



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

İNSAN A549 HÜCRELERİ METASTAZI ÜZERİNDE

D VİTAMİNİNİN ETKİSİ

Gülnar MAHMUDOVA

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Füsun ÖZTAY**

Ocak, 2022

İSTANBUL

İntihal Programı Beyanı

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.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2021-37890 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, FYL-2021-37890 numaralı Yüksek Lisans projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Ben doğuştan şanslı olanlardanım, çünkü mükemmel bir insanın kızıyım. Hayatımın her anında sevgisiyle, insanlığıyla bana örnek olan, canım Babam, bu yolda cismen yanımda olamasan da, sevgini ve güvenini yine yanımda hissettim. Bana kattığın her şey için çok teşekkür ederim. Maddi ve manevi her konuda yanımda olan annem, kardeşlerim, amcam varlığınız ve desteğiniz için çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatıma katkı sağlayan, bana sunduğu bilgilerle ve imkânlarla yoluma ışık olan, değerli danışmanım Prof. Dr. Füsün ÖZTAY'a çok teşekkür ederim. Değerli bilgileri ve vizyonu ile bana yardımcı olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e büyük teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimin her aşamasında bilgisini, sabrını, tüm zamanını bana ayıran, her konuda bana destek olup yardımını hiç esirgemeyen güzel hocam Arş. Gör. Merve YILDIRIM'a hem hocalığı hem de arkadaşlığı için çok teşekkür ederim. Yardımlarını ve bilgileri hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR'a ve Doç. Dr. Ayşe Karatug KAÇAR'a teşekkürlerimi sunarım. Koç Üniversitesinden Dr. Özgecan KAYALAR'a deneylerime yaptığı yardımları için çok teşekkür ederim. İhtiyacım olduğunda bana hep destek olan tatlı ve sevgili hocalarım Arş. Gör. Merve ERÇİN ve Arş. Gör. Öyküm GENÇ'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Çalışma ortamında olan arkadaşlıklarından ve manevi desteklerinden dolayı Uzm. Biyolog Ertan ÇELİK, Biyolog Nazlı TAYYAN ve Biyolog Resul KIYMAZ'a teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü hocalarına özellikle Proteomik laboratuvarına deneylerim esnasında Biorad görüntüleme cihazlarını kullanıma açtıkları için teşekkürlerimi sunuyorum.

Hem ev arkadaşım hem sınıf arkadaşım hem de yol yoldaşım olan sevgili Biyolog Ayan Huseynzade'e her şey için çok teşekkür ederim.

Ocak, 2022

Gülнар MAHMUDOVA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL KISIMLAR	5
2.1. AKCİĞER KANSERİ: EPİDEMİYOLOJİSİ VE NEDENLERİ	5
2.2. AKCİĞER KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI	10
2.3. AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİ.....	13
2.4. EPİTELİYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ	15
2.5. D VİTAMİNİ.....	17
3.MALZEME VE YÖNTEM	19
3.1. İN VİTRO DENEYLER.....	19
3.2. PROTEİN İZOLASYONU VE ELEKTROFOREZ	19
3.3. WESTERN BLOTTİNG	20
3.4. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR).....	21
3.5. İNSAN CDH1 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNİN METİLASYON ANALİZİ.....	22
3.6. YARA İYİLEŞME DENEYİ	22
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	23
4.BULGULAR	24
4.1. VitD, TGF- β İLE UYARILAN A549 HÜCRELERİNDE EMT'Yİ GERİLETİR	24
4.2. VitD, TGF-B İLE UYARILAN A549 HÜCRELERİNDE CDH1 PROMOTÖRÜNÜN METİLASYONUNU REGÜLE EDER	27
4.3. VitD, TGF-B İLE UYARILAN A549 HÜCRELERİNDE YARA KAPANMA ORANINI ARTTIRIR.....	30

5.TARTIşMA VE SONUÇ	31
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİş	48



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1.1:** Türkiye’de akciğer kanseri insidansı. Şekil “Uluslararası kanser araştırma ajansı” 2021’den Türkçeleştirilmiştir
(<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>)..... 6
- Şekil 2.1.2:** Azerbaycan’da akciğer kanseri insidansı. Şekil “Uluslararası kanser araştırma ajansı” 2020’den Türkçeleştirilmiştir,
(<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/31-azerbaijan-fact-sheets.pdf>) 7
- Şekil 2.2.1:** Akciğer kanseri türleri ve görülme oranları
(<https://www.drozdogan.com/akciger-kanseri-evreleme-sistemi-degisti-gelin-bu-vesile-ile-belirtilerini-ve-tedavisini-gozden-gecirelim>) 11
- Şekil 2.4.1:** Akciğer kanseri uzak organ metastazı (Mittal, 2018; Jin ve diğ., 2015 ve <https://oncobites.blog/tag/metastasis/> alınarak düzenlenmiştir)..... 16
- Şekil 4.1.1.** TGF- β ve VitD ile muamele edilen A549 hücrelerinde *CDH1* (A) ve *ACTA2* (B) gen ekspresyonlarındaki değişimler. TGF- β , *CDH1* mRNA miktarında zamana bağlı olarak azalmaya, *ACTA2* mRNA miktarında ise artışa neden olur. VitD+TGF- β uygulamaları bu değişimleri tersine çevirir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ 24
- Şekil 4.1.2.** VitD ve TGF- β uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde E-kaderin (A), α -SMA (B) ve Snail (C) protein miktarlarındaki değişiklikler ve protein bantları gösterilmiştir. VitD+TGF- β uygulamaları, TGF- β tarafından uyarılan EMT’yi E-kaderin ve Snail protein miktarını artırıp, α -SMA protein miktarını artırarak geriletir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ 26
- Şekil 4.2.1.** VitD ve TGF- β uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde *CDH1* promotör metilasyonunda meydana gelen değişimler. Bantlar (A), metillenmiş (116 bp; M) ve metillenmemiş (97 bp, UM) aleller için spesifik amplifikasyon ürünlerine karşılık gelir. Metillenmiş bir allel amplikonunun varlığı, metilasyon pozitifliği için standart olarak kullanıldı. Deney gruplarındaki *CDH1* promotör metilasyon oranındaki değişimler grafikte (B) gösterilmiştir. TGF- β uygulamaları *CDH1* promotör metilasyon oranını artırırken, VitD uygulamaları bu artan metilasyon yüzdesini düşürür. Anlamlılık p değerleri: ** $p<0,01$ ve **** $p<0,001$. U: metillenmemiş; M: metillenmiş durumu göstermektedir. NK: Negatif kontrol 28

- Şekil 4.2.2.** VitD ve TGF- β uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde DNMT3A (**A**) ve Kaiso (**B**) protein miktarlarındaki değişiklikler ve protein bantları gösterilmiştir. VitD+TGF- β uygulamaları, TGF- β tarafından uyarılan DNMT3A ve Kaiso protein miktarını azaltarak DNA metilasyonunu azaltır. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ 29
- Şekil 4.3.1.** VitD ve TGF- β uyarılan A549 hücrelerinde, yara kapanma oranındaki değişimler. VitD+TGF- β uygulamaları, TGF- β tarafından azaltılan yara kapanma oranını arttırır. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ 30



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.2.1: Akciğer kanserinin genel sınıflandırılması	10
Tablo 3.3.1: Western Blotting’de kullanılan antikorlar ve kullanım şekilleri.....	20



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
dk	: Dakika
G	: Santrifüj kuvveti
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
U	: Ünite
V	: Volt
ΔCT	: Siklus eşit değeri

Kısaltmalar	Açıklama
1,25(OH) ₂ D ₃	: 1,25 dihidroksikolekalsiferol
A549	: İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı
CDH1	: E-kaderin geni
DMEM/F12	: Dulbeco'nun modifiye edilmiş medyum ve Ham'ın F12 medyum
DNMT3A	: DNA metiltransferaz 3 alfa
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMT	: Epitelial mezenkimal geçiş
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GLOBOCAN	: Küresel kanser gözlemi
HRP	: Bayır turbu peroksidazı

ICI	: İmmün kontrol noktası inhibitörleri
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
PBS	: Fosfatla tamponlanmış tuzlu su
QRT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RXR	: Retinoid X reseptörü
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBST	: Tween-20 içeren tris tamponu
TGF-β	: Transform edici büyüme faktörü- β
VDR	: Vitamin D reseptörü
VDRE	: Vitamin D reseptörü elementleri
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
VitD	: D Vitamini
α-SMA	: Alfa-düz kas aktini

ÖZET

İNSAN A549 HÜCRELERİ METASTAZI ÜZERİNDE D VİTAMİNİNİN ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülnar MAHMUDOVA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Füsun ÖZTAY

Tüm akciğer kanserleri içinde en sık görülen akciğer adenokarsinomu, erken evrede belirti göstermemesi, hızlı ilerleyici tipte olması, tespit edildiğinde çoğunlukla metastatik özellik gösteren evre IV'de olması ve uzak organ metastazı varsa sağ kalım süresinin 5 ayın altına düşebilmesi gibi özellikleri nedeniyle insan sağlığını ciddi ölçüde tehdit etmektedir. Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) tarafından uyarılan epiteliyal mezenkimal geçiş (EMT), akciğer adenokarsinomunda tümör metastazına katkı sağlar. Metastazın önlenmesi, kanser terapisinde hedeflenen yöntemlerden biridir. Yapılan çalışmalar, akciğer kanserinin önlenmesinde yeterli D vitamini (VitD) düzeylerinin önemli olabileceğini göstermektedir. VitD'nin, EMT regülasyonunda etkili olduğu bilinir. EMT'de en karakteristik özellik, epitel hücrelerinde görülen E-kaderin protein kaybıdır. Bu nedenle, tümör gelişiminin ve yayılımının önlenmesinde E-kaderin protein kaybının önlenmesi büyük önem taşımaktadır. VitD'nin akciğer adenokarsinomunda E-kaderin proteinini kodlayan *CDH1* geni promotörünün metilasyonu üzerinde etkisi bilinmemektedir. Çalışmamızın amacı, TGF- β ile EMT uyarımı yapılan insan A549 hücrelerinde, VitD uygulamalarının *CDH1* promotör metilasyonundaki etkisini ve bu süreçte etkili molekülleri belirlemektir.

Çalışmada, A549 hücrelerinden üç deney grubu oluşturuldu. Birinci gruptaki hücreler TGF- β (5ng/ml), ikinci gruptaki hücreler TGF- β uygulamasından yarım saat önce 100 μ M VitD, üçüncü

gruptaki hücreler sadece VitD ile muamele edildiler. Madde uygulamalarından 24, 48 ve 72 saat sonra toplanan hücrelerden DNA/RNA ve protein izolasyonları yapıldı. TGF- β ile EMT uyarımı yapılan A549 hücrelerinde, VitD uygulamaları yapılan ve yapılmayan deney gruplarında, EMT etkinliği, *CDH1* promotör metilasyonu, Kaiso ve DNA metiltransferaz 3 alfa (DNMT3A) gibi DNA metilasyonunda etkili moleküllerin ekspresyonlarındaki değişimler, Western blot, QRT-PCR ve bisülfid conversion metilasyon analizleri ile belirlendi. Ayrıca, yara kapanma analizleri ile VitD'nin hücre migrasyonunu engellemede etkinliği değerlendirildi.

TGF- β uygulamaları, E-kaderin proteini ve *CDH1* mRNA miktarını azaltırken, *CDH1* promotör metilasyonu ile Snail, Kaiso, DNMT3A, ACTA2 mRNA ve alfa-düz kas aktin (α -SMA) moleküllerinin ekspresyonlarını arttırdı. VitD ön uygulamaları, A549 hücrelerinde TGF- β tarafından uyarılan EMT'yi gerilette. VitD, TGF- β sinyal yolu aktivasyonunu düşürerek, *CDH1* promotör hipometilasyonuna, *CDH1* geninin baskılayıcı transkripsiyon faktörü olan Snail proteinin miktarı ile *CDH1* promotörünün metilasyonunu düzenleyen Kaiso ve DNMT3A proteinlerinin miktarlarının azalmasına neden oldu. Böylece, A549 hücrelerinde E-kaderin protein miktarının artmasını, α -SMA miktarının ise azalmasını sağladı.

Çalışmamız, EMT'nin azaltılması yoluyla metastazın önlenmesinde VitD'nin kullanımının olabileceğine dair *in vitro*'da kanıtlar sunmaktadır. Çalışmamızın verileri, VitD'nin A549 hücrelerinde *CDH1* susturumunu DNA metilasyonu kontrolü üzerinde, EMT'yi gerilette tümör metastazını önlemede etkili olabileceğini göstermektedir. Deneyisel verilerin, klinik çalışmalarla test edilmesi, akciğer adenokarsinomunda VitD'nin anti-kanserojenik terapötiklerle kombine kullanımının faydalı olup olmayacağını belirleyecektir.

Ocak 2022, 64 sayfa.

Anahtar kelimeler: D Vitamini, EMT, TGF- β , E-kaderin, *CDH1* Promotör Metilasyonu, A549 hücreleri

SUMMARY**EFFECT of VITAMIN D on METASTASIS of HUMAN A549 CELLS]****M.Sc. THESIS****Gülnar MAHMUDOVA**** stanbul University****Institute of Graduate Studies in Sciences****Department of Biology****Supervisor : Prof. Dr. F sun  ZTAY**

Lung adenocarcinoma is the most common of all lung cancers. It has serious consequences for human health due to its features such as not showing symptoms at an early stage, being in a rapidly progressive type, being in stage IV, which often shows metastatic features when detected it, and survival time of less than 5 months if distant organ metastases are present. Epithelial mesenchymal transition (EMT) induced by transforming growth factor-beta (TGF- ) contributes to tumor metastasis in lung adenocarcinoma. Prevention of metastasis is one of the targeted methods in cancer therapy. Studies show that adequate levels of vitamin D (VitD) may be important in the prevention of lung cancer. VitD is known to be effective in EMT regulation. The most characteristic feature in EMT is the loss of E-cadherin protein in epithelial cells. Therefore, prevention of loss of E-cadherin protein is of great importance in the prevention of tumor development and spread. The effect of VitD on the promoter methylation of the *CDH1* gene encoding the E-cadherin protein is unknown in lung adenocarcinoma. The aim of the current study is to determine the effect of VitD treatments on *CDH1* promoter methylation and the effective molecules in this process in human A549 cells stimulated with TGF- .

In the current study, three experimental groups were formed from A549 cells. The cells in the first group were stimulated with TGF- β (5ng/ml), the cells in the second group were treated with 100 μ M VitD half an hour before the TGF- β stimulation, the cells in the third group were treated with VitD only. DNA/RNA and protein were isolated from cells collected at 24, 48 and 72 hours after substance administration. Alterations at EMT activity and the expression of molecules effective on *CDH1* promoter methylation, such as Kaiso and DNA methyl transferase 3 alpha (DNMT3A) were determined by Western blot, qRT-PCR and bisulfite conversion methylation analyzes in A549 cells stimulated with TGF- β at the presence and absence of VitD. In addition, the effect of VitD in inhibiting cell migration was evaluated by wound healing assays.

TGF- β treatment decreased the amount of E-cadherin, *CDH1* mRNA, while it increased *CDH1* promoter methylation and the expressions of Snail, Kaiso, DNMT3A, ACTA2 mRNA and alpha-smooth muscle actin (α -SMA) molecules. VitD pretreatments regressed TGF- β -induced EMT in A549s. VitD decreased the TGF- β signaling pathway activation and caused a decrease in the *CDH1* promoter methylation, amount of Snail protein, which is the repressor transcription factor of the *CDH1* gene, and the amounts of Kaiso and DNMT3A proteins, which methylate the *CDH1* promoter. Thus, the amount of E-cadherin protein was increased by VitD pretreatment, while the amount of α -SMA was decreased in A549 cells.

The current study provides *in vitro* evidence that the use of VitD can prevent metastasis through reduction of EMT. The data of the current study show that VitD may also be effective in preventing tumor metastasis, by reversing EMT through *CDH1* silencing via DNA methylation in A549 cells. Testing of experimental data with clinical studies will determine whether the combined use of VitD with anti-carcinogenic therapeutics in lung adenocarcinoma will be beneficial.

January 2022, 64. pages.

Keywords: Vitamin D, EMT, TGF- β , E-cadherin, *CDH1* Promotor Methylation, A549 cells

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, tüm dünyada hem erkeklerde hem de kadınlarda yaygın olarak görünür. **Küresel kanser gözlemevinin (GLOBOCAN)** 2018 yılında, 185 ülkede, 36 kanser çeşidini dikkate alarak yaptığı bir araştırmada, yaklaşık 18 milyon kanser vakası içinde akciğer kanserinin % 11,6 (yaklaşık 2.1 milyon yeni vaka) oranında olduğu bildirilmektedir (Bray ve diğ., 2018). Akciğer kanserinin insidansı son 30 yılda artmıştır. Önceleri genellikle erkeklerde görülürken, 1990'lı yılların ortalarından itibaren insidans erkeklerde düşüş, kadınlarda ise artış eğilimi göstermektedir (Cheng ve diğ., 2016). Gelişmiş ülkelerde akciğer kanseri, kadınlarda göğüs kanserinden sonra en sık görünen kanser türü olarak ikinci sırada yer alır (Torre ve diğ., 2015). Üstelik akciğer kanserine yakalanan kişiler arasında gençlerin sayısı da giderek artmaktadır (Jemal ve diğ., 2018). Mevcut yeni tedavilere rağmen, akciğer kanserinde 5 yıllık sağ kalımın % 12-15 gibi düşük bir orandadır. Bu sebeple, kanserle ilişkili ölüm nedenlerinin başında akciğer kanseri gelmektedir (Torre ve diğ., 2015). Sung ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada, dünyada 2020 yılında kanser nedeniyle ölen yaklaşık 10 milyon kişi içinden 1.8 milyon kişinin akciğer kanseri nedeni ile öldüğü belirlenmiştir (Sung ve diğ., 2021). Akciğer kanseri, dünyada olduğu gibi ülkemizde de insan sağlığını ciddi ölçüde tehdit etmektedir. Türkiye'de, 2020 yılında, 41.264 kişi akciğer kanserine yakalanmış, akciğer kanseri % 17,6 oranıyla en sık görülen kanserler içinde ilk sırada yer almış ve hastaların % 29,3 kaybedilmiştir (GLOBOCAN 2020 Database. <https://gco.iarc.fr/>).

Akciğer kanseri, **küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)** ve **küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK)** olmak üzere 2 büyük grupta sınıflandırılır. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 85'ini oluşturan KHDAK, genel olarak, adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt sınıflara ayrılır (Inamura, 2017). Akciğer adenokarsinomu, hiç sigara içmemiş kişilerde görülen en yaygın kanser tipidir. Öyle ki, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 40'ını oluşturur. Akciğer adenokarsinomu genellikle akciğer periferinde görülür ve mukozal bezlerden gelişir. Kanser alveolar alana doğru yayıldığında, tümör hücreleri pnömosit benzeri özellikler gösterirler. Birçok vakada akciğer adenokarsinomu, akciğerde skar doku veya kronik inflamasyona odaklarında da gelişebilmektedir (Li ve Lu, 2018). Akciğer adenokarsinomunun heterojenitesi ve agresifliği diğer akciğer kanserlerinden yüksektir ve *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *TP53*, *ALK*, *STK11*

ve *TTE1* mutasyonları ile ilişkili çok yüksek bir tümör mutasyon yüküne sahiptir (Travis ve diğ., 2011; Devarakonda ve diğ., 2015; Rizvi ve diğ., 2015). Akciğer adenokarsinomu tespit edildiğinde, çoğunlukla metastatik özellik gösteren evre IV'de olmaktadır. Akciğer adenokarsinom metastazı, kanserin diğer yumuşak doku/organlara yayılmasına neden olarak, hastalık progresyonunu kötü yönde etkiler. Uzak organlara metastaz varsa, sağ kalım 5 ayın altına düşebilmektedir (Riihimäki ve diğ., 2014). Bu durum, akciğer adenokarsinomunda tümör hücrelerinin öldürülmesinin yanı sıra tümör metastazının önlenmesine yönelik uygulamaların da önemli olduğunu açıkça göstermektedir.

Epiteliyal mezenkimal geçiş (EMT), pek çok kanser türünde olduğu gibi akciğer adenokarsinomunda da tümör hücrelerinin metastazına neden olur (Shu ve diğ., 2019). EMT tarafından modüle edilen metastazda, tümördeki epiteliyal karakterli bazı hücreler polaritelerini değiştirirler. Bu hücreler, epitel hücre özelliklerini kaybederek mezenkimal hücre özellikleri sergilemeye başlarlar. Ek olarak, migrasyon ve hareketlilik (motility) özelliklerini de arttırarak, tümör mikroçevresine invaze olurlar ve damar duvarını aşarak lenfe veya kana geçerler ve böylece uzak organlara metastaz yaparlar (Kang ve Massague, 2004; Yilmaz ve diğ., 2007). EMT'de, hücre-hücre adezyon bağlantılarının temel proteini olan E-kaderin proteini başta olmak üzere okludin, sitokeratin gibi epitel hücrelerine özel proteinlerin sentezinde bir azalış gözlenir. Epiteliyal karakterli proteinlerin azalışının aksine, bu hücrelerde vimentin, N-kaderin, **alfa-düz kas aktin (α -SMA)** gibi mezenkimal hücreler için özel olan proteinlerin sentezlerinde bir artış görülmektedir (Liu ve diğ., 2010; Sari ve diğ., 2020; Yıldırım ve diğ., 2021). EMT, **transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β)**, Wnt/ β -katenin, HedgeHog, Notch gibi gelişimsel sinyal yolları tarafından uyarılabilir. İnsan A549 akciğer adenokarsinom hücreleri, epitel kökenli tümör hücreleridir. TGF- β , epitel karakterli bu kanser hücrelerinin epitel fenotiplerini kaybedip mezenkimal karakterli hücrelere farklılaşmalarını sağlar. A549 kanser hücrelerinin E-kaderin protein sentezini bırakıp, mezenkimal hücrelere spesifik olan N-kaderin, vimentin ve α -SMA, kollagen ve fibronektin gibi proteinleri üretmeye başladıkları saptanmıştır (Liu ve diğ., 2010; Sari ve diğ., 2020; Yıldırım ve diğ., 2021). Tümör dokuda E-kaderin proteininin fonksiyonel durumu, genin eksprese edilip edilmediğinin ötesinde metastatik potansiyelin önemli bir belirleyicisidir (Na ve diğ., 2020). Akciğer kanserli hastalardan alınan bronko-alveolar lavaj sıvısında, kontrol grubu hastalarından daha fazla miktarda E-kaderin molekülü belirlenmiştir (Zhang ve diğ., 2020). Tsoukalas ve diğ. (2017), yeni KDHAK tanısı alan 112 hastada yaptıkları çalışmada

düşük E-kaderin ve yüksek vimentin ekspresyonunun kötü prognoz ve sağ kalım ile ilişkili olduğunu buldular.

D vitamini (VitD), steroid tabiatlı bir prohormondur. Esas olarak, vücutta kalsiyum-fosfat dengesinden sorumlu olsa da, yapılan çalışmalarda VitD'nin inflamasyon, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşması ile ilgili 200'e yakın geni kontrol edebildiğini ortaya koymuştur (Hollick ve Garabedian, 2006). VitD eksikliğinde, akciğer büyümesi ve yapısında anomaliler, astım, alerji ve kronik obstruktif akciğer hastalığı gibi çeşitli akciğer hastalıkları gelişebilmektedir (Cannell ve diğ., 2008; Donma ve diğ., 2012; Shi ve diğ., 2017). VitD, hedef hücresindeki etkisini **retinoid X reseptörü (RXR)** aracılığıyla, sitoplazmik **vitamin D reseptörüne (VDR)** bağlanarak gösterir. VDR'ye bağlanan VitD, nukleusa geçer ve hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (Murray ve diğ., 2012). VitD'nin, meme, kolon ve prostat gibi çoğu kanser türünde antiproliferatif ve pro-diferansiyatif etkiler gösterdiği ve apoptozu uyardığı bilinmektedir. Ayrıca anti-onkogenik, anti-inflamatuvar ve anti-metastatik yapısı ile birçok kanser türünde iyileştirme yönünde avantajı olduğu düşünülmektedir (Norton ve O'Connell, 2012). Akciğer kanserinin önlenmesinde yeterli VitD düzeylerinin kritik olabileceğini bildirilmektedir (Wang ve diğ., 2020). VitD'nin akciğer kanserindeki rolünü açıklığa kavuşturmak için yapılan çalışmaların meta-analizi, serum VitD düzeyleri ile diyet VitD alımının akciğer kanseri riski ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Serum VitD miktarı ile akciğer kanseri riski arasında ters bir ilişki saptanmıştır (Zhang ve diğ., 2015). Klinik çalışmalar, VitD takviyesinin kansere yakalanma riskini azalttığını kuvvetle desteklemektedir (Wu ve diğ., 2019). VDR geni çıkarılan deri kanserli farelerde, VDR sinyallemeinin deride tümör gelişimini durdurabileceği saptanmıştır (Bikle, 2011). VitD'nin çoğu kanser türünde anti-proliferatif etkisine ilaveten tümör hücrelerinde hücre farklılaşması ve apoptoz uyarımını arttırdığı bilinmektedir.

VitD'nin, EMT regülasyonunda etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır. TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde kalsitriol (**1,25-dihidroksikolekalsiferol (1,25(OH)₂D₃**) uygulamalarının, TGF- β etkisiyle uyarılan EMT'yi geriletmediği belirlenmiştir (Jiang ve diğ., 2017). EMT'de en karakteristik özellik, epitel hücrelerinde görülen E-kaderin protein kaybıdır. Bu nedenle, tümör gelişiminin ve yayılımının önlenmesinde E-kaderin protein kaybının önlenmesi büyük önem taşımaktadır. E-kaderin protein miktarı, **E-kaderin gen (CDH1)** ekspresyonu ile doğrudan ilişkilidir. *CDH1* promotöründeki CpG adacıklarının metilasyonu, genin

kapanmasına dolayısı ile hücrede E-kaderin protein miktarının azalmasına neden olur. TGF- β etkisi ile epitel hücrelerinde *CDH1* ekspresyonu ve protein sentezi baskılanır (Yildirim ve diğ., 2021). EMT'nin geriletilmesine yönelik terapötik yaklaşımlarda, hücrelerde yeniden E-kaderin sentezinin uyarılması oldukça önemlidir. Bir önceki çalışmamızda, TGF- β ile EMT'i uyarılan A549 hücrelerinde azalan E-kaderin proteininin D vitamini uygulamaları ile hücrelerde yeniden sentezlendiği ve EMT'nin gerilediği bulundu (Sari ve diğ., 2020). Yapılan literatür taramalarında, VitD'nin A549 hücrelerinde E-kaderin proteinini kodlayan *CDH1* promotörünün metilasyonu üzerinde etkisinin araştırılmadığı tespit edildi. Tez projesinde, insan A549 hücrelerinde TGF- β ile susturulan *CDH1* gen ekspresyonunun VitD uygulamaları ile yeniden nasıl açıldığı *CDH1* promotör metilasyon analizleri ile ilk kez araştırıldı. Böylece, VitD uygulamalarının metastazı azaltmadaki etkileri ortaya kondu. Çalışmamızın başlıca amacı, TGF- β ile EMT uyarımı yapılan A549 hücrelerinde, VitD uygulamalarının *CDH1* promotör metilasyonundaki etkisini ve bu süreçte etkili molekülleri belirlemektir. Ayrıca, bu hücrelerde yara kapanma analizleri ile VitD'nin hücre göçünü engellemedeki etkinliğinin belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu amaçlar doğrultusunda, çalışma kapsamında, TGF- β ile EMT uyarımı yapılan insan A549 adenokarsinom hücrelerinde, VitD uygulamaları yapılan ve yapılmayan deney gruplarında, EMT etkinliği, *CDH1* promotör metilasyonu, Kaiso ve **DNA metiltransferaz 3 alfa (DNMT3A)** gibi DNA metilasyonunda etkili moleküllerin ekspresyonlarındaki değişimlerin ve yara kapanma oranlarının analizleri gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

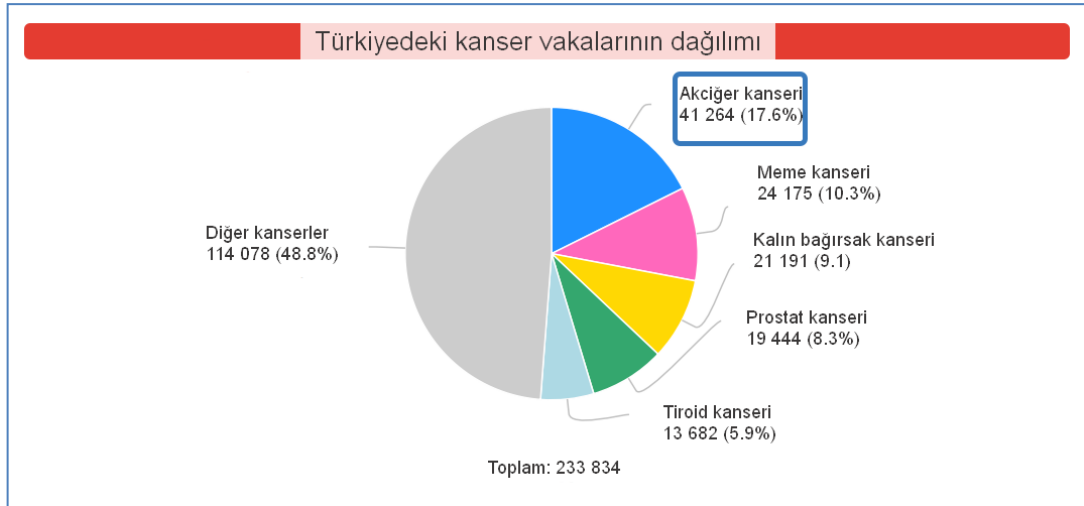
2.1 AKCİĞER KANSERİ: EPİDEMİYOLOJİSİ VE NEDENLERİ

Günümüzde akciğer kanseri, dünya genelinde hem erkeklerde hem de kadınlarda önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Akciğer kanseri, tüm kanserlerin % 12 ile % 16'sını oluşturmaktadır. Beş yıllık sağ kalım süresi % 10-15'i geçmemektedir. Kansere bağlı ölüm oranlarının % 17,8 ile % 28'i akciğer kanseri nedeniyle olmaktadır. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Derneği“ verilerine göre, akciğer kanseri, % 22,6 oranıyla Türkiye’de en sık görülen kanserdir (Günel ve diğ., 2016).

Akciğer kanserinin epidemiyolojik özellikleri ve göreceli risk faktörleri üzerine yapılan çalışmalar, akciğer kanserinin önlenmesinde, yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin araştırılmasında önemli bir rol oynamıştır (Mao ve diğ., 2016). Akciğer kanseri tüm dünyada en sık görülen ve kansere bağlı ölüm nedenleri içinde ilk sırada yer alan malignite olarak kabul edilmektedir. **Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)**, akciğer kanserinin 2012 yılında toplam 1,8 milyon yeni olgu ile tüm kanserlerin % 12,9'unu meydana getirdiğini bildirmiştir. Akciğer kanseri tüm dünyada erkeklerde en sık rastlanan kanser olma özelliği taşımaktadır (yıllık 1,2 milyon yeni olgu, tüm kanserler içinde % 16,7). Kadınlarda beklenen insidans hızı genellikle daha düşüktür (yıllık 583,000 yeni olgu, tüm kanserler içinde % 8,7). Akciğer kanseri sadece yaygın olarak görülen bir kanser olması yönüyle değil, neden olduğu mortalite yükü nedeniyle de oldukça önemli bir halk sağlığı sorunudur. DSÖ verilerine göre tüm dünyada kansere bağlı ölümler içinde en yüksek oran, her 5 kansere bağlı ölümün 1'inden sorumlu olan akciğer kanserine aittir (1,59 milyon ölüm, toplam kansere bağlı ölümlerin % 19,4'ü) (Ferlay ve diğ., 2015).

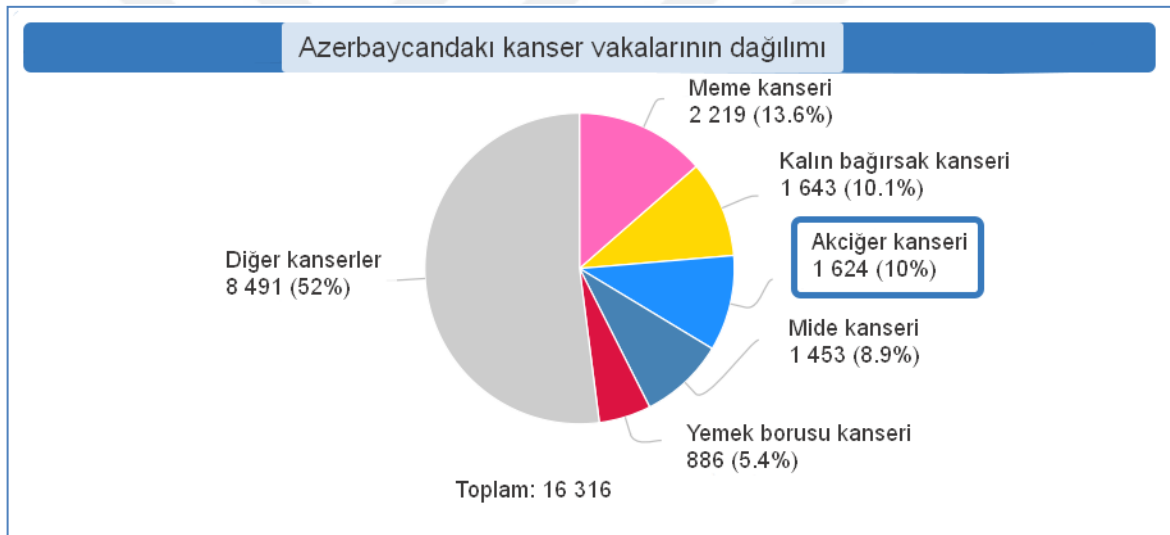
Akciğer kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde uzun yıllardır kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmasına rağmen, insidans ve mortalite istatistikleri dünya genelinde farklılıklar göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2020 yılında 1.806.590 yeni kanser vakası ve 606.520 kanser ölümünün meydana geldiği bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2013 yılında, 222.000'in üstünde yeni akciğer kanseri tanısı konmuştur. Bunların % 80'i KHDAK'dir. Medyan yaş 69 olarak bulunmuş olup, giderek yükseliş göstermektedir (Kefeli, 2015).

Akciğer kanseri tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de en çok görülen ve ölüme neden olan kanserler arasındadır. Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı’nın 2012 yılı verilerine göre akciğer kanseri Türkiye’de tüm nüfus ve erkeklerde en sık görülen kanser tipidir. Kadınlarda beşinci sıklıkta görülmektedir. Erkeklerde tüm kanserlerin % 21,8’ini, kadınlarda ise % 4,9’unu oluşturmaktadır. Türkiye’de akciğer kanserinin yaşa standardize insidans hızı erkeklerde 100.000’de 60,4 olarak, kadınlarda ise 100.000’de 9,3 olarak bildirilmektedir (Şencan ve Keskinlik, 2015) (**Şekil 2.1.1**). Türk Toraks Derneği’nin 2009 yılında gerçekleştirdiği “Türkiye’nin akciğer kanseri haritası” projesinde her yıl Türkiye’de 29.314 yeni akciğer kanseri olgusu ortaya çıktığı hesaplanmıştır. Akciğer kanserlerinin % 80,7’si KHDAK, % 16,4’ü KHAK ve % 2,9’u ise diğer alt tiplerdir. İnsidans hızı hem erkeklerde hem de kadınlarda yaş ilerledikçe artmaktadır. Bu çalışma sonuçlarına göre Türkiye’de akciğer kanserine yakalanan hastaların yaş ortalaması 60 olup, %90,4’ü erkektir. En sık rastlanan tip, skuamöz olmayan hücreli iken, 45 yaş altı genç popülasyonda ve kadınlarda en sık akciğer adenokarsinomuna rastlanmaktadır. Kişiler akciğer kanseri tanısı aldıklarında, olguların % 47’si metastatik evrede, % 37’si lokal ileri evrede, sadece % 16’sı operasyona uygun evrede yakalanmaktadır (Turkish Thoracic Society, 2013).



Şekil 2.1.1: Türkiye’de akciğer kanseri insidansı. Şekil “Uluslararası kanser araştırma ajansı” 2021’den Türkçeleştirilmiştir (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>).

Azerbaycan'ın çeşitli bölgelerinde akciğer kanseri sıklığı, farklı histolojik tipler, cinsiyet, yaş ve belirli risk faktörleri araştırıldı. KHDAK'nın bir alt tipi olan epidermoid kanserin(Skuomöz tip) tüm bölgelerde en sık görülen histolojik tip olduğu ortaya çıktı. En yüksek epidermoid kanser oranı 230 (% 55,56) ile sanayi bölgeleri ve sanayi şehirlerinde (Bakü ve Sumgayıt) gözlemlendi. En düşük akciğer kanseri oranı ise dağlık bölge 12'de (% 3,76) bulundu. Sigara ve alkol kullanımının epidermoid kanser riskini arttırdığı görüldü (hastaların % 41,2'si sigara ve alkol kullanır). Akciğer kanserinden en yüksek morbidite (100.000 nüfus başına 13,55) ve mortalite (0,11) oranları ile endüstriyel bölgelerde gözlemlendi. Analizler, farklı endojen ve eksojen faktörlerin akciğer kanseri ile ilişkili olduğunu ortaya koydu (Soltanov, 2009). Uluslararası kanser araştırma ajansının verilerine göre, Azerbaycan'da görülen tüm kanserler içinde akciğer kanseri % 10 oranında görülmektedir (**Şekil 2.1.2**).



Şekil 2.1.2: Azerbaycan'da akciğer kanseri insidansı. Şekil "Uluslararası kanser araştırma ajansı" 2020'den Türkçeleştirilmiştir, (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/31-azerbaijan-fact-sheets.pdf>).

Akciğer kanserinin başlıca nedenleri arasında sigara ve tütün kullanımı gelmektedir. Akciğer kanseri ağırlıklı olarak sigara içimi ile ilişkilidir. Sigara içmek, açık bir doz-cevap ilişkisi ile akciğer kanseri riskini 5-10 kat artırır (Schwartz ve Cote, 2016). Günlük içilen sigara sayısı, sigara içme süresi, erken başlama yaşı, dumanı derin çekme ve katran miktarı ile kanser gelişme riski artar. Sigara dumanında 4000-5000'den fazla kimyasal ve 70'den fazla kanser oluşumuna neden olan madde olduğu bilinmektedir (Rodgman ve Perfetti, 2008). Tütün dumanı ve biyolojik çeşitliliği kanserojen, toksik maddeler, tahriş edici, tümör rehberleri, co-

kanserojen ve inflamatuvar ajanların varlığı ile karakterize edilir. Sigara dumanındaki 73 bileşik arasında akciğer kanseri oluşturan 20'den fazla bileşik bulunmaktadır. Bu bileşikler arasında polisiklik aromatik hidrokarbonlar, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanon, 1,3-bütadien ve etilen oksit gibi uçucu maddeler, kadmiyum gibi metaller ve radyoaktif bileşik ²¹⁰Po yer alır (Hecht, 2011). Akciğer kanseri riski, sigara içenlerde içmeyenlere oranla 30 kat artmaktadır (Aydiner ve Can, 2010). Pasif sigara içiminde risk, % 3,5 olarak karşımıza çıkmaktadır. Sigara içiminin akciğer kanseri ile direkt ilişkisi, kadınlarda % 90, erkeklerde % 79 oranında bulunmuştur. Sigaranın bırakılması, kanser riskini tamamen ortadan kaldırmamakta olup, riski azaltmaktadır (Alar ve Şahin, 2012). Yapılan çalışmalarda, akciğer kanserli olgularda tümör tipiyle sigara alışkanlığı arasında, anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Sigara içenlerde akciğerde skuamöz hücreli karsinom daha sık bulunurken, sigara içmeyenlerde adenokarsinom daha sık gözlenmiştir (Erbaycu, 2009). Sigara ve akciğer kanseri gelişimi arasındaki bağlantı sadece sigara içenler için değil, aynı zamanda ikinci el dumana maruz kalanlar için de gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2014). Pasif içicilik kalp hastalıkları ve diğer rahatsızlıklara neden olabileceği gibi akciğer kanseri riskini de artırır. Kendileri sigara içmedikleri halde ev veya işyerlerinde pasif olarak dumana maruz kalan kişilerde akciğer kanseri gelişme riski % 20-30 artmaktadır. Tütün içiminin belirgin kanserojen etkilerine rağmen, tüm sigara içenlerde akciğer kanseri gelişimi gözlenmeyebilir; tersine bazı sigara içmeyenler diğer çevresel risk faktörlerinin yokluğunda akciğer kanseri gelişebilmektedir. Sigara içmemek, akciğer kanserinin önlenabilir başlıca nedenleri arasında sayılmaktadır. Akciğer kanseri olan hastaların önemli bir azınlığı hiç sigara içmemiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, hiç sigara içmeyenlerde akciğer kanserinden yıllık 17.000-26.000 ölüm olduğu tahmin edilmektedir (Rivera ve Wakelee, 2016).

Sigara ve tütün kullanımı yanı sıra, akciğer kanserine neden olan diğer risk faktörleri arasında genetik hassasiyet ve değişiklikler, yetersiz beslenme, çevresel ve mesleki maruziyetler bulunmaktadır (Malhotra ve diğ., 2016). Akciğer kanserinde çevresel ve genetik faktörlerin de büyük bir rolü vardır (Perriot ve diğ., 2018). Akciğer kanserine yatkınlık; hücre siklusunun kontrolü, DNA hasarının onarımı ile ilişkili genlerdeki polimorfizimleri ve karsinojen metabolizmasını etkileyebilmektedir (Dubey ve Powell, 2009). Bazı akciğer kanseri ile ilişkili yeni genleri tanımlamak zordur. Buna ailesel akciğer kanseri genleri dahildir. Bu zamana kadar, sadece birkaç akciğer kanserine özgü gen tanımlanmıştır. Bu nedenle, kanser genetiğinin anlaşılmasında daha fazla gelişme gereklidir. Bütün ekzon dizilimi ve genom

dizilimi, ardışık nesillerde de hastalıklara neden olan genleri tanımlamak için kullanılabilir. Akciğer kanseri oluşumunda etkili olan en önemli çevresel faktörlerden biri de radyasyondur. X, UV ışınları, gama ışınları, nükleer emisyonlar, gibi radyoaktif ışınlar, biyolojik makromoleküllere doğrudan etki edebilecek yeterli intrinsik (quantum) enerjiye sahiptirler. Biyolojik makromoleküllerden elektron kopartabilir ya da bunları pozitif yükle yükleyebilirler. Bunun sonucunda, DNA'da tek ve çift zincir kırıkları ile nükleotid yapılarında modifikasyonlara neden olurlar (Yılmazbayhan ve Özlük, 2010; Yokuş ve Çakır, 2012).

Asbest minerali, çevresel (ak toprak ve zeolit) ve endüstriyel (gemi ve otomotiv sanayi, izolasyon) alanlarda kullanılmaktadır. Asbestosiz oluşumu için, uzun ve yoğun asbest maruziyeti gerekli olduğundan, mesleksi olmayan çevresel asbest maruziyetlerinde akciğer kanseri riski çok düşüktür. Türkiye'de asbest teması çoğunlukla kırsal alanda gerçekleşmektedir. Ak toprak, ülkemizin birçok bölgesinde bulunur ve kırsal kesimde sıva ve boya amacıyla kullanılmaktadır. Asbest maruziyeti de, akciğer kanseri riskini 1,5-5,4 kat artırmaktadır. Radon gazı, akciğer kanser riskini % 8-11 oranlarında artırmaktadır. Ev içi radon kaynağının önemli bir kısmı (% 90), binanın temelindeki toprak ve kayalardır. Radon gazı önemli bir iyonlaştırıcı radyasyon kaynağıdır ve 3,8 günlük bir yarılanma ömrü ile bozunur. Radon kayalardan, topraktan ve yeraltı sularından yayılır. Solunum epitelinin DNA'sına zarar verebilir ve radon maruziyetinin akciğer kanserinin nedeni olduğu varsayılır (Sheen ve diğ., 2016). Radyum ve uranyum, toprak ve kayalarda değişken konsantrasyonlarda ve sıklıkla bulunabilen elementlerdir. Topraktan havaya geçen doğal bir radyoaktif gaz olan radonun yoğunluğu, toprakta bulunan uranyum konsantrasyonuna bağlı değişiklik göstermektedir (Radzikowska ve diğ., 2001). Azerbaycan'da iç mekân radon çalışmaları ilk kez 2010-2011 yıllarında gerçekleştirilmiştir. 2014-2015 yıllarında Azerbaycan Devlet Programı (2014-2018) çerçevesinde Azerbaycan'daki radon sorununun araştırılmasına devam edilmiştir. Yüksek radon konsantrasyonu seviyeleri ile akciğer kanseri riski arasında kesin bir korelasyon olduğunu göstermektedir (Aliev ve Mahmudova, 2018). Radon normal sıcaklıklarda, radyumdan bozunmayla meydana gelen inert bir gazdır ve radon bozunma parçalarının akciğere inhalasyonunun ve alfa parçacıklarının yayılımının, hücrelere ve genetik materyale zarar verebileceği bildirilmiştir. Evlere radon gazı zemindeki boşluklardan, drenajdan ve bina çatlaklarından girmektedir (Alar ve Şahin, 2012; Taştepe, 2014). Taşocağı veya yeraltında çalışan maruziyetleri, zararlılara karşı kullanılan kimyasallar olan pestisit, silika, ağır metaller (nikel, kadmiyum, krom), polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve

klorometil eterler bilinen diğer kanserojen maddelerdendir (Türkiye Halk Sağlık Kurumu, 2015).

2.2. AKCİĞER KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Akciğer kanserinin histolojik bulgulara göre sınıflandırılması DSÖ tarafından 2011 yılında güncelledi (Travis ve diğ., 2011). Akciğer kanseri, büyüme hızı, yayılımı, metastazın zamanlaması, kemoterapi ve radyoterapiye yanıtına göre temelde KHK ve KHDK olmak üzere iki ana başlık altında gruplanmaktadır. KHDK de kendi aralarında; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt gruplara ayrılır (**Tablo 2.2.1 ve Şekil 2.2.1**). Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 85'i KHDK, % 15-16'sı KHK'den oluşmaktadır (Goldstraw ve diğ., 2007).

Tablo 2.2.1: Akciğer kanserinin genel sınıflandırılması.

1) <u>Küçük Hücreli Akciğer Kanseri</u>
2) <u>Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri</u> a) <u>Adenokarsinoma</u> b) <u>Skuamöz Hücreli Karsinom</u> c) <u>Büyük Hücreli Karsinom</u>
3) <u>Diğerleri</u> <u>Karsinod Tümörler, Pulmoner Lenfoma, Mukoepidermoid Karsinom, Adenoid Kistik Karsinoma, Sarkomlar</u>



Şekil 2.2.1: Akciğer kanseri türleri ve görülme oranları (<https://www.drozdogan.com/akciger-kanseri-evreleme-sistemi-degisti-gelin-bu-vesile-ile-belirtilerini-ve-tedavisini-gozden-gecirelim>).

Tüm akciğer tümörlerinin yaklaşık % 16'sını KHAK oluşturmaktadır. KHAK, KHDAK ile karşılaştırıldığında birçok farklı özellik gösterdiği görülür. Bu farklılıklar şunlardır: daha hızlı tümör ikilenme zamanına sahip olması ve buna bağlı uzak metastazların erken gelişimi, kemoterapi ve radyoterapiye dramatik yanıt vermesi. KHAK prognozu, yıllar içinde daha etkili tedaviler geliştirilmesine rağmen, halen kötü bir seyir izler. Hastalık agresiftir ve beş yıllık sağ kalım oranları yaklaşık % 25'tir (Yıldırım ve diğ., 2015). KHAK'nin tüm dünyada görülme sıklığı ve mortalitesi bu hastalığı önemli bir sağlık sorunu haline getirmektedir. KHAK'de ilerlemenin önündeki önemli engeller şunlardır: 1) erken teşhis yöntemlerinin eksikliği, 2) translasyonel araştırma için sınırlı tümör dokusu (örneğin, DNA, RNA ve/veya protein değişikliklerinin moleküler profili), küçük tanısal biyopsiler ve standart tedavide cerrahi rezeksiyonun nadir kullanımı, 3) terapötik dirence katkıda bulunan mekanizmaların zayıf anlaşılması ile hızlı hastalık ilerlemesi (Byers ve Rudin, 2015). KHAK'nin en önemli özelliği, hızlı tümöral büyüme ve erken metastaz yapmasıdır. KHAK'lar, sıklıkla santrale yerleşirler, ileri derecede mediastinal invazyon yaparlar ve erken dönemde, paraneoplastik sendromun da dahil olduğu ekstratorasik metastazlarla karakterizedirler (Aydiner ve Can, 2010; Alar ve Şahin, 2012). KHAK, daima sigara içenlerde görülmektedir ve son yıllarda kadınlardaki yüzdesi artış göstermektedir. KHAK, kemoterapi ve radyoterapiye karşı duyarlı

olmasına rağmen, bu tür akciğer kanseri 1-2 yıl içerisinde tedaviye dirençli hale gelebilmektedir (Aydiner ve Can, 2010).

Pulmoner sistemi etkileyen tüm kanser türleri içinde KHADK karsinomu, tüm tümörlerin yaklaşık % 80-85'ini oluşturur. Geçtiğimiz birkaç on yılda sitogenetik ve ileri moleküler teknikler, akciğer kanserinin genomik yapısını tanımlamaya yardımcı oldu ve bu süreçte, ilerlemiş KHADK'lı hastaların klinik yönetimi ve tedavisinde devrim yarattı (Suster ve Mino-Kenudson, 2020). KHADK'lar, adenokarsinomları, skuamöz hücreli kanserler ve büyük hücreli kanserler gibi çoklu kanser türlerini kapsar (Relli ve diğ., 2019). KHDAK'nın karsinogenezi, hücre büyümesi, farklılaşması, göçü, istilası ve apoptozda görevli gen mutasyonları birikiminin neden olduğu çok basamaklı bir süreçtir (Zhou ve diğ., 2015). KHDAK, kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilere az duyarlıdır. İlerlemesi ve metastazı, anjiyogenez ile yakından ilişkilidir. Erken evre KHDAK tedavisinde, ilerleme kaydedilmesine rağmen, ileri evre KHDAK'nın sağ kalım oranının çok düşük olduğu bilinmektedir (Chen ve diğ., 2012; Qian ve diğ., 2016). Son çalışmalar, *EGFR* mutasyonlu KHDAK'nın, hücresel düzeyde oldukça heterojen olduğunu ve çoklu moleküler mekanizmalar yoluyla dirençli tümörlerin klonal genişlemesini kolaylaştırdığını göstermektedir. Akciğer kanseri, akciğer kanseri taramasının yanı sıra cerrahi, tıbbi ve radyasyon onkolojik tedavilerindeki ilerlemelere rağmen, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve dünya çapında kanser ölümlerinin en yaygın nedeni olmaya devam etmektedir.

Akciğer kanserli hastalar arasında adenokarsinomlu hasta sayısının yıllar içinde giderek artması, bu hasta grubu üzerinde çalışmaları artırmıştır (Hirsch ve diğ., 2008). Yapılan birçok çalışmada akciğer adenokarsinomunun histopatolojik büyüme paternlerinin hastaların sağ kalımı ile korele olduğunu gösterilmiştir (Motoi ve diğ., 2008). Hiç sigara içmemiş kişilerde görülen en yaygın alt tiptir. Akciğer adenokarsinomu genellikle akciğer çevresinde oluşur ve birçok durumda skarlarda veya kronik inflamasyon alanlarında bulunabilir. Akciğer adenokarsinomu genellikle mukozal bezlerden gelişir ve tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 40'ını temsil eder (Myers ve diğ., 2020). *EGFR* mutasyonları keşfedildiğinden beri, 5-6 ana odak noktası, hedefe yönelik tedavi ile ilişkili akciğer adenokarsinomlarının moleküler patogenezi ve prediktif faktörleri üzerinde çalışılmaktadır (Shim ve diğ., 2011).

Skuamöz hücreli karsinom öncelerden en yaygın histolojik tip olarak bilinmektedir. Daha sonra yerini adenokarsinoma bırakmıştır. KHDAK olgularının % 30'unu skuamöz hücreli

karsinoma oluşturmaktadır. Skuamöz hücreli kanser, kadınlara oranla erkeklerde daha fazla görülmektedir. Sigarayla ilişkisi, yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak % 90 olarak gösterilmiştir (Yılmazbayhan ve Özlük, 2010; Krinsky ve diğ., 2016). Diğer karsinom türlerine göre uzak organ metastazları daha azdır (Canpolat ve diğ., 2009).

2.3. AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİ

Akciğer kanserinin tedavisindeki güçlükler, bugün için hala önemli bir sorun olarak devam etmektedir. Tedavi yöntemleri, hastanın genel sağlık durumu, kanserin türü ve evresi gibi bir dizi faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi gibi farklı tedavi seçenekleri vardır. Kantitatif proteomik analiz ile ilaç direncinin prediktif belirteçleri, tanı için aday biyobelirteçler ve akciğer kanserinde prognostik belirteçler ve diğer moleküler belirteçler, akciğer kanseri için yeni terapötik hedeflerin keşfedilmesine ve tedavi yöntemine karar verilmesine olanak tanımaktadır (Cheung ve Juan 2017).

Radyoterapi, akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan önemli bir yöntemdir. Radyoterapi, hastalığın tüm evrelerinde iyileştirici veya palyatif tedavi olarak kullanılabilir. Teknolojik gelişmeler, tümörlerin daha iyi radyoterapi hedeflemesine ve çevredeki normal dokuların tesadüfi ışınlanmasını azaltmasına olanak sağlamıştır. Akciğer kanserinde radyoterapinin hem sağ kalımı artırma hem de toksisiteyi azaltma açısından olumlu sonuçları vardır. Akciğer kanseri tedavisinde modern radyoterapi tekniklerinin uygulanması daha iyi klinik sonuçlar ve daha düşük yan etki oranları sağlar (Bajcsay ve diğ., 2020). Yaygın hastalığa geleneksel yaklaşım, yalnızca bölgeye özgü palyasyon için ayrılmış radyoterapi ile kemoterapidir. Son raporlar, radyoterapi uygulamalarının arttığını göstermektedir (Videtic, 2015).

Adjuvan kemoterapi, KHDAK'ta bir dizi evreleme senaryosuna sağ kalım avantajı sunar. Akciğer kanseri cerrahisinden değişken iyileşme, bir hastanın adjuvan kemoterapiyi tolere etme yeteneğini geciktirebilir, ancak kemoterapiye başlamanın aciliyeti belirsizdir (Salazar ve diğ., 2017). Akciğer kanseri için akciğer parankimine bölgesel kemoterapi uygulanabilir ve etkilidir. Güvenlik, akciğerlere iletilen kemoterapi ajanına bağlıdır ve doza ve zamana bağlıdır. Erken akciğer kanseri evreleri ve bölgesel kemoterapinin neoadjuvan veya adjuvan tedavi olarak kullanılıp kullanılmayacağı hakkında veri sağlamak için daha fazla değerlendirmeye ihtiyaç vardır. Son olarak, inhale kemoterapi daha az sistemik yan etki ile bir

gün evde uygulanabilir. *EGFR*-mutant ve *ALK*-pozitif akciğer kanserli hastalarda kemoterapinin etkinliği artar ve onkogene dayalı kanserleri hedeflenen ajanlara dirençli hale gelen bireyleri kurtarabilir. İmmünoterapiler akciğer kanserleri için terapötik silahlanmanın bir parçası haline geldikçe, kemoterapötik ilaçlar, bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini artırmak için bağışıklık sistemini modüle etme potansiyeline sahip olmaktadır. Bu kişiselleştirilmiş tıp ve hedefe yönelik tedaviler çağında bile, kemoterapötik ajanlar kanser tedavisinde temel bileşenler olmaya devam etmektedir (Kris ve diğ., 2014). KHAK'nın kemoterapiye ve radyoterapiye nispeten iyi bir başlangıç yanıtı olmasına rağmen, ilk tedaviden sonra nüks veya hastalık ilerlemesi hızlı bir şekilde ortaya çıkabilir. İlaç direnci, özellikle çoklu ilaç direnci, KHAK kemoterapisinin başarısızlığının en önemli nedenidir (Chen ve diğ., 2012). Adjuvan platin bazlı kemoterapi evre II ve III KHDAK hastalarında bakım standardı olarak kabul edilir ve genellikle ≥ 4 cm tümörleri olan evre inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda düşünülür (Nagasaka ve Gadgeel, 2018). Platin bazlı kemoterapi, ilerlemiş KHDAK'inden etkilenen çoğu hasta için bakım standardı olmaya devam etmektedir. Halen KHDAK'da kullanılan platin bileşikleri sisplatin ve karboplatindir. Yeni nesil ilaçların mevcudiyeti, daha düşük dozlarda platin bileşikleri içeren programların benimsenmesine ve tolere edilebilirliğin artmasına neden olmuştur. Bazı veriler, üçüncü nesil sisplatin bazlı terapilerin, farklı bir güvenlik profiline sahip karboplatin bazlı kemoterapiden biraz daha üstün olduğunu ve bu nedenle sisplatinin, ilerlemiş KHDAK'li seçilmiş hastaların tedavisi için standart referans olarak kalması gerektiğini göstermektedir. Yeni platin bileşikleri ve platin ilaçlarını kişiselleştirilmiş ilaç olarak sunmak için fonksiyonel genomiklerin kullanımı araştırılmaktadır (Rossi ve Maio, 2016).

İmmünoterapi, kanserin konakçı bağışıklık sistemi tarafından yabancı olarak tanınmasını kolaylaştırır, bağışıklık sistemini uyarır ve kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını sağlayan inhibisyonu hafifletir. **İmmün kontrol noktası inhibitörleri (ICI)**, tek ajan olarak veya kemoterapi ile kombinasyon halinde klinik uygulamaya girmiştir (Pirker, 2020). Geleneksel kemoterapötik ajanların aksine, ICI'ler vücudun doğal tümör öldürme yanıtını artırarak çalışır. Bununla birlikte, bu eşsiz etki mekanizması, sınıfa özgü yan etkilerin tanınmasına da yol açmıştır. Bağışıklık ile ilişkili advers olaylar olarak etiketlenen bu toksisiteler, akciğerler de dâhil olmak üzere çoklu organ sistemlerini etkileyebilir. Kontrol noktası inhibitörü pnömonisi olarak adlandırılan ICI kullanımına bağlı immün aracılı akciğer hasarı, ICI alan hastaların yaklaşık % 3 ila % 5'inde görülebilmektedir (Suresh ve diğ., 2018).

İmmünoterapi, KHAK tedavisinde ilerleme kaydetmiştir ve nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab ve durvalumab gibi ICI'ler, KHK'nin klinik sonuçlarında önemli iyileşmelere yol açmıştır (Yang ve diğ., 2020). ICI'ler, ilerlemiş KHDAK sağ kalımını iyileştirdiği gösterilen daha yeni, immünoterapi bazlı ilaçlardır. Nivolumab, metastatik KHDAK olan daha önce tedavi edilen hastalarda etkilidir. Pembrolizumab ve atezolizumab monoterapi olarak ve diğer tedavilerle kombinasyon halinde onaylanmıştır. Geçtiğimiz yıl boyunca, platin bazlı kemoterapi ile immünoterapinin kombinasyonu, metastatik KHDAK olan ve programlanmış ölüm ligand 1 tümör oranı skoru olan hastalar için bakım standardı haline gelmiştir (Judd ve Borghaei, 2020).

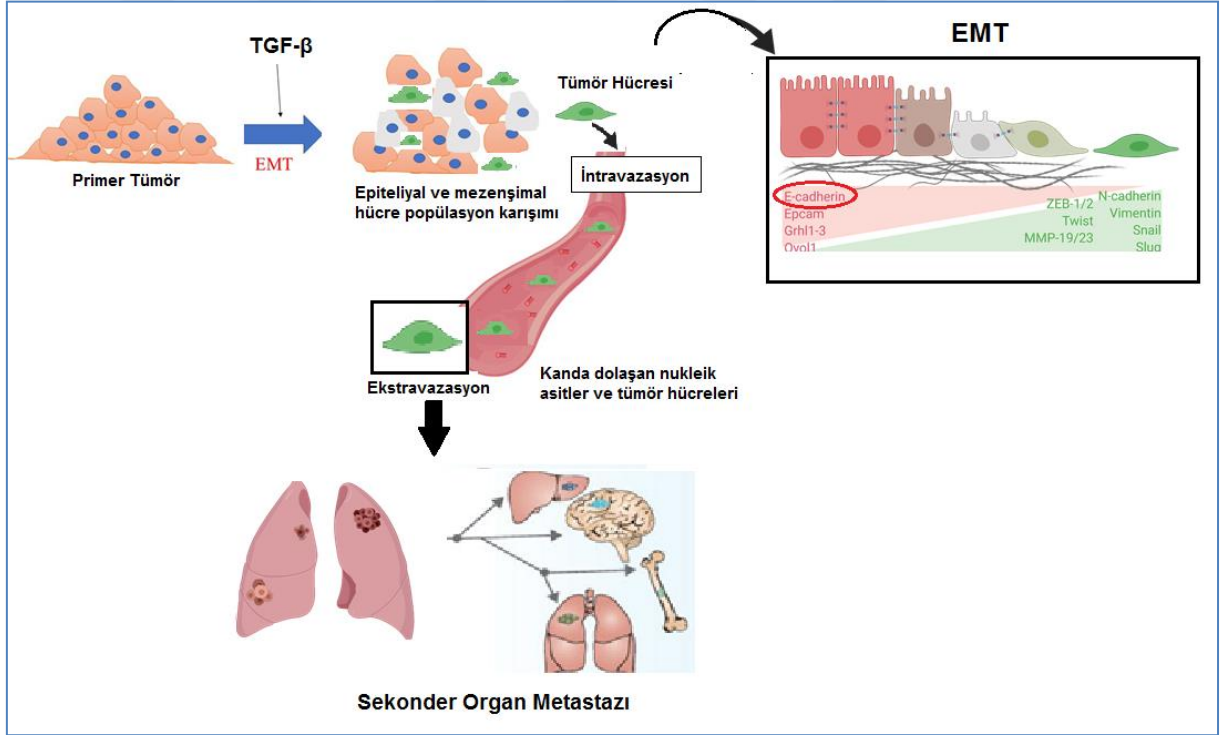
2.4. EPİTELİYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ

EMT, epitel hücrelerinin epitel fenotiplerini kaybederek mezenkimal hücrelere farklılaşması olarak tanımlanır. EMT, embriyonik gelişimde gen katmanlarının oluşumunda, yara iyileşmesinde ya da epitel homeostazına fizyolojik veya patolojik olarak meydan okunduğunda iyileşmeyi veya hastalık oluşumunu teşvik eden mezenkimal hücrelerin üretilmesini sağlar. EMT'de başlıca şu olaylar meydana gelir: Öncelikle bazal membran üzerine yerleşen epitel hücrelerinin bazal membran ve diğer komşu epitel hücreleriyle teması kesilir, epitel hücreleri polaritelerini kaybeder ve sonra epitel hücre molekülleri yerine mezenkimal hücre moleküllerini üreterek mezenkimal bir fenotip kazanırlar.

EMT, TGF- β , Wnt/ β -katenin, Hedgehog ve Notc sinyalleri ile çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörleri tarafından modüle edilmektedir (Kahata ve diğ., 2018; Yildirim ve diğ., 2021). EMT, tümör metastazının önemli bir itici gücü olarak tanımlanmaktadır (Nieto ve diğ., 2016). TGF- β ligandları, EMT'yi uyaran transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu veya aktivitelerini kontrol eder (Kahata ve diğ., 2018). Kültürdeki epitel hücrelerine TGF- β eklenmesi, çeşitli epitel hücrelerinde EMT'yi indüklemenin uygun bir yolu olarak önerilmektedir (Xu ve diğ., 2009). Smad bağımlı TGF- β sinyalinin EMT'yi aktive ettiği bilinmektedir. EMT, kanser ilerlemesini destekleyen ve yönlendiren mezenkimal karakterli stromal hücrelerin üretilmesini sağlar (Katsuno ve diğ., 2013). TGF- β , tümör anjiyogenezini ve kansere bağlı fibroblastları aktive ederek ve tümörün inhibe edici immün yanıtlardan kaçmasını sağlayarak kanser büyümesini ve ilerlemesini daha da destekler. TGF- β sinyalinin hücre döngüsü durmasında, apoptoz, EMT ve kanser hücresi metastazında da rolü vardır (Hao ve diğ., 2019). Karsinom hücre istilasının başlatılmasına ek olarak, TGF- β ile indüklenen

EMT, kanser hücrelerini farklılaşmaya ve kanser kök hücre benzeri özellikler kazanmaya yönlendirebilir. EMT ayrıca kanser ilerlemesini destekleyen ve yönlendiren stromal hücrelerin üretilmesine de izin verir (Katsuno ve diğ., 2013).

Epitel kökenli primer tümörde, epiteliyal fenotipe sahip hücrelerin bir kısmı EMT ile mezenkimal fenotip kazanırlar. Mezenkimal karakterli bu hücreler tümör dışına göç ederler (migrasyon) ve stromaya invase olurlar (invazyon). Daha sonra bu hücreler, anjiyogenez ile oluşan kapillerlerin duvarını aşarak kana geçerler (intravazasyon) ve kan ile uzak organlara taşınırlar (circulation). Metastaz yapacakları organlara geldiklerinde, damar duvarından geçerek (ekstravazasyon) hedef dokuda sekonder bir tümör oluşumunu sağlarlar. Akciğer kanserinin metastaz yaptığı organlar karaciğer, beyin, diğer akciğer ve kemiktir (Şekil 2.4.1).



Şekil 2.4.1: Akciğer kanseri uzak organ metastazı (Mittal, 2018; Jin ve diğ., 2015 ve <https://oncobites.blog/tag/metastasis/> alınarak düzenlenmiştir).

2.5. D VİTAMİNİ

VitD, steroid tabiatlı bir prohormondur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, VitD'nin kemik metabolizması ve kan kalsiyum ve fosfat dengesi üzerinde bilinen klasik rollerine ek olarak, kanser dahil birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Doğal VitD kaynakları (diyet ve ultraviyole ışınlarla maruz kalma) ile vücuda VitD temini sınırlı olabilmektedir. Bu nedenle harici VitD takviyeleri, vücuda VitD alımını arttıran ve vücuttaki VitD seviyesini iyileştiren önemli bir destek yol olarak kabul edilmektedir (Wilson ve diğ., 2017).

D3 vitamini, UV ışığının etkisi altında deride 7-dehidrokolesterolden yapılır. D2 vitamini (ergokalsiferol) bitki sterol ergosterolünden elde edilir. Vücutta üretilen veya besinlerle vücuda alınan VitD formları (D_2 ve D_3 vitaminleri), karaciğerde 25-hidroksivitamin D_3 'e dönüştürülür ve daha sonra böbreklerde CYP27B1 enzimi tarafından aktif VitD'ye ($1,25(OH)_2D_3$) çevrilir. Aktif VitD, sistemik dolaşım aracılığıyla hedef organlara taşınarak hedef hücrelerinde etkisini gösterir (Donma ve diğ., 2012). Aktif VitD, hedef hücreleri üzerindeki etkisini reseptörü (VDR) aracılığı ile göstermektedir. Hücre zarından kolayca geçen VitD, hücrenin sitoplazmasında RXR molekülüne bağlanarak dimerik bir yapı kazanır. Bu dimerik yapı, sitoplazmadan nukleusa geçer ve diğer düzenleyici proteinlerle etkileşir. Aktif VitD, VDR ve çeşitli düzenleyici proteinleri içeren bu kompleks, hedef genlerin promotör bölgelerinde bulunan özel nükleotid dizilerine (**D vitamini yanıt elemanları, VDRE**) bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (Larriba ve diğ., 2014). VitD'nin hedef genleri arasında, hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşması, hücre ölümü, anjiyogenez ve inflamasyon ile ilgili genler bulunmaktadır. Akciğer ile ilgili olarak, *in vivo* hayvan modellerinden ve *in vitro* hücre kültüründen elde edilen kanıtlar, VitD'nin pulmoner inflamasyonun önlenmesinde yararlı bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Norton ve O'connell, 2012). VitD vücutta pek çok olumlu etkileri nedeniyle, minimal yan etkileri olan özel hastalıkları hedefleyen $1,25(OH)_2D$ analogları kullanılmaktadır. VitD'nin kanser üzerinde de olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Akciğer kanserinin önlenmesi için yeterli bir VitD seviyesi önemlidir (Bikle, 2014). VitD ayrıca anti-anjiyogenik, anti-inflamatuar ve anti-metastatik etkiler de dâhil olmak üzere kanserde faydalı olabilecek birçok özelliğe sahiptir (Krishnan ve Feldman, 2011). Ek olarak, epidemiyolojik kanıtlar, çeşitli kanser türlerinin önlenmesinde ve tedavisinde VitD'nin yararlı bir rolü olduğunu

göstermektedir (Trump ve diğ., 2006; Deeb ve diğ., 2007). VitD'nin A549 hücrelerinin proliferasyonunu, istilasını ve metastazını inhibe edebildiğini, hücre apoptozunu teşvik ettiğini, kemoterapi ilaçlarının duyarlılığını düzenlediğini doğrulamaktadır. VitD'nin bu etkileri PI3K/AKT/MTOR sinyal yolu ile koreledir (Songyang ve diğ., 2021). VitD reseptörünü eksprese eden çeşitli akciğer kanseri epitel hücre hatlarında da VitD'nin anti-proliferatif etkinliği saptanmıştır. NCI-H82 ve NCI-H209 küçük hücreli akciğer karsinomunda ve EBC-1 ve H520 küçük hücreli dışı karsinom hücre hatlarında hücre proliferasyonu 1,25(OH)₂D₃ tarafından önemli ölçüde inhibe edildiği gösterildi (Higashimoto ve diğ., 1996; Güzey ve diğ., 1998). Hayvan modellerinde yapılan çeşitli çalışmalar, akciğer kanseri tedavisinde VitD'nin potansiyelini incelemiştir. Yapılan çalışmalarda 24R,25(OH)₂D₃'ün akciğer kanserinde biyolojik olarak aktif olduğunu, tümörlü farelerin hayatta kalma oranını uzattığını ve anti-metastatik etkiler gösterdiği bulundu (Maeda ve diğ., 1998). Bir başka çalışmada, tümörlü farelerde 1,25(OH)₂D₃'ün tümör metastazını ve nüksünü azalttığını ve tümör bağışıklığını arttırdığını gösterildi (Prechel ve diğ.,1996).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *İN VİTRO* DENEYLER

İnsan A549 hücreleri (CCL-185TM) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan temin edildi. Hücreler %10 fetal sıgır serumu, 50 U/ml penisilin ve 50µg/ml streptomisin (Gibco) içeren **Dulbeco'nun modifiye edilmiş medyumunu ve Ham'ın F12 (DMEM/F12)** medyumunda (Gibco), 37°C sıcaklıkta ve 5% CO₂'de inkübe edildi. Hücreler % 70 oranında yüzeyi kapladıktan sonra tripsinizasyonla kaldırıldı ve 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi (400.000 hücre/kuyucuk). Hücrelerin ortama tutunması yayılması beklendikten sonra hücreler 2.gün serumu azaltılmış medyumda kültüre edildi. Bir gün sonra medyum değiştirildi. Daha sonra hücrelerden üç deney grubu oluşturuldu. İlk gruptaki hücreler, 5 ng/ml TGF-β (PBS'de çözündü), ikinci gruptaki hücreler 100 nM VitD (DMSO:PBS karışımında) ile üçüncü gruptaki hücrelere ise 100 nM VitD uygulamasından 30 dk sonra 5 ng/ml TGF-β ile muamele edildiler. Hücreler, son uygulamayı takip eden 24., 48. ve 72. saatlerde toplandılar. Ayrıca, hiç bir madde uygulaması yapılmayan hücreler (0. saatte toplanan hücreler) kontrol grubu olarak kullanıldılar. Hücre lizatlarında Western Blotting, qRT-PCR, yara onarımı ve *CDH1* geni promotörünün metilasyon analizleri yapıldı. Tüm analizler için üç tekrarlı deneyler yapıldı.

3.2. PROTEİN İZOLASYONU VE ELEKTROFOREZ

Altı kuyucuklu kültür kaplarına ekilen (400.000 hücreМесто для формулы./kuyucuk) tüm deney gruplarındaki hücrelere madde uygulamaları yapıldıktan sonra, deney 24, 48 ve 72.saatlerde sonlandırıldı. Kültür kaplarından medyum uzaklaştırılarak, ortama lizis tampon ilave edildi. Hücreler kazıyıcı yardımıyla parçalandıktan sonra, ultrasonikatörde tekrar parçalanma işlemine devam edildi. Toplanan lizatlar, 13.000 g'de 15 dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatantlar yeni bir eppendorf tüpe alındı ve Bradford yöntemiyle (Bradford, 1976) total protein miktarları ölçüldü. Örnekler kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Elektroforez için hazırlanan tüm örnekler, 40 µg olacak şekilde %5-8'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jellere yüklendi ve kademeli olarak önce 70 V'da 45 dk, ardından 100 ve 120 V'da ortalama 2 saat yürütüldü.

3.3. WESTERN BLOTTİNG

Elektroforez ile yürütülen protein örnekleri, Biorad transblot-Turbo yarı ıslak aktarım cihazıyla PVDF membranlara aktarıldı. Protein aktarım etkinliği Ponceu S boyaması ile kontrol edildi. Transfer işlemi başarılı olan membranlar, primer antikor uygulaması yapılmadan önce %5 yağsız süt tozuyla hazırlanan bloklama solüsyonuyla 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membranlar, uygun sulandırma oranlarıyla hazırlanan E-kaderin (epitelial belirteç), α -SMA (mezenkimal hücre belirteci), Snail (*CDH1* baskılayıcı transkripsiyon faktörü), Kaiso (*CDH1* geni metilasyonundan sorumlu protein) ve DNMT3a (DNA metilasyon enzimi) primer antikorlarında +4°C’de gece boyunca inkübe edildi (**Tablo 3.3.1**). İşlem sonrasında, membranlar **Tween-20 içeren Tris tamponunda (TBST; pH 7,6; 0.5 M)** yıkandıktan sonra 1:5000 konsantrasyonda hazırlanan uygun **bayır turbu peroksidazı (HRP)** bağlı sekonder antikorlarla (keçi-anti tavşan IG-g ve keçi anti fare IG-g) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Sekonder uygulamasını takiben, membranlar TBST solüsyonunda ardından Tris tamponu solüsyonunda yıkandı. Kemilüminesan solüsyon uygulamalarından sonra protein bantları Biorad Chemidoc jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve densitometrik analizleri yapıldı. Bant yoğunlukları, **gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)** proteininin yoğunluğuyla normalize edildi. Gruplar arasındaki değişimler analiz edildi.

Tablo 3.3.1: Western Blotting’de kullanılan antikorlar ve kullanım şekilleri.

Primer Antikor	Dilüsyon Oranı	İnkübasyon Süresi ve Koşul	Firma/Katalog No
Tavşan anti-E-kaderin	1:500	Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz/sc-7870
Fare anti- α -SMA	1:500	Gece boyunca, +4°C	Novus/ NBP2-33006
Fare anti-Kaiso	1:500	Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz / sc-23871
Fare anti-Snail	1:500	Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz /sc-271977
Tavşan anti-DNMT3a	1:250	Gece boyunca, +4°C	Invitrogen/ PA585548
HRP bağlı tavşan anti-GAPDH	1:500	1 saat, oda sıcaklığında	Santa Cruz / sc-25778

3.4. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR)

TGF- β , VitD ve VitD+TGF- β ile muamele edilen ve 0, 24, 48 ve 72. saatlerde toplanan insan A549 hücrelerinden (400.000 hücre/kuyu, 6 kuyucuklu kültür kabında), Invitrogen Purelink RNA Mini kit (Katalog no, 12183018A) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'lar Nanodrop cihazında ölçüldü. Ardından RNA'nın kalitesine %1'lik agaroz jel elektroforezi yapılarak bakıldı. Her bir hücre grubundan 2000 ng RNA'lardan, Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Katalog no; 05 091 284 001) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA cDNA'ya çevrilirken 20 μ l'lik kalıp RNA karışımı hazırlandı ve karışım 10 dk 70°C'de inkübe edildi. Denatüre edilen örnekler cDNA sentez kitinden hazırlanan karışımla inkübe edildikten sonra 40 μ l son hacimli cDNA reaksiyon tüpleri hazır hale getirildi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 20°C'de 10 dk; 43°C'de 75 dk ve 99°C'de 5 dk'ya programlanmış PCR cihazında cDNA sentez işlemi tamamlandı. Elde edilen cDNA'lar nanodrop cihazında ölçülerek 500 ng olarak hesaplandı. cDNA kalıpları qRT-PCR'da kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. *CDH1* (E-kaderin), *ACTA2* (α -SMA), *GAPDH* genlerinin qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. *CDH1* geni için Forward 5'-GTCTGTAGGAAGGCACAGCC-3', Reverse 5'-TGCAACGTCGTTACGAGTCA-3', *ACTA2* geni için Forward 5'-CGAGATCTCACTGACTACCTCATGA-3', Reverse 5'-AGAGCTACATAACACAGTTTCTCCTTGA-3', *GAPDH* geni için Forward 5'-ATGACATCAAGAAGGGGTG-3', Reverse 5'-CTACCAGGAAATGAGCTTG-3' primer çiftleri kullanıldı.

PCR reaksiyonu, üretici firmanın Syber Green Master mix ile tamamlandı. Örnek sayısına göre 1X PCR karışımı hazırlandı ve hazırlanan karışım 15 μ l hacimler ile 96 kuyucuklu pleytlere eklendi. Pleyt kuyucuklarının içine hesaplanan 500 ng cDNA'dan 5 μ l eklenerek son hacim 20 μ l'ye tamamlandı. Pleyt hazırlandıktan sonra şeffaf yapışkan bir bantla kapatıldı. Pleytler Biorad CFX96 cihazına yerleştirilerek qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

İlgili genlerin ekspresyonunun kantitatif miktarı, her gen için referans gene göre belirlenen **siklus eşik değeri (Δ CT, cycling threshold)** değerine (Δ CT=Ct^{referans gen}-Ct^{hedef gen}) göre belirlenen transkript seviyesindeki relative değişiklikler kontrol gen (*GAPDH*) ile normalize edildi.

3.5. İNSAN *CDH1* GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNİN METİLASYONU

TGF- β , VitD ve VitD+TGF- β ile muamele edilen ve 0, 24, 48 ve 72. saatlerde toplanan A549 hücrelerinden (400.000 hücre/kuyu, 6 kuyucuklu kültür kabında), PureLink™ Genomik DNA Mini Kit (Invitrogen, K182001) kullanılarak genomik DNA izole edildi. İzole edilen DNA'dan 1000 ng DNA bisülfıt conversion işlemi için kullanıldı. Bu işlem için EZ DNA Methylation-Direct kit (Zymo Research, Cat no. D5020S) kullanıldı. Bisülfıt ile dönüştürülmüş DNA, 50 ng'den bir Hotstart Taq kiti (Takara, kat no. ROO7Q) ile amplifiye edildi. Polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu, 25 μ l'lık bir toplam reaksiyon hacmi ile [yukarıdaki kit kullanılarak gerçekleştirildi. Döngü koşulları şu şekildedir: 94 °C'de 30 saniye süreyle 38 döngü denatürasyon, 60 °C'de (metile edilmemiş) veya 62 °C'de (metillenmiş) 30 saniye yakalama ve 72 °C'de 1 dakika uzatma. *CDH1* promotör bölgesi için hazırlanan metile ve metile olmamış bölgelerin primer çiftlerinin dizisi şöyledir: *Sense*, 5'-TTAGGT TAGAGGGTTATCGCGT-3' ve anti-sense, 5'-TAACTAAAAATTCACCTACCGACC-3' (116 baz çiftlik metile parça); *sense*, 5'-TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT-3' ve anti-sense, 5'-CACAACCAATCAACAACACA-3' (97 baz çiftlik metile parça). Tüm PCR ürünleri, % 2 agaroz jelde elektroforezinden sonra UV altında görüntüledi. % 100 metilasyon seviyesi için bisülfıt metilasyon kontrolü firmadan alınan metile ve metile olmamış pozitif ve negatif kontrollerle yapıldı.

3.6. YARA İYİLEŞME DENEYİ

İnsan A549 hücreleri, 12 kuyucuklu pleyt içine 1 ml içinde 300.000 hücre olacak şekilde DMEMF12 medyumunda ekildi. Hücreler % 70 konfluent sağladıktan sonra, 200 μ l'lık steril pipet ucuyla plaka yüzeyinde yatay bir yara oluşturuldu. Hücreler, yara açılmasını takiben madde uygulamalarından önce hücre artıklarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra, hücrelerde 5 ng/ml TGF- β ve 100 nM VitD uyarımları gerçekleştirildi. Hücrelerin madde uygulamalarını takip eden 0, 24, 48 ve 72.saatlerdeki migrasyon durumu mikroskop altında belirlendi. Yara kapanma yüzdesi [(0 saatte yara genişliği – 24/48/72. saatte yara genişliği)/0 saatte yara genişliği] x100 şeklinde hesaplandı. Yara kapanma deneyi Cui ve diğerlerinin protokolü modifiye edilerek yapıldı (Cui ve diğ., 2019).

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

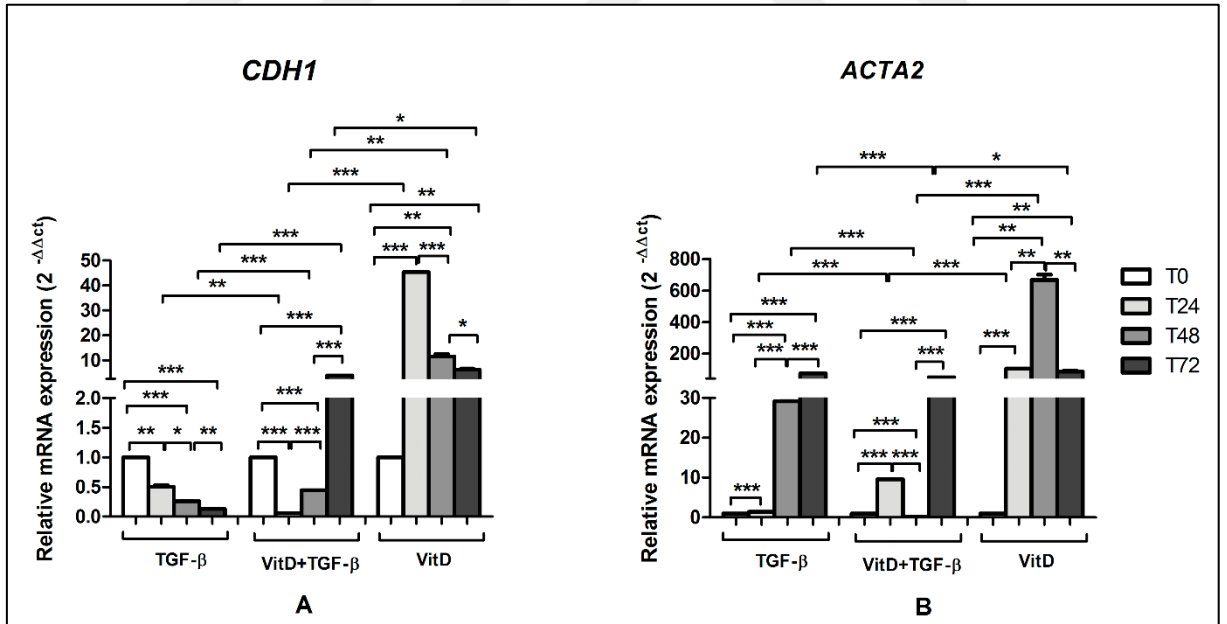
QRT-PCR, Western blotting, metilasyon ve yara kapanma bulgularının gruplar arasında anlamlı bir farklılık gösterip göstermediği istatistiksel olarak Graphpad Prism 5.0 programı ile analiz edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar One way Anova ve Student *T*-testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak değeri 0.05'ten küçük olan farklılıklar ($p<0.05$; $p<0.01$ ve $p<0.001$) anlamlı olarak kabul edildi.



4.BULGULAR

4.1.VitD, TGF- β İLE UYARILAN A549 HÜCRELERİNDE EMT'Yİ GERİLETİR

TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, uyarımı takip eden 24 ($p<0,01$), 48 ($p<0,001$) ve 72. ($p<0,001$) saatlerde *CDH1* ekspresyonu kademeli bir şekilde azalırken, *ACTA2* ekspresyonu zamanla artış gösterdi ($p<0,001$) (Şekil.4.1.1). VitD ön uygulamaları, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 0. saatle kıyaslandığında *CDH1* ekspresyonunu 24 ve 48. saatte azalttı ($p<0,001$), daha sonra 72. saatte ($p<0,001$) arttırdı. *ACTA2* ekspresyonu ise VitD+TGF- β uygulamaları yapılan hücrelerde 24. saatte bir artış ($p<0,001$), 48. saatte bir düşüş ($p<0,001$), sonra 72. saatte tekrar bir artış ($p<0,001$) gösterdi (Şekil.4.1.1). TGF- β ve VitD+TGF- β uygulaması yapılan hücrelerdeki durum karşılaştırıldığında, TGF- β etkisiyle deneyin 24. saatinden itibaren azalan *CDH1* mRNA miktarının, VitD+TGF- β uygulamaları ile deneyin 48 ve 72. saatlerinde arttığı gözlenirken ($p<0,001$), TGF- β tarafından uyarılan *ACTA2* ekspresyonun ise 48 ve 72. saatlerde azaldığı belirlendi ($p<0,001$).

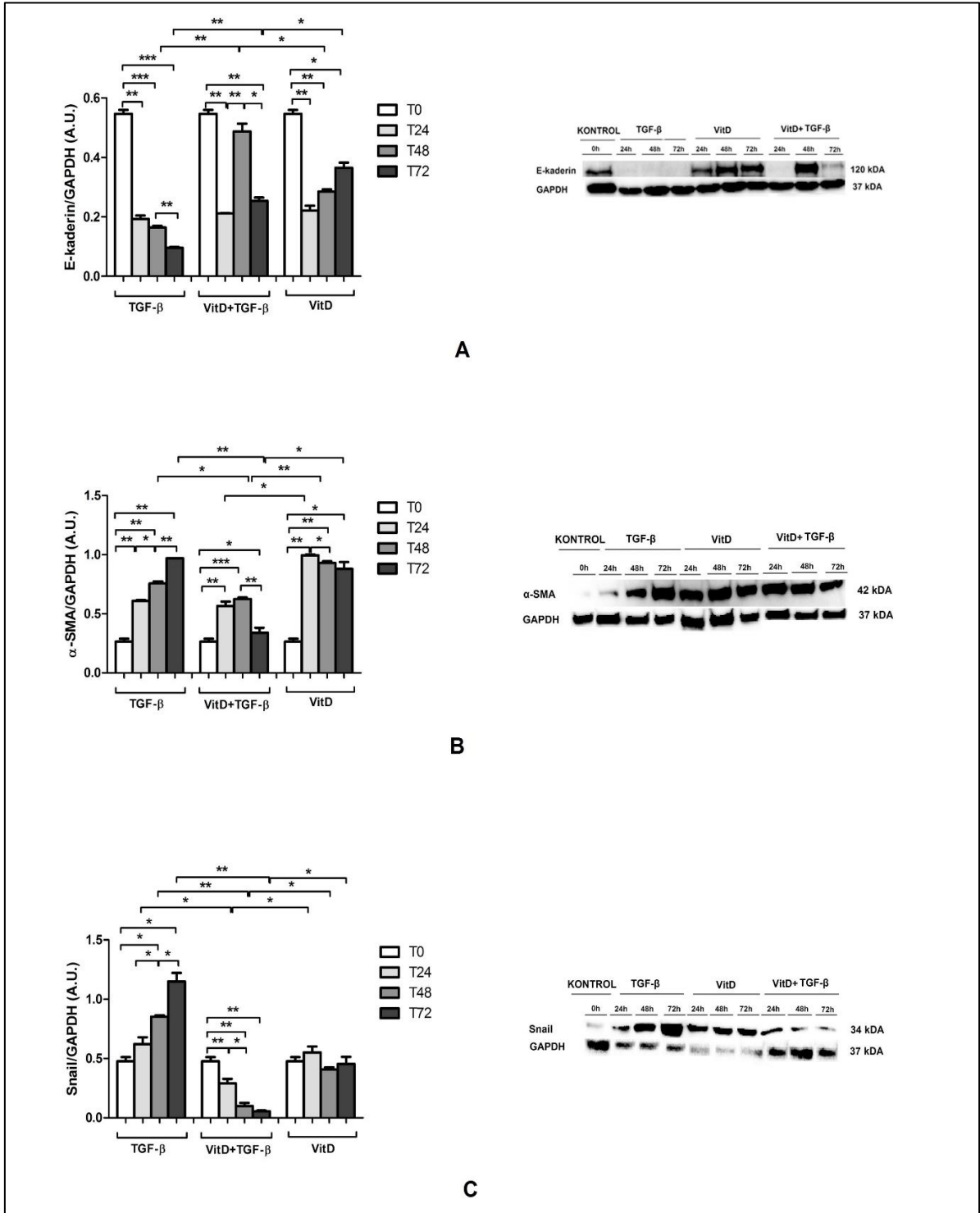


Şekil 4.1.1. TGF- β ve VitD ile muamele edilen A549 hücrelerinde *CDH1* (A) ve *ACTA2* (B) gen ekspresyonlarındaki değişimler. TGF- β , *CDH1* mRNA miktarında zamana bağlı olarak azalmaya, *ACTA2* mRNA miktarında ise artışa neden olur. VitD+TGF- β uygulamaları bu değişimleri tersine çevirir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

Sadece VitD uygulaması ise *CDH1* ekspresyonunu 0. saatle kıyaslandığında 24. saatte arttırdı ($p<0,001$), sonra bu artış 24. saatle kıyaslandığında 48 ve 72. saatlerde giderek azaldı. Ancak, 0.saatle kıyaslandığında *CDH1* mRNA miktarı yüksekti ($p<0,01$). Tek başına VitD uygulaması 0. saatle kıyaslandığında *ACTA2* ekspresyonunu 24 ($p<0,001$), 48 ve 72. saatlerde arttırdı ($p<0,01$). *ACTA2* ekspresyonu 48. saatte en yüksek seviyede idi (**Şekil 4.1.1**).

TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde E-kaderin protein miktarı 0. saatle karşılaştırıldığında, uyarımı takip eden 24. ($p<0,01$), 48. ($p<0,001$) ve 72. ($p<0,001$) saatlerde azaldı (**Şekil 4.1.2A**). VitD ön uygulamaları, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 0. saatle kıyaslandığında E-kaderin protein miktarının önce 24. saatte azalmasına ($p<0,01$), 48. saatte normale yaklaşmasına, 72. saatte de tekrar azalmasına ($p<0,01$) neden oldu. TGF- β ve VitD+TGF- β uygulaması yapılan hücrelerdeki durum karşılaştırıldığında, TGF- β etkisiyle deneyin 24. saatinden itibaren azalan E-kaderin protein miktarının, VitD+TGF- β uygulamaları ile deneyin 48 ve 72. saatlerinde arttığı gözlemlendi ($p<0,01$) (**Şekil 4.1.2A**). Sadece VitD uygulaması yapılan A549 hücrelerinde ise 0. saatle karşılaştırıldığında 24. saatte ($p<0,01$) azalan E-kaderin protein miktarının, 48. saatten itibaren bir artış gösterdiği, bu artışın 72. saatte anlamlı derecede artarak ($p<0,05$) normale yaklaştığı görüldü (**Şekil 4.1.2A**).

TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde α -SMA protein miktarı 0. saatle karşılaştırıldığında, uyarımı takip eden 24. 48. ve 72. saatlerde arttı ($p<0,01$) (**Şekil 4.1.2B**). VitD ön uygulamaları, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 0. saatle kıyaslandığında α -SMA protein miktarının 24. saatten itibaren artmasına (24 saat için $p<0,01$; 48 saat için $p<0,001$) ve 72. saatte normale yaklaşmasına neden oldu ($p<0,05$) (**Şekil 4.1.2B**). TGF- β ve VitD+TGF- β uygulaması yapılan hücrelerdeki durum karşılaştırıldığında, TGF- β etkisiyle deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde artan α -SMA protein miktarının, VitD+TGF- β uygulamaları ile deneyin 48 ($p<0,05$) ve 72. ($p<0,01$) saatlerinde anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Sadece VitD uygulaması yapılan A549 hücrelerinde ise 0. saatle karşılaştırıldığında α -SMA protein miktarı 24. saatten 72. saate kadar anlamlı bir artış gösterdi (24 ve 48. saatler için $p<0,01$); 72. saat için $p<0,05$) (**Şekil 4.1.2B**).



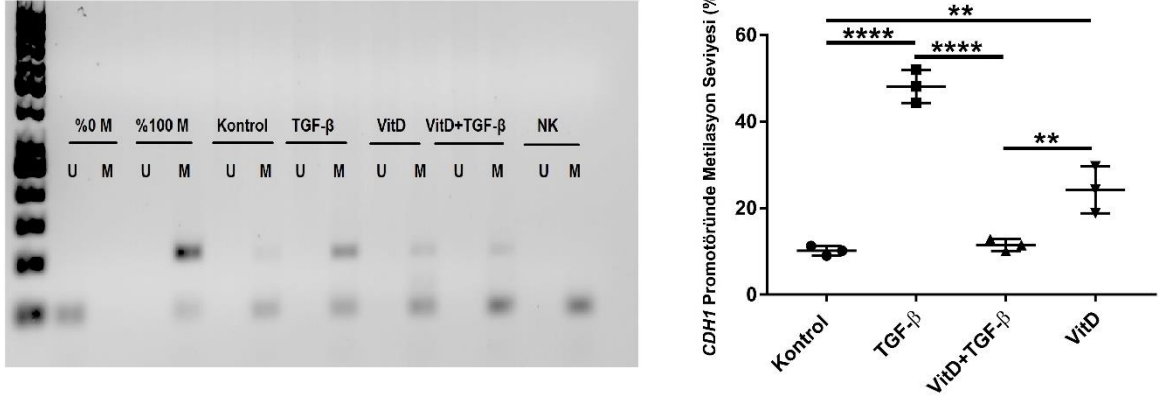
Şekil 4.1.2. VitD ve TGF- β uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde E-kaderin (A), α -SMA (B) ve Snail (C) protein miktarlarındaki değişiklikler ve protein bantları gösterilmiştir. VitD+TGF- β uygulamaları, TGF- β tarafından uyarılan EMT'yi E-kaderin protein miktarını artırıp, Snail ve α -SMA protein miktarını azaltarak geriletir. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.

TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde Snail protein miktarı 0. saatle karşılaştırıldığında, uyarımı takip eden 48. ve 72. saatlerde arttı ($p<0,05$) (Şekil 4.1.2C). VitD ön uygulamaları, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 0. saatle kıyaslandığında Snail protein miktarını 24. saatten itibaren azalttı ($p<0,01$). TGF- β ve VitD+TGF- β uygulaması yapılan hücrelerdeki durum karşılaştırıldığında, TGF- β etkisiyle deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde artan Snail protein miktarının, VitD+TGF- β uygulamaları ile deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi (24 saat için $p<0,05$; 48 ve 72. saatler için $p<0,01$) (Şekil 4.1.2C). Sadece VitD uygulaması yapılan A549 hücrelerinde ise 0. saatle karşılaştırıldığında VitD uygulaması, Snail miktarında 0. saate göre anlamlı bir değişime neden olmadı (Şekil 4.1.2C).

4.2.VitD, TGF- β İLE UYARILAN A549 HÜCRELERİNDE *CDH1* PROMOTÖRÜNÜN METİLASYONUNU REGÜLE EDER

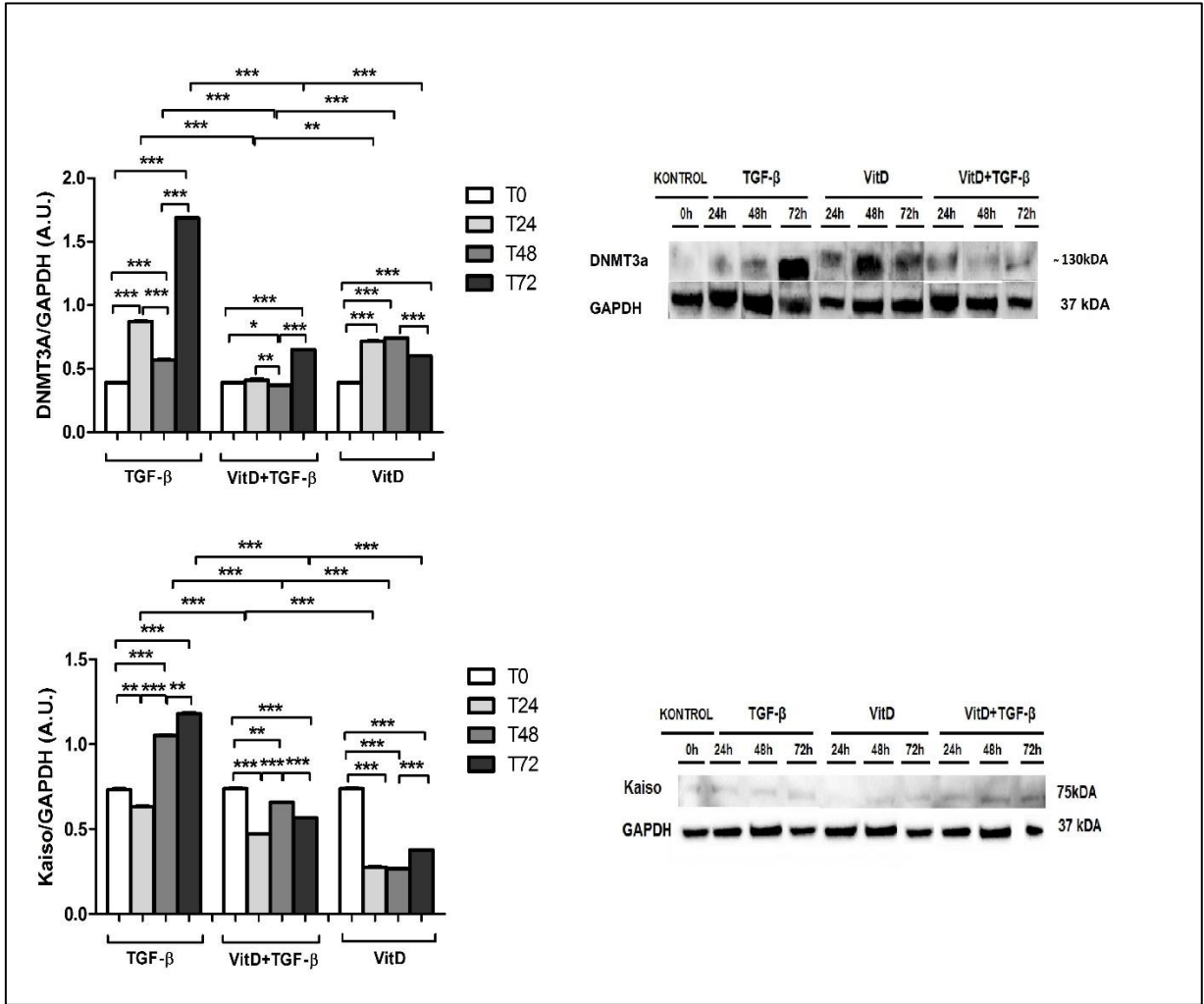
Western blot bulguları dikkate alındığında, *CDH1* promotöründe metilasyon analizi için, uygun deney saati olarak 48. saat belirlendi. TGF- β uygulaması, kontrolle kıyaslandığında (0. saat), A549 hücrelerinde deneyin 48. saatinde *CDH1* promotöründe metilasyon seviyesinde bir artışa neden oldu ($p<0,001$) (Şekil 4.2.1). VitD uygulaması, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde artan metilasyon oranını azalttı ($p<0,001$) (Şekil 4.2.1). Tek başına VitD uygulaması ise, *CDH1* promotörünün metilasyonunda 0. saatle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,01$), 48. saatteki VitD+TGF- β uygulamaları ile karşılaştırıldığında, metilasyon seviyesinde tekrar bir artış belirlendi ($p<0,01$) (Şekil 4.2.1).

TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerin DNMT3A protein miktarı 0. saatle karşılaştırıldığında, uyarımı takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde arttı ($p<0,001$) (Şekil 4.2.2). VitD ön uygulamaları, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 0. saatle kıyaslandığında DNMT3A protein miktarının 48. saatte ($p<0,05$) azalttı ve 72. saatte artırdı ($p<0,001$) (Şekil 4.2.2). TGF- β ve VitD+TGF- β uygulaması yapılan hücrelerdeki durum karşılaştırıldığında, TGF- β etkisiyle deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde artan DNMT3A protein miktarının, VitD+TGF- β uygulamaları ile deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.2.2). Sadece VitD uygulaması yapılan A549 hücrelerinde ise 0. saatle karşılaştırıldığında DNMT3A protein miktarı 24. saatten 72. saate kadar anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,001$) (Şekil 4.2.2).



Şekil 4.2.1: VitD ve TGF-β uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde *CDH1* promotör metilasyonunda meydana gelen değişimler. Bantlar (A), metillenmiş (116 bp; M) ve metillenmemiş (97 bp, UM) aleller için spesifik amplifikasyon ürünlerine karşılık gelir. Metillenmiş bir allel amplikonunun varlığı, metilasyon pozitifliği için standart olarak kullanıldı. Deney gruplarındaki *CDH1* promotör metilasyon oranındaki değişimler grafikte (B) gösterilmiştir. TGF-β uygulamaları *CDH1* promotör metilasyon oranını arttırırken, VitD uygulamaları bu artan metilasyon yüzdesini düşürür. Anlamlılık p değerleri: ** $p<0,01$ ve **** $p<0,001$. U:metillenmemiş; M:metile durumu göstermektedir. NK: Negatif kontrol.

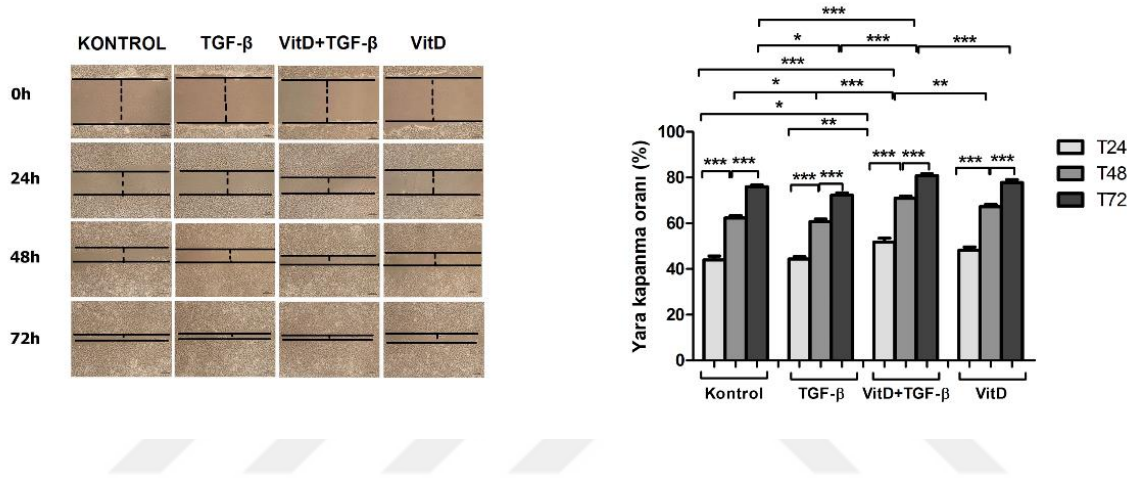
TGF-β ile uyarılan A549 hücrelerinde Kaiso protein miktarı 0. saatle karşılaştırıldığında, uyarımı takip eden 24. saatte azaldı ($p<0,01$), sonra 48. ($p<0,001$) ve 72. ($p<0,001$) saatlerde arttı (Şekil 4.2.2). VitD ön uygulamaları, TGF-β ile uyarılan A549 hücrelerinde 0. saatle kıyaslandığında Kaiso protein miktarını 24, 48 ve 72. saatlerde azalttı (24 saat için $p<0,001$; 48 saat için $p<0,01$; 72 saat için $p<0,001$). Ancak, bu azalış 24. saatten itibaren 72. saate kadar bir artış göstermesine rağmen yine de 0. saatteki değerine ulaşmadı (Şekil 4.2.2). TGF-β ve VitD+TGF-β uygulaması yapılan hücrelerdeki durum karşılaştırıldığında, TGF-β etkisiyle deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde artan Kaiso protein miktarının, VitD+TGF-β uygulamaları ile deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.2.2). Sadece VitD uygulaması yapılan A549 hücrelerinde ise 0. saatle karşılaştırıldığında Kaiso protein miktarı 24. saatten 72. saate kadar anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0,001$) (Şekil 4.2.2).



Şekil 4.2.2. VitD ve TGF- β uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde DNMT3A **(A)** ve Kaiso **(B)** protein miktarlarındaki değişiklikler ve protein bantları gösterilmiştir. VitD+TGF- β uygulamaları, TGF- β tarafından uyarılan DNMT3A ve Kaiso protein miktarını azaltarak DNA metilasyonunu azaltır. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.

4.2. VitD, TGF- β İLE UYARILAN A549 HÜCRELERİNDE YARA KAPANMA ORANINI ARTTIRIR.

TGF- β ile uyarılan grupta, kontrolle kıyaslandığında yara kapanma oranının zaman ilerledikçe yavaşladığı tespit edildi (24. saat için $p<0,05$; 48. ve 72. saatler için $p<0,001$). VitD+TGF- β ile uyarılan grupta, yara kapanma oranının kontrolle kıyaslandığında deneyin 48 ve 72. saatlerinde arttığı görüldü ($p<0,001$). Sadece VitD uygulaması yapılan grupta, yara kapanma oranı kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir değişiklik göstermedi (Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.1. VitD ve TGF- β uyarılan A549 hücrelerinde, yara kapanma oranındaki değişimler. VitD+TGF- β uygulamaları, TGF- β tarafından azaltılan yara kapanma oranını artırır. Anlamlılık p değerleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer adenokarsinomu tedavisinde, erken evrede lobektomi yöntemi ile tümör ve mediastinal lenf nodlarının çıkarılması, ileri evrede ise hedefli tedavi ve kemo-radyoterapi güncel tedavi yöntemleri olarak kullanılmaktadır (Khullar ve diğ., 2015; Hanna ve diğ., 2017). *EGFR* mutasyonlu akciğer adenokarsinomlarında, *EGFR*'ünü hedefleyen tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımı devreye sokulmaktadır (Le ve Gerber, 2019). Güncel etkili tedaviler ile son yıllarda hasta sağ kalımında olumlu gelişmeler elde edilmesine rağmen, kemoterapötik ajanlara karşı gelişen ilaç direnci ve yakın ve/veya uzak organlara metastaz, hastalığın prognozu ve sağ kalımını kötü yönde etkilemektedir. Yapılan çalışmalar, KHDAK'lı hastalarda TGF- β 'nın tümör oluşumu ile ilgili olduğunu, kanserin ilerlemesine paralel olarak TGF- β ekspresyonunda bir artışın meydana geldiğini ve bu artışa lenf nodu metastazının ve uyarılmış anjiyogenezin eşlik edebileceğini ortaya koymaktadır (Huang ve diğ., 2014; Ye ve diğ., 2015; Liu ve diğ., 2018). KHDAK'inde tümör hücreleri çok miktarda TGF- β eksprese ederler. TGF- β , bağışıklık sistemini ve tümör mikroçevresini modüle ederek, özellikle ileri evrede tümör gelişimi ve metastazına katkı sağlar. TGF- β , direkt etkisini tümör hücreleri üzerinde, indirekt etkisini tümör mikroçevresinin remodellemesi ve inflamatuvar hücreler üzerinde göstererek, bu süreçlere katkı sağlamaktadır (Padua ve Massagué, 2009; Principe ve diğ., 2014). TGF- β 'nın tümör hücrelerinde EMT'yi uyararak tümör metastazına katkı sağlayabileceği bilinmektedir. Fu ve diğ. (2020), akciğer adenokarsinomlu bir grup hastada EMT uyarımının yüksek olduğunu ve bu hastaların KHDAK'nin metastatik akciğer adenokarsinomlu bir alt grup olarak değerlendirilebileceğini önermektedirler. Yukarıdaki veriler, metastatik akciğer adenokarsinomu ile TGF- β ve EMT arasında doğrudan bir ilişki olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Bu nedenle, kanser terapilerinde, TGF- β sinyalleme ve EMT uyarımını durduran terapötik yaklaşımlar ön plana çıkmaktadır (Ramesh ve diğ., 2020; Huang ve diğ., 2021). Çalışmamızda, TGF- β ile EMT uyarımı yapılan insan akciğer adenokarsinom hücrelerinde (A549 hücreleri), VitD ön uygulamaları ile EMT'nin önlenmesi ve EMT progressiyonunda kritik rol oynayan *CDH1* ekspresyonunun regülasyonunda etkili mekanizmalarda VitD'nin etkisine odaklanılmıştır. Çalışmamızın verileri, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, VitD ön uygulamalarının bu hücrelerde EMT uyarımını azalttığını göstermektedir. VitD, TGF- β ile uyarılan A549

hücrelerinde Snail protein miktarını azaltarak ve *CDH1* geni promotör hipometilasyonunu Kaiso ve DNMT3A üzerinden regüle ederek, E-kaderin protein miktarının artmasını sağlarken, mezenkimal hücre farklılaşmasını da önleyerek hücrelerde α -SMA protein miktarının azalmasına neden olmaktadır.

TGF- β sinyalleme, sağlıklı epitel hücrelerinde ve kanser hücrelerinde EMT'yi uyarır. Elli sekiz yaşındaki beyaz bir erkeğin akciğer adenokarsinomundan tümör hücrelerinin izole edilmesi ve kültürlenmesi ile elde edilen A549 hücrelerinde, Smad bağımlı-TGF- β sinyal yolunun aktifleşmesi ile EMT'nin uyarıldığını gösteren çok sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalarda, TGF- β sinyal yolunun aktif olduğu durumlarda, EMT uyarımının da gerçekleştiği rapor edilmektedir (Yu ve diğ., 2018; Chen ve diğ., 2020; Sari ve diğ., 2020). Sigara ekstraktı ve TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde p-Smad2/3, Smad4 ve α -SMA (mezenkimal hücre belirteci) proteinlerinin miktarlarında artış gözlenirken, Smad7 ve E-kaderin protein miktarında bir azalma görülür (Sari ve diğ., 2020). TGF- β sinyalleme EMT'yi, Snail, Slug, Twist, Zeb1 gibi E-kaderin geni (*CDH1*) transkripsiyonunu baskılayan transkripsiyon faktörleri üzerinden kontrol eder. García-Cuellar ve diğ. (2021), TGF- β sinyal yolunun aktivasyonu ve Snail ve Zeb1 miktarlarındaki artışların, A549 hücrelerinde EMT'nin uyarılmasına ve bu hücrelerde E-kaderin miktarının azalmasına, N-kaderin, vimentin ve α -SMA gibi mezenkimal hücre moleküllerinin transkripsiyonunda ve translasyonunda artışa neden olduklarını saptamışlardır. Benzer veriler çalışmamızdan da elde edilmiştir. TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde EMT'nin indüklendiği gözlemlenmiştir. Bu hücrelerde, TGF- β uyarımını takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde zamanla E-kaderin ekspresyonunun azaldığı, α -SMA ve Snail ekspresyonlarının ise arttığı bulundu. TGF- β sinyalinin bloklanması, A549 hücrelerinde EMT'nin gerilemesi ile sonuçlanır. Ding ve diğ. (2013), VitD reseptörünün Smad3 geninin bağlanacağı bölgelere bağlanarak fibrotik karaciğerde EMT'nin ilerlemesini durdurduğunu gösterdiler. VitD uygulamaları, A549 hücrelerinde sigara ekstraktı ve TGF- β tarafından azaltılan VDR sinyalleme arttırarak, bu hücrelerde Smad bağımlı TGF- β sinyal yolu aktivasyonun azalması yolu ile EMT'yi geriletir (Sari ve diğ., 2020). Çalışmamızda da VitD uygulamalarının A549 hücrelerinde TGF- β tarafından uyarılan EMT'nin gerilemesine neden olduğu belirlenmiştir. VitD uygulamaları, Snail miktarını azaltarak *CDH1* transkripsiyonunun uyarılmasına dolayısı ile E-kaderin miktarının artmasına, mezenkimal hücre farklılaşmasını önleyerek de α -SMA protein miktarının azalmasını sağladı. Western blot analiz sonuçlarımız, VitD+TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde Snail azaldığında,

CDH1 mRNA ve E-kaderin protein miktarının arttığını, *ACTA2* mRNA ve α -SMA protein miktarının azaldığını açıkça göstermektedir. Yapılan çalışmalar, serum VitD miktarı ile akciğer kanseri riski arasında ters bir ilişki olduğunu, VitD takviyesinin kansere yakalanma riskini azaltabileceğini göstermektedir (Zhang ve diğ., 2015; Wu ve diğ., 2019). *In vitro* çalışmalarda, VitD'nin VDR reseptörü bulunduran bazı akciğer kanseri hücrelerinde (NCI-H82, NCI-H209, EBC-1 ve H-520 hücre hatları) anti-proliferatif etkili olduğunu göstermektedir (Güzey ve diğ., 1998; Higashimoto ve diğ., 1998). 1,25(OH)₂D₃ ve analogları, Lewis akciğer karsinoma fare modelinde tümör bağışıklığını arttırırken, tümör nüksü ve metastazını, anjiyogenezi ve tümör hücre invazivliği etkileyerek azaltmaktadır (Prechel ve diğ., 1996; Young ve diğ., 1996; Nakagawa ve diğ., 2005). Bu veriler ışığında, VitD'nin akciğer adenokarsinom hücrelerinde EMT'yi gerileterek de tümör metastazını önlemede etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Kanserde sık rastlanan mutasyonlar ve gen kopya sayısındaki değişimler gibi genetik değişiklikler ile DNA metilasyonu ve histon protein modifikasyonları gibi epigenetik değişiklikler önemli onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin ve DNA onarım/hausekeeping genlerinin düzensizliğine neden olur. Bireylerin genomunda gözlenen DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlanmayan RNA'ların dahil olduğu epigenetik değişiklikler, bireyin fenotipik ve metabolik özelliklerine bağlı olarak malignite riskini arttırır. Bu epigenetik değişikliklerden, DNA metilasyonu ile *CDH1*, *CDH13*, *p16INK4a*, *RASSF1A*, *APC*, *RAR β* , *DAPK*, *FHIT* ve *MGMT* gibi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının baskılanması KHDAK'inde sık rastlanılan durumdur (Langevin ve diğ., 2015). DNA'nın metilasyon durumundaki bu değişiklikler, tümör oluşumu ve gelişiminde rol oynar. DNA'da CpG adacıklarının metilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonunun baskılanması ile sonuçlanır. Metilasyon, CpG adacıklarındaki sitozin bazlarının 5. karbonuna metil (CH₃) grubunun kovalent bağla eklenmesi ile gerçekleşir ve sitozin bazı 5-metilsitozin formuna modifiye olur. Metilasyon, transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotörlerine bağlanmasını engelleyerek ve diğer transkripsiyonel baskılayıcı proteinlerin de bu bölgeye bağlanmasını sağlayarak gen transkripsiyonunu bloke olması ile sonuçlanır (Suzuki ve Bird, 2008). CpG adacıklarındaki sitozinlerin metillenmesi, DNA metil transferazlar tarafından yapılır. Bu enzimlerden DNMT1, esas olarak replikasyon sırasında bakım metil transferazı görevi görürken, DNMT3A ve 3B *de novo* metilasyonda görev alır (Okano ve diğ., 1999).

KHDAK'leri DNMT miktarındaki artışlar ile karakterize edilir (Lin ve diğ., 2007). DNMT1 ekspresyonundaki değişiklikler bilinmesine rağmen, akciğer adenokarsinomunda DNMT3A'nın rolü hakkında çok şey bilinmemektedir. DNMT3A, KHDAK'lerinin % 3,82'sinde değişik ekspresyon profili sergiler (The AACR Project GENIE Consortium, 2017). Husni ve diğ., (2016), akciğer adenokarsinomunun bir alt tipinde yüksek miktarda DNMT3A ekspresyonu olduğu saptadılar. Diğer bir çalışmada, DNMT3A ekspresyonundaki artışların, akciğer kanserinde tümör hücrelerinin artmış proliferasyonuna ve metastazına neden olabileceği görüldü. Yan ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bu çalışmada, H1975, H1299 ve LLC akciğer kanser hücre hatlarında DNMT3A ekspresyonu azaldığında, genel ve *CDH1* genindeki CpG adacıklarının promotörünün hipometile olduğu ve *CDH1* transkripsiyonunun arttığı tespit edildi. *In vitro* bir çalışmada, miR-708-5p tarafından DNMT3A'nın translasyonu doğrudan engellendiğinde, A549 hücrelerinde promotör DNA metilasyon seviyelerinde önemli bir azalma ve tümör baskılayıcı gen *CDH1*'in mRNA miktarında bir artış tespit edilmiştir (Liu ve diğ., 2018). EMT, epitel karakterli hücreler arasındaki zonula adherens bağlantıların azalması nedeniyle, hücre-hücre bağlantılarının yitilmesi ile karakterize edilir. Dolayısı ile E-kaderin protein miktarının azalması, EMT başlaması için kritik öneme sahiptir. *CDH1* promotör hipermetilasyonu, E-kaderin protein miktarındaki azalmaya neden olur (Lopez ve diğ., 2012). EMT ile de metastaz arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Akciğer kanserli hastaların (n=657) tümör dokularından alınan biyopsiler üzerinde yapılan çalışmaların meta-analizi, tümör dokularında *CDH1* metilasyonunun yüksek olduğu, *CDH1* metilasyonundaki artışın sıklıkla evre III ve IV'de daha da arttığı dikkati çekmektedir (Yu ve diğ., 2015). Akciğer adenokarsinomunun evre III ve özellikle evre IV'de metastatik olabileceği bilinmektedir. TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, 5-aza-2'-deoksisitidin (DNA metilasyon inhibitörü) uygulamaları, *CDH1* geni promotör metilasyonunda azalmalara neden olarak E-kaderin protein miktarının artmasını EMT'nin gerilemesini sağlamıştır (Liu ve diğ., 2014). TGF- β uygulamaları, ovaryum kanser hücrelerinde, DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B genlerinin hem ekspresyonunu hem de aktivitesini artırır ve *CDH1* promotör hipermetilasyonuna neden olur (Cardenas ve diğ., 2014). Çalışmamızda TGF- β uygulaması A549 hücrelerinde *CDH1* promotör metilasyonunda ve DNMT3A miktarında artışa neden olmuştur. *CDH1* promotör hipermetilasyonu, *CDH1* mRNA ve E-kaderin protein miktarının azalması ile sonuçlanmıştır. Lopez ve diğ. (2012), 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ 'nin meme kanser hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerinde *CDH1* promotör demetilasyonuna neden olarak hücrelerde *de*

novo E-kaderin sentezini uyardığını buldular. Bizim çalışmamızda da *CDH1* promotör hipermetilasyonu nedeni ile TGF- β tarafından miktarı azalan *CDH1* mRNA ve E-kaderin protein miktarlarının, *CDH1* promotör demetilasyonu aracılığı ile VitD+TGF- β tarafından artırıldığı görülmektedir. Mokarram ve diğ. (2021), VitD uygulamaların nöronal kök hücrelerde *DNMT3A* ekspresyonu üzerinde herhangi bir etki yaratmadığını gözlemlediler. VitD'nin akciğer kanserinde *DNMT3A* ekspresyonu veya aktivitesi üzerindeki etkisi bilinmez. Çalışmamızda, A549 hücrelerinde TGF- β tarafından artırılan *CDH1* promotör metilasyonu ve *DNMT3A* protein miktarı, VitD+TGF- β uygulamaları ile azaltıldı. TGF- β 'nın, ovaryum kanserinde *DNMT3A* genlerinin hem ekspresyonunu hem de aktivitesini arttırdığı ve *CDH1* promotör hipermetilasyonuna neden olduğu (Cardenas ve diğ., 2014) ve VitD+CSE+TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinde TGF- β sinyalinin etkilerini azalttığı (Sari ve diğ., 2020) bilinir. Bu veriler dikkate alındığında, çalışmamızda VitD+TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinde TGF- β sinyalinin etkilerini azaltarak, *DNMT3A* miktarında azalmaya neden olduğunu ve bu durumun da *CDH1* promotör hipometilasyonu ile sonuçlanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızın verilerine dayanarak, VitD uygulamalarının, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde *CDH1* ekspresyonunu DNA demetilasyonu ile epigenetik olarak regüle edebileceğini söyleyebiliriz.

Kaiso proteini, metillenmiş CpG adacıklarına bağlanarak, gene ekspresyonunu susturan bir transkripsiyon faktörüdür ve *CDH1* promotör metilasyonunda etkilidir. Duktal karsinom ve prostat kanser hücrelerinde, Kaiso'nun *CDH1* promotöründeki metillenmiş dizilere bağlanarak, E-kaderin gen ekspresyonunu azalttığı ve EMT'ye neden olduğu belirlenmiştir (Jones ve diğ., 2012; Jones ve diğ., 2014). A549 hücrelerinde EMT'nin uyarıldığı durumlarda, Kaiso miktarının artarken, E-kaderin protein miktarı azalır. TGF- β sinyallemedeki artış, Kaiso protein miktarının artırarak EMT oluşumuna katkı sağlamaktadır (Sari ve diğ., 2020). Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde Kaisonun gen ifadesi susturulduğunda TGF- β R1 ve SMAD2 seviyelerinde bir azalma olduğu ve buna bağlı olarak EMT'nin gerilediği rapor edilmiştir (Bassey-Archibong ve diğ., 2016). Renal kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada, Kaisonun *DNMT3A* ve *DNMT3B* enzimleri ile direkt olarak etkileşmeye de, aracı moleküller ile bu metilasyon enzimlerinin metilasyon bölgelerine çekilerek genom metilasyonunu regüle ettiği sonucuna varılmıştır (Kaplun ve diğ., 2021). Bizim çalışmamızda da TGF- β tarafından A549 hücrelerinde *CDH1* promotör

hipermetilasyonunun uyarıldığı ve bu nedenle *CDH1* mRNA ve E-kaderin miktarının azaldığı durumlarda hem Kaiso hem de DNMT3A ekspresyonlarının arttığı tespit edilmiştir. Sari ve diğ. (2020), A549 hücrelerinde VitD ön uygulamalarının, TGF- β tarafından uyarılan Kaiso miktarını azaltarak, bu hücrelerde E-kaderin protein miktarının artmasına ve EMT'nin gerilemesine neden olduğunu buldular. Bizim çalışmamızda, VitD uygulamaları A549 hücrelerinde *CDH1* promotör hipometilasyonuna neden oldu. Bu hücrelerde artan *CDH1* mRNA ve E-kaderin protein miktarlarına azalan Kaiso ve DNMT3A protein miktarları eşlik etti. Buna göre, VitD'nin, Kaiso ve DNMT3A protein miktarlarının azalmasına neden olarak, *CDH1* promotör metilasyonunu regüle edebileceği söylenebilir.

Yara iyileşmesi testi, kanser çalışmalarında hücrelerin migrasyonu kapasitelerini belirlemek için kullanılır. Hücre migrasyonu, tümör hücrelerinin metastazına zemin hazırlar. TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, EMT uyarımı nedeni ile hücre migrasyonunun uyarılacağı bu nedenle, *in vitro*'da mikropipet ucu ile açılan yara bölgesinde yara kapanma hızının arttığı Jiang ve diğ., 2017; Cui ve diğ., 2019), VitD uygulamalarının da TGF- β ile uyarılan hücrelerde yara kapanma hızını yavaşlattığı rapor edilmektedir (Jiang ve diğ., 2017). Çalışmamızda 3 tekrarlı deneylerden elde edilen veriler, bu sonuçlarla ters düşmektedir. Çalışmamızda yapılması planlanan transwell migrasyonu ve invazyon analizleri, deney chamberlarının firma tarafından teslim edilememesi nedeniyle yapılamamıştır. Mevcut literatür verileri ile ters düşen sonuçlarımızın, transwell migrasyonu ve invazyon analizleri ile valide edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüm akciğer kanserler içinde en sık görülen akciğer adenokarsinomu, erken evrede belirti göstermemesi, hızlı ilerleyici tipte olması, tespit edildiğinde çoğunlukla metastatik özellik gösteren evre IV'de olması ve uzak organ metastazı varsa sağ kalım süresinin 5 ayın altına düşebilmesi gibi özellikleri nedeniyle bugün için insan sağlığını ciddi ölçüde tehdit etmektedir. TGF- β tarafından yönlendirilen EMT, akciğer adenokarsinomunda tümör metastazına katkı sağlar. EMT'nin başlangıcında, hücreleri bir arada tutan hücre-hücre bağlantı proteinlerinden E-kaderinin molekülünün miktarının azalması kritik bir öneme sahiptir. Çalışmamız, VitD uygulamalarının, *in vitro*'da, insan adenokarsinom hücrelerinde (A549 hücrelerinde) anti-kanserojenik etkilerine dair veriler sunmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar şöyle sıralanabilir: TGF- β , A549 hücrelerinde EMT'yi uyararak epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere farklılaşmasına neden olur. TGF- β , Snail, Kaiso ve

DNMT3A protein miktarını ve *CDH1* promotör hipermetilasyonunu arttırarak, *CDH1* transkripsiyonunu baskılama yönünde düzenler ve E-kaderin protein miktarının azalmasına neden olur. VitD ön uygulamaları, A549 hücrelerinde TGF- β tarafından uyarılan EMT'nin geriletilmesinde etkilidir. VitD, TGF- β sinyal yolu aktivasyonunu düşürerek, *CDH1* promotör hipometilasyonuna, *CDH1* geninin baskılayıcı transkripsiyon faktörü olan Snail proteinin miktarı ile *CDH1* promotörünün metilasyonunu sağlayan Kaiso ve DNMT3A proteinlerinin miktarlarının azalmasına neden olur. Böylece, VitD, A549 hücrelerinde *CDH1* susturumunu DNA metilasyonu üzerinden kontrol ederek, E-kaderin protein miktarının artmasını sağlar ve epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere farklılaşmasını önler. Bu sonuçlar, VitD'nin EMT'nin azaltılması yoluyla metastazın azaltılması veya önlenmesinde anti-kanserojenik terapötiklerle kombine kullanımının olabileceğine dair *in vitro*'da kanıtlar sağlamaktadır. Deneysel verilerin, klinik çalışmalarla test edilmesi, akciğer adenokarsinomunda VitD'nin kullanımının faydalı olup olmayacağını belirleyecektir.

KAYNAKLAR

- AACR Project Genie Consortium. (2017). AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer discovery*, 7(8), 818-831.
- Alar, T., & Şahin, M. E. (2012). Akciğer Kanseri: Birinci Basamakta Tanı, Tedavi ve Korunma. *Smyrna Tıp Dergisi*, 68-74.
- Aliev, C. S., & Mahmudova, F. F. (2018). Assessment of the risk of radon impact on population health of Azerbaijan. *Journal of Radiation Researches*, 5(2), 357-359.
- Aydiner, A., & Can, G. (2010). Akciğer Kanseri Tedavi ve Bakım. 10/11/2021 tarihinde http://www.akad.org.tr/userfiles/file/akciger_kanser_kitap.pdf
- Bajcsay, A., Jánváry, L. Z., Ladányi, K., Pócza, T., Major, T., & Polgár, C. (2020). Application of modern radiotherapy in lung cancer. *Magyar Onkologia*, 64(3), 255-261.
- Bikle, D. D. (2011). The vitamin D receptor: a tumor suppressor in skin. *Discov. Med.* 11, 7–17.
- Bikle, D. D. (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry & biology*, 21(3), 319-329.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bulaşıcı olmayan hastalıklar-programlar ve kanser. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser daire Başkanlığı. (2015) Ankara. <http://kanser.gov.tr/Dosya/Bilgi-Dokumanlari/ raporlar/birim.pdf>.
- Byers, L. A., & Rudin, C. M. (2015). Small cell lung cancer: where do we go from here?. *Cancer*, 121(5), 664-672.
- Cannell, J. J., Hollis, B. W., Zasloff, M., & Heaney, R. P. (2008). Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 9(1), 107-118.
- Canpolat, F., Cemil, B. Ç., Eskioğlu, F., & Han, Ü. (2009). A case with squamous cell lung cancer with skin metastasis. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji Dergisi*, 19(2), 118-121.
- Cardenas, H., Vieth, E., Lee, J., Segar, M., Liu, Y., Nephew, K. P., & Matei, D. (2014). TGF- β induces global changes in DNA methylation during the epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Epigenetics*, 9(11), 1461-1472.

- Chen, Y. T., Feng, B., & Chen, L. B. (2012). Update of research on drug resistance in small cell lung cancer chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(8), 3577-3581.
- Chen, Z., Gao, H., Dong, Z., Shen, Y., Wang, Z., Wei, W., & Jin, S. (2020). NRP1 regulates radiation-induced EMT via TGF- β /Smad signaling in lung adenocarcinoma cells. *International Journal of Radiation Biology*, 96(10), 1281-1295.
- Cheng, T. Y. D., Cramb, S. M., Baade, P. D., Youlden, D. R., Nwogu, C., & Reid, M. E. (2016). The international epidemiology of lung cancer: latest trends, disparities, and tumor characteristics. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(10), 1653-1671.
- Cheung, C. H. Y., & Juan, H. F. (2017). Quantitative proteomics in lung cancer. *Journal of biomedical science*, 24(1), 1-11.
- Cui, Q., Ren, J., Zhou, Q., Yang, Q., & Li, B. (2019). Effect of asiatic acid on epithelial-mesenchymal transition of human alveolar epithelium A549 cells induced by TGF- β 1. *Oncology letters*, 17(5), 4285-4292.
- Cui, Q., Ren, J., Zhou, Q., Yang, Q., & Li, B. (2019). Effect of asiatic acid on epithelial-mesenchymal transition of human alveolar epithelium A549 cells induced by TGF- β 1. *Oncology letters*, 17(5), 4285-4292.
- Deeb, K. K., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature reviews cancer*, 7(9), 684-700.
- Devarakonda, S., Morgensztern, D., & Govindan, R. (2015). Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *The lancet oncology*, 16(7), e342-e351.
- 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.
- 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
- Dubey, S., & Powell, C. A. (2009). Update in lung cancer 2008. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 179(10), 860-868.
- Erbaycu, E. A. (2009). Sigara İçenlerde ve İçmeyenlerde Akciğer Kanseri: Genel Özelliklerde Farklılık Var mı? *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, (2), 19.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
- Fu, X. G., Deng, J., Xu, W. J., Chen, J. Y., Sun, J., & Deng, H. (2020). Histidine decarboxylase-expressing PMN-MDSC-derived TGF- β 1 promotes the epithelial-mesenchymal transition of metastatic lung adenocarcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13(6), 1361.

García-Cuellar, C. M., Santibáñez-Andrade, M., Chirino, Y. I., Quintana-Belmares, R., Morales-Bárceñas, R., Quezada-Maldonado, E. M., & Sánchez-Pérez, Y. (2021). Particulate Matter (PM10) Promotes Cell Invasion through Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) by TGF- β Activation in A549 Lung Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12632.

GLOBOCAN 2020 Database. <https://gco.iarc.fr/>

Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D. J., Groome, P. A., Rami-Porta, R., ... & International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *Journal of thoracic oncology*, 2(8), 706-714.

Günel, N., Gülbahar, G., Öztürk, B. E., & Dural, K. (2016). Akciğer Kanseriinde Prognostik Faktörler. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory*, 7 (2), 39- 47.

Güzey, M., Sattler, C., & DeLuca, H. F. (1998). Combinational Effects of Vitamin D3 and Retinoic Acid (Alltrans and 9cis) on Proliferation, Differentiation, and Programmed Cell Death in Two Small Cell Lung Carcinoma Cell Lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 249(3), 735-744.

Hanna, N., Johnson, D., Temin, S., Baker Jr, S., Brahmer, J., Ellis, P. M., ... & Masters, G. (2017). Systemic therapy for stage IV non–small-cell lung cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*.

Hao, Y., Baker, D., & Ten Dijke, P. (2019). TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2767.

Hecht, S. S. (2011). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. In *Chemical carcinogenesis* (pp. 53-74). Humana Press.

Higashimoto, Y., Ohata, M., Nishio, K., Iwamoto, Y., Fujimoto, H., Uetani, K., ... & Saijo, N. (1996). 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid inhibit the growth of a lung cancer cell line. *Anticancer research*, 16(5A), 2653-2659.

Hirsch, F. R., Herbst, R. S., Olsen, C., Chansky, K., Crowley, J., Kelly, K., ... & Gandara, D. R. (2008). Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non–small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26(20), 3351.

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.

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/31-azerbaijan-fact-sheets.pdf>

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>

<https://oncobites.blog/tag/metastasis/>

<https://www.drozdogan.com/akciger-kanseri-evreleme-sistemi-degisti-gelin-bu-vesile-ile-belirtilerini-ve-tedavisini-gozden-gecirelim/>

Huang, A. L., Liu, S. G., Qi, W. J., Zhao, Y. F., Li, Y. M., Lei, B., ... & Shen, H. (2014). TGF- β 1 protein expression in non-small cell lung cancers is correlated with prognosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(19), 8143-8147.

Huang, C. Y., Chung, C. L., Hu, T. H., Chen, J. J., Liu, P. F., & Chen, C. L. (2021). Recent progress in TGF- β inhibitors for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 134, 111046.

Immuno-Onkoloji Derneği, Türk Akciğer Kanseri Derneği, Türk Tıbbi Onkoloji Derneği ve Türk Toraks Derneği 2016 raporu (2016). Türkiye'nin Akciğer Kanseri Haritası.

Inamura, K. (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in oncology*, 7, 193.

Jemal, A., Miller, K. D., Ma, J., Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Islami, F., ... & Thun, M. J. (2018). Higher lung cancer incidence in young women than young men in the United States. *New England Journal of Medicine*, 378(21), 1999-2009.

Jiang, F., Yang, Y., Xue, L., Li, B., & 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, X., & Mu, P. (2015). Targeting breast cancer metastasis. *Breast cancer: basic and clinical research*, 9, BCBCR-S25460.

Judd, J., & Borghaei, H. (2020). Combining immunotherapy and chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Thoracic surgery clinics*, 30(2), 199-206.

Kahata, K., Dadras, M. S., & Moustakas, A. (2018). TGF- β Family Signaling in Epithelial Differentiation and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(1), a022194.

Kang, Y., & Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118(3), 277-279.

Kaplun, D., Starshin, A., Sharko, F., Ganova, K., Filonova, G., Zhigalova, N., ... & Zhenilo, S. (2021). Kaiso regulates DNA methylation homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7587.

Katsuno, Y., Lamouille, S., & Derynck, R. (2013). TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current opinion in oncology*, 25(1), 76-84.

Kefeli, U. (2015). Akciğer Kanseriinde Sağkalımı Etkileyen Klinikopatolojik Özellikler. *Marmara Medical Journal*, 28, 21-26.

- Khullar, O. V., Liu, Y., Gillespie, T., Higgins, K. A., Ramalingam, S., Lipscomb, J., & Fernandez, F. G. (2015). Survival after sublobar resection versus lobectomy for clinical stage IA lung cancer: an analysis from the National Cancer Data Base. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(11), 1625-1633.
- Kim, C. H., Lee, Y. C. A., Hung, R. J., McNallan, S. R., Cote, M. L., Lim, W. Y., ... & Zhang, Z. F. (2014). Exposure to secondhand tobacco smoke and lung cancer by histological type: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *International journal of cancer*, 135(8), 1918-1930.
- Krimsky, W., Muganlinskaya, N., Sarkar, S., Vulchi, M., Patel, P., Rao, S., ... & Harley, D. (2016). The changing anatomic position of squamous cell carcinoma of the lung—a new conundrum. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 6(6), 33299.
- Kris, M. G., Hellmann, M. D., & Chaft, J. E. (2014). Chemotherapy for lung cancers: here to stay. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 34(1), e375-e380.
- Krishnan, A. V., & Feldman, D. (2011). Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 51, 311-336.
- Langevin, S. M., Kratzke, R. A., & Kelsey, K. T. (2015). Epigenetics of lung cancer. *Translational Research*, 165(1), 74-90.
- 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.
- Le T, Gerber DE. Newer-Generation EGFR Inhibitors in Lung Cancer: How Are They Best Used? *Cancers (Basel)*. 2019 Mar 15;11(3):366. doi: 10.3390/cancers11030366.
- Li, C., & Lu, H. (2018). Adenosquamous carcinoma of the lung. *OncoTargets and therapy*, 11, 4829.
- Lin, R. K., Hsu, H. S., Chang, J. W., Chen, C. Y., Chen, J. T., & Wang, Y. C. (2007). Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5' CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung cancer*, 55(2), 205-213.
- 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.
- Liu, H., Zhang, M., Xu, S., Zhang, J., Zou, J., Yang, C., ... & Li, Y. (2018). HOXC8 promotes proliferation and migration through transcriptional up-regulation of TGFβ1 in non-small cell lung cancer. *Oncogenesis*, 7(2), 1-15.
- Liu, T., Wu, X., Chen, T., Luo, Z., & Hu, X. (2018). Downregulation of DNMT3A by miR-708-5p inhibits lung cancer stem cell-like phenotypes through repressing Wnt/β-catenin signaling. *Clinical Cancer Research*, 24(7), 1748-1760.
- Liu, Y. Y., Han, J. Y., Lin, S. C., Liu, Z. Y., & Jiang, W. T. (2014). Effect of CDH1 gene methylation on transforming growth factor β-induced epithelial-mesenchymal transition

- in alveolar epithelial cell line A549. *Genetics and Molecular Research*, 13(4), 8568-8576.
- Lopes, N., Carvalho, J., Duraes, C., Sousa, B., Gomes, M., Costa, J. L., ... & Schmitt, F. (2012). 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ induces de novo E-cadherin expression in triple-negative breast cancer cells by CDH1-promoter demethylation. *Anticancer research*, 32(1), 249-257.
- Maeda, Y., Yamato, H., Hirai, T., Kobori, N., Fujii, T., Kobayashi, Y., ... & Nomoto, K. (1988). Antitumor and other effects of 24R, 25-dihydroxycholecalciferol in lewis lung carcinoma causing abnormal calcium metabolism in tumor-bearing mice. *Oncology*, 45(3), 202-205.
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *European Respiratory Journal*, 48(3), 889-902.
- Mao, Y., Yang, D., He, J., & Krasna, M. J. (2016). Epidemiology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 25(3), 439-445.
- Mittal, V. (2018). Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13, 395-412.
- Motoi, N., Szoke, J., Riely, G. J., Seshan, V. E., Kris, M. G., Rusch, V. W., ... & Travis, W. D. (2008). Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *The American journal of surgical pathology*, 32(6), 810-827.
- Murray, R., Bender, D., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V., & Weill, P. A. (2012). Micronutrients, Vitamins & Minerals. *Harper's Illustrated Biochemistry*. New York: McGraw Hill Medical:, 467-478.
- Myers, D. J., & Wallen, J. M. (2020). Cancer, lung adenocarcinoma. *StatPearls [Internet]*.
- Na, T. Y., Schecterson, L., Mendonsa, A. M., & Gumbiner, B. M. (2020). The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(11), 5931-5937.
- Nagasaka, M., & Gadgeel, S. M. (2018). Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 18(1), 63-70.
- Nakagawa, K., Sasaki, Y., Kato, S., Kubodera, N., & Okano, T. (2005). 22-Oxa-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis*, 26(6), 1044-1054.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y. J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21-45.
- Norton, R., & O'CONNELL, M. A. (2012). Vitamin D: potential in the prevention and treatment of lung cancer. *Anticancer research*, 32(1), 211-221.

- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257.
- Padua, D., & Massagué, J. (2009). Roles of TGF β in metastasis. *Cell research*, 19(1), 89-102.
- Perriot, J., Underner, M., Peiffer, G., & Dautzenberg, B. (2018). Help to quit smoking for smokers with COPD, asthma and lung cancer who have had surgery. *Journal of Clinical Pneumology*, 74 (3), 170-180.
- Pirker, R. (2020). Chemotherapy remains a cornerstone in the treatment of nonsmall cell lung cancer. *Current opinion in oncology*, 32(1), 63-67.
- Pooneh M, Parisa A, Saeideh S, Nasim R, Marzieh B, Morvarid S (2021). Effects of Vitamin A and D on DNA Methyltransferases 3A and 3B Expression and Neural Stem Cell Differentiation *Journal Of Leukemia*. ISSN: 2329-6917
- Prechel MM, Lozano Y, Wright MA, Ihm J, Young MR (1996). Immune modulation by interleukin-12 in tumor-bearing mice receiving vitamin D3 treatments to block induction of immunosuppressive granulocyte/macrophage progenitor cells. *Cancer Immunol Immunother*. 42(4):213-220.
- Principe, D. R., Doll, J. A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H. G., Bartholin, L., & Grippo, P. J. (2014). TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106(2).
- Qian, X., Liu, J., Sun, Y., Wang, M., Lei, H., Luo, G., ... & Tang, Y. (2016). Circulating cell-free DNA has a high degree of specificity to detect exon 19 deletions and the single-point substitution mutation L858R in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(20), 29154.
- Radzikowska, E., Roszkowski, K., & Głaz, P. (2001). Lung cancer in patients under 50 years old. *Lung cancer*, 33(2-3), 203-211.
- Ramesh, V., Brabletz, T., & Ceppi, P. (2020). Targeting EMT in cancer with repurposed metabolic inhibitors. *Trends in cancer*, 942-950
- Relli, V., Trerotola, M., Guerra, E., & Alberti, S. (2019). Abandoning the notion of non-small cell lung cancer. *Trends in molecular medicine*, 25(7), 585-594.
- Riihimäki, M., Hemminki, A., Fallah, M., Thomsen, H., Sundquist, K., Sundquist, J., & Hemminki, K. (2014). Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung cancer*, 86(1), 78-84.
- Rivera, G. A., & Wakelee, H. (2016). Lung cancer in never smokers. *Lung Cancer and Personalized Medicine*, 43-57.
- Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., & Chan, T. A. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230), 124-128.

- Rodgman, A., & Perfetti, T. A. (2008). *The chemical components of tobacco and tobacco smoke*. CRC press.
- Rossi, A., & Di Maio, M. (2016). Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: optimal number of treatment cycles. *Expert review of anticancer therapy*, 16(6), 653-660.
- Salazar, M. C., Rosen, J. E., Wang, Z., Arnold, B. N., Thomas, D. C., Herbst, R. S., ... & Boffa, D. J. (2017). Association of delayed adjuvant chemotherapy with survival after lung cancer surgery. *JAMA oncology*, 3(5), 610-619.
- Sari, E., Oztay, F., & Tasci, A. E. (2020). Vitamin D modulates E-cadherin turnover by regulating TGF- β and Wnt signalings during EMT-mediated myofibroblast differentiation in A459 cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 202, 105723.
- Schwartz, A. G., & Cote, M. L. (2016). Epidemiology of lung cancer. *Lung Cancer and Personalized Medicine*, 21-41.
- Sheen, S., Lee, K. S., Chung, W. Y., Nam, S., & Kang, D. R. (2016). An updated review of case-control studies of lung cancer and indoor radon-Is indoor radon the risk factor for lung cancer?. *Annals of occupational and environmental medicine*, 28(1), 1-9.
- Shi, J., Li, F., Luo, M., Wei, J., & Liu, X. (2017). Distinct roles of Wnt/ β -catenin signaling in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mediators of inflammation*, 1-16
- Shim, H. S., Lee, D. H., Park, E. J., & Kim, S. H. (2011). Histopathologic characteristics of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutations in the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society lung adenocarcinoma classification. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(10), 1329-1334.
- Shu, J., Wang, L., Han, F., Chen, Y., Wang, S., & Luo, F. (2019). BTBD7 downregulates E-cadherin and promotes epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. *BioMed research international*, 1-11
- Soltanov, A. A. (2009). Geographic spreading of lung cancer in Azerbaijan. *Georgian medical news*, (166), 94-98.
- Songyang, Y., Song, T., Shi, Z., Li, W., Yang, S., & Li, D. (2021). Effect of vitamin D on malignant behavior of non-small cell lung cancer cells. *Gene*, 768, 145309.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

- Suresh, K., Naidoo, J., Lin, C. T., & Danoff, S. (2018). Immune checkpoint immunotherapy for non-small cell lung cancer: benefits and pulmonary toxicities. *Chest*, 154(6), 1416-1423.
- Suster, D. I., & Mino-Kenudson, M. (2020). Molecular pathology of primary non-small cell lung cancer. *Archives of Medical Research*, 784-798
- Şencan İ, Keskinçiliç B. (2015). Türkiye Kanser İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
- Taştepe, A. İ. (1998). Akciğer Kanseri Güncel Tanı ve Tedavi Yaklaşımı, (Editör: Abdullah İrfan Taştepe), Akciğer Kanseri Etiyolojisi, Derman Tıbbi Yayıncılık, Ankara.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., & Yankelwitz, D. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology*, 6(2), 244-285.
- Trump, D. L., Muindi, J., Fakih, M., Yu, W. D., & Johnson, C. S. (2006). Vitamin D compounds: clinical development as cancer therapy and prevention agents. *Anticancer research*, 26(4A), 2551-2556.
- Tsoukalas, N., Aravantinou-Fatorou, E., Tolia, M., Giaginis, C., Galanopoulos, M., Kiakou, M., ... & Theocharis, S. (2017). Epithelial–mesenchymal transition in non small-cell lung cancer. *Anticancer Research*, 37(4), 1773-1778.
- Turkish Thoracic Society, (2013) Lung and Pleural Malignancies Study Group. Prognostic factors affecting survival in cases with lung cancer [A Lung Cancer Mapping Project in Turkey (LCMPT)]. Abstract Number 852840.
- Videtic, G. M. (2015). The role of radiotherapy in small cell lung cancer: a revisit. *Current oncology reports*, 17(8), 1-6.
- Wang, W., Hu, W., Xue, S., Chen, Q., Jiang, Y., Zhang, H., & Zuo, W. (2020). Vitamin D and Lung Cancer; Association, Prevention, and Treatment. *Nutrition and Cancer*, 1-13.
- Wilson, L. R., Tripkovic, L., Hart, K. H., & Lanham-New, S. A. (2017). Vitamin D deficiency as a public health issue: using vitamin D2 or vitamin D3 in future fortification strategies. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76(3), 392-399.
- Wu, X., Hu, W., Lu, L., Zhao, Y., Zhou, Y., Xiao, Z., ... & Li, M. (2019). Repurposing vitamin D for treatment of human malignancies via targeting tumor microenvironment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(2), 203-219.
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*, 19(2), 156-172.

- Yan, F., Shen, N., Pang, J., Xie, D., Deng, B., Molina, J. R., & Liu, S. (2014). Restoration of miR-101 suppresses lung tumorigenesis through inhibition of DNMT3a-dependent DNA methylation. *Cell death & disease*, 5(9), e1413-e1413.
- Yang, B., Zhang, W., Zhang, M., Wang, X., Peng, S., & Zhang, R. (2020). KRT6A promotes EMT and cancer stem cell transformation in lung adenocarcinoma. *Technology in cancer research & treatment*, 19, 1533033820921248.
- Ye, Y., Liu, S., Wu, C., & Sun, Z. (2015). TGF β modulates inflammatory cytokines and growth factors to create premetastatic microenvironment and stimulate lung metastasis. *Journal of molecular histology*, 46(4), 365-375.
- Yıldırım, C. H., Ergen, A. Ş., Tiken, E. E., Zalova, G., Turna, H., Öksüz, Ç. D., & Dinçbaş, Ö. F. (2015). Sınırlı evre küçük hücreli akciğer kanseri: Tedavi sonuçları ve prognostik faktörler. *Türk Onkoloji Dergisi*, 30 (4), 188-194.
- Yılmazbayhan, D., & Özlük, Y. (2010). Küçük Hücre Dışı Akciğer Karsinomlarında Patoloji. DOI: 10.4328/JCAM.35.
- Yildirim, M., Oztay, F., Kayalar, O., & Tasci, A. E. (2021). Effect of long noncoding RNAs on epithelial–mesenchymal transition in A549 cells and fibrotic human lungs. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1-15
- Yilmaz, M., Christofori, G., & Lehenbre, F. (2007). Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends in molecular medicine*, 13(12), 535-541.
- Yokuş, B., & Çakır, Ü. D. (2012). Kanser Biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1 (2): 7-18.
- Young, M. R. I., Lozano, Y., Ihm, J., Wright, M. A., & Prechel, M. M. (1996). Vitamin D3 treatment of tumor bearers can stimulate immune competence and reduce tumor growth when treatment coincides with a heightened presence of natural suppressor cells. *Cancer letters*, 104(2), 153-161.
- Yu, Q., Guo, Q., Chen, L., & Liu, S. (2015). Clinicopathological significance and potential drug targeting of CDH1 in lung cancer: A meta-analysis and literature review. *Drug design, development and therapy*, 9, 2171.
- Yu, Y., Lin, Y., Yang, G., & Tian, L. (2018). The interplay between TGF- β /SMAD and BMP/SMAD signaling pathways in the epithelial mesenchymal transition of A549 cells induced by silica. *Toxicology mechanisms and methods*, 28(4), 286-292.
- Zhang, L., Wang, S., Che, X., & Li, X. (2015). Vitamin D and lung cancer risk: a comprehensive review and meta-analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(1), 299-305.
- Zhang, Y., Liu, Z., Li, S., Wang, M., Dai, D., Jing, H., & Liu, L. (2020). Upregulation of E-cadherin in bronchoalveolar lavage fluid-derived exosomes in patients with lung cancer. *Thoracic cancer*, 11(1), 41-47.

Zhou, C., Wu, Y. L., Chen, G., Liu, X., Zhu, Y., Lu, S., & Yin, A. Y. (2015). BEYOND: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, phase III study of first-line carboplatin/paclitaxel plus bevacizumab or placebo in Chinese patients with advanced or recurrent nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(19), 2197-2204.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gülner MAHMUDOVA
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bakü Devlet Üniversitesi
Fakülte	Biyoloji
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	01.01.2019

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

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	