak EMT'i uyardığı bulunmuştur (Zhang ve diğ., 2012a). Akciğer adenokarsinomu olan hastalardan alınan örneklerle yapılan bir çalışmada, sigara içen hastalarda, EMT'yi uyarıcı ve E-kaderin kaybına sebep olan ZEB-1 transkripsiyon faktörünün daha fazla olduğu bildirilmiştir (Zhang ve diğ., 2016b). Sigaraya maruz kalan sıçanlarda ve CSE ile muamele edilen A549 hücrelerinde zamana ve CSE konsantrasyonuna bağlı olarak E-kaderin ekspresyonunun azaldığı, N-kaderin ve α -SMA'nın arttığı ve EMT'nin uyarıldığı rapor edilmiştir (Shen ve diğ., 2014). A549'larda yapılan bir başka çalışmada, CSE uygulamaları sonucunda slug, LEF-1 gibi transkripsiyon faktörleri ve HDAC miktarlarında bir artış olduğu ve bu artışlara bağlı olarak E-kaderin miktarının azaldığı

gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada sigara içen küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında E-kaderin miktarının az olduğu rapor edilmiştir (Nagathihalli ve diğ., 2012). Deneysel çalışmalar, %2,5 CSE'ye maruz kalan A549 hücrelerinde E-kaderin seviyelerinin azaldığı, N-kaderin, vimentin, α -SMA ve fibronektin seviyelerinde ise artış olduğunu, bu hücrelerde CSE aracılı EMT'nin uyarıldığını göstermektedir (Liu ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2013; Eurlings ve diğ., 2014). Benzer bulgular çalışmamızdan da elde edilmiştir. %5 CSE'ye maruz kalan A549 hücrelerinde, deneyin 48. saatinden itibaren E-kaderin miktarının azaldığı, deneyin 24. saatinden itibaren de α -SMA protein miktarının zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca faz-kontrast mikroskopik analizler, A549 hücrelerinin %5 CSE maruziyetinden sonra, hücrelerin birbirinden uzaklaşarak içi bir yapı kazandığını ve sitoplazmik uzantılarını arttırdıkları göstermektedir. Bu veriler, A549 hücrelerinde %5 CSE'nin EMT'yi indüklediğini açıkça göstermektedir.

TGF- β sinyal yolu birçok fibrotik hastalığın başlangıcında ve ilerlemesinde aktif bir şekilde rol oynamaktadır (Biernacka ve diğ., 2011). TGF- β , fibroblast fenotipini ve fonksiyonunu düzenleyerek miyofibroblast farklılaşmasını uyarır ve pulmoner fibrozisin gelişimine katkıda bulunur (Wynn ve Ramalingam, 2012). IPF patogenezi, fibroblast birikimi ve TGF- β aktivasyonu ile karakterize edilir (Leppäranta ve diğ., 2012). TGF- β 'nın, IPF'li hastaların akciğer dokusunda artmış miktarlarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Khalil ve diğ., 1990; Khalil ve diğ., 1996). TGF- β sinyali, EMT uyarımında önemli bir rol oynar. TGF- β ile uyarılan insan ve kemirgen primer alveolar epitel hücrelerinde ve A549 hücrelerinde EMT'nin uyarıldığı epitel fenotipin mezenkimal fenotipe dönüştüğü çok sayıda çalışmada rapor edilmiştir. Smad bağımlı TGF- β sinyali EMT'nin uyarılmasında görev alır. TGF- β , hedef hücresindeki reseptörüne bağlandığında reseptör aktivite kazanır ve SMAD2 ve SMAD3 proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar. Fosforile olan SMAD2 ve SMAD3 proteinleri (p-SMAD2/3) SMAD4 ile birleşir ve nukleusa taşınarak EMT oluşumuna sebep olan hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır (Yue ve diğ., 2010; Biernacka ve diğ., 2011; Xu ve diğ., 2017; Shi ve diğ., 2017b). TGF- β sinyali aktivasyonunda SMAD2/3 ve SMAD4 miktarı artarken, bu sinyal yolunu negatif feedback mekanizmasıyla inhibe edecek olan SMAD6 ve SMAD7 gibi inhibitör Smadların ekspresyonu ise azalır. Özellikle SMAD7, SMAD4 ile kompetatif olarak rekabet sonucu pSMAD2/3 kompleksine bağlanarak Smad bağımlı TGF- β sinyal yolu aktivasyonunu engeller (Massague, 1996). Sigaranın TGF- β sinyalini uyararak

EMT'ye sebep olan transkripsiyon faktörlerinin miktarını arttırdığı ve EMT'yi uyardığı bilinmektedir (Milara ve diğ., 2013). A549 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, %5 ve % 10 CSE'nin 1, 3 ve 5 haftalık etkisine bakıldığında TGF- β 1, TGF β 2, SMAD2, SMAD3, fibronektin, MMP-2, MMP-7, IL-8, gibi 1000'den fazla pro-fibrotik gen ve proteinin ekspresyon düzeyinde önemli bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Checa ve diğ., 2016). A549 hücreleri üzerinde yapılan başka çalışmalarda da %1 CSE uyarımı sonucunda hücrelerde p-SMAD2 ve p-SMAD3 proteinlerinin arttığı rapor edilmiştir (Liao ve diğ., 2018; Liang ve diğ., 2018). Çalışmamızda, yukarıdaki çalışmaların sonuçlarına benzer olarak, %5 CSE ile uyarılan A549 hücrelerinde 48. saatten itibaren p-SMAD2/3 protein miktarlarında anlamlı bir artış gözlemlenirken, %5 CSE+TGF- β bu hücrelerde p-SMAD2/3 miktarını daha erken saatten itibaren, deneyin 24. saatinden itibaren daha fazla miktarda arttırmaya başladığı tespit edildi. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda CSE'nin SMAD2/3 fosforilasyonu arttırdığı bilinmesine rağmen, CSE maruziyetinin SMAD4 proteinini ne yönde etkilediği henüz saptanmamıştır. Çalışmamızda %5 CSE ile uyarılan A549 hücrelerinde deneyin 48. ve 72. saatlerinde, sıfıncı saate kıyasla SMAD4 protein miktarlarında anlamlı bir artış belirlendi. Benzer bir artış, %5 CSE+TGF- β ile uyarılan hücrelerde de tespit edildi. Ancak, %5 CSE+TGF- β uygulamaları, daha erken saatte, deneyin 24. saatinden itibaren SMAD4 protein miktarını arttırdığı belirlendi. Smad sinyal yolu inhibitörlerinden SMAD7'nin, CSE uygulamaları sonrasında A549 hücrelerine miktarının azaldığı bilinmektedir (Eurlings ve diğ., 2014; Liang ve diğ., 2018). Çalışmamızda %5 CSE ile uygulamalarının, SMAD7 miktarını deneyin 72. saatinde anlamlı miktarda azalttığı, %5 CSE+TGF- β uygulamalarının ise deneyin 48. saatinden itibaren SMAD7 protein miktarını azalttığı saptandı. %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde Smad bağımlı sinyal yolunun aktive olduğu saatlerde E-kaderin miktarı düşerken, α -SMA protein miktarının artması, %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinde smad bağımlı TGF- β sinyal yolunu aktive ederek EMT uyarımını gerçekleştirdiği göstermektedir. Bu sonuçlara göre, CSE'nin TGF- β sinyal yolunu aktive ederek EMT'yi uyardığını, TGF- β uygulamalarının bu sinyali erken dönemden itibaren daha da kuvvetlendirerek EMT'yi daha erken uyarabildiğini, her iki uygulamanın da A549 hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmasında görev aldığını söyleyebiliriz. Bu sonuçlar, sigara kullanımının Smad bağımlı TGF- β sinyal yolu aktivasyonu uyararak EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasını sağladığını, dolayısı ile sigara içiminin pulmoner fibrozise uyarda etkili olabileceğini, ayrıca sigara içiminin fibrozisli hastalarda

pulmoner fibrozisin ilerlemesinde önemli bir risk faktörü olabileceğini bize düşündürmektedir.

Wnt sinyali, gelişmekte olan akciğerde hava yolu oluşumunu ve dallanma morfogenezini düzenlerken, olgun akciğerde genellikle yaralanma sonrası doku onarımı ve rejenerasyonunda etkin olur. Wnt sinyal yolunun düzensiz bir şekilde işlemesi birçok hastalığın temelini oluşturabilir (Shi ve diğ., 2017b). Örneğin IPF'de Wnt sinyal yolu aktivasyonu anormal doku remodellmesi, EMT uyarımı ve miyofibroblast farklılaşmasına doğrudan katkı sağlar (Yıldırım, 2018; Kayalar, 2019). Aktive edilmiş Wnt/ β -katenin sinyalinin, IPF'de görülen kalıcı fibroproliferatif duruma sebep olduğu, ayrıca pulmoner fibroblastların antiapoptotik ve profibrotik fenotipleri indükleyerek miyofibroblastlara farklılaşmalarına neden olduğu bilinmektedir. Deneysel çalışmalar TGF- β sinyal yolunun Wnt sinyal yolunu uyarabileceğini ve Wnt/ β -katenin sinyalleme ile TGF- β arasındaki bu etkileşimin, epitel onarımı ve IPF patogenezinde etkili EMT düzenlenmesi için kritik önem taşıdığına dair veriler sunmaktadır (Hasaneen ve diğ., 2016). TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde TGF- β sinyal yolunun uyarıldığı ve bu hücrelerde E-kaderin proteinin miktarı azalırken, α -SMA ve aktif β -katenin proteinlerinin seviyelerinin arttığı ve EMT oluşumu gözlemlenmektedir (Yıldırım, 2018; Kayalar, 2019). Wnt/ β -katenin sinyal yolunda, sitoplazmik β -katenin, Axin, adenomatous polipozis koli (APC), GSK3 β ve kazein kinazdan oluşan, çoklu protein kompleksinin fosforilasyonu hedef alınır. Wnt sinyal yolunu aktive edecek ligandların varlığında aktive edilmiş sinyal kaskatı, hücre içi sitozolik β -katenin birikimine yol açan GSK3 β 'yi inhibe eder ve yıkım kompleksi tarafından yıkılmayan aktif sitoplazmadan nukleusa geçer (Logan ve Nusse, 2004; Shi ve diğ., 2017b). Nukleusa geçen aktif β -katenin TCF/LEF'e bağlanarak Wnt hedef genlerinin ekspresyonunu düzenler. Wnt/ β -katenin sinyal yolu aktivasyonunda, Wnt sinyal yolu inhibitörlerinden olan DKK1 gibi inhibitör proteinlerinin seviyesi azalır (He ve diğ., 2004). Bronşiyol epitel hücreleriyle yapılan bir çalışmada, %5 ve %10 CSE maruziyetinin bu hücrelerde Wnt sinyalini uyardığı bulunmuştur. Aktive olan Wnt sinyallerinin sonucunda inflamatuvar yanıtın görüldüğü ve EMT'ye sebep olan genlerin aktivasyonu gözlemlenmiştir (Heijink ve diğ., 2013). Çeşitli hücre hatlarında yapılan çalışmalarda %2 CSE maruziyeti sonucunda Wnt ligandlarının arttığı ve nukleusta aktif β -katenin'in biriktiği; buna bağlı olarak EMT'nin geliştiği bildirilmiştir (Tian ve diğ., 2009; Hao ve diğ., 2015). Çalışmamızda %5 CSE ile uyarılan A549 hücrelerinde sıfırıncı saate

kıyasla 48. ve 72. saatlerde aktif β -katenin miktarında anlamlı bir artış sebebiyle Wnt sinyal yolunun aktivasyonun arttığı tespit edildi. TGF- β , miyofibroblast farklılaşmasını, kanonikal Wnt sinyal yolu üzerinden de etkileyebilmektedir (Wei ve diğ., 2012). %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde ise sıfıncı saate kıyasla 24., 48. ve 72. saatlerde aktif β -katenin miktarında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, her iki uygulama da A549 hücrelerinde Smad bağımlı TGF- β sinyal yolu aracılığıyla Wnt/ β -katenin sinyalinin aktivasyonuna sebep olmuştur. Güncel çalışmalar, sigara ve TGF- β uyarımının DKK1 seviyelerini azaltarak Wnt sinyal yolunun uyarılmasına neden olduğunu göstermektedir (Hussain ve diğ., 2009; Akhmetshin ve ark., 2012). Çalışmamızda %5 CSE ile uyarılan A549 hücrelerinde sıfıncı saate kıyasla 24., 48. ve 72. saatlerde; %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde ise 72. saatte DKK1 seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β grupları karşılaştırıldığında, %5 CSE + TGF- β ile uyarılan hücrelerde, %5 CSE ile uyarılan hücelere kıyasla 24. ve 48. saatlerde anlamlı bir şekilde daha az DKK1 seviyesi tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Bu bulgular, CSE maruziyeti ve TGF- β sinyal yolu aktivasyonunun, Wnt sinyal yolu inhibitörü olan DKK1'in seviyesini azaltıp, hücrelerde aktif β -katenin miktarını arttırarak A549 hücrelerinde, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonuna sebep olduğunu göstermektedir. %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uygulamaları A549 hücrelerinde Smad bağımlı TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yolları tarafından EMT'nin uyarılmasına neden olmuştur.

D vitamini eksikliği, kistik fibroz ve KOAH gibi çeşitli akciğer hastalıklarına neden olabilmektedir (Bloom ve diğ., 2004; Hollick, 2007; Cannell ve diğ., 2008; Donma ve diğ., 2012). Ayrıca D vitamini eksikliği olan insanlarda, özellikle çocuklarda, astım ve alerji gibi inflamatuvar hastalıkların görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir (Majak ve diğ., 2011). Epidemiyolojik olarak yapılan çalışmalarda, serumdaki 25(OH)D₃ seviyesinin birçok doku ve organdaki fibrozis ile ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır (Petta ve diğ., 2010). IPF hastalarının serum örneklerinden yapılan bir çalışmada, IPF hastalarında D vitamini eksikliği olduğu ve D vitamininin IPF tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir (Tzilas ve diğ., 2019). D vitamininin fibrozis ile ilişkisini incelemek için yapılan bir deneysel çalışmada, bleomisinle pulmoner fibrozis uyarımı yapılan farelerde, hayvanların beslenmelerine D vitamini takviyesi yapıldığı zaman TGF- β ve α -SMA miktarlarının azalarak pulmoner fibrozisin gerilediği bildirilmiştir (Zhang ve diğ., 2015a). Ayrıca TGF- β ile uyarılan A549

hücrelerinde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ uygulamalarının, TGF- β etkisiyle uyarılan EMT'yi geriletmediği gösterilmiştir (Jiang ve diğ., 2017). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ formunun hastalarda kalsemik etkiye sebep olması nedeniyle, bazı çalışmalarda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ yerine kolekalsiferol (D_3 vitamini) uygulamaları tercih edilebilmektedir. Kolekalsiferol ile muamele edilen tümörogenik insan prostat kanser hücrelerinde kolekalsiferolü aktif D vitamini formuna çeviren CYP27A1'in ve VDR+RXR kompleksinin arttığı, buna bağlı olarak D vitaminin doğrudan ya da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'e dönüşerek dolaylı yoldan VDR ile etkileşime girebileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, 50 nM Vitamin D ile uyarılan prostat kanser hücrelerinde MMP-9, MMP-2 ve vimentin seviyelerinde azalma olduğu rapor edilmiştir (Tokar ve diğ., 2005). Mevcut çalışmalar incelendiğinde, *in vitro* ortamda alveolar epitel hücreleri üzerinde kolekalsiferol uygulamalarının yapılmadığı tespit edilmiştir. A549 hücrelerinde, CYP27A1 sentezi yapıldığı ve bu hücrelerde prostat hücrelerine oranla daha fazla CYP27A1 miktarının olduğu bilinmektedir (Hiramitsu ve diğ., 2018; Anon., 2019b). A549 hücrelerinde yapılan çalışmalarda, $25(\text{OH})\text{D}_3$ 'ün CYP27B1 enzimi ile aktif D vitamini formu olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'e çevirilebildiği gösterilmiştir (Hansdottir ve diğ., 2008). Çalışmamızda %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, D vitamininin EMT üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sigara ve TGF- β uygulamalarından yarım saat önce hücreler 50 nM kolekalsiferol ile muamele edilerek, CSE ve TGF- β aracılı EMT uyarımında D vitamininin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda A549 hücrelerine uygulanan inaktif form olan kolekalsiferol, A549 hücrelerinde bulunan CYP27B1 enzimi tarafından aktif forma dönüştürüleceğinden, bu hücrelerde VDR sinyalleme gerçeğesi beklenmektedir. EMT, A549 hücrelerinde E-kaderin miktarının azalması, α -SMA miktarının artmasıyla karakterize edilir. Çalışmamızda, D vitamininin, CSE ve TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde azalan VDR sinyalleme artırarak, bu hücrelerde görülen EMT'yi geriletmede etkili olduğu saptanmıştır. D vitamini uygulamaları bu hücrelerde E-kaderin miktarını normalize edip, α -SMA miktarını azaltmıştır. Sigaranın, kandaki $25(\text{OH})\text{D}$ ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ seviyelerini düşürdüğü bilinmektedir (Brot ve diğ., 1999). Sigaranın D vitamini sinyalizasyonunu da olumsuz yönde etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. %1, %5 ve %10 CSE ile beş dakika muamele edilen A549 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak VDR'nin nukleusa taşınmasının engellendiği gözlemlenmiştir (Uh ve diğ., 2012). Ayrıca CSE ile uyarılan HSNEC hücrelerinde, D vitamininin aktif formunu kazanmasını sağlayan CYP27B1 enziminin azaldığı bulunmuştur. Çalışmamızda %5 CSE ve TGF- β

uygulamalarının VDR siyalleşmesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. D vitamininin etkisini incelemek üzere, aktif hâle gelmiş VDR reseptörü olan p-VDR'nin hücre içi seviyesi analiz edilmiştir. Çalışmamızın Western blot sonuçları, %5 CSE ve %5CSE ve TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde uyarımı takip eden 48. ve 72. saatlerde p-VDR proteinin miktarındaki azalmaya bağlı olarak D vitamini sinyalizasyonunun azaldığını ve bu hücrelerde EMT uyarımının olduğu göstermektedir. Bu hücrelere CSE ve TGF- β uygulamalarından yarım saat önce D vitamini uygulandığında ise 24., 48. ve 72. saatlerde p-VDR miktarında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Tüm bu veriler, sigaranın D vitamini sinyalleşmesini engelleyebileceğini ve VDR sinyalleşmesindeki azalmanın sigaraya bağlı olarak gelişen pulmoner fibrozisde önemli bir risk faktörü olabileceğini desteklemektedir. 93 tane IPF'li hastanın serumunda yapılan çalışmada, IPF hastalarında D vitamini eksikliği olduğu ve D vitamininin IPF tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir (Tzilas ve diğ., 2019). Çalışmamızda fibrotik (n=3) ve fibrotik olmayan (n=4) akciğer örneklerinde p-VDR miktarında anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır. Bu sonucun hasta sayısının az olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

D vitamini eksikliği olan farelerin akciğerlerinde, yüksek oranda kollagen ve fibronektin gibi ECM elemanlarının birikerek akciğer yapısının bozulduğu ve α -SMA miktarının arttığı bildirilmiştir (Shi ve diğ., 2017a). Bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan farelerde D vitamini uygulamalarının TGF- β ve α -SMA protein seviyelerini düşürerek EMT'yi geriletliği gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2015a). *In vitro* çalışmalarda ise 10 ve 100 nM D vitamini uygulamaları yapılan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında, EMT'de görevli transkripsiyon faktörlerinden ZEB1 ve Twist'i ekspresyonunu azaldığı rapor edilmiştir (Upadhyay ve diğ., 2013). Vitamin D'nin pulmoner fibrozisteki anti-fibrotik etkisini araştırmak için tip II akciğer epitel hücre hattı olan RLE-6TN ve akciğer fibroblastlarında yapılan bir çalışmada, D vitamininin TGF- β 'nın profibrotik etkisini azalttığı ve α -SMA protein seviyesini azaltıp, E-kaderin seviyesini arttırdığı rapor edilmiştir (Ramirez ve diğ., 2010). A549 hücrelerinin TGF- β ile uyarımı sonucunda artan fibronektin ve kollagen-1 mRNA seviyelerinin yanı sıra azalan E-kaderin ve artan snail, N-kaderin ve vimentin protein seviyelerinin, 50 nM uygulanan 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ile düzenlenerek EMT uyarımının azaltıldığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Jiang ve diğ., 2017). Bronşiyal epitel hücrelerinde

yapılan bir çalışmada, D vitamini uygulamalarının, TGF- β izoformları aracılığı ile uyarılan EMT'yi inhibe ettiği ve bunu TGF- β 1 ve TGF- β 2 ile farklı moleküler yollar aracılığıyla düzenlediği bildirilmiştir. Çeşitli D vitamini dozları kullanılarak yapılan bu çalışmada, 100 nM D vitamini uygulamalarının, TGF- β ile mRNA ve protein seviyeleri düşürülmüş olan E-kaderin seviyelerini tekrar normal seviyeye çıkardığı rapor edilmiştir. Ayrıca snail, vimentin ve N-kaderin seviyelerinin de D vitamini uygulamaları ile azaldığı bildirilmiştir (Fischer ve Agrawal, 2014). İnsan bronşiyal hücre hattı olan HBE hücreleri ile yapılan bir çalışmada, %2,5 CSE ile uyarım sonucunda E-kaderin seviyelerinin azaldığı, 10^{-8} mol/L D vitamini ve CSE uygulamalarının birlikte yapıldığı grupta ise, E-kaderin seviyelerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2015b). Çalışmamızda, 50 nM VitD+%5 CSE ile muamele edilen hücrelerde E-kaderin seviyelerinin sıfıncı saate kıyasla arttığı görülmektedir. %5 CSE ile uyarılan hücrelerle karşılaştırıldığında ise, 50 nM vitD+%5 CSE ile uyarılan hücrelerde, D vitamininin 48. ve 72. saatlerde daha yüksek E-kaderin seviyesine neden olduğu gözlenmektedir. α -SMA miktarında 50 nM VitD+%5 CSE ile uyarılan grupta sıfıncı saate oranla anlamlı bir şekilde artış gözlemlense de α -SMA miktarının zamana bağlı olarak azaldığı ve 0. saatteki seviyesine yaklaştığı görülmüştür. %5 CSE ile uyarılan grupla kıyaslandığında ise deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde α -SMA miktarının 50 nM VitD+%5 CSE ile uyarılan hücrelerde daha az olduğu tespit edilmiştir. 50 nM VitD+ %5 CSE+TGF- β ile uyarılan grupta ise E-kaderin seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenemezken, α -SMA'nın zamana bağlı olarak önce arttığı sonra azalarak 0. saatteki seviyesine yaklaştığı görülmüştür. %5 CSE ve TGF- β ile kıyaslandığı zaman ise 72. saatte anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, CSE ve TGF- β uygulamalarından yarım saat önce yapılan D vitamini uygulamalarının, bu hücrelerde VDR sinyalleme uyararak, CSE ve TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde azalan E-kaderin miktarını arttırarak, artan α -SMA miktarını da azaltarak EMT uyarılmasında koruyucu bir etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

D vitamininin anti-fibrotik etkisini TGF- β 'nin ekspresyonunu azaltarak gösterdiği bilinmektedir (Zhang ve diğ., 2015a). İnsan peritoneal mezoteliyal hücrelerinde yapılan bir çalışmada, yüksek glikoz maruziyetiyle fibrozis modeli oluşturulduğunda TGF- β miktarı artarken, D vitamini uygulamaları ile TGF- β miktarında hem mRNA hem de protein seviyesinde azalma olduğu, ayrıca fibrozis ile artan SMAD3 ve p-SMAD3 seviyelerinde

azalma görüldüğü bildirilmiştir (Yang ve diğ., 2017). Karaciğer fibrozunda, VDR'nin aktivitesine bağlı olarak, VDR'nin EMT'den sorumlu SMAD3 ile rekabete girdiği, SMAD3 geninin bağlanacağı bölgelere bağlanarak EMT'nin ilerlemesini durdurduğu bildirilmiştir (Ding ve diğ., 2013). İnsan kalp kardiyak fibroblastları ile yapılan bir çalışmada ise 1,25(OH)₂D₃ 'ün TGF-β'nın uyardığı p-SMAD2 protein seviyelerini azaltarak anti-fibrotik etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Meredith ve diğ., 2015). Farelerde karaciğer fibrozisi modeli oluşturulup, D vitamini agonisti olan kalsipotriyol ile tedavi edildiğinde, TGF-β ve p-SMAD2/3 seviyelerinin azalarak fibrozisin geriletildiği gözlemlenmiştir (Wahsh ve diğ., 2016). Yapılan güncel bir çalışmada ise, farelerden elde edilen akciğer primer fibroblastlarına 24 saat 25(OH)D₃ uygulamaları sonrasında TGF-β ile uyarım yapıldığında, TGF-β aracılığı ile artan p-SMAD3 seviyelerinin azaldığı rapor edilmiştir (Tzilas ve diğ., 2019). Çalışmamızın verileri, yapılan bu çalışmaların sonuçları ile korelasyon göstermektedir. %5 CSE ve %5 CSE ve TGF-β ile uyarılan p-SMAD2/3 sinyalinin D vitamini uygulamaları ile 48. ve 72. saatlerden itibaren anlamlı bir şekilde azaltıldığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar D vitamini uygulamalarının TGF-β sinyal aktivasyonunu p-SMAD2/3 proteinleri yanı sıra SMAD4 proteini aracılığı ile de kontrol edebileceğini göstermektedir. İnsan uterus leiomyoma hücrelerinin TGF-β ile uyarımı ardından artan p-SMAD2, p-SMAD3 ve SMAD4 seviyelerinin 1,25(OH)₂D₃ ile muamele edilen grupta azaldığı bildirilmiştir (Halder ve diğ., 2011). HeLa hücreleri ile yapılan bir çalışmada, 1ng/ml ile TGF-β uyarım sonucunda artan SMAD3/4 kompleksinin tek başına 50 nM 1,25(OH)₂D₃ uygulandığında, ayrıca 1,25(OH)₂D₃ ve TGF-β birlikte uygulandığında TGF-β'lı gruba göre daha az olduğu bildirilmiştir (Seuter ve diğ., 2006). Çoklu miyelom hücreleri olan NCI-H929 hücre hattında yapılan bir çalışmada TGF-β uyarımı sonucunda SMAD4 protein miktarı artarken, D vitamini analogu olan EB1089 ile TGF-β birlikte uygulandığında ise artan SMAD4 protein seviyelerinin azaldığı görülmüştür. Tek başına EB1089 uygulandığında ise kontrol grubundan fazla, ancak TGF-β ve TGF-β+EB1089 ile uyarılan hücrelerden daha az miktarda SMAD4 proteininin ekspresyonu olduğu gözlemlenmiştir (Park ve diğ., 2002). A549 hücre hattında ya da diğer akciğer hücre hatlarının herhangi birinde D vitamini ve SMAD4 ilişkisi araştırılmamıştır. Çalışmamız, bu alanda ilk kez A549 hücrelerinde D vitamini uygulamaları ile SMAD4 arasındaki ilişkiyi gösterecek olması bakımından önemlidir. 50 nM VitD+%5 CSE uygulanan grupta, %5 CSE ile uyarılan grup ile karşılaştırıldığında, zamana bağlı olarak SMAD4 seviyelerinde bir azalma olduğu görülmüştür. 50 nM VitD+%5 CSE+TGF-β uygulanan

grupta da, %5 CSE ve TGF- β uygulanan gruba oranla zamana bağılı olarak SMAD4 protein seviyelerinin azaldığı görülmektedir. Çalışmamızın bu verileri, diğer doku ve hücre hatlarında yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. D vitamininin, TGF- β sinyalinin hücre içi inhibitörü olarak bilinen SMAD7 ile ilişkisine bakıldığında ise, insan pre-osteoblast hücre hattı olan SV-HFO hücrelerinde 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulamaları sonrasında SMAD7 mRNA seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Woeckel ve diğ., 2013). Çalışmamızda %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde azalan SMAD7 miktarlarının, ön D vitamini uygulamaları ile arttırıldığı görülmüştür. Tüm bu veriler dikkate alındığında, A549 hücrelerinde CSE ve TGF- β uygulamaları sonucunda artan p-SMAD2/3 ve SMAD4, azalan SMAD7 seviyeleri, bu hücrelerde TGF- β sinyal yolunun uyarıldığını göstermektedir. A549 hücrelerinde, CSE ve TGF- β uygulamaları yapılmadan yarım saat önce 50 nM VitD uygulandığında p-SMAD2/3'teki azalma, SMAD7'deki artış ise D vitamininin TGF- β sinyal yolunu bloke ederek anti-fibrotik etki gösterebileceğini işaret etmektedir. Bu sonuçlar, p-VDR/p-SMAD2/3 ikili immunflöresan işaretleme verilerimiz ile de desteklenmektedir. %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde azalan p-VDR immunoreaktivitesi yanı sıra bu hücrelerde zamanla artan ve çoğunlukla nuklear yerleşimli p-SMAD2/3 immunoreaktivitesi gözlenmiştir. Ön D vitamini uygulamaları A549 hücrelerinde CSE ve TGF- β tarafından azaltılan VDR sinyalleme arttırarak, bu hücrelerde smad bağımlı TGF- β sinyalinin azalmasına ve EMT'nin gerilemesine neden olmuştur.

Wnt sinyal yolu EMT uyarımını kontrol eden önemli sinyal yollarından biridir belirteçlerindendir. D vitamini ve Wnt sinyal yolu birbiri ile iletişim hâlinindedir. D vitaminin antifibrotik rolünü Wnt/ β -kateninin inhibisyonu ile gösterdiği bildirilmiştir (Mirković ve de Borst, 2012; Shi ve diğ., 2017a). Kolon kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda VDR'in β -katenine bağlanarak, β -kateninin TCF4/LEF kompleksine bağlanmasını engelleyerek Wnt sinyal yolunu engellediği gösterilmiştir (Palmer ve diğ., 2001; Bikle, 2011). Ölümsüzleştirilmiş insan uterus fibroit hücrelerinde yapılan bir çalışmada 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulamalarının doza bağılı olarak hücrelerdeki β -katenin seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir (Al-Hendy ve diğ., 2016). İnsan bronşiyol epitel hücre hattı olan 16HBE ile yapılan bir çalışmada, CSE'nin β -katenin seviyelerini arttırdığı, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulamaları yapıldığı zaman ise CSE'nin indüklediği β -katenin seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir (Zhang ve

diğ., 2015b). A549 hücrelerinde TGF- β uyarımı ile artan β -katenin seviyelerinin 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulamaları ile azaltıldığı bildirilmiştir (Jiang ve diğ., 2017). Yukarıdaki çalışmaların verileri, D vitamininin β -katenin miktarını azaltmak ya da β -kateninin sitoplazmik ve nuklear yerleşimini kontrol etmek suretiyle Wnt/ β -katenin sinyalini kontrol edebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda da, diğer çalışmaların sonuçlarına benzer olarak %5 CSE ve TGF- β uygulamalarıyla artan β -katenin seviyelerinin, D vitamini uygulamaları ile azaltılarak 0. saatteki seviyelerine yaklaştırıldığı görülmektedir. Ayrıca, fibrotik (IPF'li) ve fibrotik olmayan insan akciğer dokularında yaptığımız p-VDR- β -katenin ko-immunopresipitasyon deneylerinin sonuçları p-VDR'in β -katenin bağlayabileceğini göstermektedir. İlavenen, D vitaminin, Wnt sinyal yolu inhibitörlerinden DKK1 ile de ilişkisi olduğu bilinmektedir. Kolorektal hücrelerde yapılan bir çalışmada, D vitamini uygulamalarının Wnt sinyal yolu inhibitörü olan DKK1 seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Pendás-Franco ve diğ., 2008). Kolon kanseri hücrelerinde ise yine aynı şekilde 25(OH)D $_3$ uygulamasının ardından DKK1 seviyelerini arttığı bildirilmiştir (Refaat ve diğ., 2015). Yine kolon kanseri hücre hattı olan SW480-ADH ile yapılan bir çalışmada DKK1'in hem mRNA hem de protein seviyelerinin 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulamaları ile ekspresyonunun arttırıldığı tespit edilmiştir (Aguilera ve diğ., 2007). Çalışmamızda %5 CSE, %5 CSE+TGF- β uygulamalarının ardından azalan DKK1 seviyelerinin, ön D vitamini uygulamaları ile tekrar normalize edildiği gösterilmiştir. Tüm bu veriler, CSE ve TGF- β uygulamalarının β -katenin seviyelerini arttırıp, DKK1 seviyelerini azaltarak Wnt sinyali uyardığını doğrulamaktadır. Çalışmamızın verilerine göre, CSE ve TGF- β uygulamalarından yarım saat önce yapılan D vitamini uygulamaları, CSE ve TGF- β ile A549 hücrelerinde artan β -katenin seviyelerinin azaltarak ve azalan DKK1 seviyelerinin ise arttırarak, ayrıca β -katenin bağlamak suretiyle β -kateninin transkripsiyonel aktivitesini kontrol ederek bu hücrelerde Wnt sinyalizasyonunu engellediğini düşünmekteyiz. Ön D vitamini uygulamaları A549 hücrelerinde CSE ve TGF- β tarafından azaltılan VDR sinyalleme arttırarak, bu hücrelerde smad bağımlı TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyallerinin azalmasına ve EMT'nin gerilemesine neden olmuştur.

EMT, mukozal epitel hücreleri arasındaki zonula adherens bağlantılarının azalması nedeniyle, hücre-hücre-hücre bağlantılarının yitilmesi ile karakterize edilir. p120ctn, hücre-hücre adezyonunda önemli bir rol oynamaktadır. p120ctn, klasik (α - ve β -katenin) ve tip 2 kaderin

(E-kaderinler) proteinlerinin sitoplazmik kuyruğu ile etkileşerek, E-kaderinin hücre membranındaki stabilizasyonunu sağlar (Ireton ve diğ., 2002; Reynolds ve Rocznia-Ferguson; 2004). İnsan kolorektal adenokarsinoma hücresi olan, SW48'ler ile yapılan bir çalışmada, siRNA uygulamaları ile p120ctn translasyonu bloke edildiğinde, hücrelerde epitel (E-), plasental (P-), nöronal (N-) ve vasküler endotel (VE-) kaderinlerin ve bu kaderinlerin yanı sıra α ve β -kateninlerin de p120ctn yokluğunda hızlı bir şekilde bozulduğu ve hücre-hücre yapışma bağlantılarının kaybına neden olduğu rapor edilmiştir (Davis ve diğ., 2003). Primer insan bronşiyal epitel hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, sigara dumanının p120ctn proteininin sitoplazmik translokasyonunu düzenlediğini ve p120ctn kaybına sebep olduğu rapor edilmiştir (Zhang ve diğ., 2012b). Normal bronşiyol epitel hücrelerinde yapılan immünohistokimya çalışmalarında, p120ctn izoformu 1'in membranda bulunmadığı, sitoplazmada ise çok az miktarda bulunduğu görülmüştür. Aynı çalışmada skuamöz hücreli akciğer kanseri veya akciğer adenokarsinom hastalarından alınan doku örneklerinde ise p120ctn izoformu 1'in sitoplazmada aşırı eksprese edildiği, buna bağlı olarak E-kaderin seviyelerinde anormal bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak p120ctn izoformu 1'in aşırı ekspresyonunun, kötü prognozlu akciğer kanseri ile doğru orantılı olduğu rapor edilmiştir (Miao ve diğ., 2010). İnsan bronşiyol epitel hücreleri olan BEAS-2B hücre hattında, sigara ile konsantre edilmiş medyumla 4 saat muamelenin sonucunda p120ctn'nin membranla ilişkisini kaybedip, sitoplazmada tekrardan dağıldığı görülmüştür (Yang ve diğ., 2018). Diğer yandan, deneysel çalışmalar, p120ctn'nin E-kaderinin membrandaki stabilizasyonu yanı sıra, Wnt/ β -katenin sinyalini de düzenleyebileceğini göstermektedir. Fare akciğer alveolar epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada p120ctn'nin, E-kaderine bağlı hâldeyken, E-kaderin endositozunu ve β -kateninin nukleusa geçişini engelleyerek akciğeri hasara karşı koruduğu bildirilmiştir (Gu ve diğ., 2016). *İn vitro* koşullarda, p120ctn'nin sitoplazmik birikiminin β -kateninin nukleusa geçişini uyararak Wnt sinyal yolunu aktive ettiği üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Anastasiadis, 2007). Çalışmamızda, %5 CSE ile uyarılan hücrelerde 24., 48. ve 72. saatlerde, 0. saate kıyasla p120ctn protein miktarlarında anlamlı bir artış gözlemlendi. CSE uygulamaları sonucunda artan β -katenin miktarını göz önüne alarak, çalışmamızda p120ctn'nin artışının, E-kaderin yıkımına ve Wnt sinyalinin uyarılmasına neden olarak A549 hücrelerinde EMT'nin gelişiminde etkili olduğunu düşünmekteyiz. Diğer yandan, p120ctn ve TGF- β sinyalleme arasında da bir ilişkinin olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. TGF- β ile uyarılan

kolorektal karsinom hücrelerinde yapılan bir çalışmada p120ctn'nin ekspresyonunda bir değişim olmadığını, ancak p120ctn'nin sitoplazmadaki yerleşiminin E-kaderin kaybıyla doğru orantılı olduğu ve EMT'yi ilerletebildiği gösterilmiştir (Bellovin ve diğ., 2005). TGF- β ve p120ctn arasındaki ilişkiyi gözlemleyebilmek için karaciğer hücreleri olan LX-2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, membrandaki E-kaderine bağlı p120ctn'ne RhoA faktörünü bağlandığında SMAD2/3'ün fosforilasyonunu engellendiği ve E-kaderin kaybında ise p120ctn domainindeki bu bağlanmanın yokluğunda karaciğer fibrozisinin arttığı ve TGF- β hedef genlerinin ekspresyonunda artış olduğu rapor edilmiştir (Cho ve diğ., 2010). Çalışmamızda, A549 hücrelerinin %5 CSE ve TGF- β uygulamalarını takiben 0. saate kıyasla 24., 48.ve 72. saatlerde p120ctn miktarının anlamlı bir şekilde arttığı, aynı saatlerde E-kaderin miktarının azaldığı, Smad bağımlı TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyallerinin uyarıldığı gözlemlenmiştir. p120ctn'nin miktarındaki artışın, E-kaderin kaybına bir cevap olarak oluştuğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, p120ctn-E-kaderin bağlantısının kopması A459 hücrelerinde TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyallerinin uyarılmasına neden olmuş olabilir. Diğer yandan, p120ctn ve VDR sinyalleme arasında ilişki henüz bilinmemektedir. Fibrotik (IPF'li) ve fibrotik olmayan insan akciğer örneklerinde yaptığımız p-VDR-p120ctn ko-immunopresipitasyon deneylerimiz bu iki molekül arasında fiziksel bir etkileşim olmadığını göstermektedir. A549 hücrelerinde üzerinde yaptığımız deneylerde, bu hücrelerin %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uyarımından önce D vitamini ile uyarılmalarının, %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uyarımı ile artan p120ctn miktarını azaltarak normal seviyesine inmesine neden olduğunu göstermektedir. Buna göre ön D vitamini uygulamalarının p120ctn kaynaklı EMT uyarımının azaltılmasında etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Kaiso, transkripsiyonel bir baskılayıcıdır (Daniel ve Reynolds, 1999). Prostat kanser hücreleri ve infiltre edilmiş duktal karsinom hücrelerinde yapılan çalışmalarda Kaiso'nun E-kaderin geninin promotöründeki metillenmiş dizilere direkt olarak bağlanarak E-kaderin gen ekspresyonunu azaltmak suretiyle EMT'ye sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır (Jones ve diğ., 2012; Jones ve diğ., 2014). Çalışmamızda da CSE ve TGF- β uygulamaları ile EMT'si uyarılan A549 hücrelerinde E-kaderin protein miktarının azaldığı,, Kaiso protein miktarının ise arttığı görülmektedir. Diğer yandan, Kaiso, p120ctn ile olan etkileşimi sayesinde Wnt/ β -katenin sinyal yolu aktivasyonunu düzenler. Kaiso, β -kateninin DNA'da bağlanacağı gen

bölgelerine bağlanarak Wnt/ β -katenin sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonunu engeller. Kaisonun p120ctn'nin ile etkileşimi ise, p120ctn'nin tarafından bağlanan Kaisonun nukleustan sitoplazmaya çıkmasına neden olur. Böylece, Kaiso β -kateninin DNA'da bağlanacağı bölgelere bağlanamaz ve Wnt/ β -katenin sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonu gerçekleşir. İnsan bronşiyol epitel hücreleri ile yapılan bir çalışmada, sağlıklı HBE'lerde sitoplazmada az miktarda Kaiso sentezlenirken, sigara ile konsantre edilmiş medyumla muamele edilen hücrelerde Kaiso miktarının nukleustan sitoplazmaya doğru bir akışla sitoplazmada arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan immünohistokimyasal çalışmalar sitoplazmada biriken Kaiso'nun, p120ctn ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Sitoplazmada biriken Kaiso, DNA'ya bağlanamadığı için transkripsiyon faktörü olarak görev alamayacağından, kanser prognozunun gelişebileceği ileri sürülmüştür (Zhang ve diğ., 2016a). Benzer bulgular çalışmamızda da tespit edilmiştir. CSE, CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, Kaiso miktarının arttığı zaman dilimlerinde E-kaderin protein seviyesinde azalma gözlenirken, TGF- β ve Wnt sinyallemede bir artış dikkati çekmektedir. Çalışmamızda, CSE ve TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde Kaiso immunoreaktivitesinin nukleusta bulunmakla birlikte özellikle sitoplazmada nukleus periferinde yoğunlaştığı ve bu hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyal yolu ve EMT'nin uyarıldığı tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak, CSE ve TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinde Kaiso protein miktarının arttırdığını, artan Kaisonun daha çok sitoplazmada yerleşmesinin bu hücrelerde Wnt/ β -katenin aracılı EMT oluşumuna katkı sağladığını düşünmekteyiz. Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde Kaiso ekspresyonu TGF- β tarafından uyarılabilmektedir. Bu hücrelerde Kaisonun gen ifadesi susturulduğunda TGF- β R1, SMAD2 ve seviyelerinde bir azalma olduğu ve buna bağlı olarak EMT'nin gerilediği rapor edilmiştir (Bassey-Archibong ve diğ., 2016). Yukarıdaki çalışmaların verileri dikkate alındığında, Kaiso E-kaderin genini promotörüne bağlanarak E-kaderin geninin ekspresyonunu susturarak veya smad bağımlı TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarını kontrol ederek EMT'yi kontrol edebildiği sonucuna varılmaktadır. Çalışmamızda CSE ve TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde artan TGF- β sinyal yolu Kaiso protein miktarının artmasına neden olmuş olabilir. Artan Kaisonun da nukleus yanı sıra daha çok sitoplazmada nukleus periferinde yerleşmesi, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun hedef genlerini transkripte etmesine dolayısı ile A549 hücrelerinde TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu aracılı EMT'nin uyarılmasına neden olmuş olabilir. Diğer yandan, Kaiso ve VDR sinyalleme arasında ilişki henüz bilinmemektedir. Fibrotik (IPF'li) ve fibrotik olmayan insan akciğer

örneklerinde yaptığımız p-VDR-Kaiso ko-immunopresipitasyon deneylerimiz, bu iki molekül arasında fiziksel bir etkileşim olduğunu göstermektedir. A549 hücrelerinde üzerinde yaptığımız deneylerde, bu hücrelerin %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uyarımından önce D vitamini ile uyarılmalarının, %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uyarımı ile artan Kaiso miktarının azalarak normal seviyesine inmesine neden olduğu gösterilmiştir. P-VDR/Kaiso ikili immunoflörasan işaretlemeler, ön D vitamini uygulamalarının %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β uyarımı ile artan Kaiso miktarını azalttığını ve immunoreaktivitenin nükleus yanı sıra yine çoğunlukla sitoplazmada nükleus periferinde yoğunlaştığını göstermektedir. Bu veriler, Kaiso protein miktarı yanı sıra hücre içi yerleşiminin de Kaisonun aktivitesini belirlemede etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer yandan, çalışmamızın insan akciğer örneklerinde yapılan ko-immunopresipitasyon analizleri, Kaiso aktivitesinin p210ctn yanı sıra p-VDR ile de kontrol edilebileceğini göstermektedir. VitD+%5 CSE ve VitD+%5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde azalan p120ctn protein miktarı nedeniyle, miktarı artan p-VDR'nin Kaiso proteininin aktivitesini düzenleyebileceğini düşünmekteyiz. P-VDR sinyalleme artış durumlarında, E-kaderin gen ekspresyonu ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu hedef genlerinin ekspresyonunun kontrolünde etkili olan Kaisonun aktivitesinin p-VDR tarafından kontrolü EMT'nin kontrolü bakımından önemli olacaktır.

NEDD9, sinyal iletim yollarında protein-protein etkileşimlerini yöneten bir proteindir. NEDD9'un E-kaderinin lizozomal yıkımından sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hücre yapışmasındaki protein komplekslerinin regüle edilmesinde, hücre göçü ve yayılmasında, kanser metasazında önemli rolü olduğu bildirilmiştir (Anon., 2019a). Yapılan çalışmalarda NEDD9 proteinin akciğer adenokarsinomunda ekspresyonunun oldukça yüksek olduğu ve NEDD9 proteininin aşırı ekspresyonunun, kötü prognoz gösteren akciğer adenokarsinomunda evreleme ve farklılaşma derecesine ve tümör boyutuna kuvvetle korele olduğu gösterilmiştir. (Chang ve diğ., 2012). A549 hücrelerindeki NEDD9 seviyesi baskılandığında vimentin miktarının azalıp, E-kaderin miktarının arttığı rapor edilmiştir (Jin ve diğ., 2014). Küçük olmayan akciğer karsinom hastalarının doku örneklerinden yapılan bir çalışmada, kanser dokulu örneklerde, sağlıklı örneklerle kıyasla NEDD9 proteinin fazla olduğu bildirilmiştir. NEDD9'un aşırı ekspresyonu sebebiyle membrandaki E-kaderin ve β -katenin miktarının azaldığı, EMT belirteçlerinden N-kaderin miktarında ise bir artış olduğu

gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak NEDD9 seviyelerindeki aşırı ekspresyonun EMT'ye sebep olarak akciğer kanserinin prognozunu kötü yönde etkilediği düşünülmektedir (Miao ve diğ., 2013). Amfizemli insan akciğerlerinde yapılan bir çalışmada, amfizematözlü bölgelerde E-kaderin miktarının NEDD9'un etkisiyle azaldığını gösterilmiştir (Gogus ve diğ., 2017). NEDD9 ekspresyonu TGF- β tarafından kontrol edilmektedir. TGF- β ile uyarılan fare kemik iliği hücrelerinde, p-SMAD2/3'ün, NEDD9'un transkripsiyon başlama bölgesine bağlanarak ekspresyonunu uyardığı gözlemlenmiştir (Omata ve diğ., 2016). Prostat kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise hücreler TGF- β ile uyarıldığında EMT'nin uyarımının yanı sıra NEDD9 proteinin de arttığı görülmüştür. NEDD9 proteinin ekspresyonu susturulduğunda ise TGF- β kaynaklı tetiklenmiş tümör istilasının azaldığı, EMT'nin gerilediği rapor edilmiştir (Morimoto ve diğ., 2014). TGF- β 'nin NEDD9 üzerindeki etkisini araştırmak için yapılan başka bir çalışmada ise, insan deri fibroblastlarında TGF- β ile uyarım sonucunda NEDD9'un ekspresyonunun arttığı ve Src'nin, NEDD9'un adezyon molekülleri üzerindeki etkisini kontrol ettiği bildirilmiştir (Zheng ve McKeown-Longo, 2002). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda sigaranın NEDD9 proteini üzerindeki etkisi ele alınmamıştır. Sigaranın NEDD9 proteini üzerindeki etkisi ilk kez bizim çalışmamızda açıklanmıştır. Çalışmamızda %5 CSE ve %5 CSE+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde zamana bağlı olarak NEDD9 protein miktarlarında anlamlı bir artış gözlemlendi. Bu artış, bu hücrelerde E-kaderin protein miktarındaki azalış ve Smad bağımlı TGF- β sinyal yolu uyarımı ile paralellik göstermektedir. Dolayısı ile, CSE ve TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinde TGF- β sinyal yolu tarafından uyarılan NEDD9 miktarını arttırmak suretiyle bu hücrelerde E-kaderin yıkımını uyarmış olabileceğini ve EMT'ye neden olmuş olabileceğini düşünmekteyiz. Ön D vitamini uygulamaları, A549 hücrelerinde CSE ve TGF- β tarafından azaltılan VDR sinyallemeyi arttırarak, bu hücrelerde smad bağımlı TGF- β sinyalinin azalmasına, E-kaderin protein seviyesinin artmasına ve artan NEDD9 seviyelerinin de azalarak normaldeki seviyelerine yaklaşmasını sağlayarak A549 hücrelerinde CSE ve TGF- β tarafından uyarılan EMT'nin gerilemesine neden olmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda %5 CSE ve TGF- β birlikte kullanılarak, *in vitro* deney şartlarında sigara kullanımına devam eden IPF hastası modelize edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları şöyle sıralanabilir:

1. %5 CSE veya %5 CSE+TGF- β uygulamaları A549 hücrelerinde uyarımı takip eden zaman dilimlerinde E-kaderin sentezinin azalmasına, α -SMA sentezinin artmasına neden olarak bu hücrelerde EMT'nin uyarılmasına, dolayısı ile A549 hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmasına neden oldu.
2. %5 CSE veya %5 CSE+TGF- β uygulamaları A549 hücrelerinde EMT uyarımını TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarının aktivasyonu aracılığı ile gerçekleştirmektedir.
3. %5 CSE veya %5 CSE+TGF- β ile EMT uyarılan A549 hücreleri, azalan VDR sinyalleme, artan p120ctn, Kaiso ve NEDD9 protein seviyeleri ile karakterizedir. Artan p120ctn ve NEDD9 miktarı A549 hücrelerinde E-kaderinin hücre membranındaki stabilizasyonunu bozarak ve hücre içi lizozomal yıkımını uyararak E-kaderin miktarının azalmasına neden olur.
4. IPF'li hasta akciğerlerinde yapılan p-VDR/ β -katenin, p-VDR/p120ctn ve p-VDR/Kaiso ko-immunopresipitasyon deneyleri VDR'nin β -katenin ve Kaiso ile fiziksel etkileşimde bulunduğunu göstermektedir. Dolayısı ile VDR sinyalleme β -katenin ve Kaisonun transkripsiyonel aktivitesini kontrol ederek hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonunu düzenler.
5. %5 CSE veya %5 CSE+TGF- β ile EMT uyarılan A549 hücrelerinde azalan VDR sinyalleme, TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarının aktivasyonuna neden olarak bu hücrelerde EMT uyarımını tetikler.
6. CSE ve TGF- β uygulamalarından yarım saat önce A549 hücrelerinin 50 nM D vitamini ile muamele edilmeleri, bu hücrelerde azalan VDR sinyallemenin tekrardan artmasına neden olur. Artan VDR sinyalleme, DKK1, aktif β -katenin ve Kaiso proteinleri aracılığı ile TGF- β ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarının aktivasyonunun azalmasını sağlayarak A549 hücrelerini EMT'ye karşı korumaktadır.

Sigara içiciliği, sigara içiciliğine eşlik eden TGF- β sinyal yolunun aşırı aktivasyonu ve azalan VDR sinyalleme, EMT'ye neden olduğu için IPF gelişimine sebep olabilirler. D vitamini eksikliği olan IPF hastalarının tedavisinde kullanılan terapötiklerin yanında ek destek olarak D vitamini kullanımı önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Aguilera O., Pena C., Garcia JM., Larriba MJ., Ordonez-Moran P., Navarro D., Barbachano, Lopez de Silanes I., Ballestar E., Fraga MF., Esteller M., Gamallo C., Bonilla F., Gonzalez-Sancho JM., Munoz A., 2007, The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ associated with the differentiation of human colon cancer cells, *Carcinogenesis*, 28, 1877-1884
- Akhmetshina A., Palumbo K., Dees C., Bergmann C., Venalis P., Zerr P., Horn A., Kireva T., Beyer C., Zwerina J., Schneider H., Sadowski A., Riener MO., 2012, Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis, *Nature Communication.*, 3, 735
- Al-Hendy, A., Diamond, M. P., Boyer, T. G., & Halder, S. K., 2016, Vitamin D₃ Inhibits Wnt/ β -Catenin and mTOR Signaling Pathways in Human Uterine Fibroid Cells, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(4), 1542–1551.
- Aloia J.F., Li-Ng M., 2007, Re: Epidemic influenza and vitamin D, *Epidemiology and Infection*, 137
- Anastasiadis PZ., 2007, p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1173, 34-46.
- Anonim, 2018, VDR vitamin D receptor [Homo sapiens (human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7421>, [Ziyaret Tarihi: 15.11.8]
- Anonim, 2019a, Neural Precursors Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9 [Homo sapiens (Human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4739>, [Ziyaret Tarihi: 30.04.19]
- Anonim, 2019b, CYP27A1 cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1 [Homo sapiens (human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1593>, [Ziyaret Tarihi: 07.05.2019]
- Aoshiba K., Tamaoki J., Nagai A., 2001, Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages, *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.*, 281,1392–1401
- Arnson Y., Shoenfeld Y., Amital H., 2010, Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity, *Journal of Autoimmunity.*, vol. 34, no. 3, 258–265,
- Barratt SL., Mulholland S., Al Jbour K., Steer H, Gutsche M., Foley N., Srivastava R., Sharp C., Adamali HI., 2018, South-West of England's Experience of the Safety and Tolerability Pirfenidone and Nintedanib for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF), *Frontiers in Pharmacology.*, 1480.

- Bassey-Archibong BI., Kwiecien JM., Milosavljevic SB., Hallett RM., Rayner LG., Erb MJ., Crawford-Brown CJ., Stephenson KB., Bédard PA., Hassell JA., Daniel JM., 2016, Kaiso depletion attenuates transforming growth factor- β signaling and metastatic activity of triple-negative breast cancer cells, *Oncogenesis*, 5, 208.
- Baumgartner KB., Samet JM., Stidley CA., Colby TV., Waldron JA., 1997, Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 155: 242–248
- Bellovin DI., Bates RC., Muzikansky A., Rimm DL., Mercurio AM., 2005, Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Research.*, 1;65(23):10938-45.
- Biernacka A., Dobaczewski M., Frangogiannis NG., 2011, TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors.*, 29(5):196-202.
- Bikle, D.D., 2011, The vitamin D receptor: a tumor suppressor in skin. *Discovery Medicine*, 11, 7–17.
- Bloom E., Klein EJ., Shushan D., Feldman KW., 2004, Variable presentations of rickets in children in the emergency department. *Pediatric Emergency Care*, 20 (2), 126 -30
- Bradford MM., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 7 (72), 248-54.
- Brody AL., Mandelkern MA., London ED., Olmstead RE., Farahi J., Scheibal D., 2006, Cigarette smoking saturates brain $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors, *Archives of General Psychiatry*, 63(8), 907-915.
- Brot C., Jorgensen NR., Sorensen OH., 1999, The influence of smoking on vitamin D status and calcium metabolism, *European Journal of Clinical Nutrition*, 53, 920.
- Cannell JJ., Hollis BW., Zasloff M., Heaney RP., 2008, Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency, *Expert Opinion on Pharmacotherapy.*, 9 (1), 107-118.
- Cerveri I., Accordini S., Corsico A., Zoia MC., Carrozzi L., Cazzoletti L., Beccaria M., Marinoni A., Viegi G., de Marco R; ISAYA Study Group., 2003, Chronic cough and phlegm in young adults, *European Respiratory Journal.*, 22 (3), 413-417
- Chambers TJ., Magnus CJ., 1982, Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts, *The Journal of Pathology*. 136, 27–39
- Chang CM., Edwards SH., Arab A., Del Valle-Pinero AY., Yang L., Hatsukami DK., 2017, Biomarkers of Tobacco Exposure: Summary of an FDA-Sponsored Public Workshop. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.*, 26 (3), 291-302.

- Chang JX., Gao F., Zhao GQ., Zhang GJ., 2012, Expression and clinical significance of NEDD9 in lung tissues, *Medical Oncology.*, 29 (4), 2654-2660.
- Checa M., Hagood JS., Velazquez-Cruz R., Ruiz V., García-De-Alba C., Rangel-Escareño C., Urrea F., Becerril C., Montaña M., García-Trejo S., Cisneros Lira J., Aquino-Gálvez A., Pardo A., Selman M., 2016, Cigarette Smoke Enhances the Expression of Profibrotic Molecules in Alveolar Epithelial Cells, *PLoS One*, 11 (3).
- Chen LY., Zhou XJ., Li X., Li Z., Hong JG., 2012, Effect of 1,25-(OH)₂D₃ supplementation during gestation and lactation on TGF- β 1 and SMAD3 expression in lungs of rat offspring with asthma, *Zhongguo Dang Dai Er. Ke. Za. Zhi.*, 14 (5), 366-370.
- Chen ZH., Kim HP., Sciurba FC., Lee SJ., Feghali-Bostwick C, Stolz DB., Dhir R., Landreneau RJ., Schuchert MJ., Yousem SA., Nakahira K., Pilewski JM., Lee JS., Zhang Y., Ryter SW., Choi AM., 2008, Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease, *PLoS One*, 2, 3(10), 3316
- Chung KF., Pavord ID., 2008, Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough, *Lancet*, 19, 371(9621), 1364-1374.
- Cooper JR., Abdullatif MB., Burnett EC., Kempell KE., Conforti F., Tolley H., Collins JE., Davies DE., 2016, Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype., *PLoS One*, 28;11(10)
- Crosby LM., Waters CM., 2010, Epithelial repair mechanisms in the lung, *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 298 (6), 715-731.
- Crotty Alexander LE., Shin S., Hwang JH., 2015, Inflammatory Diseases of the Lung Induced by Conventional Cigarette Smoke: A Review, *Chest*, 148 (5), 1307-1322.
- Çetinoğlu E.D., 2014, Türkiye’de ve Dünyada İnterstisyel Akciğer Hastalığı Epidemiyolojisi, *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 2 (3), 257-262.
- Daniel JM., Reynolds AB., 1999, The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor, *Molecular and Cellular Biology*, 19(5), 3614–33623.
- Darlow SD., Heckman CJ., Munshi T., Collins BN., 2017, Thirdhand smoke beliefs and behaviors among healthcare professionals, *Psychology, Health & Medicine* ., 22 (4), 415-424.
- Davis, M. A., Ireton, R. C., & Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover, *Journal of Cell Biology.*, 163 (3), 525–534.
- DeLuca HF., 2004, Overview of general physiologic features and functions of vitamin D, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (6), 1689-1696.

- DeMarini DM., 2004, Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review, *Mutation Research.*, 567 (2-3), 447-474.
- Ding,N.,Yu R.T.,Subramaniam,N.,Sherman,M.H.,Wilson,C.,Rao,R., 2013, A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response, *Cell* 153, 601–613.
- Domino EF., 1999, Pharmacological significance of nicotine. In: Gorrod JW, Jacob P III, editors. *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites*, New York: Elsevier,:1–11.
- Donma M., Donma O., Michalke B., Halbach S., Nischwitz V., 2012, *Vitamin D*, Vitamins, Minerals and Metabolic Pathways in Health and Diseases, Chapter 2: Vitamins, Istanbul University, İstanbul, Turkey, ISBN: 978-975-404-890-2
- Drehmer JE., Ossip DJ., Rigotti NA., Nabi-Burza E., Woo H., Wasserman RC., Winickoff JP., 2012, Pediatrician interventions and thirdhand smoke beliefs of parents, *American Journal of Preventive Medicine*, 43 (5), 533–536.
- Dusso A.S., Brown A.J., 1998, Mechanism of vitamin D action and its regulation. *American Journal of Kidney Disease Official Journal National Kidney Foundations*, 32, 13–24.
- Eurlings IM., Reynaert N.L., van den Beucken T., Gosker H. R., de Theije, C. C., Verhamme, F. M., Dentener, M. A., 2014, Cigarette smoke extract induces a phenotypic shift in epithelial cells; involvement of HIF1 α in mesenchymal transition. *PloS one*, 9 (10).
- European Lung Foundation (ELS) ve European Respiratory Society, 2013, Avrupa'daki Akciğer Sağlığı, Gerçekler ve Rakamlar, *Charlesworth Yayıncılık*, İngiltere, ISBN: 978-1-84984-058-3.
- Fernandez IE., Eickelberg O., 2012, New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis, *Lancet*, 18, 380 (9842), 680-688.
- Fischer D.K, Agrawal K.D,. 2014, Vitamin D regulating TGF- β induced epithelial-mesenchymal Transition, *Respiratory Research*, 15 (1), 146.
- Gilpin EA, Pierce JP., 2002, Demographic differences in patterns in the incidence of smoking cessation: United States 1950–1990, *Annals of Epidemiology.*, 12, 141–150.
- Gogus E., Kayalar O., Ongen HG., Oztay F., 2017, Alterations at the Synthesis and Degradation of E-cadherin in the Human Lungs with Emphysema, *European Journal of Biology*, 76 (2): 61-68.
- Gu C., Dai C., Sun Y., Liu M., Wang Y., Wu X., 2016, P120 regulates beta-catenin nuclear translocation through E-cadherin endocytosis in ventilator-induced lung injury, *Oncotarget*, 20, 7 (51), 83859-83868.
- Guan S., Xu W., Han F., Gu W., Song L., Ye W., Liu Q., Guo X., 2017, Ginsenoside Rg1 Attenuates Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Epithelial-Mesenchymal Transition via Inhibition of the TGF- β 1/Smad Pathway, *Biomed. Research International*, 2017, 12.

- Gürdöl F., 2016, *Beslenme*, Tıbbi Biyokimya, Kısım7, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, ISBN: 978-605-335-350-8, 494-495
- Hackett TL., 2012, Epithelial–mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12, 53–59.
- Halder, S. K., Goodwin, J. S., & Al-Hendy, A., 2011, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reduces TGF-beta3-induced fibrosis-related gene expression in human uterine leiomyoma cells, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.*, 96 (4),754–762.
- Hang B., Sarker AH., Havel C., Saha S., Hazra TK., Schick S., Gundel LA., 2013, Thirdhand smoke causes DNA damage in human cells, *Mutagenesis.*, 28 (4), 381–391.
- Hansdottir S., Monick MM., Hinde SL., Lovan N., Look DC., Hunninghake GW., 2008, Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense, *Journal of Immunology*,15, 181(10), 7090-7099.
- Hao YQ., Su ZZ., Lv XJ., Li P., Gao P., Wang C., Bai Y., Zhang J., 2015, RNA-binding motif protein 5 negatively regulates the activity of Wnt/ β -catenin signaling in cigarette smoke-induced alveolar epithelial injury, *Oncology Reports*, 33 (5), 2438-44.
- Harris JE., 1996, Cigarette Smoke Components and Disease: Cigarette Smoke Is More Than a Triad of Tar, Nicotine, and Carbon Monoxide, *Smoking and Tobacco Control Monograph No. 7*, Chapter 5, 59-75
- Hasaneen NA, Cao J., Pulkoski-Gross A., Zucker S., Foda H D., 2016, “Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) promotes lung fibroblast proliferation, survival and differentiation to myofibroblasts,” *Respiratory Research*, vol. 17, no. 1, p. 17.
- Haverić A., Haverić S., Ibrulj S., 2016, Chromosome aberrations frequency in peripheral blood lymphocytes in young tobacco smoking and non-smoking people, *Journal of Health Sciences*, 6 (2), 121-127.
- He X., Semenov M., Tamai K., Zeng X., 2004, LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way, *Development*, 131:1663–1677.
- Heijink IH., de Bruin HG., van den Berge M., Bennink LJ., Brandenburg SM., Gosens R., van Oosterhout AJ., Postma DS., 2013, Role of aberrant WNT signalling in the airway epithelial response to cigarette smoke in chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax*, 68 (8), 709-716.
- Heijink IH., de Bruin HG., Dennebos R., Jonker MR., Noordhoek JA., Brandsma CA., vanden Berge M., Postma DS., 2016, Cigarette smoke-induced epithelial expression of WNT-5B: implications for COPD, *European Respiratory Journal*, 48 (2), 504-15.
- Henningfield JE., Pankow JF., Garrett BE., 2004, Ammonia and other chemical base tobacco additives and cigarette nicotine delivery: issues and research needs, *Nicotine and Tobacco Research*, 6 (2), 199-205.

- Higgins DF., Kimura K., Bernhardt WM., 2007, Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition, *Journal of Clinical Investigation*, 117, 3810–3820.
- Hiramitsu S., Ishikawa T., Lee WR., Khan T., Crumbley C., Khwaja N., Zamanian F., Asghari A., Sen M., Zhang Y., Hawse JR., Minna JD., Umetani M., 2018, Estrogen Receptor Beta-Mediated Modulation of Lung Cancer Cell Proliferation by 27-Hydroxycholesterol, *Frontiers in Endocrinology*, 23 (9), 470.
- Hogg JC., Chu F., 2004, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease, *The New England Journal of Medicine*, 350, 2645–2653.
- Holick MF., Garabedian M., 2006, Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ, ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, *American Society for Bone Mineral Research*, 6, 129-37.
- Holick MF., 2007, Vitamin D deficiency, *The New England Journal of Medicine*, 19, 357 (3), 266-281.
- Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T., 2001, Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line, *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(2), 509-516.
- Hritcu L., Ciobica A., Gorgan L., 2009, Nicotine-induced memory impairment by increasing brain oxidative stress, *Central European Journal of Biology*, 4(3), 335–342.
- Hu B., Wu Z., Phan SH., 2003, SMAD3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(3-1), 397–404.
- Hughes DA., Norton R., 2009, Vitamin D and respiratory health, *Clinical Experimental Immunology*, 158, 20-25.
- Imirzalioğlu P, Uckan S, Alaaddinoğlu EE, Haberal A, Uckan D., 2005, Cigarette smoking and apoptosis, *Journal of Periodontology*, 76 (5), 737-739.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2004, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 83
- Ireton, R.C., Davis MA., van Hengel J., Mariner DJ., Barnes K., Thoreson MA., Anastasiadis PZ., Matrisian L., Bundy LM., Sealy L., 2002, A novel role for p120 catenin in E-cadherin function, *Journal of Cell Biology*, 159, 465–476
- Jemal A., Thun MJ., Ries LA., Howe HL., Weir HK., Center MM., 2008, Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control, *Journal of National Cancer Institute*, 100, 1672–1694.

- Jiang F., Yang Y., Xue L., Li B., and Zhang Z., 2017, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ Attenuates TGF- β Induced Pro-Fibrotic Effects in Human Lung Epithelial Cells through Inhibition of Epithelial–Mesenchymal Transition, *Nutrients*, 9 (9), 980.
- Jin Y., Li F., Zheng C., Wang Y., Fang Z, Guo C., Wang X., Liu H., Deng L., Li C., Wang H., Chen H., Feng Y., Ji H., 2014, NEDD9 promotes lung cancer metastasis through epithelial-mesenchymal transition, *International Journal of Cancer*., 15, 134 (10), 2294-2304.
- Jones G., Strugnelli SA., DeLuca HF., 1998, Current understanding of the molecular actions of vitamin D, *Physiology Reviews*, 78 (4), 1193-1231.
- Jones J., Wang H., Karanam B., Theodore S., Dean-Colomb W., Welch DR., Grizzle W., Yates C., 2014, Nuclear localization of Kaiso promotes the poorly differentiated phenotype and EMT in infiltrating ductal carcinomas, *Clinical & Experimental Metastasis*, 31 (5), 497-510.
- Jones J., Wang H., Zhou J., Hardy S., Turner T., Austin D., Nuclear kaiso indicates aggressive prostate cancers and promotes migration and invasiveness of prostate cancer cells, *The American Journal of Pathology*, 2012; 181: 1836–1846.
- Kärkkäinen M., Kettunen HK. Nurmi H., Selander T., Purokivi M., Kaarteenaho R., (2017). Effect of smoking and comorbidities on survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 18 (1) , 160.
- Kalaras MD, Beelman RB, Elias RJ., 2012, Effects of postharvest pulsed UV light treatment of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) on vitamin D₂ content and quality attributes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 11, 60 (1), 220-225.
- Kalluri R., Weinberg RA., 2009, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *Journal of Clinical Investigation*, 119 (6), 1420-1428.
- Kasai H., Allen J.T., Mason R.M., Kamimura T., Zhang Z., 2005, TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT), *Respiratory Research*, 6, 4.
- Kayalar Ö., 2019, *Pulmoner nöroendoktrin hücrelerin akciğer fibrozisi üzerine muhtemel rolleri*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Kendall RT., Feghali-Bostwick CA., 2014, Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Frontiers in Pharmacology*, 27 (5), 123.
- Khalil N., O'Connor RN., Flanders KC., Unruh H., 1996, TGF- β , but not TGF- β 2 or TGF- β 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: An immunohistochemical study, *The American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*, 14, 131-138.

- Kim KK., Wei Y., Szekeres C., Kugler MC., Wolters PJ., Hill ML., Frank JA., Brumwell AN., Wheeler SE., Kreidberg JA., Chapman HA., 2009, Epithelial cell $\alpha 3\beta 1$ integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis, *Journal of Clinical Investigation*, 119 (1), 213-224.
- Kim MS., Yun JW., Park JH., Park BW., Kang YH., Hah YS., Hwang SC., Woo DK., Byun JH., 2016, Autophagy Has a Beneficial Role in Relieving Cigarette Smoke-Induced Apoptotic Death in Human Gingival Fibroblasts, *International Journal of Medical Sciences*, 27, 13 (5), 357-364.
- Kim SH, Park JW., 2019, Morin hydrate attenuates CSE-induced lipid accumulation, ER stress and oxidative stress in RPE cells: implications for age-related macular degeneration, *Free Radical Research*, 1, 1, 211.
- Kim SM., Hwang KA., Choi DW., Choi KC., 2018, The cigarette smoke components induced the cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition via production of reactive oxygen species in endometrial adenocarcinoma cells, *Food and Chemical Toxicology*, 121, 657-665.
- Kirkham S., Kolsum U., Rousseau K., et al., 2008, MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178, 1033–1039.
- Kolahian S., Fernandez IE., Eickelberg O., Hartl D., 2016, Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 55 (3), 309-322.
- Kühn J., Schröter A., Hartmann BM., Stangl GI., 2018, Cocoa and chocolate are sources of vitamin D₍₂₎, *Food Chemistry*, 15, 269, 318-320.
- Larriba MJ., González-Sancho JM., Bonilla F., Muñoz A., 2014, Interaction of vitamin D with membrane-based signaling pathways, *Frontiers in Physiology*, 18, 5, 60.
- Leppäranta O., Sens C., Salmenkivi K., Kinnula VL., Keski-Oja J., Myllärniemi M., Koli K., 2012, Regulation of TGF- β storage and activation in the human idiopathic pulmonary fibrosis lung, *Cell and Tissue Research*, 348 (3), 491-503.
- Ley B., Collard HR., 2013, Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis., *Clinical Epidemiology*, 25, 483-492.
- Liang S., Meng X., Wang Z., Liu J., Kuang H., Wang Q., 2018, Polysaccharide from *Ephedra sinica* Stapf inhibits inflammation expression by regulating Factor- $\beta 1$ /SMAD2 signaling, *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 947-954.
- Liao K., Yong CW., Hua K., 2018, SB431542 inhibited cigarette smoke extract induced invasiveness of A549 cells via the TGF- $\beta 1$ /SMAD2/MMP3 pathway, *Oncology Letters*, 15 (6), 9681-9686.

- Liu Y., Gao W., Zhang D., 2010, Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system, *Clinical and Experimental Medicine* 10, 159–67.
- Logan CY., Nusse R., 2004, The Wnt signaling pathway in development and disease, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 78.
- Lu Q., Gottlieb E., Rounds S., 2018, Effects of cigarette smoke on pulmonary endothelial cells, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1, 314 (5), 743-756.
- Mahmood M. Q., Walters E. H., Shukla SD., Weston S., Muller H. K., Ward C., Sohal, SS., 2017, β -catenin, Twist and Snail: Transcriptional regulation of EMT in smokers and COPD, and relation to airflow obstruction, *Scientific Reports*, 7(1), 10832.
- Majak P., Olszowiec-Chlebna M., Smejda K., Stelmach I., 2011, Vitamin D supplementation in children may prevent asthma exacerbation triggered by acute respiratory infection, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127, 1294–1296.
- Markidan J., Cole JW., Cronin CA., Merino JG., Phipps MS., Wozniak MA., Kittner SJ., 2018, Smoking and Risk of Ischemic Stroke in Young Men, *Stroke*, 49 (5), 1276-1278.
- Marmai C., Sutherland RE., Kim KK., Dolganov GM., Fang X, et al., 2011, Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301, 71–78.
- Massague, J., 1996, TGF- β signaling: Receptors, transducers, and Mad proteins, *Cell*, 85, 947–950.
- Massague, J., and Wotton, D., 2000, Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *The EMBO Journal*, 19, 1745–1754.
- Mayo Clinic, *Pulmonary Fibrosis, Diagnosis and Treatment*, <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-fibrosis/diagnosis-treatment/drc-20353695>, [Ziyaret Tarihi: 13.01.2019]
- Meredith, A., Boroomand, S., Carthy, J., Luo, Z., & McManus, B., 2015, 1,25 Dihydroxyvitamin D3 Inhibits TGF β 1-Mediated Primary Human Cardiac Myofibroblast Activation, *PloS one*, 10 (6).
- Miao Y., Li AL., Wang L., Fan CF., Zhang XP., Xu HT., Yang LH., Liu Y., Wang EH., 2013, Overexpression of NEDD9 is associated with altered expression of E-Cadherin, β -Catenin and N-Cadherin and predictive of poor prognosis in non-small cell lung cancer, *Pathology & Oncology Research*, 19 (2), 281-286.
- Miao Y., Liu N., Zhang Y., Liu Y., Yu JH., Dai SD., Xu HT., Wang EH., 2010, p120ctn isoform 1 expression significantly correlates with abnormal expression of E-cadherin and poor survival of lung cancer patients, *Medical Oncology*, 27 (3), 880-886.

- Milara J., Peiró T., Serrano A., Cortijo J., 2013, Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke, *Thorax*, 68 (5), 410-420.
- Mirković K, de Borst MH., 2012, Beyond the RAAS: dissecting the antifibrotic effects of vitamin D analogues, *Laboratory Investigation*, 92, 1666–1669.
- Morimoto K., Tanaka T., Nitta Y., Ohnishi K., Kawashima H., Nakatani T., 2014, NEDD9 crucially regulates TGF- β -triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: involvement in cancer progressiveness. *Prostate. Jun.* 74 (8), 901-10.
- Morse D., Rosas IO., 2014, Tobacco smoke-induced lung fibrosis and emphysema, *Annual Review of Physiology.*, 76, 493-513.
- Mosmann T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 16, 65(1-2), 55-63.
- Mossina A., Lukas C. , Konigshoff M., et al, 2016, Cigarette smoke alters the secretome of lung epithelial cells, *Proteomics* 17, 1–2, 2017.
- Mulligan JK., Nagel W., O'Connell BP., Wentzel J., Atkinson C., Schlosser RJ., Cigarette smoke exposure is associated with vitamin D3 deficiencies in patients with chronic rhinosinusitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2014,134(2), 342-349.
- Murray R., Bender D., Botham K., Kennely P., Rodwell V. and Weil P, 2012, *Micronutrients:Vitamins & Minerals*, Harper's Illustrated Biochemistry, In: Bender D.A., (ed), Chapter 44, Lange, China, ISBN:978-0-07-176576-3, 529-532.
- Nagathihalli NS., Massion PP., Gonzalez AL., Lu P, Datta PK., 2012, Smoking induces epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer through HDAC-mediated downregulation of E-cadherin, *Molecular Cancer Therapeutics.*, 11 (11), 2362-2372.
- Norton R., O'Connell MA., 2012, Vitamin D: potential in the prevention and treatment of lung cancer, *Anticancer Research*, 32 (1), 211-221.
- Novak A., Hsu SC, Leung-Hagesteun C., et al., 1998, Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95, 4374–4379.
- Nyunoya T., Mebratu Y., Contreras A., Delgado M., Chand HS., Tesfaigzi Y., 2014, Molecular processes that drive cigarette smoke-induced epithelial cell fate of the lung, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50 (3), 471-482.
- Okutan O., Çalışkan T., Sigara ile ilişkili İnterstisyel Akciğer Hastalıkları, 2011, *Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği (TÜSAD) Solunum 2011*;13(3): 131–139

- Omata, Y., Nakamura, S., Koyama, T., Yasui, T., Hirose, J., Izawa, N., ... Tanaka, S., 2016, Identification of Nedd9 as a TGF- β -SMAD2/3 Target Gene Involved in RANKL-Induced Osteoclastogenesis by Comprehensive Analysis, *PloS one*, 11 (6).
- Oruqaj G., Karnati S., Vijayan V., Kotarkonda LK., Boateng E., Zhang W., Ruppert C., Günther A., Shi W., Baumgart-Vogt E., 2015, Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF- β signaling., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 21, 112 (16), 2048-2057.
- Oztay F., Kayalar O. and Yildirim M . 2019, *Pulmonary Oxidative Stress and Antioxidant Defence System in the Lung Ageing and Fibrotic and Diabetic Lungs*
In Oxidative stress in Lung Diseases, Springer Nature, edited by Chakraborti, ISBN 978-981-13-8412-7.
- Övet H. , Öztay F., 2014, The Copper Chelator Tetrathiomolybdate Regressed Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis In Mice, By Reducing Lysyl Oxidase Expressions, *Biol. Biological Trace Element Research*, 162,189-199.
- Palmer HG., Gonzalez-Sancho JM., Espada J., Berciano MT., Puig I., Baulida J., Quintanilla M., Cano A., de Herreros AG., Lafarga M., Munoz A., 2001, Vitamin D₍₃₎ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling, *Journal of Cell Biology*, 154, 369-387.
- Pankow JF., 2001, A consideration of the role of gas/particle partitioning in the deposition of nicotine and other tobacco smoke compounds in the respiratory tract, *Chemical Research in Toxicology*,14 (11), 1465–1481.
- Park WH., Seol JG., Kim ES., Binderup L., Koeffler HP., Kim BK., Lee YY., 2002, The induction of apoptosis by a combined 1,25(OH)₂D₃ analog, EB1089 and TGF-beta1 in NCI-H929 multiple myeloma cells, *International Journal of Oncology*., 20 (3), 533-542.
- Pendás-Franco N., Aguilera O., Pereira F., González-Sancho JM., Muñoz A., 2008, Vitamin D and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes, *Anticancer Research*, 28 (5A), 2613-2623.
- Perez, A., Rogers, R.M., and Dauber, J.H., 2003, The prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*., 29 (3), 19–26.
- Petta, S., Camma, C., Scazzone, C., Tripodo, C., Di Marco, V., Bono, A., Cabibi, D., Licata, G., Porcasi, R., Marchesini, G., et al., 2010, Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C., *Hepatology*, 51, 1158–1167.
- Qin H, Gao F, Wang Y, Huang B, Peng L, Mo B, Wang C., 2019, Nur77 promotes cigarette smoke-induced autophagic cell death by increasing the dissociation of Bcl2 from Beclin-1, *Int. J. Mo.l Med.*, 44 (1), 25-36.

- Raghu G., Collard HR., Egan JJ., Martinez FJ., Behr J., Brown KK, Colby TV, et al., Schünemann HJ, 2011ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 15, 183 (6), 788-824.
- Ramirez A.M., Wongtrakool C., Welch T., Steinmeyer A., Zugel U., Roman J., 2010, Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118, 142–150.
- Refaat, B., El-Shemi, A. G., Kensara, O. A., Mohamed, A. M., Idris, S., Ahmad, J., & Khojah, A., 2015, Vitamin D3 enhances the tumouricidal effects of 5-Fluorouracil through multipathway mechanisms in azoxymethane rat model of colon cancer, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34 (1), 71.
- Reynolds AB., Roczniak-Ferguson A., 2004, Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer, *Oncogene*, 23, 7947–7956.
- Seimetz M., Parajuli N., Pichl A., Bednorz M., Ghofrani HA., Schermuly RT., Seeger W., Grimminger F., Weissmann N., 2015, Cigarette Smoke-Induced Emphysema and Pulmonary Hypertension Can Be Prevented by Phosphodiesterase 4 and 5 Inhibition in Mice, *PLoS One*, 9, 10(6).
- Seuter S., Sorg BL., Steinhilber D., 2006, The coding sequence mediates induction of 5-lipoxygenase expression by Smads3/4, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 6, 348(4), 1403-1410.
- Shen HJ., Sun YH., Zhang SJ., Jiang JX., Dong XW., Jia YL., Shen J., Guan Y., Zhang LH., Li FF., Lin XX., Wu XM., Xie QM., Yan XF., 2014, Cigarette smoke-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition is mediated by Rac1 activation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840 (6), 1838-1849.
- Shi, Tianjing L., Yao L, Xing Y., Zhao X., Fu J. Xue X., (2017a), Chronic vitamin D deficiency induces lung fibrosis through activation of the renin-angiotensin system, *Scientific Report*, 7, 3312.
- Shi J., Li F., Luo M., Wei J., Liu X., (2017b), Distinct Roles of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Mediators of Inflammation*, 2017,16.
- Shields PG., Berman M., Brasky TM., Freudenheim JL., Mathe E., McElroy JP., Song MA., Wewers MD., 2017, A Review of Pulmonary Toxicity of Electronic Cigarettes in the Context of Smoking: A Focus on Inflammation, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 26 (8), 1175-1191.
- Silva DR., Gazzana MB., Barreto SS., Knorst MM., 2008, Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema in smokers, *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 34, 779–786.

- Stockert JC., Blázquez-Castro A., Cañete M., Horobin RW., Villanueva A., 2012, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochemica*., 114 (8), 785-96.
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA), 2016 National Survey on Drug Use and Health: Detailed Tables. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, SAMHSA, Center for Behavioral Health Statistics and Quality; 2017.)
- Takizawa H., Tanaka M., Takami K., et al., 2001, Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163, 1476–1483.
- Talikka M, Sierro N, Ivanov NV, Chaudhary N, Peck MJ, et al., 2012, Genomic impact of cigarette smoke, with application to three smoking-related diseases, *Critical Reviews in Toxicology*, 42, 877–889.
- Thomas MK., Lloyd-Jones DM., Thadhani RI., et al., 1998, Hypovitaminosis D in medical inpatients, *New England Journal of Medicine*., 338, 777 – 783.
- Tian D., Zhu M., Li J., Ma Y., Wu R., 2009, Cigarette smoke extract induces activation of beta-catenin/TCF signaling through inhibiting GSK3beta in human alveolar epithelial cell line, *Toxicology Letters*, 22, 187(1), 58-62.
- Tilp C., Bucher H., Haas H., Duechs MJ., Wex E., Erb KJ., 2016, Effects of conventional tobacco smoke and nicotine-free cigarette smoke on airway inflammation, airway remodelling and lung function in a triple allergen model of severe asthma, *Clinical & Experimental Allergy*, 46 (7), 957-972.
- Tokar EJ., Webber MM., 2005, Cholecalciferol (vitamin D3) inhibits growth and invasion by up-regulating nuclear receptors and 25-hydroxylase (CYP27A1) in human prostate cancer cells, *Clinical & Experimental Metastasis*, 22 (3), 275-284.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2017, <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=27620>, [Ziyaret Tarihi: 16.11.18]
- Tzilas V., Bouros E., Barbayianni I., Karampitsakos T., Kourtidou S., Ntassiou M., Ninou I., Aidinis V., Bouros D, Tzouvelekis A., 2019, Vitamin D prevents experimental lung fibrosis and predicts survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*., 55, 17-24.
- U.S. Department of Health and Human Services (USDHHS), 2010, *A Report of the Surgeon General: How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease*, the Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, DC 20402. ISBN 978-0-16-084078-4

- Uh ST., Koo SM., Kim YK., Kim KU., Park SW., Jang AS., Kim DJ., Kim YH., Park CS., 2012, Inhibition of vitamin d receptor translocation by cigarette smoking extracts, *Tuberculosis Respiratory Disease (Seoul)*, 73 (5), 258-265.
- Upadhyay S. K., Verone A., Shoemaker S., et al., 2013, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) signaling capacity and the epithelial-mesenchymal transition in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): implications for use of 1,25(OH)₂D₃ in NSCLC treatment, *Cancers*, 5 (4), 1504–1521.
- Vareille M., Kieninger E., Edwards MR., Regamey N., 2011, The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses, *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (1), 210–229.
- Von Essen M.R., Geisler C., 2018, VDR, the Vitamin D Receptor. In: Choi S. (eds) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, Cham, DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_287
- Vu T., Jin L., Datta P.K., 2016, Effect of Cigarette Smoking on Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Lung Cancer, *Clinical Medicine*, 5, 44.
- Wahsh E., Abu-Elsaad N., El-Karef A., Ibrahim T., 2016, The vitamin D receptor agonist, calcipotriol, modulates fibrogenic pathways mitigating liver fibrosis in-vivo: An experimental study, *European Journal of Pharmacology*, 15, 789, 362-369.
- Walters P.J., Collard H.R. ve Jones K.D., 2009, Pathogenesis of Idiopathic pulmonary fibrosis, *Annual Review of Pathology*, 9, 157-179.
- Wang Q., Wang H., Zhang Y., Zhang Y., Xiao W., 2013, Activation of uPAR is required for cigarette smoke extract-induced epithelial-mesenchymal transition in lung epithelial cells, *Oncology. Research*, 21 (6), 295-305.
- Wei J., Bhattacharyya S., Jain M., Varga J., 2012, Regulation of matrix remodeling by peroxisome proliferator-activated receptor- γ : a novel link between metabolism and fibrogenesis, *Open Rheumatology Journal*, 6, 103–115.
- Wilson MSm, Wynn TAm, Pulmonary Fibrosis; Pathogenesis, Etiology and Regulation, 2009, *Mucosal Immunology*, 2 (2), 103-121.
- WoECKEL VJ., van der Eerden BC., Schreuders-Koedam M., Eijken M., Van Leeuwen JP., 2013, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates activin A production to fine-tune osteoblast-induced mineralization, *Journal of Cellular Physiology*, 228 (11), 2167-2174.
- Wynn T.A., Ramalingam T.R., 2012, Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease, *Nature Medicine*, 18, 1028–1040.
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R., 2009, TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19 (2), 156–172.

- Yan H., Zhao L., Wu X., Liu H., Wu C., Li Y., Zheng W., Jiang H., 2015, Inflammation and pathological damage to the lungs of mice are only partially reversed following smoking cessation on subacute exposure to cigarette smoke, *Molecular Medicine Reports*, 11 (6), 4246-4254.
- Yang IV. 2012. Epigenomics of idiopathic pulmonary fibrosis, *Epigenomics* 4:195–203
- Yang K., Zhang C., Sun L., Li D., Hong X., 2018, Cigarette smoke condensate could promote human bronchial epithelial BEAS-2B cell migration through shifting neprilysin trafficking, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14 (3), 680-687
- Yang L., Wu L., Zhang X., Hu Y., Fan Y., Ma J., 2017, 1,25(OH)₂D₃/VDR attenuates high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in human peritoneal mesothelial cells via the TGF β /SMAD3 pathway, *Molecular Medicine Reports*, 15 (4), 2273-2279.
- Yao HW., Xie QM., Chen JQ., Deng YM., Tang HF., 2004, TGF- β 1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro, *Life Sciences*, 76(1), 29–37.
- Ye Q., Huang K., Ding Y., Lou B., Hou Z., Dai H., Wang C., 2014, Cigarette smoking contributes to idiopathic pulmonary fibrosis associated with emphysema, *Chinese Medical Journal*, 127 (3), 469-474.
- Yıldırım M., *İnsan pulmoner fibrozisinde etkili uzun kodlanmayan RNA'ların in vitro modelde belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, 2018
- Yilmaz Ö., Öztay F., Kayalar O., 2015, Dasatinib attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *Growth Factors*, 33, 366-375.
- Yue X., Shan B., Lasky J., 2010, TGF- β : Titan of Lung Fibrogenesis, *Current Enzyme Inhibition*, 1, 6(2).
- Zahedi A., Phandthong R., Chaili A., Remark G., Talbot P., 2018, Epithelial-to-mesenchymal transition of A549 lung cancer cells exposed to electronic cigarettes, *Lung Cancer*, 122:24-233.
- Zhang, H., Liu, H., Borok, Z., Davies, K. J., Ursini, F., & Forman, H. J. (2012a). Cigarette smoke extract stimulates epithelial-mesenchymal transition through Src activation. *Free Radical Biology Medicine*, 52 (8), 1437–1442.
- Zhang L., Gallup M., Zlock L., Finkbeiner W., McNamara NA., (2012b) p120-catenin modulates airway epithelial cell migration induced by cigarette smoke, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 6, 417(1), 49-55.
- Zhang Z., Yu X., Xia F., Liang A., Zhang Y., Gu P., Zeng Y., He J., Zhu H., et al., (2015a), Preventive effects of vitamin D treatment on bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Scientific Reports*, 5, 17638.

- Zhang R., Zhao H., Dong H., Zou F., Cai S., (2015b), 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ counteracts the effects of cigarette smoke in airway epithelial cells, *Cellular Immunology*, 295 137–143
- Zhang L., Gallup M., Zlock L., Feeling Chen YT., Finkbeiner WE., McNamara NA., (2016a), Cigarette Smoke Mediates Nuclear to Cytoplasmic Trafficking of Transcriptional Inhibitor Kaiso through MUC1 and P120-Catenin, *The American Journal of Pathology*, 186 (12), 3146-3159.
- Zhang T., Guo L., Creighton C. J., Lu Q., Gibbons D. L., Yi E. S., Yang Y. (2016b), A genetic cell context-dependent role for ZEB1 in lung cancer. *Nature Communucation*, 7, 12231.
- Zheng M., McKeown-Longo PJ., 2002, Regulation of HEF1 expression and phosphorylation by TGF-beta 1 and cell adhesion, *Journal of Biological Chemistry*, 18, 277 (42), 39599-39608.
- Zhou LL., Wang M., Liu F., Lu YZ., Song LJ., Xiong L., Xiang F., He XL., Shuai SY., Xin JB., Ye H., Yu F., Ma WL., 2019, Cigarette smoking aggravates bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis, *Toxicology Letters*, 17, 303, 1-8.
- Zhou W., Suk R., Liu G., Park S., Neuberg DS., Wain JC., Lynch TJ., Giovannucci E., Christiani DC., 2005, Vitamin D is associated with improved survival in early-stage non-small cell lung cancer patients, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14 (10), 2303-23039.
- Zhou XM., Wang GL., Wang XB., Liu L., Zhang Q., Yin Y., Wang QY., Kang J., Hou G., 2017, GHK Peptide Inhibits Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice by Suppressing TGF β 1/Smad-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition, *Frontiers in Pharmacology*, 12, 8, 904.
- Zuo L., He F., Sergakis GG., Koozehchian MS., Stimpfl JN., Rong Y., Diaz PT., Best TM., 2014, Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1, 307(3), 205-218.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ezgi SARI
Doğum Yeri	Muratpaşa, ANTALYA
Doğum Tarihi	27.02.1994
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0 (534)335 0779
E-Posta Adresi	ezgissari@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	2016

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji Programı

Makale ve Bildiriler
Sarı E., Öztay F., D Vitamini, Sigara Dumanı Özütü Ve TGF-β'ya Maruz Kalan A549 Hücrelerinde TGF-β ve Wnt Sinyal Yollarının Aktivasyonunu Azaltarak EMT'yi Geriletir, Türk Toraks Derneği 22. Yıllık Kongresi, Antalya, 2019, Sözlü Bildiri Sarı E., Öztay F., Vitamin D downregulates EMT by reducing TGF-β and WNT signaling pathways in A549 cells exposed cigarette smoke extract and TGF-β, Pulmonary & Critical Care, Stanford University, Stanford, California, The United States of America, 2019, Presentation