



**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA RADYOTERAPİ
ÖNCESİ/SONRASI SERUMDA VİTAMİN D,
PHOSPHOINOSITIDE-3-KINASE, PROTEİN-KINASE B,
HYPOXIA-INDUCIBLE-FACTOR-1 ALPHA
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Muhammed KÖKPİNAR
Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ

Doktora Tezi-2024



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA RADYOTERAPİ
ÖNCESİ/SONRASI SERUMDA VİTAMİN D,
PHOSPHOINOSİTİDE-3-KİNASE, PROTEİN-KİNASE B,
HYPOXİA-INDUCIBLE-FACTOR-1 ALPHA
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Muhammed KÖKPİNAR

**Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ**

**ERZURUM
2024**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Akciğer Kanseri Tanım, Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Risk Faktörleri.....	4
2.2. Akciğer Kanseri Histopatolojisi ve Prognozu.....	6
2.2.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)	7
2.2.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)	7
2.3. Akciğer Kanseri Evreleme	8
2.4. Akciğer Kanseri Semptom ve Klinik Bulgular.....	10
2.5. Akciğer Kanseri Tanı	10
2.6. Akciğer Kanseri Tedavi	13
2.7. Vitamin D ve KHDAK İlişkisi.....	14
2.8. Hypoxia-inducible-factor-1 alpha ve KHDAK İlişkisi.....	18
2.9. Phosphoinositide-3-kinase ve KHDAK İlişkisi	22
2.10. Protein-kinase B ve KHDAK İlişkisi	24
3. MATERYAL VE METOT	28
3.1. Çalışma ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi	28
3.2. Numunelerin Toplanması ve Hazırlanması.....	29

3.3. Kullanılan Cihaz, Kit ve Malzemeler	30
3.4. Analiz Yöntemi: ELISA	30
3.5. İstatistiksel Ölçümler	38
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR	65
EKLER	71
EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	71
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	72

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı kıymetli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yanımda olan, bilimin ve biyokimyanın felsefesini öğreten danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a en içten saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez kapsamında numunelerin toplanmasında büyük emekleri olan Tez İzleme Komitesi Üyesi Doç. Dr. Hilal KIZILTUNÇ ÖZMEN'e, Tez İzleme Komitesi Üyesi Doç. Dr. Esra LALOĞLU'na, akademik ve laboratuvar deneyimlerini esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hocalarına ve personellerine, çalışmalarım sırasında ilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Halil İbrahim ÖZKAN'a ve Arş. Gör. Neslihan YÜCE'ye, istatistiksel analizlerin yapılması ve yorumlanmasında emeği geçen Doç. Dr. Sinan YILMAZ'a, bu çalışmayı **TDK-2022-10915** nolu proje numarası kapsamında destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, eğitim öğretim dönemim boyunca beni sabırla destekleyen eşime ve aileme teşekkür ederim.

Muhammed KÖKPINAR

ÖZET

Akciğer Kanseri Hastalarda Radyoterapi Öncesi/Sonrası Serumda Vitamin D, Phosphoinositide-3-Kinase, Protein-Kinase B, Hypoxia-Inducible-Factor-1 Alpha Seviyelerinin Belirlenmesi

Amaç: Bu doktora tezinin amacı, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) tanısı alıp kemoradyoterapi öncesi ve sonrası serumlarında 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PI3K, PKB seviyelerini tespit etmek, birbirleri arasındaki korelasyonu belirlemek, böylece hastanın tanı, tedavi, takip ve prognozuna katkı sağlamaktır.

Materyal ve Metot: Çalışmanın deney grubunu Atatürk Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi Bölümü'nde KHDAK tanısı alıp radyoterapi uygulanan hastalardan randomize seçilen 40-85 yaş arası 50 hasta oluşturmaktadır. Kontrol grubunu ise 40-72 yaş arası 30 sağlıklı birey oluşturmaktadır. Hasta ve kontrol serumlarının HIF1 α , PI3K, PKB, 1,25(OH)₂D₃ düzeyleri ELISA yöntemiyle spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bunun için de hasta grubundan RT öncesinde ve sonrasında iki defa; kontrol grubundan ise bir defa sekiz saat gece açlığının ardından venöz kan örnekleri alınmıştır.

Bulgular: Çalışma grubunda radyoterapi öncesi ve sonrası Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi'ne göre HIF1 α ve PKB parametrelerinde anlamlı fark görülürken PI3K ve 1,25(OH)₂D₃'te görülmedi. Hasta grubunda RT öncesi Spearman korelasyon analizinde tüm parametreler arasında anlamlı pozitif yönlü ilişki mevcuttu. Hasta grubunda RT sonrası 1,25(OH)₂D₃ ile HIF1 α ; 1,25(OH)₂D₃ ile PI3K ve HIF1 α ile PI3K arasında anlamlı pozitif yönlü ve orta düzeyli korelasyon bulundu. RT öncesi çalışma grubuyla sağlıklı kontrol grubu arasında karşılaştırma yapmak için gerçekleştirilen MWU testine göre gruplar arasında 1,25(OH)₂D₃ ve PKB dağılımları yönünden anlamlı düzeyde fark vardı. Sağlıklı kontrol grubunda PKB ile PI3K arasında anlamlı, pozitif yönlü ve yüksek düzeyde ilişki vardı. ROC analizine göre 1,25(OH)₂D₃ ve PKB'nin KHDAK'ni öngörmesi açısından tanısal biyobelirteç değerinin olduğu, HIF1 α ve PI3K'nin ise tanısal değerinin olmadığı tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızda kemoradyoterapi öncesi ve sonrası 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PKB ve PI3K ile KHDAK arasında anlamlı ilişkiler tespit edildi. Bu dört parametrenin hasta tanı, prognoz, takip ve tedavisine yardımcı birer biyobelirteç olabileceği sonucuna varıldı. Daha geniş katılımlı ve farklı kanser türleriyle bu parametreleri ele alan kapsamlı çalışmaların yapılmasının konuyu daha iyi aydınlatacağı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, hypoxia-inducible-factor-1 alpha, phosphoinositide-3-kinase, protein-kinase B, radyoterapi, vitamin D

ABSTRACT

Measurement of Vitamin D, Phosphoinositide-3-kinase, Protein-kinase B, Hypoxia-inducible-factor-1 alpha levels in serum before/after radiotherapy patients with lung cancer

Aim: The aim of this doctoral thesis is to determine the levels of $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$, HIF1 α , PI3K, and PKB in the serum of patients diagnosed with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) before and after chemoradiotherapy, to determine the correlation between them, and thus to contribute to the diagnosis, treatment, follow-up and prognosis of the patient.

Material and method: The experimental group of the study consisted of 50 patients between the ages of 40-85 who were randomly selected from among patients diagnosed with NSCLC and treated with radiotherapy at the Radiation Oncology Department of Atatürk University. The control group consisted of 30 healthy individuals between the ages of 40-72. HIF1 α , PI3K, PKB, $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ levels of patient and control sera were measured spectrophotometrically using the ELISA method. For this purpose, venous blood samples were taken twice from the patient group, before and after RT, and once from the control group after an eight-hour overnight fast.

Results: In the study group, according to the Wilcoxon Paired Two Sample Test before and after radiotherapy, there was a significant difference in HIF1 α and PKB parameters, but not in PI3K and $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$. In the patient group, there was a significant positive correlation between all parameters in the Spearman correlation analysis before RT. In the patient group, a significant positive and moderate correlation was found between $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and HIF1 α ; $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and PI3K; and HIF1 α and PI3K after RT. According to the MWU test performed to compare the study group and the healthy control group before RT, there was a significant difference between the groups in terms of $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and PKB distributions. In the healthy control group, there was a significant, positive and high-level correlation between PKB and PI3K. According to ROC analysis, it was determined that $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and PKB had diagnostic biomarker value in predicting NSCLC, while HIF1 α and PI3K did not have diagnostic value.

Conclusion: In our study, meaningful relationships were detected between $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$, HIF1 α , PKB and PI3K and NSCLC before and after chemoradiotherapy. It was concluded that these four parameters could be biomarkers that could help in patient diagnosis, prognosis, follow-up and treatment. It was concluded that conducting comprehensive studies with wider participation and different cancer types addressing these parameters would shed more light on the subject.

Key Words: Lung cancer, hypoxia-inducible-factor-1 alpha, phosphoinositide-3-kinase, protein-kinase B, radiotherapy, vitamin D

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
1,25(OH) ₂ D ₃	: 1,25-dihydroxyvitamin D ₃
Ac-CoA	: Asetil-Koenzim A
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
AUC	: Area under Curve, Eğri altında kalan alan
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CBEP	: Cyclic AMP response element-binding protein
CRP	: C-reaktif protein
CV	: Değişkenlik Katsayısı, Varyasyon katsayısı
CYP24A1	: 25-hidroksivitamin D-24-hidroksilaz enzimi. Kalsitriolün 24-hidroksilasyonunu içeren reaksiyonları katalize eden P450 ailesi üyesi bir mitokondriyal monooksijenaz
CYP27B1	: Renal 25-hidroksivitamin D-1α-hidroksilaz enzimi
CYP2R1	: Hepatik D vitamini-25-hidroksilaz enzimi
D ₂	: Ergokalsiferol
D ₃	: Kolekalsiferol
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ, WHO	: Dünya Sağlık Teşkilatı, World Health Organization
EIA	: Enzim Immuno Assay
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentetaz
FH	: Fumarat hidrataz
FIH	: HIF'i önleyen faktör (Asparajinil hidroksilazdır)
GA	: Güven Aralığı
GGT	: Gama glutamil transferaz
GLOBOCAN	: Dünyanın birçok ülkesinde ulusal düzeyde, başlıca kanser türlerinin insidansı, mortalitesi ve prevalansı hakkında, ülkelerin geçmiş yıllardaki verileri kullanılarak güncel tahminler sunmak amacıyla oluşturulan proje

GSTF	: Gene spesifik transkripsiyon faktörleri
Gy	: Gray, birim zamanda soğurulan doz miktarı
HIF1α	: Hypoxia-inducible-factor-1 alpha
HRE	: Hipoksiye cevap elemanları
IDH	: İzositrat dehidrojenaz
IGF-1R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IQR, Q3-Q1	: Çeyreklikler arası aralık
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
MAPK	: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MAPK	: Mitojen aktif protein kinaz
MDM2	: Murine double minute 2, p53 tümör baskılayıcı genini negatif olarak kontrol altında tutan gen
mL	: Mililitre
MR	: Magnetik Rezonans Görüntüleme
mTOR	: Mammalian target of rapamycin
MWU	: Mann-Whitney U testi
n	: Örneklem büyüklüğü
ng	: Nanogram
Ort	: Ortalama
p	: Anlamlılık düzeyi, Probability
p300	: CBP ile birlikte transkripsiyonel ko-aktivatör protein
p53	: Tümör baskılayıcı gen
PDK	: Piruvat dehidrojenaz kinaz
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
pg	: Pikogram
PHD	: Oksijene bağımlı prolil hidroksilaz
PI3K	: Phosphoinositide-3-kinase
PIP-3	: Fosfoinozitol-3-fosfat
PKB, AKT	: Protein-kinase B
pmol	: Pikomol
PTEN	: Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu
Q1-Q3	: Birinci dörttebirlik ile üçüncü dörttebirlik arasındaki açıklık
r, R	: Korelasyon katsayısı

Ras/Raf	: Ras Associated Factor, G-Proteini türünde bir proto-onkogen ve bunu kodlayan gen
ROC	: Receiver Operating Characteristic, işlem karakteristiği eğrisi, testin ayırt edicilik oranı
ROS1	: Hücre membranında bulunan protein yapıdaki tirozin kinaz reseptörünü kodlayan gen
rpm	: Revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı
RT	: Radyoterapi
RTK	: Tirozin kinaz reseptörleri
SCC	: Skuamöz yassı hücreli karsinom
SD, SS	: Standart Sapma, Standart Deviation
SDH	: Süksinat dehidrojenaz
TCA	: Krebs döngüsü, sitrik asit döngüsü, Trikarboksilik asit
TNM	: Tümör, lenf nodu, metastaz
USG	: Ultrasonografi
VATS	: Video Yardımlı Göğüs Cerrahisi
VDR	: Vitamin D reseptörü
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
W	: Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi
Z Skoru	: Sayısal veriler üzerinde uygulanan ve değerlerin ortalamaya göre konumunu belirleyen puan

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Türkiye’de her yaş ve cinsiyetten kanser tanısı alan yeni vaka oranları	5
Şekil 2.2. Akciğer kanserinin histopatolojik sınıflandırması	7
Şekil 2.3. Vitamin D sentezi ve metabolizması.	15
Şekil 2.4. PI3K/AKT/mTOR sinyal yoluna genel bakış	16
Şekil 2.5. Vitamin D’nin KHDAA’nde Warburg etkisi.....	17
Şekil 2.6. HIF-1 α ’nın oksijene bağımlı düzenlenmesi.....	19
Şekil 2.7. CBP/p300’ün kontrol mekanizmaları. Ac: asetil grubu	20
Şekil 2.8. Akciğer kanserinde CBP/p300 mutasyonunun etki mekanizması	20
Şekil 2.9. HIF-1 α ve mitokondriyal fonksiyonu	21
Şekil 2.10. Ekspresyonu HIF-1 α ’nın aktivasyon durumuyla bağlantılı olan ve EMT ile sonuçlanan genler.....	22
Şekil 2.11. IGF-1R sistemi ve ilgili reseptörler.	24
Şekil 2.12. ROS1 geninin kodladığı tirozin kinaz reseptörünün görevleri	25
Şekil 2.13. AKT substratlarının hücrel fonksiyonları.	26
Şekil 2.14. Kanserde PKB/AKT genel mekanizması.....	27
Şekil 2.15. PI3K/Akt/mTOR sinyal yollarının kanser gelişimine katılımı	27
Şekil 4.1. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi ve sonrası 1,25(OH) $_2$ D3 dağılımı.....	43
Şekil 4.2. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi ve sonrası HIF1 α dağılımı	43
Şekil 4.3. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi ve sonrası PKB dağılımı.....	44
Şekil 4.4. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi ve sonrası PI3K dağılımı	44
Şekil 4.5. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi parametrelerin saçılım grafiğı	45
Şekil 4.6. Çalışma grubunda radyoterapi sonrası parametrelerin saçılım grafiğı	46
Şekil 4.7. RT öncesi çalışma (hasta) ve kontrol grubunda 1,25(OH) $_2$ D3 dağılımı	48

Şekil 4.8. RT öncesi çalışma (hasta) ve sağlıklı kontrol grubunda HIF1 α dağılımı	48
Şekil 4.9. RT öncesi çalışma (hasta) ve sağlıklı kontrol grubunda PKB dağılımı	49
Şekil 4.10. RT öncesi çalışma (hasta) ve sağlıklı kontrol grubunda PI3K dağılımı	49
Şekil 4.11. Sağlıklı kontrol grubunda parametrelerin saçılım grafiği	50
Şekil 4.12. Çalışma grubunun RT öncesi/sonrası ile kontrol grubuna ait 1,25(OH) $_2$ D3'ün grafiği	51
Şekil 4.13. Çalışma grubunun RT öncesi/sonrası ile kontrol grubuna ait HIF1 α 'nın grafiği	51
Şekil 4.14. Çalışma grubunun RT öncesi/sonrası ile kontrol grubuna ait PKB'nin grafiği	52
Şekil 4.15. Çalışma grubunun RT öncesi/sonrası ile kontrol grubuna ait PI3K'nin grafiği	52
Şekil 4.16. 1,25(OH) $_2$ D3 (Dvit3), HIF1 α , PKB ve PI3K parametrelerinin ROC eğrisi .	54

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Akciğer kanseri TNM evreleme sistemi.....	9
Tablo 2.2. Akciğer kanserinde metastaz ve sıklığı.....	10
Tablo 3.1. Kullanılan cihaz, kit ve malzemeler.....	30
Tablo 3.2. Kullanılan kitlerin ölçüm parametreleri	38
Tablo 3.3. Korelasyon katsayısı (r) değerlendirme cetveli	39
Tablo 4.1. Grupların sosyal demografik özelliklerine ait tanımlayıcı bilgiler	41
Tablo 4.2. Grupların yaş dağılımına göre karşılaştırılması.....	41
Tablo 4.3. Çalışma grubuna ilişkin 1,25(OH) ₂ D ₃ , HIF1 α , PKB, ve PI3K değişkenlerinin RT öncesi ve sonrası karşılaştırılması	42
Tablo 4.4. Hasta grubunda radyoterapi öncesi parametreler arası ilişkiler.....	45
Tablo 4.5. Hasta grubunda radyoterapi sonrası parametreler arası ilişkiler	46
Tablo 4.6. Parametrelerin kontrol grubu ve radyoterapi öncesi çalışma grubuyla karşılaştırılması	47
Tablo 4.7. Sağlıklı kontrol grubunda parametreler arası ilişkiler.....	50
Tablo 4.8. 1,25(OH) ₂ D ₃ , HIF1 α , PKB, ve PI3K değişkenlerine ait ROC tablosu	53

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, akciğer dokusu hücrelerinin ihtiyaç ve kontrol dışı çoğalarak akciğer içinde veya diğer organlarda kitle (metastaz) oluşturmalarıdır. Dünya Sağlık Teşkilatı (DSÖ) verilerine göre akciğer kanseri dünyada en sık görülen ve en fazla ölüme neden olan kanser türüdür. Akciğer kanserleri içerisinde de çoğu vakayı küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) oluşturur (İnal ve ark., 2013).

Radyoterapi (RT) iyonlaştırıcı ışınlarla sağlam dokuya zarar vermeden kanserli hücreleri planlı, kontrollü ve bölgesel olarak yok etmektir. RT küçük hücreli dışı akciğer kanseri vakalarının çoğunda küratif ve palyatif tedavilerin yanında en az bir kez uygulanmaktadır (Brown ve ark., 2019).

Vitamin D, Protein-kinase B (PKB, AKT), Phosphoinositide-3-kinase (PI3K) ve Hypoxia-inducible-factor-1 alpha (HIF1 α) kanserde önemli dört parametredir. Vitamin D antikanserojen etkili kolesterolden sentezlenen hormon benzeri bir vitamindir. PKB hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminde, embriyogeneze, proliferasyon, büyüme, farklılaşma ve fosforilasyonda önemli rol oynar. PKB uyarısındaki değişiklik apoptoz mekanizmasını bozarak karsinogenezi başlatır. PI3K kanserde etkin rol oynayan fosfo inozitol-3-fosfatı fosforlayarak aktive eder. Bu aktiflenme AKT1'i uyararak PI3K/AKT sinyal iletim yolunu aktive eder. Kanserli hücrelerde AKT ve PI3K sentezinin artışı beklenir. HIF1 α dokuların oksijen seviyelerini, protein stabilizasyonunu, hücre içi lokalizasyonunu ve transkripsiyonunu etkiler. PI3K/AKT1 sinyal iletim yolunda PI3K ve AKT1, HIF1 α 'nın pozitif düzenleyicisidir. Hipoksik koşullarda HIF1 α seviyesinin yükselmesi beklenir. Radyoterapi en iyi etkiyi oksijen varlığında gösterir. HIF1 α yüksekliğinde radyoterapinin etkinliği azalacağı için radyoterapi öncesi HIF1 α seviyesinin ölçülmesi ve diğer parametrelerle ilişkisinin belirlenmesi hayati önem arz etmektedir (N. Calapoğlu, 2016; Doğan & Güç, 2004; Liu ve ark., 2017).

Ulusal ve uluslararası literatür taramasında akciğer kanserinin ve radyoterapinin bu dört parametre üzerinde etkili olduğunu kanıtlayan farklı çalışmalara ulaşılmış, ancak insan serumunda bu dört parametrenin birlikte değerlendirilerek aralarındaki ilişkinin saptandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez konusu, bu dört parametrenin radyoterapi öncesi ve sonrası kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak tespiti, akciğer kanserinin erken tanısına (erken evrede biyopsi alınmasına), prognozuna ve tedavinin etkin olup olmadığına yardımcı olması konusunda bilime ışık tutması ve literatürdeki eksikliğin giderilmesi açısından duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek özgün bir çalışmadır.

Bu doktora tezinin amacı, KHDAK tanısı alıp RT tedavisi alacak hastalarda kemoradyoterapi öncesi ve sonrası serumlarında $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, HIF1 α , PKB ve PI3K seviyelerini tespit etmek ve birbirleri arasındaki korelasyonu belirlemektir. Çalışma sonunda bu parametrelerin sonuçlarının sağlıklı kontrol grubundan ve RT öncesi değerlerden farklı çıkması, örneğin PKB ve PI3K için beklenenden yüksek olması durumunda “imatinib gibi AKT inhibitörü, arrestin gibi PI3K inhibitörü mü verilecek?”, D vitamini eksikliğinde ise “vitamin D takviyesi mi yapılacaktır?” şeklinde hekime yol gösterecektir. PI3K yolu HIF’i aktive ettiği için PI3K/AKT inhibitörü HIF’in de negatif regülatörüdür. Dolayısıyla HIF, vitamin D, PI3K ve AKT’yi normal seviyede tutmak kemoradyoterapinin etkinliğini artıracaktır. Bu kapsamda çalışmaya ait araştırma aşağıdaki sorulara cevap aramaktadır:

a. RT öncesi ve sonrası akciğer kanserli kişilerde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, HIF1 α , PKB ve PI3K seviyeleri arasındaki ilişki nedir?

b. Akciğer kanseri gelişiminde, prognozunda ve RT tedavi protokolünde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, HIF1 α , PKB ve PI3K’nin rolü nedir?

Çalışmanın başarıyla sonuçlanması akciğer kanserinde erken evrede biyopsiye gidilerek erken teşhise yardımcı olabilecek, hastalığın prognoz parametrelerini destekleyebilecek ve RT tedavisinin etkinliğini takip parametrelerinde klinisyene yardımcı olabilecektir. Akciğer kanserinin ve RT'nin bu parametreler üzerine etkisi ve birbirleri arasındaki ilişki tespit edilebilecektir. Bu parametrelerin beklenenden yüksek veya düşük çıkmasına bağlı olarak hekim, hastanın tedavi protokolünü değiştirebilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri Tanım, Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Risk Faktörleri

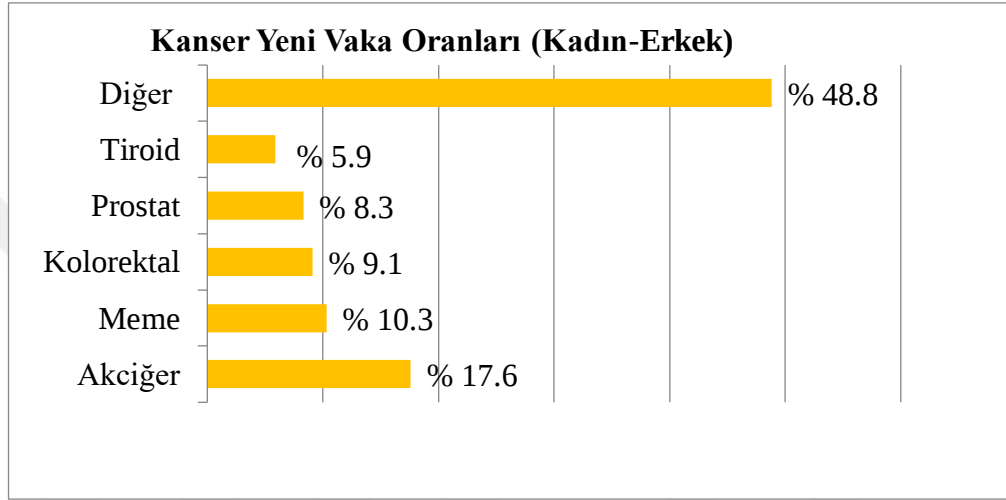
Kanser, vücudun herhangi bir hücresinin normal kontrol mekanizmalarının dışında anormal miktarda çoğalmasıdır. Kanser, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşiminin bir sonucudur. Bu çoğalmanın sonucu olarak hücrenin metabolik ihtiyacını karşılayabilmesi için anjiogenez denilen var olan damarlardan yeni damarlar oluşturması gerekir. Metastaz için bu gerekli bir yoldur. Akciğer kanseri, akciğer dokusu hücrelerinin ihtiyaç ve kontrol dışı çoğalarak akciğer içinde veya vücudun diğer organlarında kitle oluşturmasıdır (Küçükkaya ve ark., 2018).

Akciğer kanseri dünya genelinde her yıl yaklaşık 1.6 milyon (1.1 milyon erkek ve 500 bin kadın) insanın ölümüne neden olan yaygın bir hastalıktır. Akciğer kanserinin karakteristik özellikleri ileri evrede teşhis konma, agresif ilerleme ve sistemik tedavilere olumlu yanıt vermedir. Akciğer kanseri kanserden ölümlerde erkeklerde birinci, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Tedavi tekniklerinin gelişmesine rağmen hastaların beş yıllık sağkalım oranı %10-20 arasındadır. Erken evrede bilgisayarlı tomografi (BT) ile tespit edilebilmesine rağmen tüm kanserler içerisindeki ölüm oranı %20 seviyelerindedir (Dirican ve ark., 2016).

Akciğer kanseri olgularının %85'i sigara ile ilişkili olup dünyada kanserden ölüm oranlarında birinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde ise akciğer kanserinin sigara ile ilişkisi 2013-2018 yılları arasında %90 oranındadır (Erbaycu, 2020).

Türkiye'de 2018 yılında yeni kanser tanısı alan hasta sayısı 210 bin civarında iken, 2020 yılında bu sayı yaklaşık 233 bine yükselmiştir. Benzer şekilde 2018 yılında Türkiye'de kansere bağlı ölüm sayısı yaklaşık 116 bin iken, 2020 yılında bu sayı 126 bini geçmiştir (Globocan, 2020).

2020 yılı istatistiklerine göre her kadın/erkek cinsiyet ve her yaştan kanser tanısı konulan yeni vaka sayısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir Buna göre Türkiye’de 2020 yılında en çok görülen kanser türleri sırasıyla akciğer kanseri (%17.6), meme kanseri (%10.3), kolorektal kanser (%9.1), prostat kanseri (%8.3) ve tiroid kanseri (%5.9)’dir. Ayrıca bu beş kanser türü, tüm kanserlerin %50’sinden fazlasını oluşturmaktadır (Globocan, 2020).



Şekil 2.1. Türkiye’de her yaş ve cinsiyetten kanser tanısı alan yeni vaka oranları

Uranyum bozunmasıyla ortaya çıkan radon gazı, asbestozis, kömür, radyasyon, pasif sigara içiciliği, çeşitli metaller, organik kimyasallar, kirletici maddeler, tüberküloz geçirme öyküsü, arsenik, egzoz partikülleri ve birçok mesleki maruziyetler (lastik üretimi, taş döşeme, çatı kaplama, baca temizleyiciliği gibi) çevresel toksinler olarak akciğer kanseri için diğer risk faktörleridir (Bayram, 2019).

Diyet ile ilgili risk faktörleri beta karoten, C vitamini ve alfa-tokoferolün serumda düşük olması, ekmek, pirinç, kırmızı et, süt ürünleri, bitkisel ve hayvansal yağlar başta olmak üzere birçok gıda sayılabilir. Sebze, meyve ve ayçiçek yağının akciğer kanseri için koruyucu olabileceğini destekleyen çalışmalar mevcuttur (Alıcı & Şimşek, 2022).

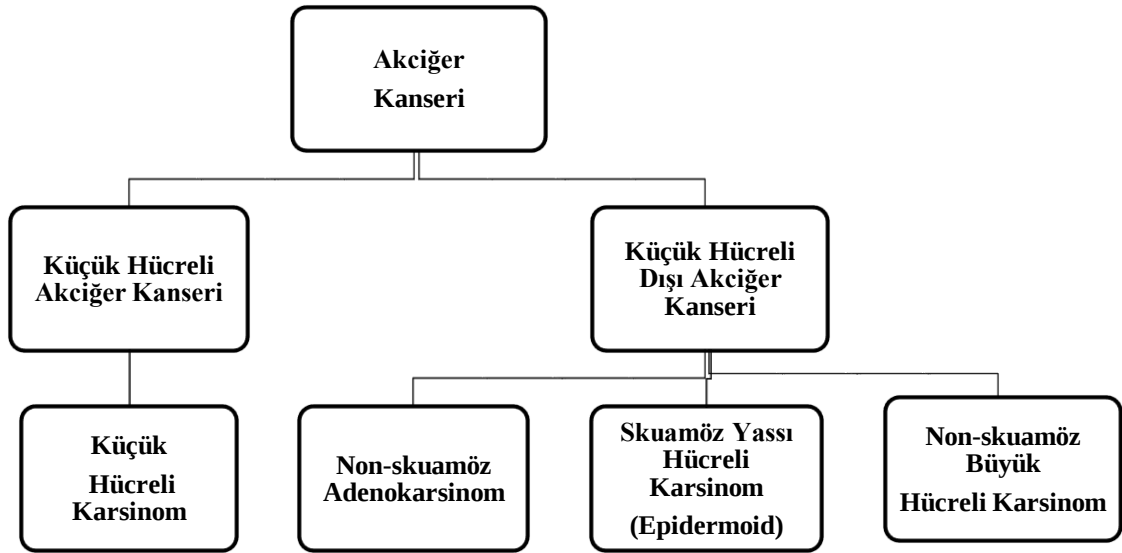
Akciğer fibrozisli hastalarda sigaradan bağımsız olarak 7 kat, insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonunda 2.5 kat ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olanlarda ise 2.8 kat akciğer kanserine yakalanma riski olduğu tespit edilmiştir. Human papilloma virüs ve Epstein Barr virüsü de akciğer kanseri riskini artırmaktadır (Lim ve ark., 2009).

Akciğer kanseri dışında hastalara uygulanan radyoterapi, erkek cinsiyet ve ailesel genetik yatkınlık da akciğer kanseri için risk faktörü olarak rapor edilmiştir (Topu ve ark., 2004).

Etkin tütün ürünleri kontrol politikaları, sağlık eğitimi ve korunma önlemleri, toplumda farkındalığı sağlayacak bilgilendirmeler, akciğer kanseri insidansını azaltabilecek önlemlerden bazılarıdır (Erbaycu, 2020).

2.2. Akciğer Kanseri Histopatolojisi ve Prognozu

Akciğer kanserlerinin histopatolojik alt tiplerine göre sınıflandırılması en iyi tedavi yöntemi ve hastalığın prognozu hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Sınıflandırma, doğru tanı için ışık mikroskobuna ek olarak immünohistokimyasal boyamalara dayanmakta ve tedavi stratejisini belirlemektedir. 2015 yılında DSÖ'nün kabul ettiği son sınıflandırmaya göre akciğer kanseri KHAK ve KHDAK olarak ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2.2) (Li ve ark., 2016). Bu sınıflandırma tümörün mikroskopik görüntüsüne göre yapılır. Bu iki tümörün büyüme, yayılım hızı ve tedavileri farklıdır. KHDAK ise non-skumöz (adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom) ve yassı hücreli (epidermoid-skumöz) karsinom olmak üzere alt başlıklara ayrılmaktadır (Diniz ve ark., 2017).



Şekil 2.2. Akciğer kanserinin histopatolojik sınıflandırması

2.2.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)

Akciğer kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. En hızlı büyüyen ve yayılım gösteren (metastaz yapan) akciğer kanseri tipidir. Sigara ile çok yakından ilişkili olup bu tümörlerin sadece %1'i sigara içmemiş kişilerde ortaya çıkar. Çok hızlı metastaz yaptığından genellikle tanı konulduğu sırada vücutta yayılmış (metastaz) olduğu görülür. Bununla beraber kemoterapiye yanıtı gayet iyidir, ancak tanı konulduğunda ileri evrede olduğu için prognozu kötüdür (Doğan, 2012).

2.2.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)

En fazla görülen akciğer kanseri tipi olup tüm akciğer kanseri hastalarının %85-90'ını oluşturur. KHDAK'nın DSÖ'nün son sınıflamasına göre üç ana tipi vardır:

Adenokarsinom: Kadınlarda ve sigara içmeyenlerde daha sık görülür. Gelişmiş ülkelerde en sık görülen (%40) akciğer kanseri türüdür.

Skuamöz yassı hücreli karsinom (SCC): Ülkemizde en sık görülen akciğer kanseri türüdür. Erkeklerde daha sık görülür. Sigara kullanımı ile yakından ilişkilidir. Hastalık sıklıkla akciğer içinde sınırlı kalır veya komşu lenf bezelerine yayılır. Akciğer

kanserleri içerisindeki oranı %25-30'dur. Adenokarsinoma göre SCC daha geç metastaz yapar (Alar & Şahin, 2012).

Büyük hücreli karsinom: KHDAK'ler içinde en az sıklıkta görülenidir ve tüm akciğer kanserlerinin %10 kadarını oluşturur. Uzak organlara metastaz yapma eğilimi yüksektir (Liu ve ark., 2019).

2.3. Akciğer Kanseri Evreleme

Küçük hücreli akciğer kanseri için en yaygın evreleme sistemi iki aşamalıdır: Sınırlı evre (tek taraflı akciğerde) ve ileri evre (kanseri karşı akciğere veya vücuda metastaz yapmış ise).

Akciğer kanserinde dünya genelinde kabul görmüş “Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneği (*International Association for the Study of Lung Cancer: IASLC*)” tarafından tanımlanan TNM evreleme sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemde **T** primer tümörü, **N** bölgesel lenf bezlerini ve **M** uzak metastazı temsil eder. TNM evreleme sistemi, tümörün büyüklüğü, ciddiyeti, metastaz durumu, hastanın hayatta kalma oranı, hastalığın prognozu, hastaya uygulanacak en iyi tedavi yöntemi hakkında standart oluşturur. Günümüzde 2016 yılında *IASLC* tarafından kabul edilen 8. TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2.1) (Çok, 2018).

Tablo 2.1. Akciğer kanseri TNM evreleme sistemi

T: Primer Tümör	
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor. Tümörün bronkoskopi veya görüntüleme ile saptanamadığı, fakat malign hücrelerin balgam ya da bronşial lavajda görüldüğü durumlar
T0	Primer tümöre ilişkin belirti yok.
Tis	Karsinoma in situ Akciğer veya visseral plevra ile çevrili, ≤ 3 cm tümör
T1	• T1a(mi) Minimal invaziv adenokarsinom • T1a Tümörün en geniş çapı ≤ 1 cm • T1b Tümörün en geniş çapı >1 cm ≤ 2 cm • T1c Tümörün en geniş çapı >2 cm ≤ 3 cm Tümörün en geniş çapı >3 cm ≤ 5 cm veya
T2	• Karina tutulumu olmayan ana bronş tutulumu • Visseral plevra tutulumu • Hiler bölgeye yayılan atelektazi veya post-obstrüktif pnömoni T2a Tümörün en geniş çapı >3 cm ≤ 4 cm T2b Tümörün en geniş çapı >4 cm ≤ 5 cm Tümörün en geniş çapı >5 cm ≤ 7 cm veya
T3	• Primer tümör ile aynı lobta nodül olması • Aşağıdaki yapıların direkt invazyonu ✓ Parietal plevra ve superior sulkus tümörleri dâhil göğüs duvarı tutulumu ✓ Frenik sinir ✓ Parietal perikard Tümörün en geniş çapı >7 cm veya
T4	• İpsilateral farklı lobta nodül(ler) olması • Aşağıdaki yapıların direkt invazyonu ✓ Diyafram, kalp, mediasten, rekürren laringeal sinir, major damarlar, trakea, vertebra korpusu, özefagus, karina
N: Bölgesel Lenf Nodu Tutulumu	
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor.
N0	Bölgesel lenf nodu yayılımı yok.
N1	İpsilateral peribronşial, intrapulmoner lenf nodlarında ve/veya hilerde metastatik tutulum
N2	İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarında metastatik tutulum
N3	Mediastinal ve/veya hiler lenf nodlarının kontralateral tutulumu Skalen veya supraklaviküler lenf nodlarının tutulumu
M: Uzak Metastaz	
M0	Uzak metastaz yok. Uzak metastaz var.
M1	• M1a Karşı akciğerde metastatik nodüller ✓ Perikardiyal, plevral metastatik nodüller ✓ Perikardiyal, plevral malign efüzyon M1b Tek ekstratorasik metastaz M1c Multipl ekstratorasik metastaz

2.4. Akciğer Kanserinde Semptom ve Klinik Bulgular

Akciğer kanserinde bulguların büyük çoğunluğu tümörün lokal, metastatik ve sistemik durumuna göre semptomatiktir. Diğer solunum sistemi hastalıklarında olduğu gibi en sık görülen belirtiler: öksürük (%51.6), göğüs ağrısı (%44.2), nefes darlığı (%34.8), balgam çıkarma (%21), kilo kaybı (%19), hemoptizi (%14.1), halsizlik (%12.7) ve iştahsızlıktır (%10.7). Rutin tarama ve başka bir sistem hastalığı incelemesi sırasında ortaya çıkan asemptomatik bulgular yok denecek kadar azdır. Ekstremiteler ağrısı, nörolojik semptomlar, ses kısıklığı, gastrointestinal sistem bulguları, terleme, vena kava superior sendromu, çomak parmak, lenf bezi tutulumu, kardiyovasküler sistem hastalıkları semptomları, psikiyatrik semptomlar, horner sendromu ve hıçkırık daha az görülen belirtilerdir (Erbaycu ve ark., 2009).

Akciğer bol kanlanan bir organ olması nedeniyle akciğer kanserinde lenf sistemi ve kan yoluyla diğer organ ve dokulara metastaz olayı sıklıktır (Tablo 2.2) (Alar & Şahin, 2012).

Tablo 2.2. Akciğer kanserinde metastaz ve sıklığı

Metastaz bölgesi	Sıklık (%)	Metastaz bölgesi	Sıklık (%)
Santral sinir sistemi	0-20	Plevral doku	8-15
Kemik doku	25	Karaciğer dokusu	1-35
Kalp-perikard	20	Deri-yumuşak doku	1-3
Böbrek	10-15	Adrenal	2-22
Gastrointestinal sistem	12		

2.5. Akciğer Kanserinde Tanı

Akciğer kanserine spesifik herhangi bir laboratuvar testi yoktur, ancak muhtemel girişimlere hazırlık için tam kan sayımı, Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST), Gama glutamil transferaz (GGT), C-reaktif protein (CRP),

glukoz, üre, kreatinin, sodyum, potasyum, alkalen fosfataz, kalsiyum ve sedimentasyon gibi biyokimyasal testler istenmektedir (Yılmaz & Kabalak, 2024).

Akciğer kanserinin tanısında görüntüleme (direkt akciğer grafisi, MR, BT, PET, endobronşiyal ultrasonografi) ve girişimsel (bronkoskopi, mediastinoskopi, ince iğne aspirasyon biyopsisi, videotorakoskopik cerrahi ve torakotomi) yöntemlerden yararlanılmaktadır.

Direkt Akciğer Grafisi: Soliter pulmoner nodül, atelektazi, pnömonik infiltrasyon, hiler dolgunluk, mediastinal genişleme, plevral sıvı ve lokalize saydamlık artışı gibi durumlar saptanabilir.

Bilgisayarlı Tomografi (BT): Direkt akciğer grafisinde kitle lezyonu saptanan her hastaya uygulanması gereken bir radyolojik yöntemdir. BT tümörün genel yapısı ve dağılımı, hiler bölge ve mediastinal tutulum ile bu bölgedeki lenfadenopatiler, büyük damar ve kalp invazyonu, göğüs duvarı tutulumu ve plevral efüzyon gibi tümörün gerek evrelemesinde gerekse cerrahisi için gerekli önemli ipuçlarını verir.

Magnetik Rezonans Görüntüleme (MR): Yumuşak dokularda daha iyi görüntü vermesi ve birçok planda kesit alması gibi özellikleri nedeniyle mediasteninin, göğüs duvarının, kalp ve büyük damarların, diyafragma ve spinal kanalın daha ayrıntılı değerlendirilmesine olanak sağlar. Ancak BT ile karşılaştırıldığında akciğer parenkimi hakkında daha az bilgi vermesi ve daha pahalı olması dezavantajlarıdır.

Pozitron Emisyon Tomografisi (PET): (18F) Floro-2-deoksi-D-glukoz kullanılarak uygulanan pozitron emisyon tomografisi (FDG-PET) anormal kitle tespiti ve evreleme amaçlı kullanılmaktadır. Bu görüntüleme yönteminde yanlış pozitif (pnömoni, granuloma, sarkoidoz, tüberküloz, aspergilloz, histoplazmoz, inflamasyon, pulmoner hamartom, atelektazi ve bronşiektazi gibi inflamatuvar cevaplar) ve yanlış negatif (1 cm ve altındaki KHDAK, atipik karsinoid, bronkoalveolar karsinom gibi)

sonuçlar alınabileceği unutulmamalıdır. Bu radyolojik işlemin en önemli dezavantajı çok yaygın olmaması ve yüksek maliyetidir (Akpınar ve ark., 2013).

Bronkoskopi: Santral yerleşen ve endobronşiyal tümörlerde histopatolojik tanı değeri %90'ın üzerindedir. Buna karşılık periferik lezyonlarda tanı değeri %40'a kadar düşebilmektedir. Lezyondan direkt biyopsi, bronş içi yıkama ve fırçalama ile hücre elde edilmesi, transbronşiyal biyopsi ile parenkim içi kitleden ince iğne ile doku alınması işlemlerinden oluşur. Günümüzde videobronkoskopi, endobronşiyal ultrasonografi, otofloresan bronkoskopi, elektromanyetik navigasyon diagnostik bronkoskopi gibi çeşitleri mevcuttur (Almeida, 2012).

Transtorasik İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi: Periferik tümörlerde BT veya Ultrasonografi (USG) eşliğinde yapılan ince iğne aspirasyon biyopsisi önemli bir teşhis aracıdır. Ancak bu işlemin kanama, pnömotoraks gibi komplikasyonları mevcuttur.

Mediastinoskopi: Bu cerrahi işlemde genel anestezi altında mediastinoskop ya da video-mediastinoskop adı verilen alet yardımıyla mediastendeki lenf bezleri ve kitlelerden biyopsi alınır. Tanı ve kanser evresi tespiti amacıyla uygulanır.

Torakoskopi: Lokal anestezi altında ve sedatif analjezi ile hastanın toraks boşluğuna girilerek lezyonlardan biyopsi almak ya da plevral sıvıyı boşaltmak için kullanılan bir cerrahi işlemdir.

Video Yardımlı Göğüs Cerrahisi (Video Assisted Thoracic Surgery, VATS): Bu endoskopik cerrahi işlem genel anestezi altında uygulanan hem teşhis hem tedavi amacıyla kullanılabilen günümüzün önemli operasyonlarından birisidir. Bu teknikle lobektomi, pnömonektomi gibi açık cerrahide yapılan tüm işlemler güvenle uygulanabilmektedir (Toker & Kaya, 2009).

Torakotomi: Minimal invazif yöntemler ile tanı konamayan hastalarda en son çare olarak torakotomi ile kitleden direkt biyopsi ve kanser evresine göre yapılması gereken cerrahi rezeksiyon işlemidir (Almeida, 2012).

2.6. Akciğer Kanserinde Tedavi

Küçük hücreli akciğer kanseri hızlı büyüme özelliği, hematojen yoluyla metastaz hızı yüksek olması nedeniyle evre 1 döneminde cerrahi uygulanabilir. Ayrıntılı bir evrelemenin ardından radyoterapi ile birlikte platin bazlı kemoterapi (etopozid ve sisplatin) temel tedavi yaklaşımıdır (Öztuna ve ark., 2003).

Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde hastanın yaşı, pulmoner kardiyak özellikleri, hastalığın evresi, ko-morbidite durumuna göre değişmekle birlikte mediastene invazyonu olmayan antimetastatik evre 1 ve evre 2'de temel yaklaşım cerrahidir (segmentektomi, lobektomi ve wedge rezeksiyonu). Cerrahiye uygun olmayan hastalarda radyoterapi ve kemoterapi en uygun tedavi yaklaşımıdır (Yılmaz, 2018).

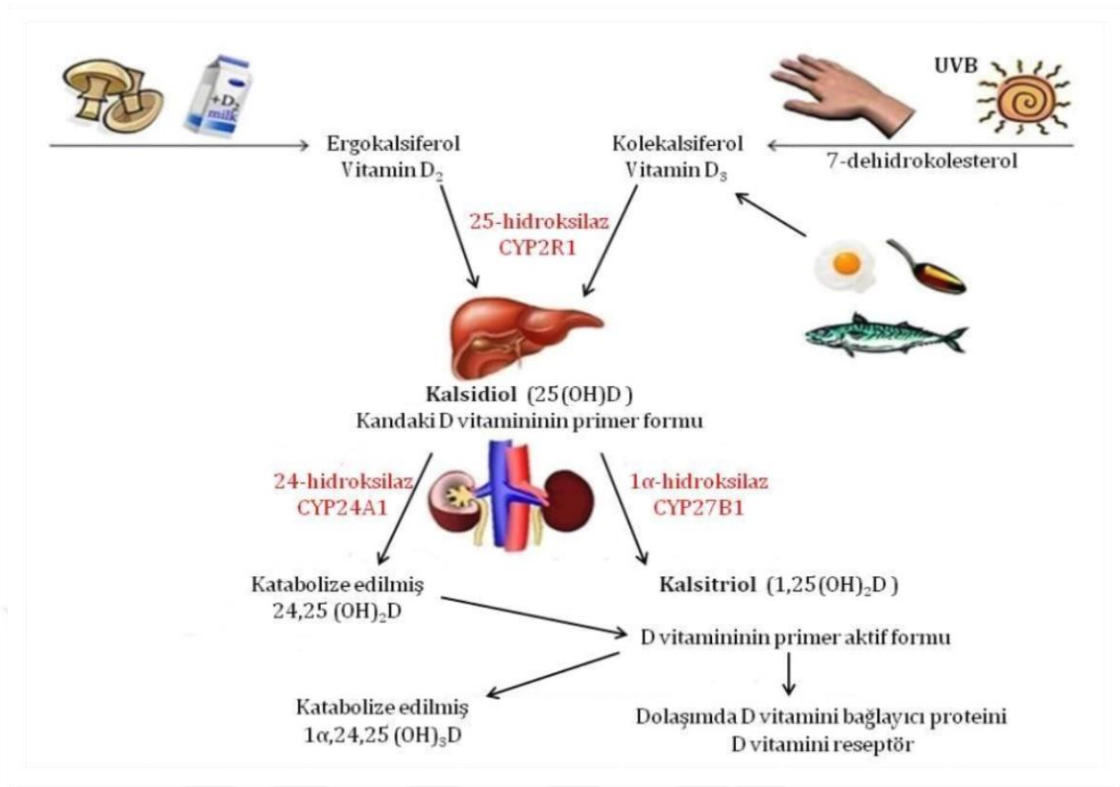
Küçük hücreli dışı evre 3 akciğer kanserinde cerrahiye uygun lenf nodu tutulumu olan hastalarda rezeksiyon sonrasında kemoterapi veya radyoterapi uygulanabilir. Cerrahiye uygun olmayan lokal ileri evre hastalarda eş zamanlı veya ardışık olarak kemoterapi (sisplatin+vinca alkaloid, sisplatin+etoposid, sisplatin+pemetreksetin (non skuamoz histolojide) ve radyoterapi (indüksiyon kemoterapisinin ardından 60-66 Gray dozun, 30-33 fraksiyonda verildiği, 6-7 hafta süren bir tedavidir) en uygun tedavidir (Kanat ve ark., 2003).

İleri evre 4 akciğer kanserinde tedavi yaklaşımı hastanın yaşam kalitesini bozmadan tedaviye bağlı yan etkileri asgari düzeyde tutarak sağkalım süresini uzatmaktır. Tümörün ve hastanın durumuna göre cerrahi ve kemoterapi seçenekler arasındadır (Yılmaz, 2018).

2.7. Vitamin D ve KHDAK İlişkisi

Vitamin D, kalsiyum ve fosfatın sindirim yolunda kullanımı, emilimi, bağışıklık sistemi, tiroid fonksiyonlarına ve kemik gelişimi üzerine etkisi olan yağda çözünen, antiproliferatif, sitotoksik, immünomodülatör, antikanserojen etkiye sahip hormon benzeri steroldür. Vitamin D'nin D2 (ergokalsiferol) ve D3 (kolekalsiferol) olmak üzere iki önemli formu mevcuttur. Yapılan çalışmalar otuzdan fazla dokuda bulunan kalsitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ve analoglarının vitamin D reseptörü aracılığı ile insan kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini (antikanser özelliği) göstermektedir (Urbschat ve ark., 2013).

Vitamin D kaynakları güneş ışığı etkisiyle (UVB) ciltte, yiyeceklerden ve ilaçlardan sağlanır. Deride sentezlenen ve diyetle alınan D vitamini inaktif vitamin D bağlayıcı proteine bağlanarak dolaşıma dahil olur. Karaciğerde 25 hidroksilaz (bunu sağlayan gen CYP2R1'dir.) ile hidroksillenerek dolaşımdaki gerçek formu olan 25-hidroksivitamin D, yani $25(\text{OH})\text{D}$ 'ye dönüşür. Böbreklerde 1α -hidroksilaz enzimi tarafından hidroksillenerek aktif formu ve kaynağı sadece böbrek olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'ye yani kalsitriole dönüşmektedir. Bunu sağlayan gen ise sadece CYP27B1'dir (Şekil 2.3) (Duman & Ün, 2019).



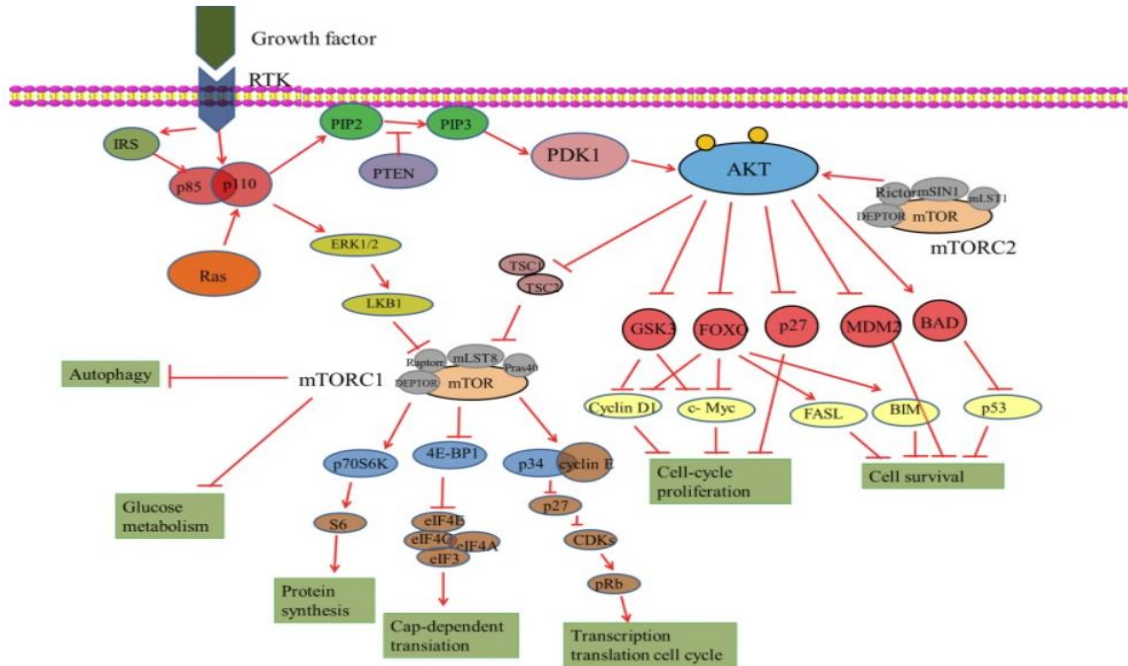
Şekil 2.3. Vitamin D sentezi ve metabolizması

Kanda kalsiyum ve fosfor düzeylerinin düşmesi ile artan paratiroid hormonu, D vitamini üretimini artırmaktadır. 25(OH)D'nin yarılanma ömrü 2-3 hafta iken, 1,25(OH)₂D'nin yarılanma ömrü 4-6 saattir. Bu yüzden 1,25(OH)₂D'nin kandaki miktarı 25(OH)D'nin miktarından 1000 kat daha azdır. Kandaki 25(OH)D yeterlilik düzeyinin 30-60 ng/mL olması beklenir. 25(OH)D'nin antikanserojen etkisi 30 ng/mL'nin üzerinde ortaya çıkmaktadır. 1,25(OH)₂D'nin kanser hücrelerinde proliferasyon, invazyon, metastaz ve angiogenez üzerine azaltıcı, apoptozis ve diferansiasyon üzerine artırıcı etkileri mevcuttur. D vitamini, akciğer kanserli hastaların prognozunu olumlu yönde etkileyen ve hasta sağkalımını artıran protektif hormon benzeri bir steroldür (Upadhyay ve ark., 2013).

Dolaşımda vitamin D'nin aktif formu olan 1,25(OH)₂D'nin serumda yüksekliği ve yüksek vitamin D alımı ile akciğer kanseri insidansı arasında negatif bir korelasyon vardır. PI3K/Akt/mTOR yolunun aktivasyonu kanser hücrelerinin kontrolsüz

çoğalmasına, genomik kararsızlığa ve metabolik olarak hücrelerin yeniden programlanmasına neden olabilmektedir. Vitamin D ise endometrium, prostat, akciğer ve hepatosellüler kanser gibi bazı kanserlerde PI3K/AKT yolunu inhibe ederek hücre büyümesini ve çoğalmasını engellemektedir (Duman & Ün, 2019; Wang ve ark., 2022).

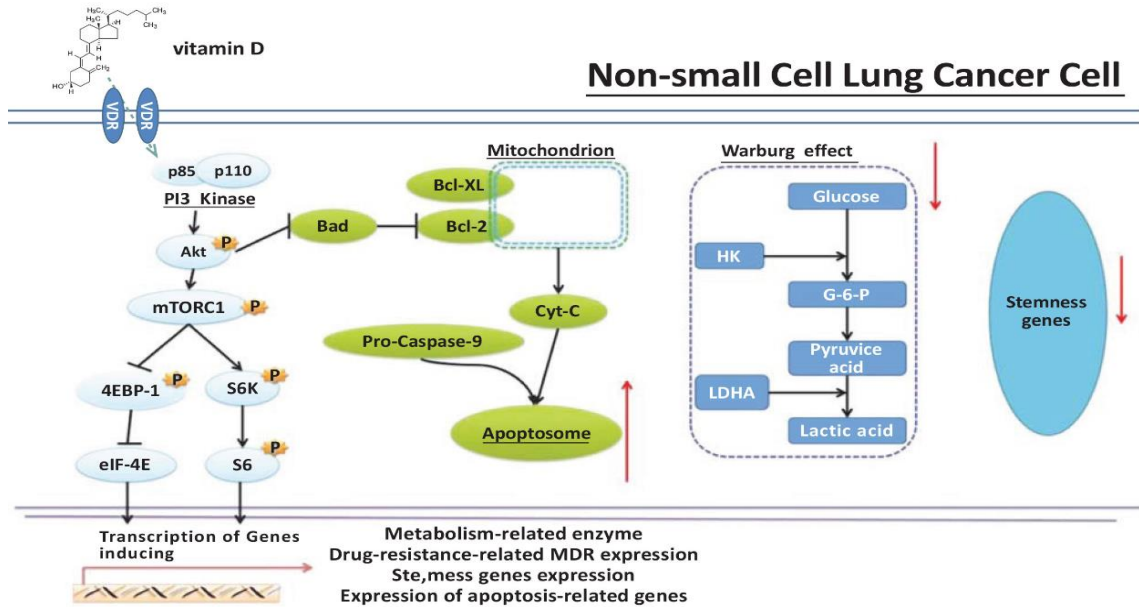
PI3K/AKT/mTOR yolu, tümör oluşumunda ve gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. PI3K, büyüme faktörleri gibi yukarı yönlü sinyaller tarafından uyarıldığında, aşağı yöndeki sinyal moleküllerini daha da aktive eden kanser hücresi proliferasyonunu, istilasını, metastazı, anjiyogenezi ve karbonhidrat metabolizmasını düzenleyen AKT'yi aktive eder. Buna göre, tümörlerin büyümesi ve metastazı, PI3K/AKT/mTOR yolundaki her bir molekülün ekspresyonunun baskılanması ve sinyalleme blokajı ile inhibe edilebilir ve bu durum antitümör etkisi ile sonuçlanır (Şekil 2.4). PI3K, Akt ve mTOR'un otofaji, glukoz metabolizması, protein sentezi, hücre proliferasyonu, hücre sağkalımı ve daha birçok süreçte rol oynadığı görülmektedir (Xu ve ark., 2020).



Şekil 2.4. PI3K/AKT/mTOR sinyal yoluna genel bakış

Normal hücreler, oksijen varlığında glukozu pirüvata glikolizis yoluyla parçalar ve daha sonra oluşan pirüvatın büyük çoğunluğunu oksidatif fosforilasyonla mitokondride tamamen okside edip CO₂'e dönüştürür. Anaerobik koşullarda ise normal hücreler glikolitik pirüvatı mitokondrial oksidasyona yönlendirmeyip büyük ölçüde laktata indirger. Warburg'un çalışmasından köken alan temel mekanizma, normal hücrelerin aksine hızlı proliferasyon olan tümörlerin bu işlem sonucu üretilen 1 molekül glukozdan elde edilen ATP miktarının çok az olmasına rağmen glukozu aerobik ortamda laktata dönüştürmesidir. Görünürde mantığa aykırı gelen bu mekanizmaya Warburg etkisi denir (Kısaçam & Temizer Ozan, 2019; Vander Heiden ve ark., 2009).

Yiyan ve ark. (2022) tarafından yapılan çalışmada vitamin D'nin PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolunun inaktivasyonu KHDAC hücrelerinde Warburg etkisini ve kök hücre devamlılığını baskıladığı, dolayısıyla KHDAC'nin ilerlemesini inhibe ettiği (antitümör etkisi) gösterilmiştir (Şekil 2.5). Bu çalışma, D vitamininin KHDAC'ye karşı tedaviye potansiyel bir parametre olduğunu göstermektedir (Yiyan ve ark., 2022).



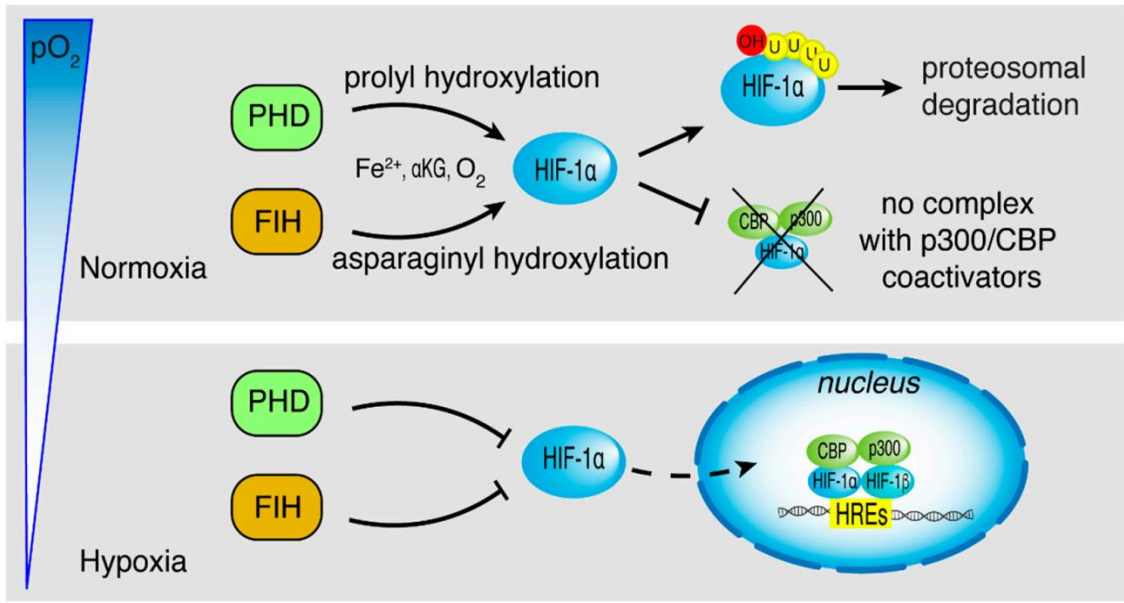
Şekil 2.5. Vitamin D'nin KHDAC'nde Warburg etkisi

2.8. Hypoxia-inducible-factor-1 alpha ve KHDAC İlişkisi

HIF1-2-3, dimerik yapıya sahip ökaryotik hücrelerde transkripsiyon faktörüdür. Dokularda hipoksiye karşı ilk ve erken cevabı düzenleyen HIF1 α 'dır. HIF1 proteininin stabilizasyon ve aktivasyonunda esas rolü dokuların oksijen miktarı belirler ancak cevabın şiddetini büyüme faktörlerine dayalı sinyal yollarından olan Ras/Raf/MAPK ve PI3K/Akt/mTOR ayarlar. Bu yollar hipokside bağımsız olarak normal şartlarda HIF1 aktivitesi üzerine etkilidir. HIF proteini anjiyogenezis, eritropoezis, hidroksilasyon, apoptozis, ubiquitinasyon, asetilasyon, hücre proliferasyonu, fosforilasyon, demir metabolizması, oksijen metabolizması ve glukoz metabolizması gibi metabolik süreçlerin transkripsiyonel düzenleyicisidir. PI3K/AKT sinyal yolağındaki PI3K ve AKT, HIF1 α 'nın pozitif düzenleyicisi; P53 ve mTOR ise negatif regülatörüdür (N. Calapoğlu, 2016; Lu ve ark., 2002).

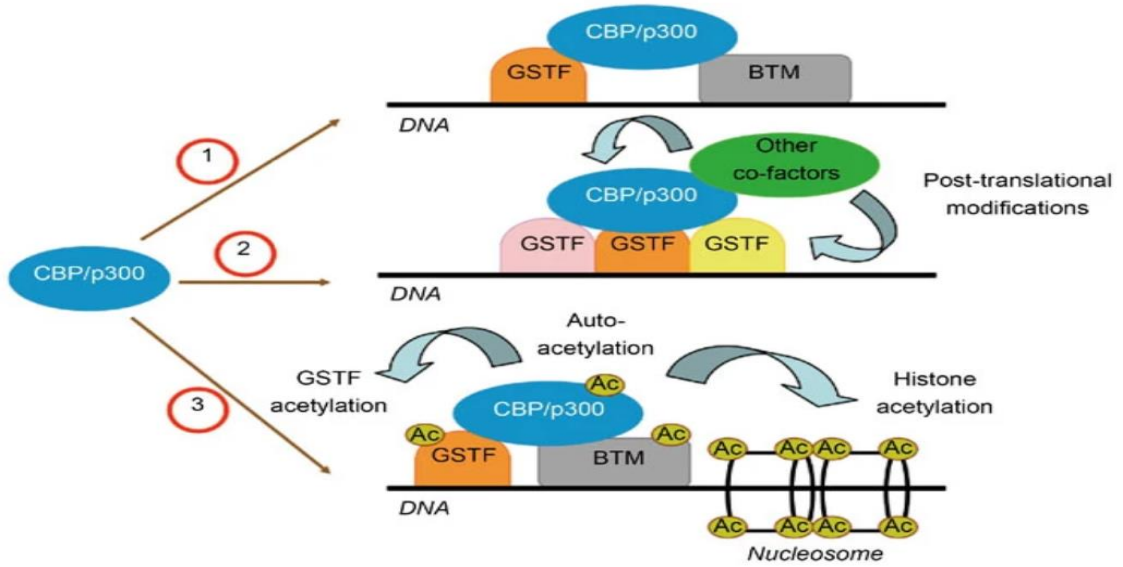
p53 tümör baskılayıcı gen, insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan gen ve sıklıkla akciğer pre-malign ve malign lezyonlarında düzensiz olduğu tespit edilmiştir (Sun, 2006). HIF1 α KHDAC hastalarda büyük ölçüde eksprese edilmekte olup bu durum hastalığın kötü prognozu ile ilişkilidir (Swinson ve ark., 2004).

Normokside, HIF-1 α prolin hidroksilasyonu proteazomal bozulmayı uyarırken; HIF-1 α asparajin hidroksilasyonu CBP/p300 bağlanmasını bloke ederek HIF-1 α fonksiyonunu bozar. Hem prolin (PHD) hem de asparaginil (FIH) hidroksilazlar O₂, Fe(II) ve α -ketoglutarat (aKG) gerektirir. Hipoksi altında ise HIF-1 α hidroksillenemez ve nükleer translokasyonu HIF-1 β ile dimerizasyona, CBP/p300 ortak aktivatörleri ile birleşmeye, dolayısıyla hipoksiye cevap elemanlarına (HRE'ler) bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu artırır (Şekil 2.6) (Infantino ve ark., 2021).



Şekil 2.6. HIF-1α'nın oksijene bağımlı düzenlenmesi

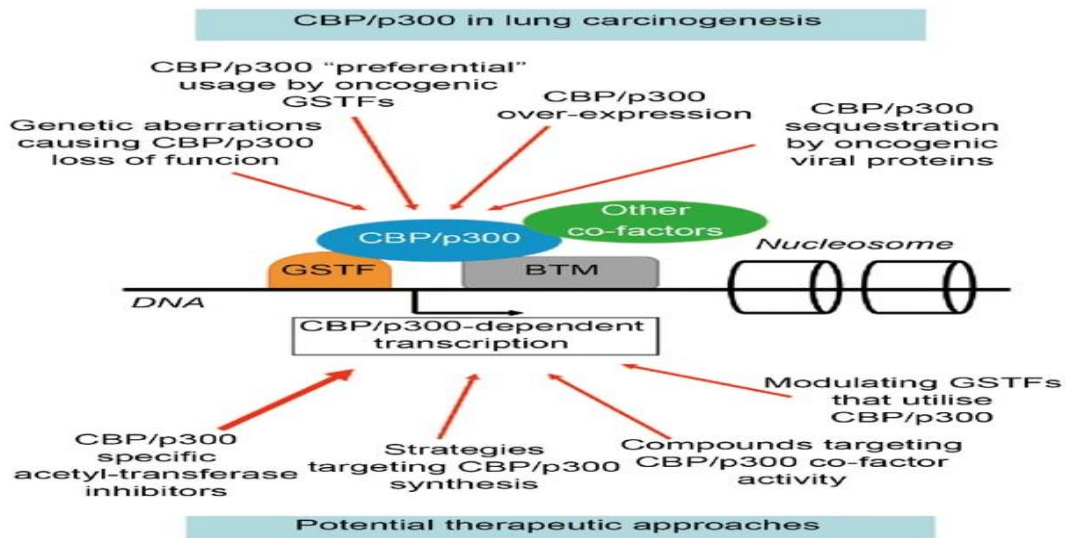
cAMP yanıt elemanı bağlayıcı proteine (CREB) bağlayıcı protein (CBP) ve onun homologu p300, DNA onarımı, hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoz gibi birçok hücrel aktivitelere rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel ortak aktivatörleridir. CBP ve p300 embriyonik gelişim sırasında değiştirilebilir rollere sahiptir ve birçok süreçte hücrel homeostazı kontrol edebilen proteinlerdir. CBP/p300 çeşitli mekanizmalar yoluyla transkripsiyonel kontrole katılır: (1) Gene spesifik transkripsiyon faktörleri (GSTF'ler) ile bazal transkripsiyon faktörleri (BTM) arasında köprü kurmak, (2) Çoklu protein komplekslerinin oluşumuna katkıda bulunmak ve post-translasyon sonrası modifikasyonlar yoluyla GSTF'lerin aktivasyon durumunu doğrudan ve/veya dolaylı olarak düzenlemek, (3) Nükleozomlar ve belirli GSTF'ler üzerinde asetil-transferaz aktivitesini sağlamak (Şekil 2.7) (Karamouzis ve ark., 2007).



Şekil 2.7. CBP/p300'ün kontrol mekanizmaları. Ac: asetil grubu

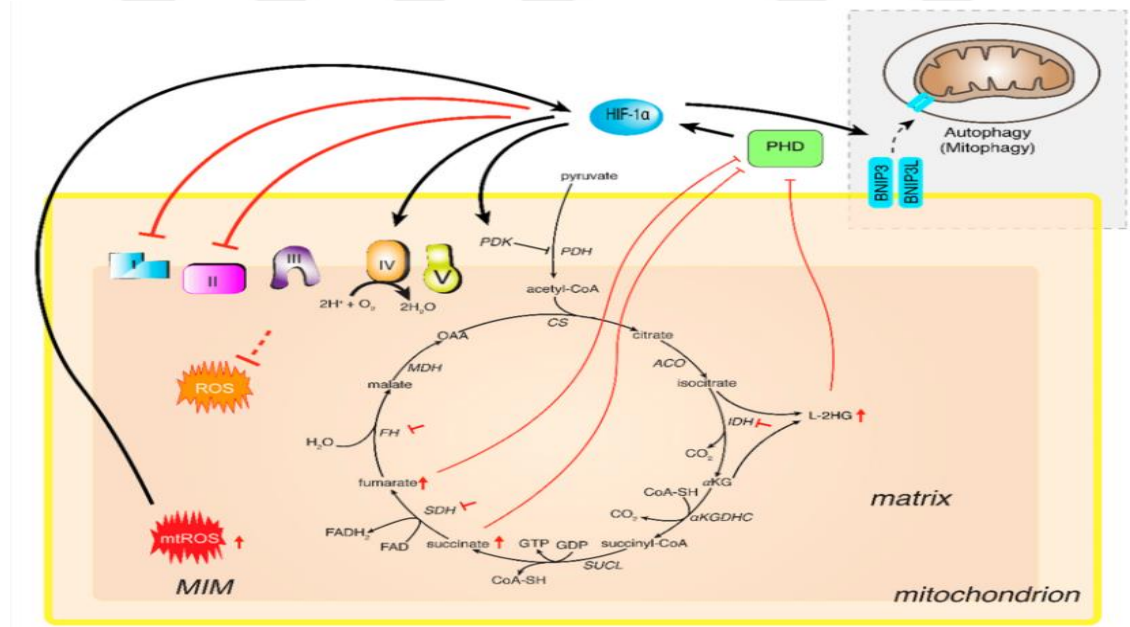
CBP geninin akciğer kanseri hücre dizilerinin neredeyse %15'inde ve primer akciğer tümörlerinin %5'inde genetik olarak değiştirildiği gösterilmiştir (Kishimoto ve ark., 2005).

CBP/p300'deki mutasyonlar p53 genine göre nadir olduğundan CBP/p300 alternatif mekanizmalar yoluyla akciğer karsinogenezine katkıda bulunabilir. Terapötik müdahalelere yönelik potansiyel stratejiler çoğunlukla CBP/p300 asetil-transferaz aktivitesini hedeflemektedir (Şekil 2.8) (Karamouzis ve ark., 2007).



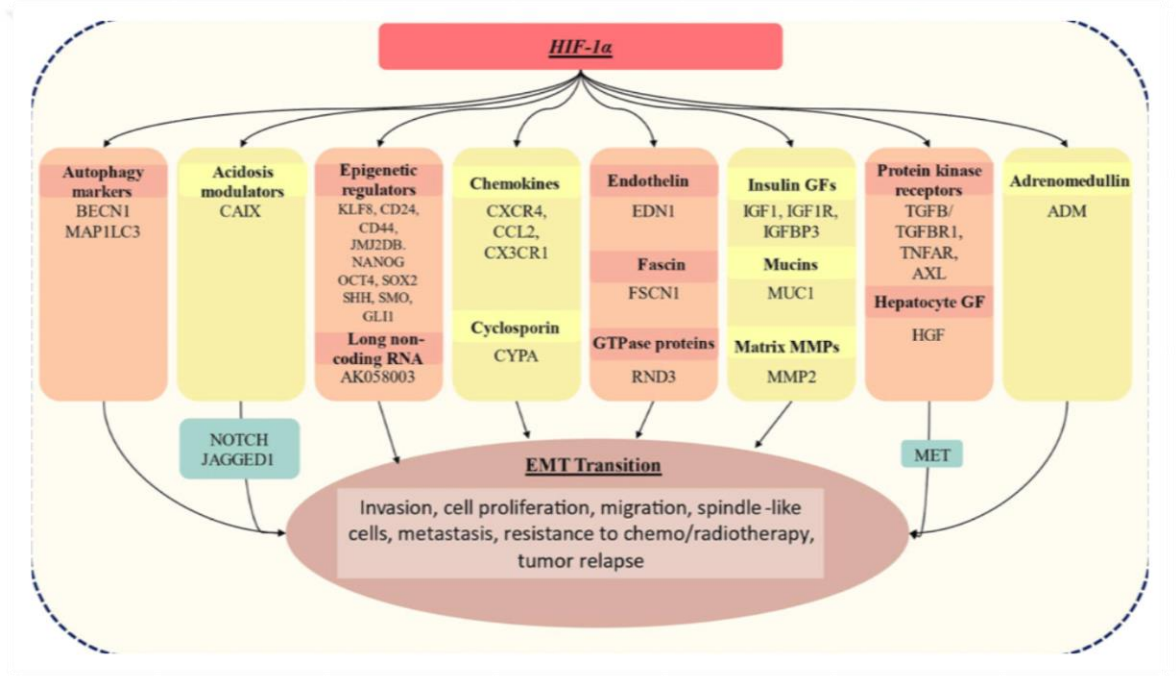
Şekil 2.8. Akciğer kanserinde CBP/p300 mutasyonunun etki mekanizması

Hipoksik koşullar altında kanser hücreleri HIF-1'i aktive eder ve bunun mitokondri ile etkileşimi, hücrenin hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. HIF-1 α , piruvat dehidrojenaz kinazı (PDK) aktive ederek piruvatın asetil-CoA'ya dönüşümünü bozar. Mitokondriyal proteinlerin BCL2 ailesine ait iki protein (BNIP3 ve BNIP3L), HIF-1 ile aktivasyonu takiben mitofajiyi tetikler. Süksinat dehidrojenaz (SDH), fumarat hidratat (FH) ve izositrat dehidrojenaz (IDH) TCA döngüsü enzimlerini kodlayan genlerdeki düzensizlik ve/veya mutasyonlar, süksinat, fumarat ve L-2-hidroksiglutaratın (L-2HG) birikmesine yol açar. PHD'nin aktivitesini azaltır, bu da HIF-1 α alt ünitesinin stabilizasyonu ile sonuçlanır. HIF-1, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda Kompleks I ve Kompleks II'de bir azalmaya neden olur, böylece hipoksik koşullarda elektronların oksijene aktarılmasında Kompleks IV aktivitesini geliştirip ROS üretimini azaltır ve membran potansiyelini korur. Mitokondriyal ROS (mtROS), HIF-1'i aktive eder (Şekil 2.9) (Infantino ve ark., 2021).



Şekil 2.9. HIF-1 α ve mitokondriyal fonksiyonu. CS: sitrat sentaz; ACO: akonitaz; IDH: izositrat dehidrojenaz; aKGDHC: aKG dehidrojenaz kompleksi; SUCL: Süksinil-CoA ligaz; FH: fumarat hidratat; MDH: malat dehidrojenaz; PDH: piruvat dehidrojenaz; PHD: oksijene bağımlı prolin hidroksilaz; L-2HG: L-2-hidroksiglutarat; aKG: a-ketoglutarat; Ac-CoA: Asetil-Koenzim A.

Hipoksik koşullarda HIF-1 α , çok çeşitli genlerin aktivasyonunda bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gören, büyük fenotipik değişiklikleri düzenleyen ve sonunda Epitelyal Mezenkimal Geçişe (EMT) yol açan HIF kompleksini oluşturur. EMT'yi takiben hücreler, normal morfolojilerini kaybeder ve mezenkimal özellik kazanır. Ekspresyonu HIF-1 α 'nın aktivasyon durumuyla bağlantılı olan ve EMT ile sonuçlanan genlerin EMT geçişi ve artan invazivlik, hücresel proliferasyon, migrasyon, iğ benzeri hücresel görünüm, kemo/radyoterapiye direnç ve tümörün nüksetmesi ile sonuçlanır (Şekil 2.10) (Sharma ve ark., 2022).



Şekil 2.10. Ekspresyonu HIF-1 α 'nın aktivasyon durumuyla bağlantılı olan ve EMT ile sonuçlanan genler

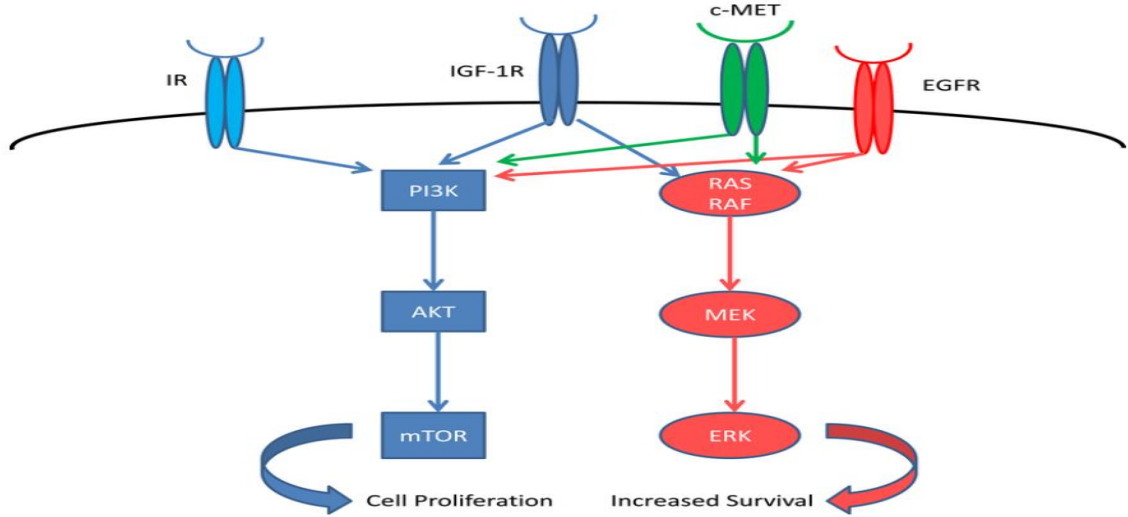
2.9. Phosphoinositide-3-kinase ve KHDAK İlişkisi

PI3K, kanserde etkin rol oynayan fosfoinozitol-3-fosfatı (PIP-3) fosforlayarak aktive eder. Bu aktiflenme protein kinaz B'yi uyararak PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolunu aktive eder. Kanser mekanizmasında tümör süpresör geni olan PTEN, PIP-3'ü

inhibe eder. Kanserli hücrelerde PI3K aktivite, miktar ve sentezinin artışı beklenir (Çoban & Güran, 2013).

Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) sinyal yolu, hücre büyümesinde ve hücrenin hayatta kalmasında kritik bir role sahiptir. PI3K/AKT/mTOR yolundaki değişiklikler, PI3K aktivasyonu ve malign transformasyonla birçok düzeyde meydana gelebilir. PI3K'ler genellikle EGFR, IGF1-R ve HER2/neu gibi tirozin kinaz reseptörleri (RTK'ler) tarafından aktive edilir ve aktivasyon sıklıkla enzimlerin fosfotirozin bağlanmasıyla hücre zarlarına alınması yoluyla gerçekleşir. PI3K yolu, bileşenlerinden birini etkileyen ve PI3K sinyalleşmesinin artmasına neden olan genetik değişiklikler nedeniyle akciğer kanserinde sıklıkla serbest bırakılır. PI3K aktivasyonu sıklıkla, RTK mutasyonunun ve/veya amplifikasyonunun aktive edilmesine, PI3K amplifikasyonuna, PTEN kaybı veya inaktivasyonuna, AKT'nin aşırı ekspresyonuna, p110 α katalitik alt birimini kodlayan PIK3CA geninin mutasyonel aktivasyonuna veya aktivasyonuna yanıt olarak Ras onkogeninin mutant formlarına neden olur (Sarris ve ark., 2012).

İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-1R) hücre büyümesini, proliferasyonunu ve apoptozu düzenleyen bir tirozin kinaz reseptörüdür. Artan IGF1 sinyalleşmesi PI3K/AKT/mTOR yoluyla hücre proliferasyonu ve apoptozun çoğalmasına ve RAF/RAS/MEK/ERK yolunun inhibisyonuna neden olarak insanlarda kötü yaşam koşullarına ortam hazırlamaktadır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türü, IGF-1R ve ligandını eksprese eder (Şekil 2.11) (Huang ve ark., 2016).



Şekil 2.11. IGF-1R sistemi ve ilgili reseptörler. IR: insülin reseptörü; EGFR: epidermal büyüme faktörü reseptörü; c-MET: mezenkimal-epitelyal geçiş, tirozin kinaz reseptörü

KHDAK tedavisinde kemoradyoterapinin yanı sıra hedefe yönelik tedavi de en önemli yöntemlerden biridir. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) mutasyonları olan KHDAK hastalarının %67'sinde PI3K yolağının yapısal aktivasyonu vardır. Klinik çalışmalar, ilerlemiş KHDAK'de PI3K yolunun aşırı ekspresyonunun kötü bir prognostik faktör olduğunu göstermiştir. PI3K yolu aktivasyonuna sahip EGFR mutasyonları olan hastalarda sağkalım oranı daha düşüktür (Jiang ve ark., 2022).

2.10. Protein-kinase B ve KHDAK ilişkisi

PKB hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, motilitesi, hücre içi sinyal iletiminde ve apoptoziste önemli rolü olan bir enzimdir. Protein kinaz, hücrede sinyal iletimi esnasında proteinlerin fosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlar. Membran fosfolipidlerinden hücreye gelen uyarı ile PI3K'nin fosforlamasıyla fosfo inozitol-3-fosfat (PIP-3) aktive olur, bu aktiflenme protein kinaz B (Akt proteini)'yi aktifler. Protein kinaz B, Akt 1 ve Akt 2 genleri tarafından kodlanan önemli bir proteindir. Tümör hücrelerinde, sinyal iletiminde görevli PI3K ve protein kinazların sentezinin artması, akciğer kanseri patogenezi üzerine doğrudan etkili parametrelerdir. PI3K,

AKT1 genini aktive eder, bu da mTOR sinyal iletim yolundan hücrenin büyümesini, çoğalmasını, metastazı ve angiogenezi sağlayarak etkisini gösterir. Kinazların aktive olması için gerekli fosfat ATP'den sağlanır. Genel olarak kanserlerde ilk etkilenen mekanizma hücre içi sinyal iletim yolları olduğu için KHDAK'de diğer kanserlerde olduğu gibi imatinib gibi protein kinaz inhibitörleri kullanım alanı bulmuştur (Çoban & Güran, 2013).

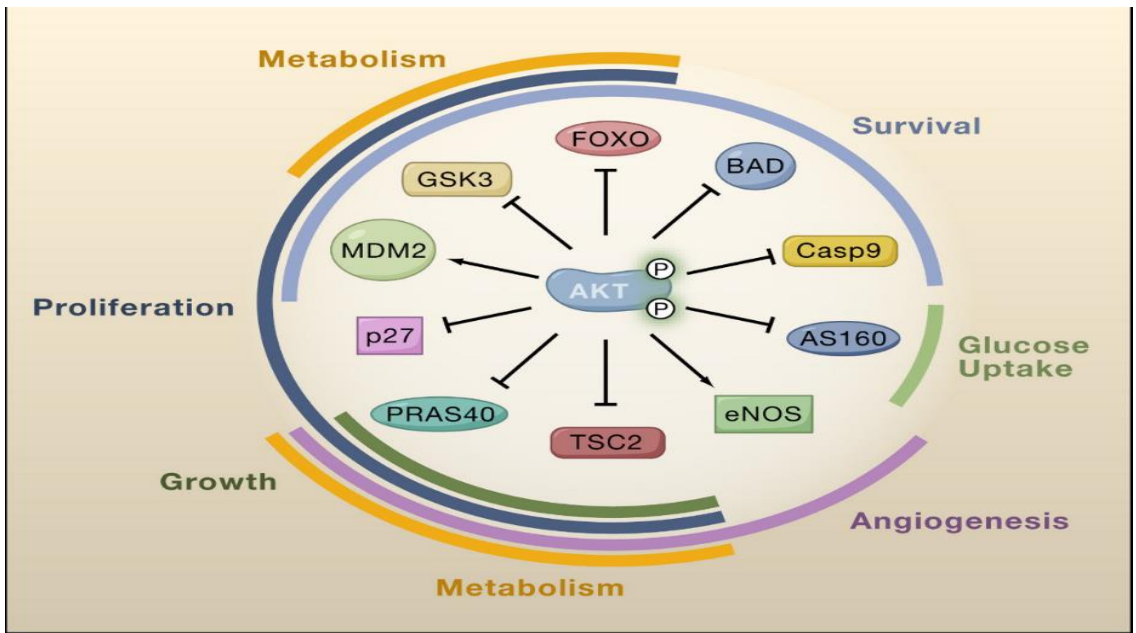
İnsan vücudundaki ROS1 geni, hücre yüzeyinde bulunan protein yapıdaki tirozin kinaz reseptörünü kodlamakla görevlidir. Bu reseptör, hücrelerin büyümesi, çoğalması, farklılaşması, hayatta kalması ve angiogenez ile ilgili çeşitli sinyal yollarını aktive eder. Şekil 2.12'de ROS1 geninin kodladığı tirozin kinaz reseptörünün, hücre içinde hangi sinyal yollarını aktifleştirerek hücre büyüme ve çoğalmasında rol aldığı gösterilmektedir (Özdoğan, 2024).



Şekil 2.12. ROS1 geninin kodladığı tirozin kinaz reseptörünün görevleri

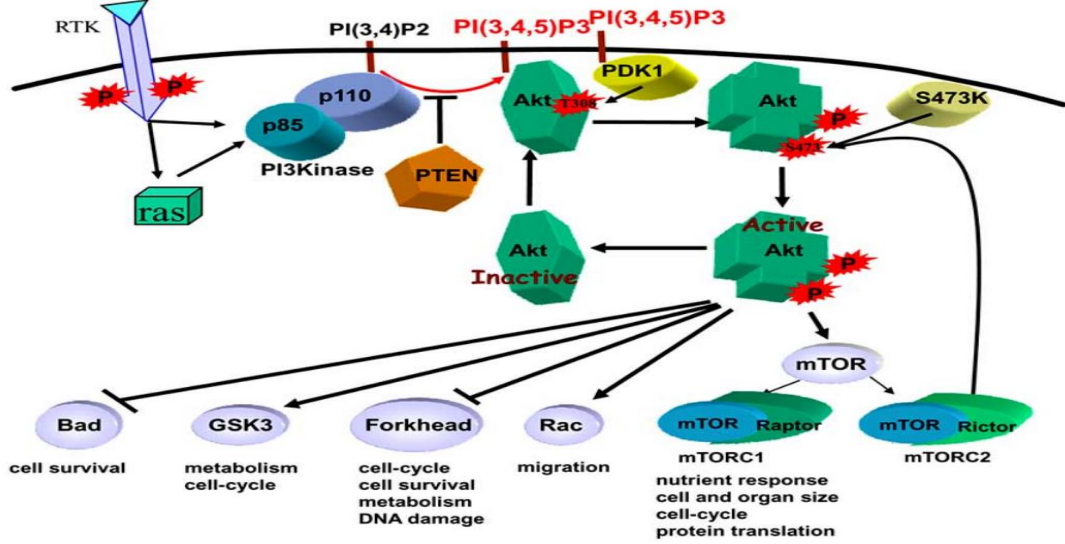
Hücrede sinyal iletimi esnasında proteinlerin Akt aracılı fosforilasyonu, bunların aktivasyonunu (oklar) sağlar veya inhibisyonuna (okları bloke etme) neden olur. Bu substratların Akt tarafından düzenlenmesi, Şekil 2.13'te gösterilen çeşitli hücresel

olayların (yani hayatta kalma, çoğalma, büyüme, glukoz alımı, metabolizma ve anjiyogenez) aktivasyonuna katkı sağlar. Örneğin eNOS ve MDM2 proteinlerinin Akt aracılı fosforilasyonu hücresel fonksiyonlarda pozitif regülatör iken AS160, Casp9, BAD, FOXO, GSK3, p27, PRAS40, TSC2 negatif regülatör işlevi görür. Yani AKT tarafından aktive veya inhibe edilen proteinler hücrenin hayatta kalma, çoğalma, büyüme, glukoz alımı, metabolizma ve anjiyogenez üzerine etki eder (Manning & Cantley, 2007).



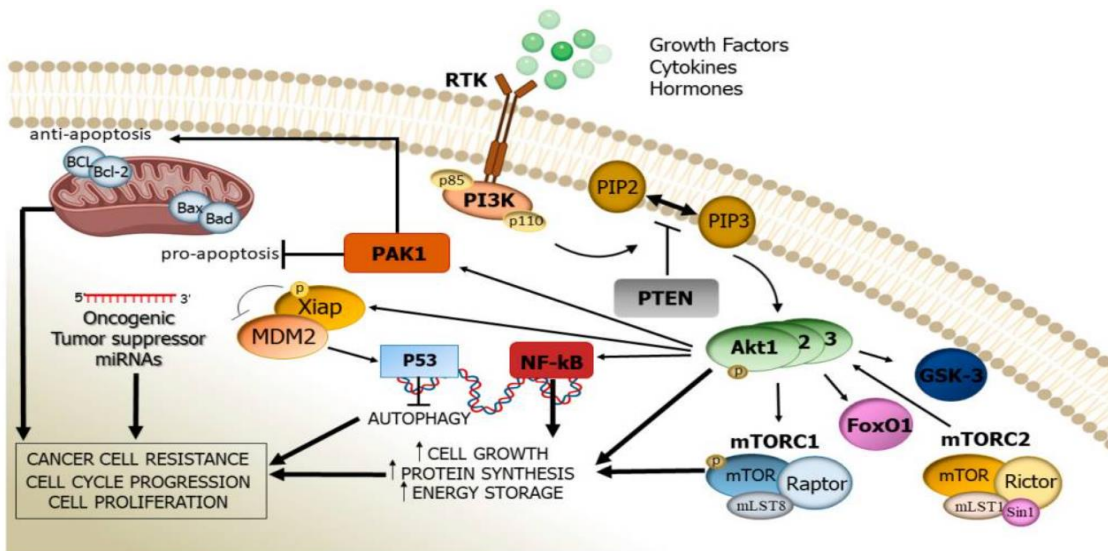
Şekil 2.13. AKT substratlarının hücresel fonksiyonları

AKT aktivasyonu, birçok fizyolojik substratın fosforilasyonu yoluyla hücre döngüsü ilerlemesini, hayatta kalmayı, metabolizmayı ve göçü uyarır. AKT hücre döngüsünde PTEN/PI3K'den sonra gelen AKT1, AKT2 ve AKT3 genleri tarafından kodlanan bir serin-treonin kinazdır. Bunlar her hücrede eksprese edilir, ancak ekspresyon seviyeleri doku tipine bağlı olarak değişir. AKT'nin amino terminali fosfolipitleri bağlayan bir alan içerir. AKT aktivitesi, PIP3 bağlanması yoluyla AKT'yi hücre zarına toplayan ve bunun Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) tarafından aktivasyonu PI3K tarafından düzenlenir (Şekil 2.14) (Carnero, 2010).



Şekil 2.14. Kanserde PKB/AKT genel mekanizması

Şekil 2.15'te PI3K/Akt/mTOR sinyal yollarının kanser gelişimine katılımı gösterilmiştir. Buna göre PI3K'nın oto-fosforilasyonu, PIP2'den PIP3'e dönüşüm yoluyla Akt'nin aktivasyonuna yol açar. PI3K/Akt ve mTORC1, tümör hücrelerinin büyümesine ve kanser hücrelerinin enerji depolamasına neden olur. Akt'nin düzenlenmesi, apoptoz ve otofajinin inhibisyonunu teşvik eden hedef genlerin ve proteinlerin fosforilasyonunu teşvik eder. Düzensiz olarak çoğalan miRNA'lar aynı zamanda kanser hücresi çoğalmasına da neden olur (Rascio ve ark., 2021).



Şekil 2.15. PI3K/Akt/mTOR sinyal yollarının kanser gelişimine katılımı

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışma ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmanın yürütülebilmesi için gerekli etik kurul izni Erzurum Atatürk Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 04.11.2021 tarih ve 464 sayılı toplantısının 07/32 nolu kararı ile alınmıştır (Ek-2). Çalışma Ağustos 2021-Ekim 2023 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yürütülmüş olup TDK-2022-10915 proje kodu ile Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Çalışma grubu Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisine Erzurum ve çevre illerden başvuran ve KHDAK tanısı almış bireylerden oluşturulmuştur. Hastaların çalışmaya dâhil edilme kriterleri lokal ileri evre (Evre 3A, Evre 3B, Evre 3C) KHDAK tanısı almış, daha önce cerrahi yapılmamış ve RT veya kemoterapi almamış olmak şeklinde belirlenmiştir. Tedavi sürecinde ex olan veya herhangi bir sebeple tedaviyi tamamlayamayan hastalar araştırma kapsamı dışında tutulurken diyabet ve hipertansiyon gibi kronik hastalığı olanlar, dışlanma kriteri sayılmamıştır.

Araştırma öncesi çalışma grubunu oluşturan örneklem sayısı 50 olarak belirlenmiştir. Bir radyasyon onkolojisi uzmanı koordinatörlüğünde KHDAK tanısı almış toplam 50 hastadan, RT'den hemen önce ve sonra kan örnekleri alınmıştır. Çalışma grubundaki hastalara Lineer Akselerator özellikli Varian Trilogy 13.6 Version (Seri No:6196 USA) cihazı ile hafta içi her gün 2 Gy/gün/fraksiyon olmak üzere toplamda 66 Gy radyoterapi (yaklaşık 6-7 haftalık bir tedavi süreci) uygulanmıştır. Kemoterapi tedavisi olarak eş zamanlı haftalık 45 mg/m² paklitaksel, AUC2'den karboplatin uygulanmıştır.

Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan örneklem sayısı ise 30 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu Erzurum Atatürk Üniversitesi polikliniklerine başvuran, bilinen kronik hastalığı olmayan sağlıklı bireylerden oluşturulmuştur.

Çalışmaya dâhil olacak kişilere çalışma öncesi araştırma ile ilgili bilgi verilmiş, *Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu* okutularak gerekli onaylar alınmıştır. Çalışma grubu ve kontrol grubunun demografik bilgilerine ilişkin (yaş, cinsiyet, eğitim durumu, medeni durum, aile hikâyesi, kronik hastalık durumu, sigara ve alkol kullanım durumu) bilgileri elde etmek için araştırmacı tarafından gerekli hasta dosyası taranarak oluşturulan *Kişisel Bilgi Formu* kullanılmıştır.

3.2. Numunelerin Toplanması ve Hazırlanması

Çalışma grubundan RT öncesi ve sonrasında olmak üzere iki defa kontrol grubundan ise bir defa sekiz saat gece açlığının ardından venöz kan örnekleri alınmıştır. Serum elde etmek için pıhtı aktivatörü içeren jel seperatörlü biyokimya tüpleri (GreinerBio-oneGmbH, Vacuette, Kremsmünster, Avusturya) kullanılmıştır. Jelli tüplerdeki numunelerin serumları 3000-4000 rpm'de 10 dakikalık soğutmalı (+4°C) santrifüj işlemi sonrasında ayrılmıştır. Elde edilen serumlar etiketlenmiş, kilitli kapaklı mikro santrifüj tüplerine aktararak alikotlanmış ve çalışma gününe kadar -80°C derin dondurucuda (Nüve DF 290, Türkiye) saklanmıştır.

Analizlerin yapılacağı günden bir gün önce örnekler sırayla -20°C, +4°C ve oda sıcaklığına alınarak aşamalı olarak çözündürülmüştür. 1,25(OH)₂D₃ pmol/L, HIF1- α pg/mL, PKB ng/mL, PI3K ng/mL ölçümleri enzim-bağılı immunosorbent ölçüm (ELISA) metoduyla ticari kitlerde yer alan talimatlara göre serum numunesinde gerçekleştirilmiştir (sırasıyla SunRed Human 1,25-dihydroxivitamin D₃ (DVD/DHVD) ELISA kit Katalog No: 201-12-1557; SunRed Human hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) ELISA kit Katalog No: 201-12-0423; SunRed Human protein kinase B (PKB)

ELISA kit Katalog No: 201-12-0893; SunRed Human Phosphotylinosital 3 kinase (PI3K) ELISA kit Katalog No: 201-12-0897).

3.3. Kullanılan Cihaz, Kit ve Malzemeler

Tablo 3.1. Kullanılan cihaz, kit ve malzemeler

Malzeme/Cihaz/ Kit adı	Firma
Santrifüj	Backman Coulter, Allegra X30R, ABD
Derin dondurucu (-80 °C)	Nüve DF 290,Türkiye
Buzdolabı (-20, +4 °C)	Arçelik 5231 NFY, Türkiye
Ayarlanabilir Hacimli 8 kanallı Otomatik Pipet (10-100 µL)	Eppendorf Research Plus, Almanya
Ayarlanabilir Hacimli Otomatik Pipet (100-1000 µL)	Axygen, ABD
Ayarlanabilir Hacimli Otomatik Pipet (20-200 µL)	Axygen, ABD
Tek Kullanımlık Pipet Ucu (10, 20, 100, 200, 1000 µL)	ISOLAB, Almanya
Kilitli Kapaklı Mikro Santrifüj Tüpü (1.5 mL)	ISOLAB, Almanya
Vorteks	Velp Scientifica ZX3, İtalya
İnkübatör	Inovia Technology SC-200-1001,Türkiye
Saf Su Cihazı	Mes mp MINIpure, Türkiye
Mikroplate Okuyucu (Spektrofotometri Cihazı)	BIO-TEK PowerWave XS, ABD
İnsan 1,25 Vitamin D ELISA Kiti	SunRed Biotechnology Company, Çin
İnsan HIF-1 α ELISA Kiti	SunRed Biotechnology Company, Çin
İnsan PKB ELISA Kiti	SunRed Biotechnology Company, Çin
İnsan PI3K ELISA Kiti	SunRed Biotechnology Company, Çin

3.4. Analiz Yöntemi: ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Enzime bağlı immuno ölçüm antikor ve antijenleri kullanarak bir molekülün bir solüsyon içindeki tespitini ve miktarını belirleyen biyokimyasal bir yöntemdir. Örneklemde immuno ölçüm ile tespit edilecek maddeler genellikle protein yapısında olup analit olarak adlandırılır (Avrameas, 1969).

Yalow ve Berson radyoaktif sinyale bağlı antikor aracılı saptama tekniğini 1960 yılında kullanan ilk kişilerdir. Ancak radyoaktif ışınların sağlık riski nedeniyle radyoaktivite içermeyen yöntemlerin aranma ihtiyacı belirli enzim-substrat

kombinasyonlarının ölçülebilir renk değışiklikleri ürettiğinin keşfedilmesine neden olmuştur. Böylece spesifik analitleri tespit edebilen antikorlara bağı enzim-substrat kombinasyonları geliştirilmiştir (Yalow & Berson, 1960).

Enzim Immuno Assay (EIA), immünolojik tepkimelerin varlığını ve konsantrasyonunu ölçmek için enzimin katalitik özelliğinden yararlanılan biyokimyasal yöntemdir. Enzime bağı immüno sorbent testi (ELISA), klinik uygulama çalışmalarında, temel bilim araştırmalarında ve teşhiste yaygın olarak kullanılan en spesifik ve basit testlerden olan bir EIA yöntemidir. Analitik yöntemlerdeki gelişmelere bağı olarak ELISA testi özgülüğünü ve duyarlılığını artırmak için sürekli olarak optimize edilmiştir (Lequin, 2005).

ELISA tekniğı hedef protein olan antijen ile ilgili antijene karşı birincil antikor arasındaki etkileşime dayanır. Antijenin varlığı, eklenen substratın enzime bağı antikor kataliziyle doğrulanır; bunların ürünleri ya niteliksel olarak görsel incelemeyle ya da niceliksel olarak bir lüminometre veya spektrofotometreden alınan okumalar kullanılarak tespit edilir. ELISA yöntemleri antijenin nasıl tespit edildiğine bağı olarak farklı kategorilere ayrılır ve genel olarak doğrudan, dolaylı, sandviç ve rekabetçi ELISA olarak sınıflandırılır. Bunların tümü antijenlere, antikorlara, substratlara ve deney koşullarına göre değışiklik gösterebilir. Direkt ELISA, enzimle konjüge edilmiş primer antikorların antijen kaplı plakalara bağlanması esasına dayanır. Dolaylı ELISA, antijen kaplı plakalara bağı birincil antikorlara özgü enzime bağı ikincil antikorları ortaya koyar. Rekabetçi ELISA, birincil antikor için örnek antijen ile plaka kaplı antijen arasında bir rekabeti ve ardından enzime bağı ikincil antikorların bağlanmasını içerir. Sandviç ELISA tekniğı ise antikorla önceden kaplanmış plakaya eklenen bir numune antijeni ve enzime bağı sekonder antikorların antijen üzerindeki tanıma bölgelerine sıralı bağlanmasını içerir (Lin, 2015).

Karmaşık analitler sandviç ELISA yöntemi ile analiz edilir. Testin adı fiziksel yapısı gereği ilgili antijeni iki antikor molekülü arasında sandviç yapabilmesinden kaynaklanmaktadır. Bir yakalama antikoru içeren kaplama tamponu solüsyonu, kuyucuklu bir plakaya ilave edilir ve antijenle birleşmesi sağlanır. İnkübasyonun ardından plaka yıkanır ve kuyucuklarda kalan bağlanma bölgelerini bloke etmek için bloke edici tampon eklenir. Numune daha sonra her kuyucuğa eklenir ve kitin talimatına göre bir süre inkübe edilir. Sonuçların doğruluğundan emin olmak için her bir plaka ile bir standart numune (pozitif kontrol) ve bir kör numune (negatif kontrol) çalışmaya eklenmelidir. Daha sonra her kuyucuğa bir tespit antikoru eklenir, sonra konjuge bir ikincil antikor ve bloke edici tampon eklenir. Her adım sonrasında kuyucuklar fosfat tamponlu tuzlu su ile yıkanır. Substrat solüsyonu eklenir ve sonucu belirlemek için bir mikroplaka okuyucu kullanılır (Buss ve ark., 1997).

Sandviç ELISA'nın avantajı, analit tespitinde yüksek özgüllüğe sahip olmasıdır. Yakalama antikoru numunedeki spesifik antijeni immobilize ettiği için doğrudan ve dolaylı ELISA'ların aksine numunenin önceden saflaştırılması gerekmez. İki antikor tanıma adımı kullanılarak antijen birincil ve ikincil antikorlar arasında etkili bir şekilde sıkıştırılır. Sandviç ELISA'nın en önemli dezavantajı, belirli birincil ve ikincil antikorların kullanılmasının gerekli olmasıdır. Birincil ve ikincil antikorlar antijen üzerindeki farklı epitoplara bağlanır ve antijen bağlanma bölgeleri için rekabeti önlemek amacıyla “eşleşen çiftler” olarak birlikte çalıştıklarının doğrulanmasıdır. Sandviç ELISA yöntemi ayrıca doğrudan ve dolaylı ELISA'lara göre pahalı ve daha fazla zaman alıcıdır (Clark & Engvall, 2018; Shah & Maghsoudlou, 2016).

1,25(OH)₂D₃ Ölçümü: Serum numunesinde Vitamin D düzeyi ölçümü için ticari ELISA kiti (Sun Red Biotechnology Company Human DVD/DHVD3 ELISA kit Katalog No: 201-12-1557, China) kullanılmıştır. Serum, plazma ve diğer ilgili vücut

sıvılarındaki Vitamin D ölçümü amacıyla üretilen kitin standart eğri aralığı 5-1500 pmol/L, duyarlılığı 4.3177 pmol/L, çalışma içi kesinlik CV değeri <%10, çalışmalar arası kesinlik CV değeri <%12'dir.

Sandviç ELISA prensibine göre çalışan bu kitte, öncelikle insan 1,25 Vitamin D antikoruna ile kaplanmış olan kuyucuklara numune eklenir. Numunedeki Vitamin D, katı fazı oluşturan kuyucuklardaki antikorlarına bağlanır. İnkübasyonun ardından eklenen biyotinlenmiş insan 1,25 Vitamin D antikoruna numunedeki Vitamin D ile bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir, biyotinlenmiş Vitamin D antikoruna bağlanır ve immunkompleks oluşur. 37°C'de 60 dakikalık inkübasyondan sonra yapılan yıkama işlemi ile antikora bağlanmamış serbest haldeki Streptavidin-HRP deney ortamından uzaklaştırılır. Sonra kromojen A ve B solüsyonları eklenir ve numunelerdeki 1,25 Vitamin D konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde renk değişimi gerçekleşir. 37°C'de 10 dakikalık inkübasyon sonrasında asidik karakterli stop çözeltisinin eklenmesi ile reaksiyon durdurulur ve 450 nm dalga boyunda absorbanst ölçümü yapılır.

Kitin kullanım talimatı doğrultusunda aşağıdaki basamaklar takip edilerek serum numunesinde 1,25 Vitamin D (1,25(OH)₂D₃) miktarı analiz edilmiştir:

- a. Kit ve numuneler oda sıcaklığına getirilerek hazırlandı.
- b. Standart kuyucuklarına 50 µL standart eklendi.
- c. Numune kuyucuklarına 40 µL numune ve 10 µL DVD/DHVD₃ antikoruna eklendi.
- d. Kör haricindeki tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklendi, kuyucukların üzeri kapatılarak 60 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- e. Her bir kuyucukta 350 µL yıkama solüsyonu 1-2 dk kadar bekletilerek beş defa yıkama yapıldı.

- f. K r, standart ve numune kuyucuklarına 50  L kromojen A ve B solüsyonları eklendi. Kuyucukların  zeri kapatılarak 37 C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında mavi renk oluştu.
- g. Her bir kuyucuğa 50  L durdurma (stop) solüsyonu eklendi, mavi rengin sarıya d n  t    görüldü. BIO-TEK PowerWave XS mikropate okuyucu cihazında 450 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. R² değeri 0.9916 olarak tespit edildi. Standart e riden yola çıkılarak numunelerin 1,25 Vitamin D konsantrasyonları pmol/L birimine göre belirlendi.

HIF1   l  m : Serum numunesinde HIF-1  düzeyi ölçümü için ticari ELISA kit (Sun Red Biotechnology Company Human HIF-1  ELISA kit Katalog No: 201-12-0423, China) kullanılmıştır. Serum, plazma ve diğer ilgili vücut sıvılarındaki HIF-1  ölçümü amacıyla üretilen kitin standart eğri aralığı 1-300 pg/mL, duyarlılığı 0.946 pg/mL, çalışma içi kesinlik CV değeri <%10, çalışmalar arası kesinlik CV değeri <%12’dir.

Sandviç ELISA prensibine göre çalışan bu kitte öncelikle, insan HIF1  antikoru ile kaplanmış olan kuyucuklara numune eklenir. Numunedeki HIF-1  katı fazı oluşturan kuyucuklardaki antikorlarına ba lanır. Ink basyonun ardından eklenen biyotinlenmi  insan HIF-1  antikoru, numunedeki HIF1  ile ba lanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir, biyotinlenmi  HIF-1  antikoruna ba lanır ve immunkompleks oluşur. 37 C’de 60 dakikalık inkübasyondan sonra yapılan yıkama işlemi ile antikora ba lanmamı  serbest haldeki Streptavidin-HRP deney ortamından uzaklaştırılır. Kromojen A ve B solüsyonları eklenir ve numunelerdeki HIF1  konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde renk değişimi gerçekleşir. 37 C’de 10 dakikalık inkübasyon sonrasında asidik karakterli stop çözeltisinin eklenmesi ile reaksiyon durdurulur ve 450 nm’de absorbans ölçümü gerçekleştirilir.

Kitin kullanım klavuzu doğrultusunda aşağıdaki basamaklar takip edilerek serum numunesinde HIF-1 α analiz edilmiştir:

- a. Kit ve numuneler oda sıcaklığına getirilerek hazırlandı.
- b. Standart kuyucuklarına 50 μ L standart eklendi.
- c. Numune kuyucuklarına 40 μ L numune ve 10 μ L HIF-1 α antikoru eklendi.
- d. Kör haricindeki tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 μ L streptavidin-HRP eklendi, kuyucukların üzeri kapatılarak 60 dakika 37°C’de inkübe edildi.
- e. Her bir kuyucukta 350 μ L yıkama solüsyonu 1-2 dk kadar bekletilerek beş defa yıkama yapıldı.
- f. Kör, standart ve numune kuyucuklarına 50 μ L kromojen A ve B solüsyonları eklendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 37°C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında mavi renk oluştu.
- g. Her bir kuyucuğa 50 μ L durdurma (stop) solüsyonu eklendi, mavi rengin sarıya dönüştüğü görüldü. BIO-TEK PowerWave XS mikropate okuyucu cihazında 450 nm’de absorbands değerleri ölçüldü. R² değeri 0.9889 olarak tespit edildi. Standart eğriden yola çıkılarak numunelerin HIF-1 α konsantrasyonları pg/mL birimine göre belirlendi.

PKB (AKT) Ölçümü: : Serum numunesinde PKB düzeyi ölçümü için ticari ELISA kit (Sun Red Biotechnology Company Human PKB ELISA kit Kat. no: 201-12-0893, China) kullanılmıştır. Serum, plazma ve diğer vücut sıvılarındaki PKB ölçümü amacıyla üretilen kitin standart eğri aralığı 0.75-200 ng/mL, duyarlılığı 0.726 ng/mL, çalışma içi kesinlik CV değeri <10%, çalışmalar arası kesinlik CV değeri <12%’dir.

Sandviç ELISA prensibine göre çalışan bu kitte öncelikle, insan PKB antikoru ile kaplanmış olan kuyucuklara numune eklenir. Numunedeki PKB katı fazı oluşturan kuyucuklardaki antikorlarına bağlanır. İnkübasyonun ardından eklenen biyotinlenmiş

insan PKB antikoru numunedeki PKB ile bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir, biyotinlenmiş PKB antikoruna bağlanır ve immunkompleks oluşur. 37°C’de 60 dakikalık inkübasyondan sonra yapılan yıkama işlemi ile antikora bağlanmamış serbest haldeki Streptavidin-HRP, deney ortamından uzaklaştırılır. Kromojen A ve B solüsyonları eklenir ve numunelerdeki PKB konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde renk değişimi gerçekleşir. 37°C’de 10 dakikalık inkübasyon sonrasında asidik karakterli stop solüsyonunun eklenmesi ile reaksiyon durdurulur ve 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilir.

Kitin kullanım klavuzu doğrultusunda aşağıdaki basamaklar takip edilerek serum numunesinde PKB analiz edilmiştir:

- a. Kit ve numuneler oda sıcaklığına getirilerek hazırlandı.
- b. Standart kuyucuklarına 50 µL standart eklendi.
- c. Numune kuyucuklarına 40 µL numune ve 10 µL PKB antikoru eklendi.
- d. Kör haricindeki tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklendi, kuyucukların üzeri kapatılarak 60 dakika 37°C’de inkübe edildi.
- e. Her bir kuyucukta 350 µL yıkama solüsyonu 1-2 dk kadar bekletilerek beş defa yıkama yapıldı.
- f. Kör, standart ve numune kuyucuklarına 50 µL kromojen A ve B solüsyonları eklendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 37°C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında mavi renk oluştu.
- g. Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma (stop) solüsyonu eklendi, mavi rengin sarıya dönüştüğü görüldü. BIO-TEK PowerWave XS mikropate okuyucu cihazında 450 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. R² değeri 0.9999 olarak tespit edildi. Standart eğriden yola çıkılarak numunelerin PKB konsantrasyonları ng/mL birimine göre belirlendi.

PI3K Ölçümü: Serum numunesinde PI3K düzeyi ölçümü için ticari ELISA kit (Sun Red Biotechnology Company Human PI3K ELISA kit Katalog No: 201-12-0897, China) kullanılmıştır. Serum, plazma ve diğer ilgili vücut sıvılarındaki PI3K ölçümü amacıyla üretilen kitin standart eğri aralığı 0.25-70 ng/mL, duyarlılığı 0.243 ng/mL, çalışma içi kesinlik CV değeri <9%, çalışmalar arası kesinlik CV değeri <11'dir.

Sandviç ELISA prensibine göre çalışan bu kite öncelikle, insan PI3K antikoru ile kaplanmış olan kuyucuklara numune eklenir. Numunedeki PI3K katı fazı oluşturan kuyucuklardaki antikorlarına bağlanır. İnkübasyonun ardından eklenen biyotinlenmiş insan PI3K antikoru numunedeki PI3K ile bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir, biyotinlenmiş PI3K antikoruna bağlanır ve immunkompleks oluşur. 37°C'de 60 dakikalık inkübasyondan sonra yapılan yıkama işlemi ile antikora bağlanmamış serbest haldeki Streptavidin-HRP deney ortamından uzaklaştırılır. Kromojen A ve B solüsyonları eklenir ve numunelerdeki PI3K konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde renk değişimi gerçekleşir. 37°C'de 10 dakikalık inkübasyon sonrasında asidik karakterli stop solüsyonunun eklenmesi ile reaksiyon durdurulur ve 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilir.

Kitin kullanım klavuzu doğrultusunda aşağıdaki basamaklar takip edilerek serum numunesinde PI3K analiz edilmiştir:

- a. Kit ve numuneler oda sıcaklığına getirilerek hazırlandı.
- b. Standart kuyucuklarına 50 µL standart eklendi.
- c. Numune kuyucuklarına 40 µL numune ve 10 µL PI3K antikoru eklendi.
- d. Kör haricindeki tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklendi, kuyucukların üzeri kapatılarak 60 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- e. Her bir kuyucukta 350 µL yıkama solüsyonu 1-2 dk kadar bekletilerek beş defa yıkama yapıldı.

- f. K r, standart ve numune kuyucuklarına 50  L kromojen A ve B solüsyonları eklendi. Kuyucukların  zeri kapatılarak 37 C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında mavi renk oluştu.
- g. Her bir kuyucuğa 50  L durdurma solüsyonu eklendi, mavi rengin sarıya d n  t     görüldü. BIO-TEK PowerWave XS mikropate okuyucu cihazında 450 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. R² değeri 0.9990 olarak tespit edildi. Standart e riden yola çıkılarak numunelerin PI3K konsantrasyonları ng/mL birimine göre belirlendi.

Tablo 3.2. Kullanılan kitlerin ölçüm parametreleri

	1,25(OH)₂D3	HIF1�	PKB	PI3K
Yöntem	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
Birimi	pmol/L	pg/mL	ng/mL	ng/mL
Kitin standart eğri aralığı	5-1500 pmol/L	1-300 pg/mL	0.75-200 ng/mL	0.25-70 ng/mL
Duyarlılığı	4.317 pmol/L	0.946 pg/mL	0.726 ng/mL	0.243 ng/mL
Çalışma içi kesinlik CV değeri	<%10	<%10	<%10	<%9
�alı�malar arası kesinlik CV değeri	<%12	<%12	<%12	<%11
R ² değeri	0.9916	0.9889	0.9999	0.9990

3.5. İstatistiksel  l  mler

Çalışma verilerinin analizinde SPSS versiyon 27 kullanıldı. Numerik değişkenler ortalama, standart sapma, ortanca ve  eyreklikler, kategorik değişkenler ise sayı ve yüzdelere şeklinde hesaplandı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi, basıklık ve  arpıklık için hesaplanan z değerleri (-2 ile +2 aralığında normal kabul edildi) ve grafikleme yöntemleri ile araştırıldı. Normal dağılan değişkenlerin gruplar arası mukayese edilmelerinde student t, normal da ılmayanlar için Mann Whitney U, grup içi ardışık ölçümlerin kar ıla tırılmasında Wilcoxon, kategorik değişkenlerin kar ıla tırılmasında ise Ki kare testleri kullanıldı.  l  m parametreleri

arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde Spearman korelasyon analizinden yararlanıldı. Korelasyon analizi Tablo 3.3'te belirtilen değerlendirme cetveline göre yapıldı. Parametrelerin birinci ölçümleri ile Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi yürütülerek, kesme noktası ve karşılık gelen sensitivite spesifite (duyarlılık ve özgüllük) değerleri hesaplandı. $p < 0.05$ olarak bulunan bütün analizlerin sonuçları anlamlı olarak değerlendirildi.

Tablo 3.3. Korelasyon katsayısı (r) değerlendirme cetveli

Korelasyon katsayısı (r)	Durum
<0.2	Çok zayıf ilişki ya da korelasyon yok
0.2-0.4	Zayıf korelasyon
0.4-0.6	Orta korelasyon
0.6-0.8	Yüksek (ileri) korelasyon
0.8>	Çok yüksek korelasyon

4. BULGULAR

Çalışmanın konusunu oluşturan KHDAK tanısı alıp RT öncesi ve sonrası 50 hastanın ve 30 sağlıklı kontrol grubunun serumlarında 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PI3K, PKB seviyeleri tespit edilerek birbirleri arasındaki korelasyon bu bölümde analiz edilmiştir. Çalışma ve kontrol grubunun sosyal demografik özelliklerine ait tanımlayıcı bilgiler Tablo 4.1’de verilmiştir. Buna göre çalışma grubundaki katılımcıların %92’si erkek olup %44’ü 55-64 yaş aralığındadır. %94 katılımcı evli olup meslek olarak %54’ü emeklilerden oluşmaktadır. Hastaların %54’ünde kronik bir hastalık öyküsü mevcut olup ailede kanser öyküsü olan hasta oranı %42’dir. %92 gibi yüksek bir oranda sigara kullanma öyküsü mevcut olup bunların %5’i alkol kullanmaktadır. Hastalarda görülen KHDAK’i çeşitlerinden %80’i SCC olup %20’si adenokarsinom tipine sahiptir.

Kontrol grubundaki katılımcıların sosyal demografik özelliklerine ilişkin tanımlayıcı bilgiler ise katılımcıların %80’ini erkek ve %20’sini kadın cinsiyet oluşturmaktadır. Ki kare testine göre p=0.164 olduğundan çalışma ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımları benzerdi. Katılımcıların yaş aralığında 40-54 grubu %66.6 ile en yüksek oranı temsil etmektedir.

Tablo 4.1. Grupların sosyal demografik özelliklerine ait tanımlayıcı bilgiler

Değişkenler		Çalışma Grubu		Kontrol Grubu	
		n	%	n	%
Cinsiyet	Kadın	4	8.0	6	20.0
	Erkek	46	92.0	24	80.0
Yaş	40-54 yaş	7	14.0	20	66.6
	55-64 yaş	22	44.0	5	16.6
	65 yaş ve üstü	21	42.0	5	16.6
Medeni Durum	Evli	47	94.0		
	Bekâr	3	6.0		
	Emekli	27	54.0		
Meslek	Serbest, işçi	19	38.0		
	Ev hanımı	4	8.0		
Kronik Hastalık Durumu	Var	27	54.0		
	Yok	23	46.0		
Sigara Kullanma	Kullanıyor	46	92.0		
Öyküsü	Kullanmıyor	4	8.0		
Alkol Kullanma	Kullanıyor	5	10.0		
Öyküsü	Kullanmıyor	45	90.0		
Ailede Kanser Öyküsü	Kanser Öyküsü Olan	21	42.0		
	Kanser Öyküsü Olmayan	29	58.0		
	Adenokarsinom	10	20.0		
Kanser Türü	Skuamöz Hücreli				
	Karsinom (SCC)	40	80.0		
TOPLAM		50	100.0	30	100.0

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun yaş dağılımına göre karşılaştırılması Tablo 4.2’de verilmiştir. Buna göre Mann-Whitney U testi 247.500; Wilcoxon W testi 712.500; Z skoru -4.998; p değeri (2-tailed) .000 ($p < 0.05$) olduğundan gruplar arasında yaş dağılımı açısından anlamlı düzeyde fark vardı ($p < 0.001$). Nonparametrik analiz kullanıldığı için sonuçlar ortanca (median) ve IQR (Q1-Q3) üzerinden değerlendirildi. Buna göre hastaların ortanca yaşı 63.0 (10.0) ve kontrollerin ortanca yaşı 47.5 (14.0) idi. Buna göre hasta ve kontrollerin yaş ortalaması birbirine yakın olmasına rağmen dikkate alınan parametrelerin sonuçlarında farklılık olması da gözönünde bulundurulmalıdır.

Tablo 4.2. Grupların yaş dağılımına göre karşılaştırılması

		Ortalama	SD	Ortanca	Q1	Q3
Hastalar	Yaş	63.6	9.2	63.0	59.0	69.0
Kontrol	Yaş	50.2	9.2	47.5	42.0	56.0

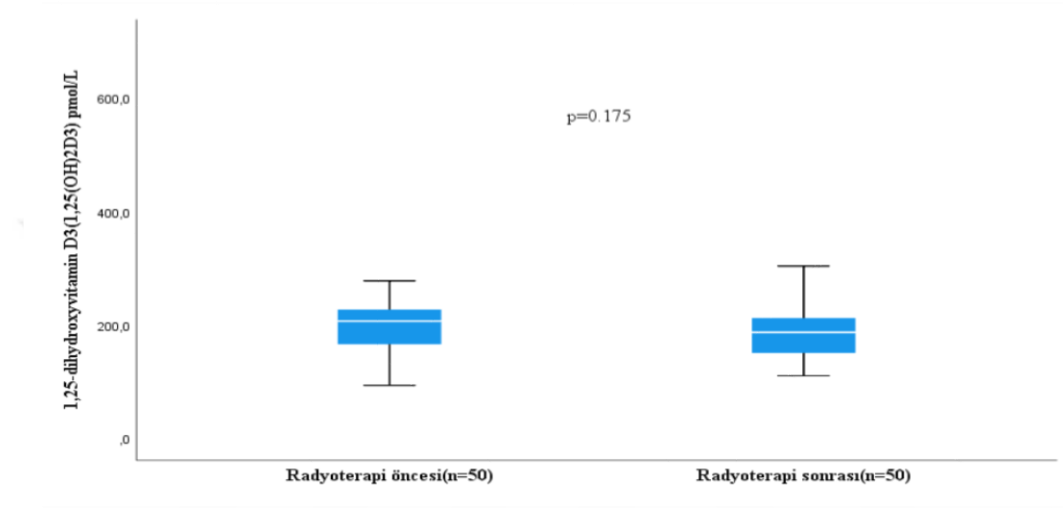
Çalışma grubuna ilişkin 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PKB, ve PI3K değişkenlerinin RT öncesi ve sonrası karşılaştırılması Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Buna göre çalışma grubunda yer alan KHDAK tanısı almış hastaların RT öncesi ve sonrası 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PKB, ve PI3K değerleri arasında anlamlı bir farklılığın olup olmadığını belirleyebilmek için Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi'nden yararlanıldı ve sonuçlar aşağıda verildi. Yapılan analiz sonucunda HIF1 α ve PKB değişkenlerinin RT öncesi ve sonrası değerleri arasında anlamlı bir farklılık olduğu görüldü. Buna göre HIF1 α RT öncesi medyan değeri 51.0 (43.9-58.0) iken, RT sonrası medyan değeri 45.3 (32.8-58.2) idi. Elde edilen bu bulguya göre RT öncesi ve sonrası HIF1 α dağılımları arasında anlamlı bir farklılık vardı (p=0.010). Benzer şekilde PKB'nin RT öncesi medyan değeri 9.4 (6.8-14.0) iken RT sonrası medyan değeri 12.5 (7.0-23.2) idi. Elde edilen bu bulgu RT öncesi ve sonrası PKB'nin dağılımları arasında anlamlı bir farklılık olduğunu gösterdi (p=0.046). 1,25(OH)₂D₃ ve PI3K parametrelerinde RT öncesi ve sonrası arasında anlamlı bir fark görülmedi (sırayla p=0.175 ve p=0.958).

Tablo 4.3. Çalışma grubuna ilişkin 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PKB, ve PI3K değişkenlerinin RT öncesi ve sonrası karşılaştırılması

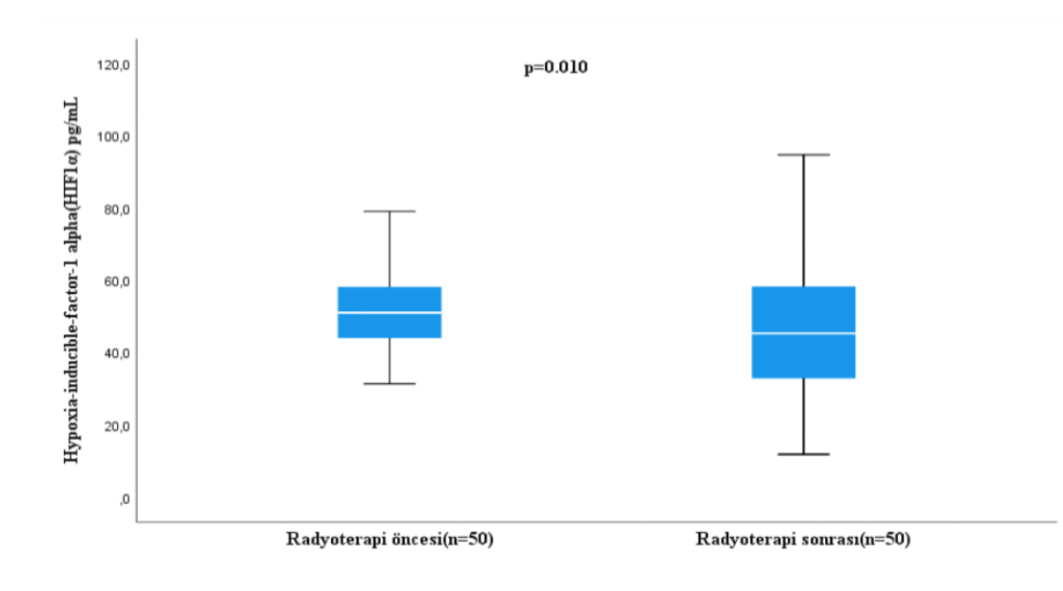
	RT Öncesi	RT Sonrası	Test Değeri	
	Ort. $\pm$ SS / Medyan (Q1-Q3)	Ort. $\pm$ SS / Medyan (Q1-Q3)	Z skoru	p
1,25(OH)₂D₃	210.1 $\pm$ 69.4	202.5 $\pm$ 96.1	-1.356	0.175
(pmol/L)	207.5 (166.6-227.6)	187.3 (151.0-212.6)		
HIF1α	51.9 $\pm$ 17.0	44.6 $\pm$ 17.2	-2.563	0.010*
(pg/mL)	51.0 (43.9-58.0)	45.3 (32.8-58.2)		
PKB	12.7 $\pm$ 10.7	19.9 $\pm$ 23.0	-1.994	0.046*
(ng/mL)	9.4 (6.8-14.0)	12.5 (7.0-23.2)		
PI3K	10.8 $\pm$ 6.5	12.2 $\pm$ 12.1	-0.053	0.958
(ng/mL)	9.0 (7.0-11.6)	9.4 (6.3-12.4)		

*p<0.05

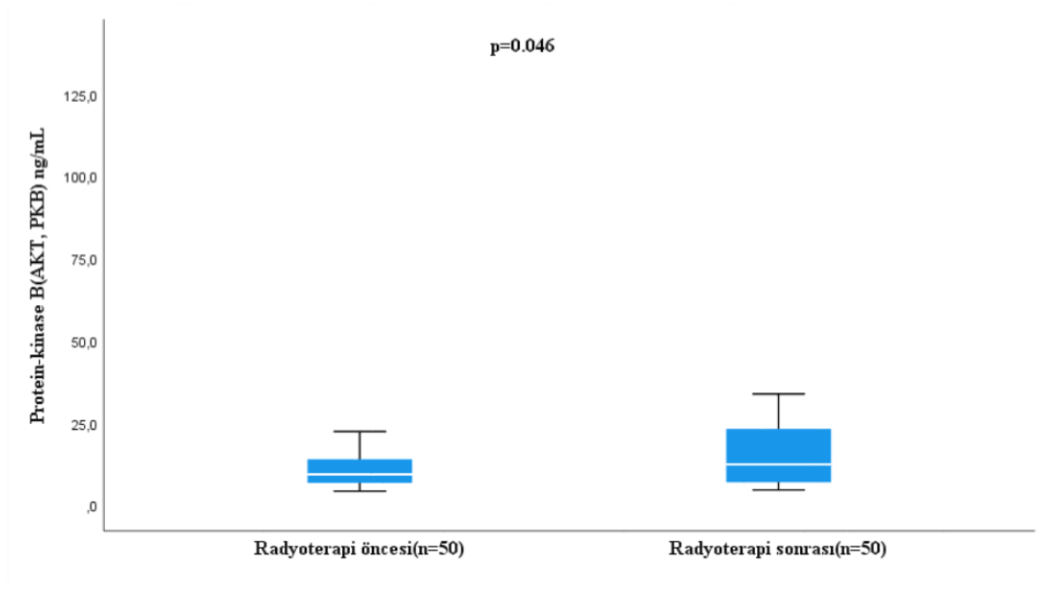
Çalışma grubunda Tablo 4.3'e göre hesaplanan RT öncesi ve sonrası 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PKB ve PI3K parametrelerinin dağılım grafikleri sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Bu dağılımların hesaplanmasında kullanılan teknik “İki Bağımlı Grup Karşılaştırması İçin Kullanılan Parametrik Olmayan Wilcoxon İşaretli Sıra Sayıları Testi”dir.



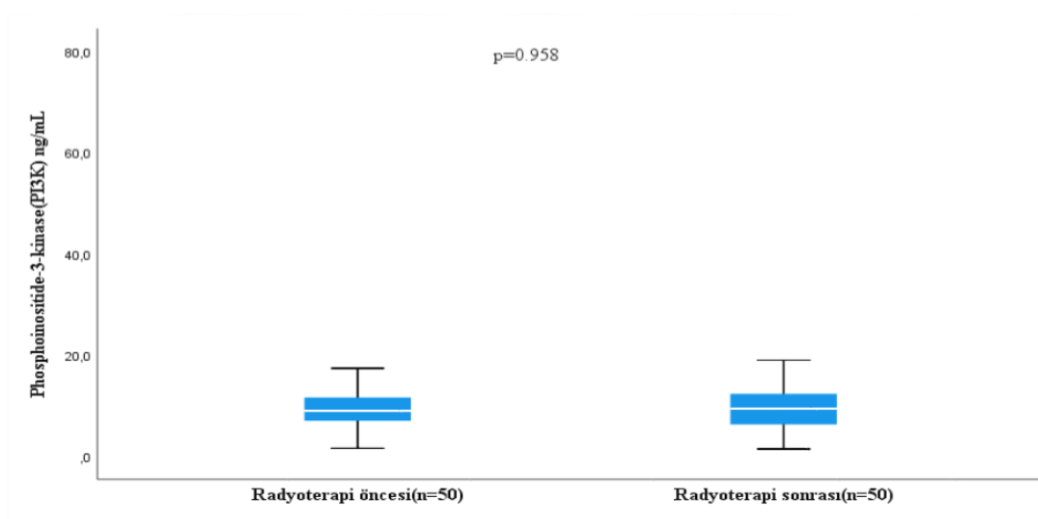
Şekil 4.1. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi ve sonrası 1,25(OH)₂D₃ dağılımı



Şekil 4.2. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi ve sonrası HIF1 α dağılımı



Şekil 4.3. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi ve sonrası PKB dağılımı



Şekil 4.4. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi ve sonrası PI3K dağılımı

Hasta grubunda radyoterapi öncesi sürekli iki değişken arasındaki ilişkinin yönünü ve derecesini tespit etmek için Spearman korelasyon analizi yapıldı. Hasta grubunda radyoterapi öncesi tüm parametreler arasında anlamlı pozitif yönlü ilişki vardı (Tablo 4.4). Örneğin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile $\text{HIF}1\alpha$ arasında anlamlı, pozitif yönlü ve ileri düzeyde korelasyon ($r=0.622$, $p<0.001$); $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile PKB arasında anlamlı, pozitif yönlü ve ileri düzeyde korelasyon ($r=0.704$, $p<0.001$); $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile PI3K arasında

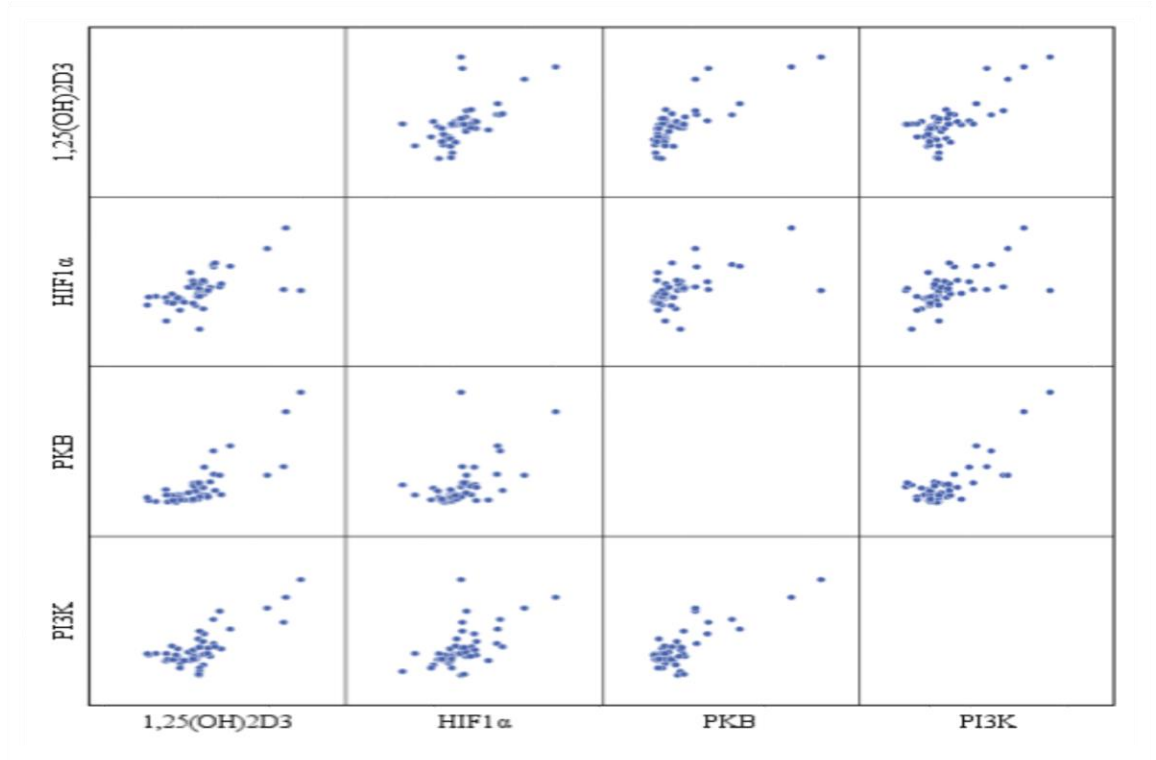
anlamlı, pozitif yönlü ve orta düzeyde korelasyon ($r=0.537$, $p<0.001$); HIF1 α ile PKB arasında anlamlı, pozitif yönlü ve orta düzeyde korelasyon ($r=0.560$, $p<0.001$); HIF1 α ile PI3K arasında anlamlı, pozitif yönlü ve ileri düzeyde korelasyon ($r=0.615$, $p<0.001$); PKB ile PI3K arasında anlamlı, pozitif yönlü ve orta düzeyde korelasyon ($r=0.477$, $p<0.001$) vardı.

Tablo 4.4. Hasta grubunda radyoterapi öncesi parametreler arası ilişkiler

	HIF1 α pg/mL	PKB ng/mL	PI3K ng/mL
1,25(OH) $_2$ D3 pmol/L	$r=.622$; $p=.000^*$	$r=.704$; $p=.000^*$	$r=.537$; $p=.000^*$
HIF1 α pg/mL		$r=.560$; $p=.000^*$	$r=.615$; $p=.000^*$
PKB ng/mL			$r=.477$; $p=.000^*$

* $p<0.05$

Çalışma grubunun (Tablo 4.4'e göre oluşturulan) radyoterapi öncesi 1,25(OH) $_2$ D3, HIF1 α , PKB ve PI3K parametrelerinin saçılım grafiği Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Çalışma grubunda radyoterapi öncesi parametrelerin saçılım grafiği

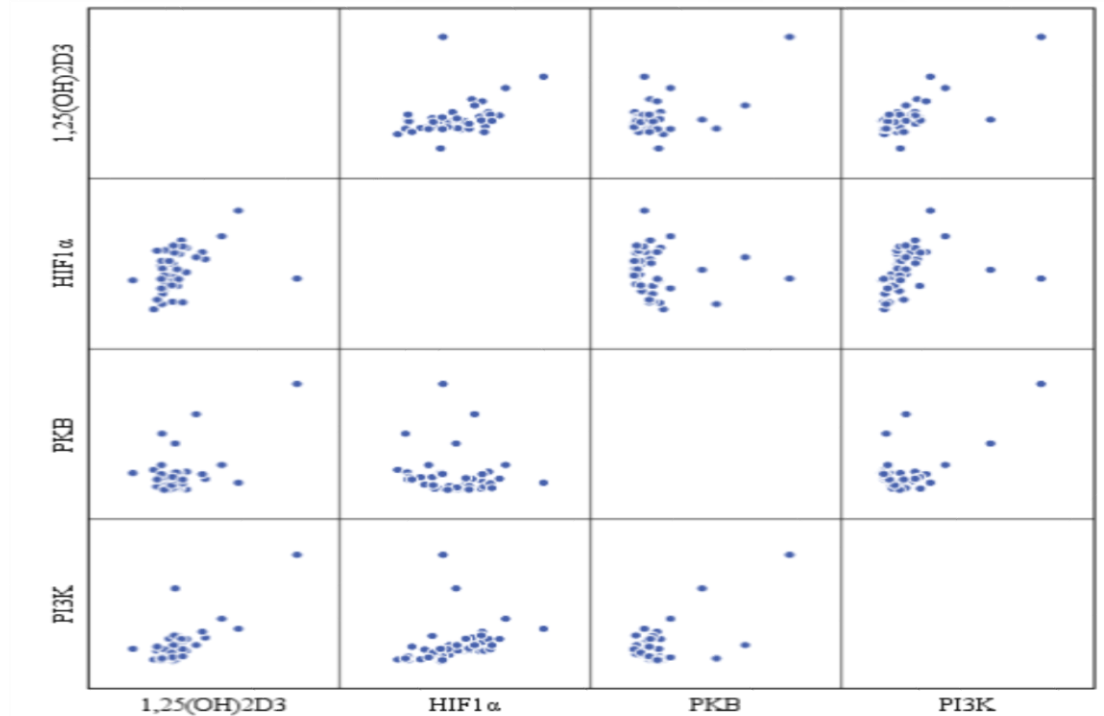
Hasta grubunda radyoterapi sonrası parametreler arasındaki ilişkiyi tespit etmek için Spearman korelasyon analizi yapıldı. Buna göre 1,25(OH)₂D3 ile HIF1 α ($r=0.413$, $p=0.003$); 1,25(OH)₂D3 ile PI3K ($r=0.474$, $p<0.001$) ve HIF1 α ile PI3K arasında anlamlı pozitif yönlü ve orta düzeyli ($r=0.586$, $p<0.001$) korelasyon vardı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Hasta grubunda radyoterapi sonrası parametreler arası ilişkiler

	HIF1 α pg/mL	PKB ng/mL	PI3K ng/mL
1,25(OH) ₂ D3 pmol/L	$r=.413$; $p=.003^*$	$r=.208$; $p=.148$	$r=.474$; $p=.001^*$
HIF1 α pg/mL		$r=-.260$; $p=.068$	$r=.586$; $p=.000^*$
PKB ng/mL			$r=.002$; $p=.987$

* $p<0.05$

Çalışma grubunda radyoterapi sonrası 1,25(OH)₂D3, HIF1 α , PKB ve PI3K parametrelerinin (Tablo 4.5'e göre oluşturulan) saçılım grafiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Çalışma grubunda radyoterapi sonrası parametrelerin saçılım grafiği

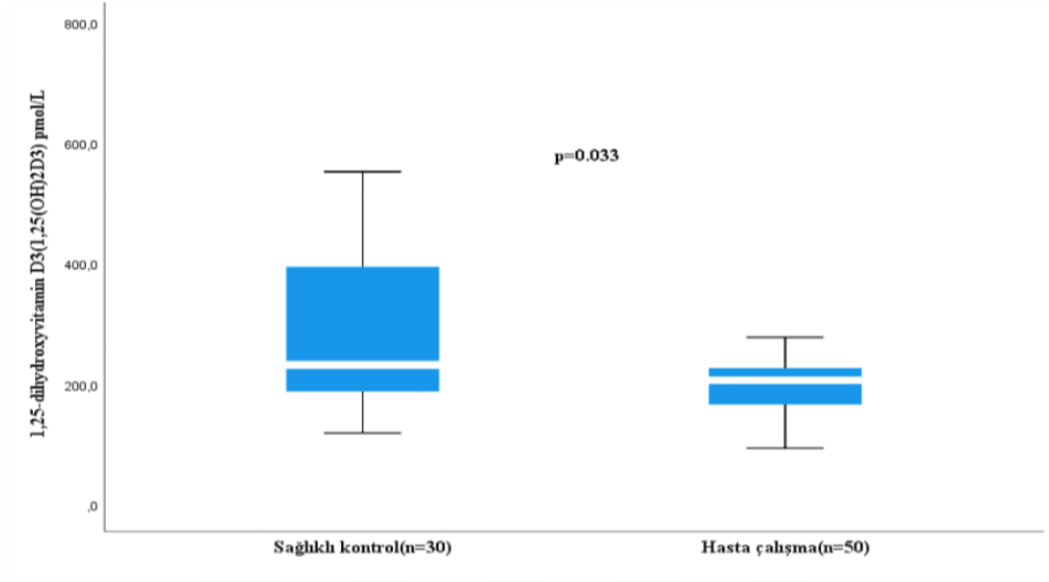
RT öncesi çalışma grubuyla sağlıklı kontrol grubunda 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PKB ve PI3K parametreleri arasında karşılaştırma yapmak için verileri normal dağılım göstermeyen bağımsız iki grup arasında gerçekleştirilen Mann-Whitney U (MWU), aynı bireylerin iki farklı sonucunu karşılaştırmak için yapılan Wilcoxon W (W) testi, bir veri noktasının ortalamasının tam olarak kaç standart sapma üstünde veya altında olduğunu ölçen Z skoru, sonuçların anlamlılık düzeyini ölçen p değeri, ortalama, standart sapma, medyan, birinci ve üçüncü çeyreklikleri gösteren Q1-Q3 sonuçları bulunmaktadır. Tablo 4.6'da görüldüğü üzere çalışma grubunda 1,25(OH)₂D₃'ün medyan değeri 207.5, sağlıklı kontrol grubunun medyan değeri 232.5 (p=0.033) ve çalışma grubunda PKB'nin medyan değeri 9.4, sağlıklı kontrol grubunun medyan değeri 50.7 (p<0.001) olduğundan gruplar arasında 1,25(OH)₂D₃ ve PKB parametreleri dağılımları yönünden anlamlı düzeyde fark vardır.

Tablo 4.6. Parametrelerin kontrol grubu ve radyoterapi öncesi çalışma grubuyla karşılaştırılması

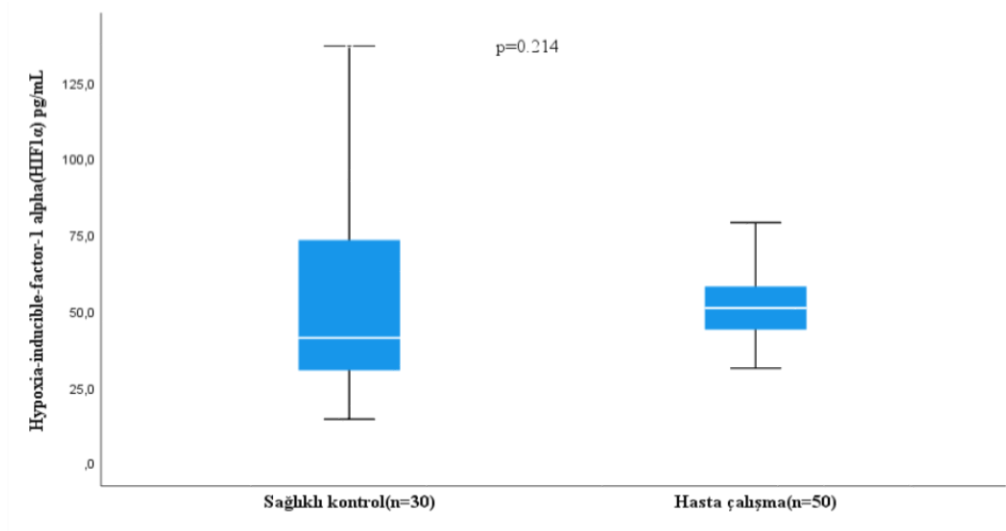
	RT Öncesi Çalışma Grubu (n=50)	Kontrol Grubu (n=30)	MWU	W	Z	p
1,25(OH)₂D₃ pmol/L						
<i>Ort±SS</i>	210.1 ± 69.4	296.2 ± 152.1	536	1811	-2.127	0.033*
<i>Medyan (Q1-Q3)</i>	207.5 (166.6-227.6)	232.5 (187.9-395.0)				
HIF1α pg/mL						
<i>Ort±SS</i>	51.9 ± 17	54.8 ± 36.2	625	1090	-1.242	0.214
<i>Medyan (Q1-Q3)</i>	51.0 (43.9-58.0)	41.1 (30.5-73.2)				
PKB ng/mL						
<i>Ort±SS</i>	12.7 ± 10.7	61.1 ± 46.2	72	1347	-6.738	0.000*
<i>Medyan (Q1-Q3)</i>	9.4 (6.8-14.0)	50.7 (32.0-65.3)				
PI3K ng/mL						
<i>Ort±SS</i>	10.8 ± 6.5	18.0 ± 19.6	715	1180	-0.348	0.728
<i>Medyan (Q1-Q3)</i>	9.0 (7.0-11.6)	7.4 (4.0-26.9)				

*p<0.05

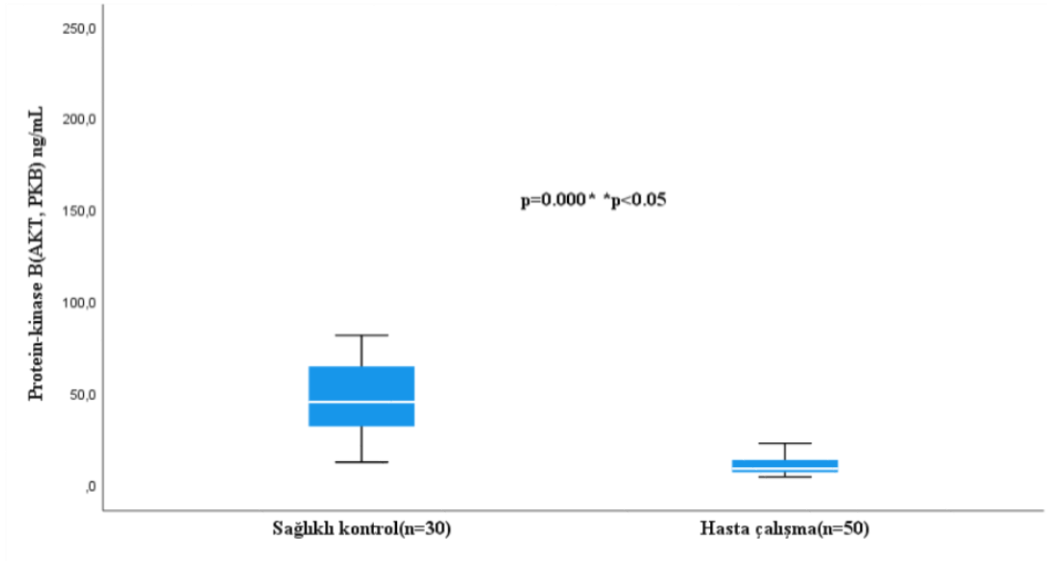
RT öncesi çalışma ve sağlıklı kontrol grubunda 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PKB ve PI3K parametrelerinin dağılımlarına ait kutu grafikleri (Tablo 4.6'ya göre oluşturulmuştur) sırasıyla Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.



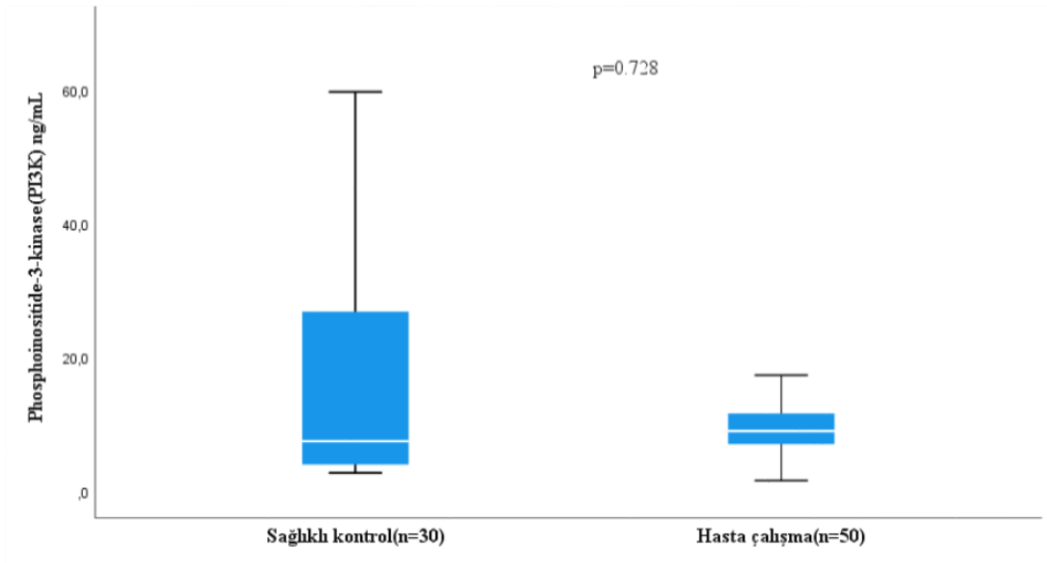
Şekil 4.7. RT öncesi çalışma (hasta) ve kontrol grubunda 1,25(OH)₂D₃ dağılımı



Şekil 4.8. RT öncesi çalışma (hasta) ve sağlıklı kontrol grubunda HIF1 α dağılımı



Şekil 4.9. RT öncesi çalışma (hasta) ve sağlıklı kontrol grubunda PKB dağılımı



Şekil 4.10. RT öncesi çalışma (hasta) ve sağlıklı kontrol grubunda PI3K dağılımı

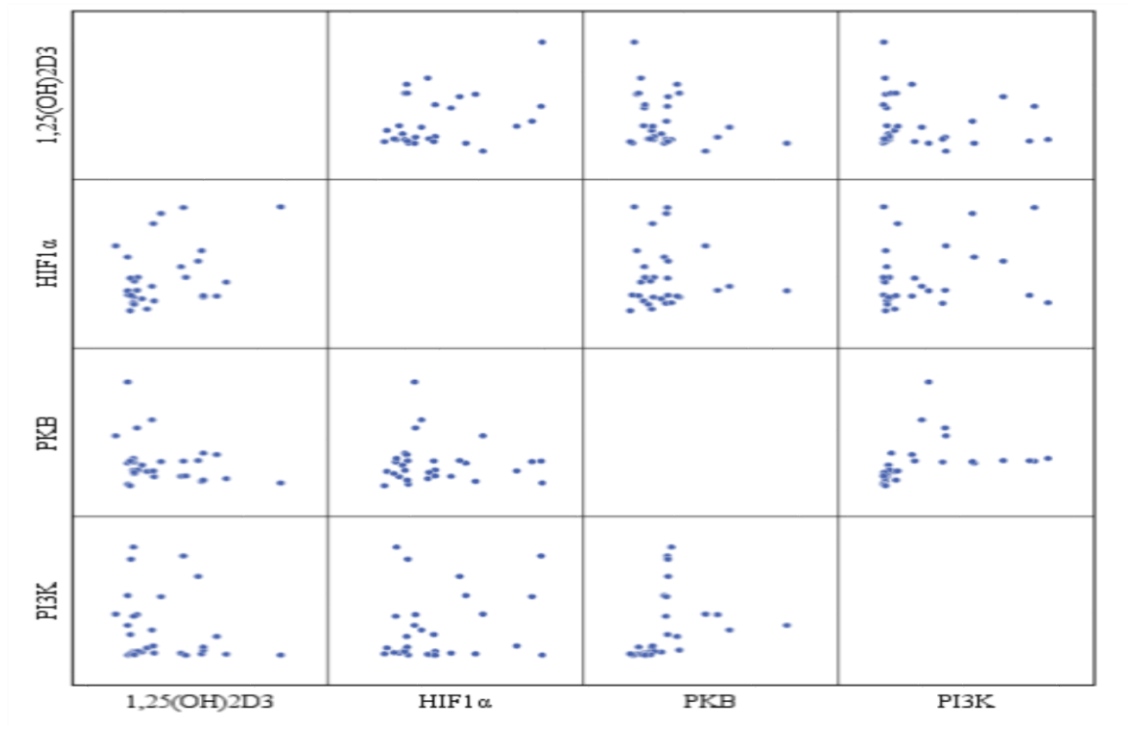
Sağlıklı kontrol grubunda parametreler arasındaki ilişkinin yönünü ve derecesini tespit etmek için Spearman korelasyon analizi yapılmıştır. Tablo 4.7’de görüldüğü gibi PKB ile PI3K arasında anlamlı, pozitif yönlü ve yüksek düzeyde ilişki vardı ($r=0.772$, $p<0.001$).

Tablo 4.7. Sağlıklı kontrol grubunda parametreler arası ilişkiler (n=30)

	HIF1α pg/mL	PKB ng/mL	PI3K ng/mL
1,25(OH)$_2$D3 pmol/L	r=.251; p=.182	r=-.224; p=.233	r=-.262; p=.162
HIF1α pg/mL		r=.043; p=.820	r=.107; p=.572
PKB ng/mL			r=.772; p=.000*

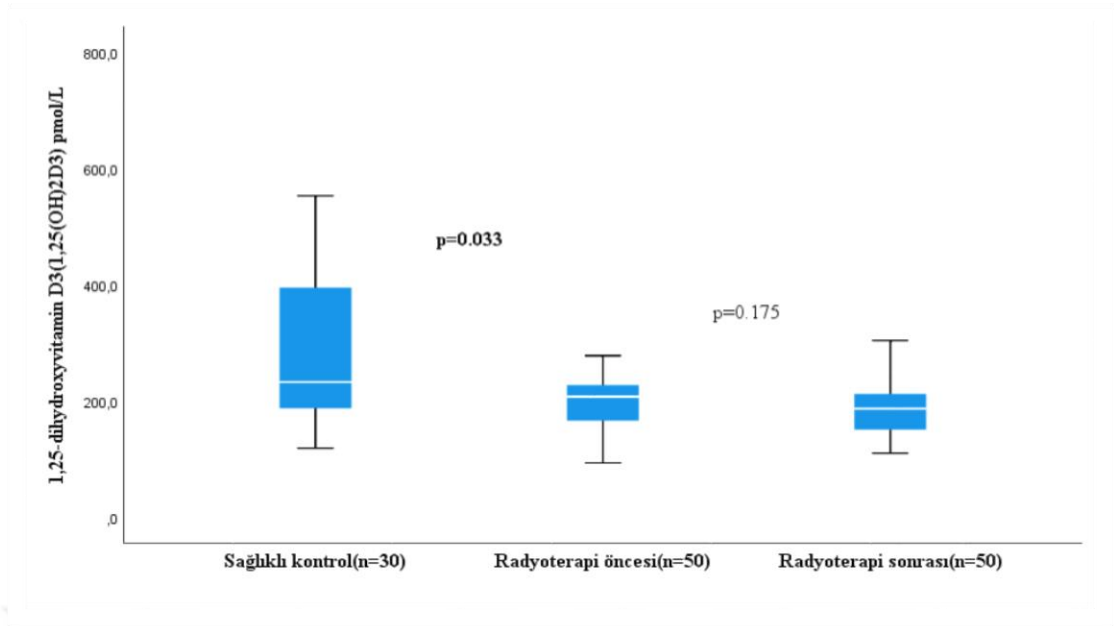
*p<0.05

Sağlıklı kontrol grubunda 1,25(OH) $_2$ D3, HIF1 α , PKB ve PI3K parametrelerine ait saçılım grafiği (Tablo 4.7'ye göre oluşturulan) Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

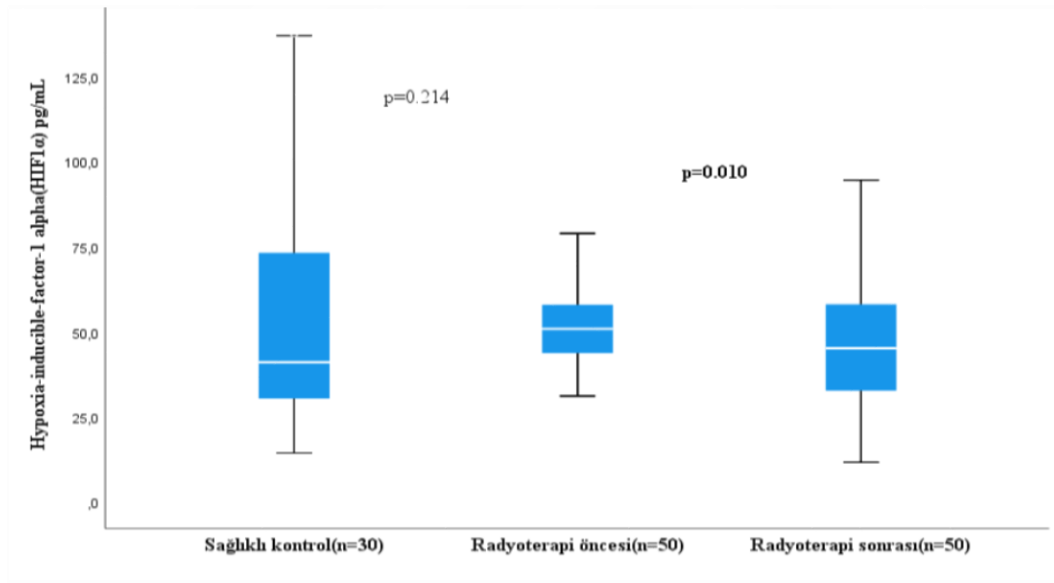


Şekil 4.11. Sağlıklı kontrol grubunda parametrelerin saçılım grafiği

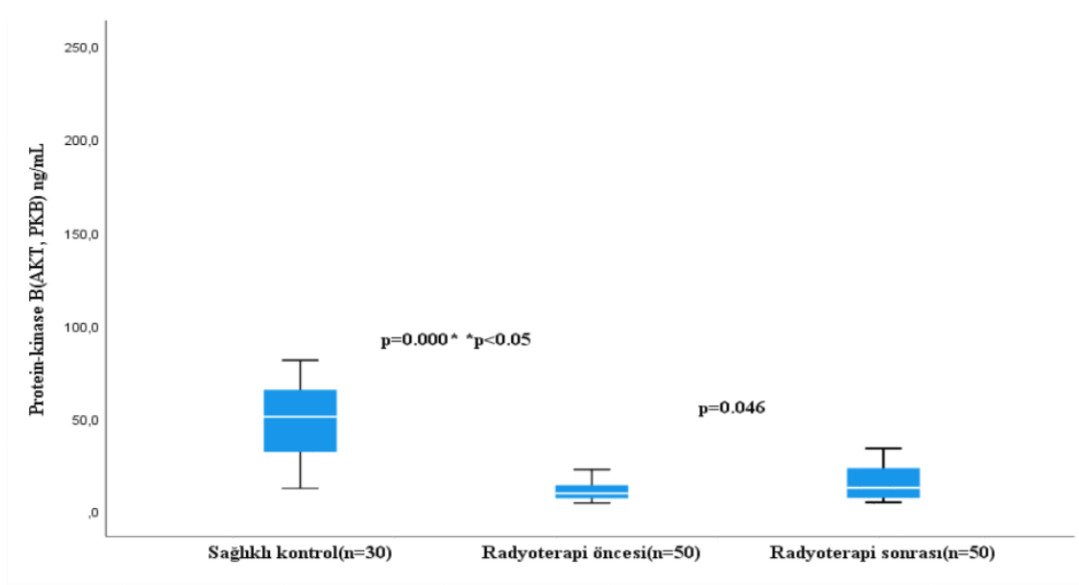
Çalışma (hasta) grubunun RT öncesi, RT sonrası ve kontrol grubuna ait 1,25(OH) $_2$ D3, HIF1 α , PKB ve PI3K parametrelerinin kutu grafikleri sırasıyla Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7'ye göre oluşturulan) gösterilmiştir.



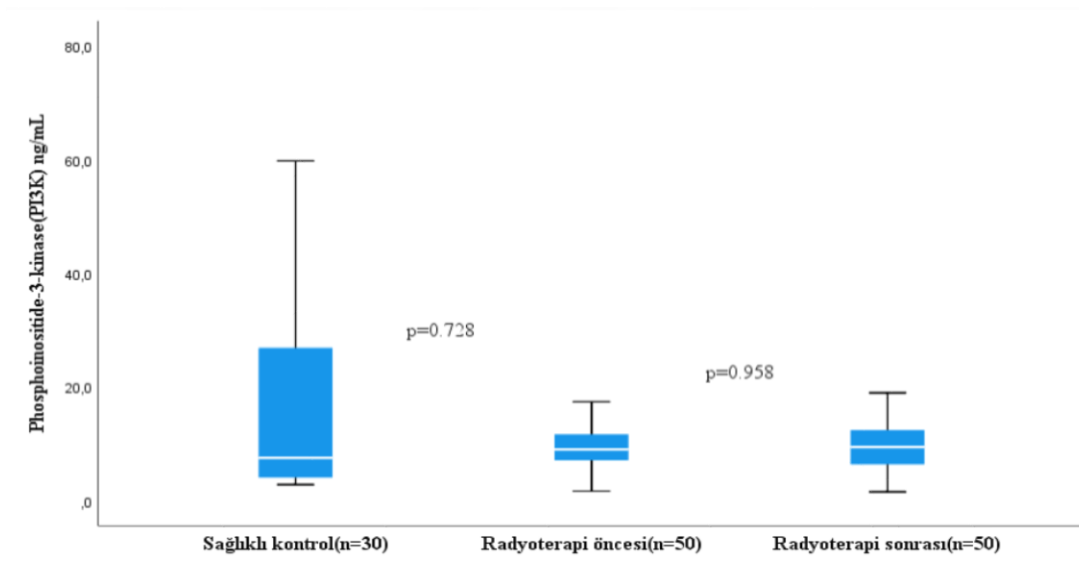
Şekil 4.12. Çalışma grubunun RT öncesi/sonrası ile kontrol grubuna ait 1,25(OH)₂D₃'ün grafiği



Şekil 4.13. Çalışma grubunun RT öncesi/sonrası ile kontrol grubuna ait HIF1α'nın grafiği



Şekil 4.14. Çalışma grubunun RT öncesi/sonrası ile kontrol grubuna ait PKB'nin grafiği



Şekil 4.15. Çalışma grubunun RT öncesi/sonrası ile kontrol grubuna ait PI3K'nin grafiği

KHDAK'li hastaların tanısal değerlerinin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $\text{HIF}1\alpha$, PKB ve PI3K parametrelerinin birincil ölçümleriyle tahmin edilmesine yönelik ROC analizi yapıldı (Tablo 4.8). Yapılan analiz sonucunda elde edilen bulgulara göre bu parametreler içerisinde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve PKB'nin KHDAK'ni öngörmesi açısından tanısal

biyobelirteç değerinin olduğu tespit edildi ($p<0.05$ ve $AUC>0.5$ olduğu için). HIF1 α ve PI3K'in ise tanısal değerinin olmadığı görüldü ($p>0.05$ ve $AUC<0.5$ olduğu için).

1,25(OH)₂D3 için $AUC=0.643$ (%95 GA: 0.509-0.776) idi ($p=0.036$). 1,25(OH)₂D3 için 259.96 kesme noktasındaki (Cut-off) sensitivite %46.7, spesifite %99.0 idi.

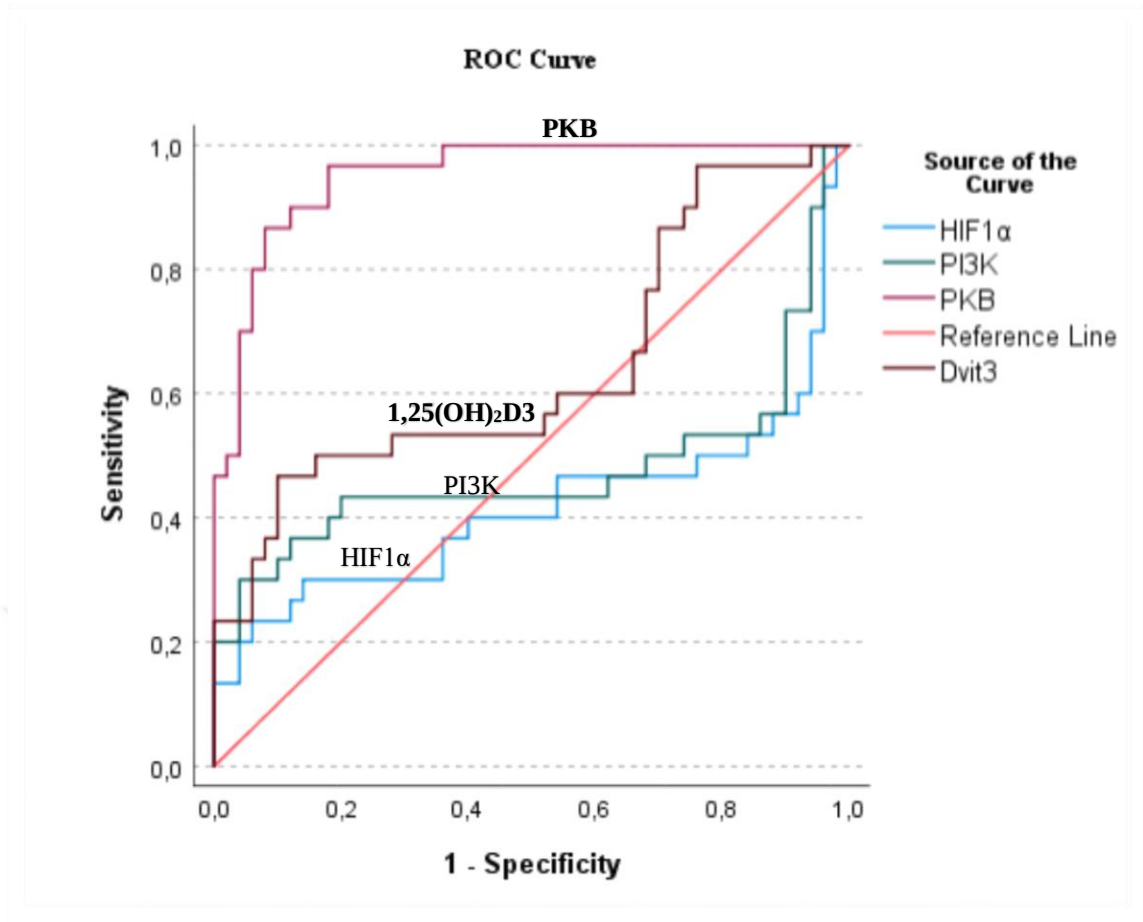
PKB için $AUC=0.952$ (%95 GA:0.910-0.994) idi ($p<0.001$). PKB için 23.23 kesme noktasında (Cut-off) sensitivite %86.7 ve spesifite %92 idi.

Tablo 4.8. 1,25(OH)₂D3, HIF1 α , PKB, ve PI3K değişkenlerine ait ROC tablosu

Değişkenler	AUC	SS	p	95% GA	
				Alt sınır	Üst sınır
1,25(OH)₂D3	.643	.068	.036	.509	.776
HIF1 α	.417	.077	.276	.267	.567
PKB	.952	.021	.000	.910	.994
PI3K	.477	.080	.770	.320	.633

GA: Güven aralığı, AUC: Eğri altında kalan alan, SS: Standart sapma, p: Anlamlılık düzeyi

Tablo 4.8 verilerine göre oluşturulan 1,25(OH)₂D3, HIF1 α , PKB, ve PI3K parametrelerine ait ROC eğrisi Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16. 1,25(OH)₂D₃ (Dvit3), HIF1α, PKB ve PI3K parametrelerinin ROC eğrisi

Çalışmanın konusu olan KHDAK'lı hastaların %20'sini adenokarsinom ve %80'ini SCC alt tipi oluşturmaktadır. Yapılan Mann Whitney U testi, Wilcoxon testi, Z skoru ve p değerlerine göre bu iki kanser türüne ait dört parametrenin (1,25(OH)₂D₃, HIF1α, PKB ve PI3K) RT öncesi ve sonrası dağılımları benzerdi (tümü için p>0.05). Yani adenokarsinom ve SCC türü kanserlerde bu dört parametre sonuçlarının dağılımları açısından fark yoktu.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın hedefi akciğer kanserli hastaların RT öncesi ve sonrası 1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PKB ve PI3K serum seviyeleri ile KHDAK arasındaki ilişkiyi açıklayarak elde edilen sonuçlarla hasta tanı, prognoz ve tedavisine katkı sağlamaktır. Bu kapsamda çalışma grubu Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Bölümü'ne Erzurum ve çevre illerden başvuran KHDAK tanısı almış kişilerden oluşturulmuştur. Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri lokal ileri evre (Evre 3A, Evre 3B, Evre 3C) KHDAK tanısı almış olmak, daha önce cerrahi yapılmamış olmak, RT veya kemoterapi almamış olmak şeklinde belirlenmiştir. Tedavi sürecinde ex olan veya herhangi bir sebeple tedaviyi tamamlayamayan hastalar araştırma kapsamı dışında tutulurken diyabet ve hipertansiyon gibi kronik hastalığı olanlar dışlanma kriteri sayılmamıştır.

Çalışma grubu radyasyon onkolojisi uzmanı koordinatörlüğünde KHDAK tanısı alıp kemoradyoterapi tedavisini tamamlayan toplam 50 hastadan oluşmaktadır. Çalışma grubundaki hastalara lineer akselerator özellikli Varian Trilogy 13.6 Version (Serial No: 6196 USA) cihazı ile hafta içi her gün 2 Gy/gün/fraksiyon olmak üzere toplamda 66 Gy RT uygulanmıştır. Kemoterapi için eş zamanlı haftalık 45 mg/m² paklitaksel, AUC=2'den karboplatin uygulanmıştır. Hasta serumları RT'den hemen önce ve kemoradyoterapi tedavisi sonrası alınmıştır.

Kontrol grubu ise, Erzurum Atatürk Üniversitesi polikliniklerine başvuran 30 sağlıklı bireylerden (bilinen herhangi bir kronik hastalığı olmayan) oluşmaktadır.

Çalışma grubundan RT öncesinde ve sonrasında olmak üzere iki defa ve kontrol grubundan bir defa sekiz saat gece açlığının ardından venöz kan örneği alınıp serum elde edilmiştir. Analizlerin yapılacağı günün öncesinde -80°C'de bekletilen örnekler sırayla -20°C, +4°C ve oda sıcaklığına alınarak aşamalı olarak çözündürülmüştür.

1,25(OH)₂D₃, HIF1 α , PKB ve PI3K analizleri ELISA metoduyla ticari kitlerde yer alan talimatlara göre serum numunesinde gerçekleştirilmiştir. Veriler IBM SPSS v27 paket programı kullanılarak uygun istatistiksel yöntemlerle analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen bulgular literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarıyla desteklenerek aşağıda tartışılmıştır.

Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25(OH)₂D₃ (kalsitriol), D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanarak ve gen ekspresyonunu düzenleyerek anti-kanser aktivitesi gösterir. Kalsitriol, hücre döngüsünde yer alan p21 ve p27 ekspresyonunu uyarır, hücre adezyon molekülü olan e-kaderin ekspresyonunu uyarak DNA hasarının tamirini ve p53 miktarını arttırarak hücre çoğalıp büyümesini inhibe etmektedir (Arı, 2021). D vitamini, reseptörü aracılığıyla akciğer kanseri epitel hücre hattında antiproliferatif etki gösterir. Antiproliferatif etkisini DNA sentezini ve hücre büyümesini engelleyen siklin bağımlı kinaz komplekslerinin inhibitörlerini artırarak ve aktivatörlerini azaltarak hücre döngüsünü G1/S kontrol noktasında durdurarak gösterir (Norton & O'connell, 2012). Songyang ve ark. vitamin D'nin aktif formu olan 1,25(OH)₂D₃'nin tümör hücre çoğalmasını baskılayarak akciğer kanserinin başlangıcını önleyebileceğini veya azaltabileceğini, kemoterapiye cevabı artırabileceğini veya geleneksel kemoterapiye direnç gelişimini geciktirebileceğini rapor etmiştir (Songyang ve ark., 2021). Akciğer kanserli hastalarda, kontrol grubuna göre daha düşük çıkan D vitamini düzeyi sonuçları yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile tutarlılık göstermektedir (Nakagawa ve ark., 2005; Upadhyay ve ark., 2013). Lappe ve ark.'nın D vitamini ve kalsiyum takviyesinin kanser riskini azalttığına dair bir çalışması mevcuttur (Lappe ve ark., 2007). Çalışmada kontrol grubundaki D vitamininin medyan değeri 232.5 (187.9-395.0) hasta grubunun RT öncesi medyan değeri ise 207.5 (166.6-227.6) olarak bulunmuştur. Bu bulguya göre gruplar arasında D vitamini dağılımlarının anlamlı düzeyde farklı olduğunu söylemek

mümkündür ($p<0.05$). Açıklanan bu nedenlerle vitamin D düşüklüğü olan bir hastaya uygulanacak kemoradyoterapi öncesi hastaların düşük olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ seviyesini normale çekmek için vitamin D takviyesi yapılmalıdır. Amaç kemoradyoterapiden hastaların daha etkin bir şekilde yararlanmasını sağlamaktır.

Vücutta vitamin D'nin en iyi göstergesi olan serum $25(\text{OH})\text{D}$ seviyesi Degirmencioglu ve ark.'nın çalışmasında KHDAK'li hastalarda kontrol grubuna göre daha düşük çıkmıştır (Degirmencioglu ve ark., 2019). Bu çalışmada da kontrol grubuna göre hasta grubunda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ seviyesi düşük çıkmıştır. Bu da hasta takip, tedavi ve prognozunda $25(\text{OH})\text{D}$ yerine serumda yarılanma ömrü daha kısa olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ölçümlerinin yapılabileceğini göstermektedir. Ayrıca sigara dumanıyla ilişkili kanserojen olan benzo[α]piren tarafından aktive edilen CYP24A1, kalsitriolü parçalayarak D vitamini düşüklüğüne neden olur (Matsunawa ve ark., 2009). CYP24A1, vitamin D'nin aktif metabolitinin ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) parçalanmasını başlatan enzim olarak bilinir (Li ve ark., 2019). Bu da akciğer kanserli çalışma grubumuzdaki yüksek sigara içeme oranı (%92) vitamin D düşüklüğünün bir nedeni olabileceğine işaret etmektedir.

Hipoksi, kanserde tedavi sonucunu olumsuz etkileyen tümörlerin ortak bir özelliğidir. HIF1 yolu, hücre çoğalmasını, anjiyogenezi, glukoz metabolizmasını ve apoptozu düzenleyen çok sayıda genin transkripsiyonunu indüklediği için hipoksik hücrelerde önemli bir hayatta kalma yoludur. PKB (AKT), birçok kanser türünde hipoksi ile aktive edilir (Stegeman ve ark., 2016). Mevcut çalışmamızda da radyoterapi öncesi hasta grubunda HIF1 α ile PKB arasında anlamlı, pozitif yönlü ve orta düzeyde korelasyon ($r=0.560$, $p<0.001$) tespit edilmesi, Stegeman ve ark.'nın çalışmasını destekler niteliktedir.

Gu ve ark. radyasyonun KHDAK'lı hastalarda HIF-1 α ekspresyonunu arttırdığını tespit etmiştir (Gu ve ark., 2015). HIF-1 pirüvatın Asetil CoA'ya dönüşümünü inhibe ederek oksidatif fosforilasyonu durdurur (N. Ş. Calapoğlu, 2016). RT öncesi yüksek çıkan HIF-1 α seviyesini normale çekmek için doxorubicin, EZN-2968, aminoflavon, gefitinib gibi inhibitörler vererek tedaviye başlamak RT'nin etkinliğini artırabilir. Ancak çalışmada RT sonrası HIF-1 α seviyesinin düşmesi hastaların radyoterapiye olumlu yanıt verdiğinin göstergesi olabilir.

Kanserde aktive olan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu hücre proliferasyonu ve büyümesinde önemli bir role sahiptir. RAS mutant genine sahip KHDAK, bu yolda aşılması en zor engeldir. Kanser hücrelerinde DNA çift sarmal yapıyı bozan radyoterapi, kemoterapi ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu inhibitörlerinin birlikte kullanımı hasta sağkalımı ve tedavi olasılığını artıracaktır. Bu yolun uyarılması HIF1 α ve VEGF'yi yükseltir; doğal inhibitörü ise kanserde azalan PTEN'dir. KHDAK hücrelerinin PI3K (wortmannin, arrestin), AKT (imatinib, perifosin), protein kinaz olan MEK (binimetinib) ve mTOR (rapamisin) inhibitörleriyle tedavisinin kanser hücresi proliferasyonunu önemli ölçüde azaltabileceği rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2020; Küçüköner, 2013). Erkeklerde, sigara içenlerde, SCC hastalarında ve hastalığın erken evresinde PI3K artışı beklenir (Sanaei ve ark., 2022). Bu çalışmada RT öncesi hasta grubunda HIF1 α ile PKB arasında anlamlı, pozitif yönlü ve orta düzeyde korelasyon ($r=0.560$, $p<0.001$); HIF1 α ile PI3K arasında anlamlı, pozitif yönlü ve ileri düzeyde korelasyon ($r=0.615$, $p<0.001$); PKB ile PI3K arasında anlamlı, pozitif yönlü ve orta düzeyde korelasyon ($r=0.477$, $p<0.001$) mevcuttur. Bu da PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun HIF1 α ile etkileşiminin kanser takip ve tedavisindeki önemini göstermektedir. Sağlıklı kontrol grubunda PKB ile PI3K arasında anlamlı, pozitif yönlü ve yüksek düzeyde ilişki ($r=0.772$, $p<0.001$) tespit edilmesi literatürle aynı doğrultuda olduğunu

göstermektedir. Hasta grubunda kontrol grubuna göre medyan değeri RT öncesi anlamlı olarak düşük çıkan PKB'nin kanserde erken teşhise gidebilmek için kanser taramalarına yardımcı bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

HIF1, AKT ve Hipoksi arasındaki etkileşim, tümör tipleri ve histolojiler arasında değişiklik göstermektedir ve bu durum, hedefe yönelik tedavilere yanıtı önemli oranda etkileyebilir (Stegeman ve ark., 2016). HIF1 α radyoterapi öncesi medyan değeri 51.0 (43.9-58.0) iken, RT sonrası medyan değeri 45.3 (32.8-58.2) idi. Elde edilen bu bulguya göre RT öncesi ve sonrası HIF1 α dağılımları arasında anlamlı bir farklılık vardı ($p=0.010$). Benzer şekilde PKB'nin RT öncesi medyan değeri 9.4 (6.8-14.0) iken RT sonrası medyan değeri 12.5 (7.0-23.2) idi. Elde edilen bu bulguya göre RT öncesi ve sonrası PKB'nin dağılımları arasında anlamlı bir farklılık vardı ($p=0.046$). RT öncesi hipoksiye bağlı olarak yükselen HIF1 α değerinin RT sonrası düşmesi radyoterapi ile eş zamanlı verilen kemoterapinin (paklitaksel ve karboplatin tedavisi) etkin olduğunu göstermektedir. RT sonrası yükselen PKB değeri ise HIF1 α ile arasındaki negatif korelasyon ile ilişkilidir.

PI3K/AKT sinyal yolu KHDAK ve diğer tüm kanserlerde tedavi direncinde (kemoradyoterapi) önemli bir faktördür (Schoorbijs ve ark., 2009). Bu çalışmada da PI3K ve PKB'nin radyoterapi öncesine (sırayla medyan 9 ve 9.4) göre radyoterapi sonrası (sırayla 9.4 ve 12.5) daha yüksek çıkması, literatürle uyumlu olarak tedavi direnci ile ilişkili olduğunun bir kanıtı olabilir. PI3K'da p değeri anlamlı olmasa da PKB'de $p<0.05$ ($p=0.046$) ile RT öncesi ve sonrası anlamlı bir fark vardı.

Brognard ve ark. Akt/PKB gibi hayatta kalmayı destekleyen spesifik bir kinazın hedeflenmesinin, KHDAK hücrelerinin apoptotik potansiyelini değiştirebileceğini, bunun da kemoterapi ve radyoterapinin daha etkili olacağını ileri sürmüştür. Akt/PKB aktivitesinin modülasyonu, KHDAK hücrelerinin radyasyona duyarlılığını

değiştirebileceğini göstermiştir (Brognard ve ark., 2001). Mevcut çalışmamızda kontrol grubunda PKB medyan 50.7, RT öncesi hastalarda medyan 9.4, RT sonrası 12.5 çıkması kanser hücrelerinde azalan Akt'nin tedavi sonrası yükselişe geçmesi kemoradyoterapinin etkinliğinin bir göstergesi olabilir.

Mevcut araştırmalar KHDAK hastalarında serum HIF1 α düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Afsar & Uysal, 2019). Bunun nedenleri, yüksek HIF1 α protein ekspresyonuna sahip tümör dokularının doku nekrozu yaşaması ve bunun sonucunda büyük miktarda HIF1 α 'nın kan dolaşımına girmesi veya KHDAK hastalarının hematolojik sisteminde kanser kök hücrelerinin özel bir düzenleme mekanizmasının bulunması olabilir. Radyoterapi sonrası seviyesinin düşmesi ise RT'nin etkinliğinin bir göstergesi olabilir.

1,25(OH) $_2$ D3 ve RT'nin kanser hücrelerini öldürme konusunda sinerjistik bir etki yaptığına dair çalışmalar vardır (Ji ve ark., 2020). Bu çalışmada da literatürle uyumlu olarak hastaların RT sonrası RT öncesine göre seviyesi azalan 1,25(OH) $_2$ D3'ün antikanser bir hormon olduğu anlaşılmaktadır.

Hipoksinin HIF-1 α /VEGF yolunu aktive ettiği, angiogenezi uyardığı, radyoterapiye direnci arttırdığı bilimsel bir gerçektir (Malekan ve ark., 2021). HIF-1 α /VEGF yolunun inhibisyonunun, hipoksinin hücre canlılığı, istilas ve göçü üzerindeki etkisini tersine çevirmekte ve böylece radyoterapiye direnci engellemektedir (Zhu & Zhang, 2018). İyonize ışınlarla veya kemoterapiyle öldürülen kanser hücrelerinin yerine sağlıklı vücut hücreleri geçeceği için hipoksi durumu ortadan kalkar ve HIF1 α seviyesi normale döner. Bu çalışmada da hasta grubunda radyoterapi sonrası HIF1 α seviyesinin düşmesi; radyoterapi sonrası HIF1 α ile 1,25(OH) $_2$ D3 ($r=0.413$, $p=0.003$); radyoterapi sonrası 1,25(OH) $_2$ D3 ile PI3K ($r=0.474$, $p<0.001$) ve HIF1 α ile

PI3K arasında anlamlı pozitif yönlü ve orta düzeyli ($r=0.586$, $p<0.001$) korelasyon bulunması kemoradyoterapinin etkinliğinin bir göstergesi olabilir.

Vitamin D eksikliği dünya çapında her iki cinsiyette ve tüm yaş gruplarında görülmektedir. Vitamin D'nin kanser hücrelerinde AKT (PKB)'yi düşürdüğü aşıkardır (Wang ve ark., 2021). Bu çalışmada da RT öncesi çalışma grubuyla sağlıklı kontrol grubu arasında karşılaştırma yapıldığında çalışma grubunda $1,25(OH)_2D3$ 'ün medyan değeri 207.5, sağlıklı kontrol grubunun medyan değeri 232.5 ($p=0.033$) idi. Çalışma grubunda PKB'nin medyan değeri 9.4 iken sağlıklı kontrol grubunun medyan değeri 50.7 ($p<0.001$) olduğundan gruplar arasında $1,25(OH)_2D3$ ve PKB parametreleri dağılımları yönünden anlamlı düzeyde fark çıkması, bir testin tanı koyma başarısını (en yüksek spesifite ve sensitivite değerlerini) belirlemek amacıyla yapılan ROC analiziyle birlikte değerlendirildiğinde PKB ve $1,25(OH)_2D3$ 'ün prognostik ve tanısal biyobelirteçler olabileceğinin göstergesidir.

Duyarlılık ve özgüllük arasındaki ilişkinin grafiksel bir gösterimi olan ROC analizi farklı tanı testlerinin doğru klinik tanı koymadaki başarısının karşılaştırılmasına olanak sağlar (Kılıç, 2013). Songyang ve ark. tarafından D vitamininin KHDAK hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını inhibe edebileceğini, hücre apoptozunu teşvik edebileceğini, kemoterapi ilaçlarının duyarlılığını artırabileceği ispatlanmıştır. D vitamininin bu etkileri PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu ile ilişkili olabilir. PI3K/AKT/mTOR protein yolu tümör hücrelerinin çoğalması, metastazı ve ilaç direncinde önemli rol oynar (Songyang ve ark., 2021). Buna göre PKB için %95 GA'nda $AUC=0.952$; $p<0.001$; 23.23 kesme noktasında (Cut-off) sensitivite %86.7 ve spesifite %92 çıkması hastada erken teşhise yardımcı bir biyobelirteç olarak değerlendirilmelidir. ROC analizine göre $1,25(OH)_2D3$ için %95 GA'nda $AUC=0.643$; $p=0.036$; 259.96 kesme noktasındaki (Cut-off) sensitivite %46.7 ve spesifite %99.0

ıkması 1,25(OH)₂D₃ düşüklüğü olan bir hastada erken tehise yardımcı bir biyobelirteç olarak değerlendirilmelidir. 1,25(OH)₂D₃ ile PKB arasında RT ncesi anlamlı, pozitif yönlü ve ileri düzeyde korelasyon (r=0.704, p<0.001) bu iki parametrenin erken tanıya yardımcı bir biyobelirteç olmasını destekler niteliktedir. Ulusal ve uluslararası yayınlarda KHDAK hastalarında bu iki parametrenin birlikte değerlendirildiği çalışmanın olmaması nedeniyle çalışmamız bu yönüyle de literatürdeki eksikliği gidermiştir.

Skuamöz hücreli karsinom adenokarsinomla karşılaştırıldığında SCC daha agresif, invaziv, sağkalım daha kötü, sigara içenlerde daha sık ve kötü prognoza sahiptir (Kawase ve ark., 2011). Çalışmanın konusu olan KHDAK'lı hastaların %20'sini adenokarsinom; %80'ini SCC alt tipi oluşturmakta ve hastaların %92'si sigara kullanmakta veya kullanma öyküsü bulunmaktadır. Bu iki kanser alt türüne ait 1,25(OH)₂D₃, HIF1, PKB ve PI3K lmleri RT ncesi ve sonrası dağılımları benzer olduğundan dört parametrenin iki kanser türü arasında fark yoktur (tümü için p>0.05).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma grubunda RT öncesi ve sonrası $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ölçümü istatistiksel olarak anlamlı olmasa da literatürle uyumlu olarak RT sonrası ölçümü RT öncesine göre daha düşük bulunmuştur. Kemoradyoterapi sonrasında vitamin D konsantrasyonunun azalması nedeniyle kemoradyoterapi ile eş zamanlı vitamin D takviyesi, vitamin D'nin antikanser özelliğinden dolayı tedavinin etkinliğini artırabilir.

Çalışma grubunda RT öncesi ve sonrası $\text{HIF}1\alpha$ ölçümü istatistiksel olarak anlamlı olup RT sonrası ölçümü RT öncesine göre daha düşük bulunmuştur. Bu da kemoradyoterapinin etkin olduğunun kanıtı olabilir. RT öncesi yüksek çıkan $\text{HIF}1\alpha$ seviyesini normale düşürmek için inhibitörler vermek tedavinin etkinliğini artırabilir.

Çalışma grubunda RT öncesi ve sonrası PKB ölçümü, istatistiksel olarak anlamlı olup RT sonrası ölçümü RT öncesine göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum kemoradyoterapinin PKB üzerine olumlu etkisinin bir göstergesi olabilir.

Çalışma grubunda RT öncesi PI3K ölçümü kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da literatürle uyumlu olarak yüksek bulunmuştur. Serumda PI3K, normale çekmek için tedaviye arrestin gibi inhibitör takviyesi tedaviye yanıtı yükseltebilir.

Hasta grubunda radyoterapi öncesi spearman korelasyon analizine göre $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $\text{HIF}1\alpha$, PKB ve PI3K parametrelerinin tümü arasında anlamlı, pozitif ve orta/ileri düzeyde korelasyon tespit edilmiştir. Bu durum serumda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $\text{HIF}1\alpha$, PKB ve PI3K parametreleri akciğer kanserinde erken evrede biyopsiye gidilerek erken teşhise yardımcı olabilecek, hastalığın prognoz parametrelerini destekleyebilecek, kemoradyoterapi tedavisinin etkinliğini takip parametrelerinde klinisyene yardımcı olabilecektir.

Çalışma grubunda radyoterapi sonrası spearman korelasyon analizine göre 1,25(OH)₂D3 ile HIF1 α ; 1,25(OH)₂D3 ile PI3K ve HIF1 α ile PI3K arasında anlamlı, pozitif yönlü ve orta düzeyde korelasyon tespit edilmesi hasta takip, tedavi ve prognozuna katkı sağlayacak parametreler olduğunun ispatıdır.

Çalışma grubunun RT öncesi ölçümü ile sağlıklı kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmaya göre 1,25(OH)₂D3 ve PKB değerleri hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ve düşük çıkmıştır. Bu da 1,25(OH)₂D3 ve PKB'nin KHDAK'nde erken tanıya gitmek için biyobelirteç parametresi olabileceğini göstermektedir. AKT/PKB sinyal yolu uyaranları ve D vitamini takviyesi kemoradyoterapi etkinliğini ve hasta sağkalımını artıracaktır. HIF1 α ve PI3K ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da literatürle uyumlu olarak yüksek bulunduğu için arrestin gibi inhibitör ilavesiyle tedavi oranı yükseltilebilir.

KHDAK'li hastaların 1,25(OH)₂D3, HIF1 α , PKB ve PI3K serum seviyelerinin RT öncesi ölçümleriyle tanısal değerinin olup olmadığını tahmin için ROC analizi yapıldı. Buna göre 1,25(OH)₂D3 ve PKB'nin, KHDAK'ni öngörmesi açısından erken tanıya yardımcı tanısal bir biyobelirteç olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubunun sayısal azlığı (hastaların ex olması, tedaviyi tamamlamama, kit temininde zorluk, numune toplama sürecinin uzun olması vb.) çalışmanın başlıca zayıf yönleridir. Çalışma sonuçları 1,25(OH)₂D3, HIF1 α , PKB ve PI3K'ın KHDAK için tanısal biyobelirteç, terapötik hedef ve prognoz takibine yardımcı parametreler olabileceğine işaret etmektedir. Konunun daha sağlıklı sonuçlara ulaşabilmesi açısından akciğer ve diğer kanserlerde daha fazla katılımcının olduğu, daha uzun süreli ve kapsamlı çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Afsar, C. U., & Uysal, P. (2019). HIF-1 α Levels in patients receiving chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung carcinoma. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 65, 1295-1299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1806-9282.65.10.1295>
- Akpınar, D., Ceylan, K. C., Duman, E., Ünsal, Ş., & Kaya, Ş. Ö. (2013). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin mediastinal evrelemesinde pozitron emisyon tomografisinin doğruluğu. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 21(1), 100-105. <https://doi.org/10.5606/tgkdc.dergisi.2011.051>
- Alar, T., & Şahin, E. M. (2012). Akciğer kanseri: birinci basamakta tanı, tedavi ve korunma Lung cancer: Diagnosis, treatment and prevention in primary care. *Smyrna Tıp Dergisi*, 68-74.
- Alıcı, N. Ş., & Şimşek, C. (2022). Akciğer Kanseri Tanılı Hastalarda Çevresel ve Mesleki Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi: Bir Olgu Kontrol Çalışması. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory*, 13(3), 386-391. <https://doi.org/https://doi.org/10.18663/tjcl.1125564>
- Almeida, F. A. (2012). Bronchoscopy and endobronchial ultrasound for diagnosis and staging of lung cancer. *Cleve Clin J Med*, 79(1), S11-S16. <https://doi.org/https://doi.org/10.3949/ccjm.79.s2.03>
- Arı, M. (2021). Vitamin D ve Antikanserojenik Etkileri. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 5(1), 136-146. <https://doi.org/https://doi.org/10.46237/amusbfd.740270>
- Avrameas, S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde: use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, 6(1), 43-52. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0019-2791\(69\)90177-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0019-2791(69)90177-3)
- Bayram, M. (2019). Akciğer Kanserinin Mesleki ve Çevresel Nedenleri. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 7(2), 28-37. <https://doi.org/https://doi:10.5152/gghs.2019.021>
- Brognard, J., Clark, A. S., Ni, Y., & Dennis, P. A. (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Research*, 61(10), 3986-3997.
- Brown, S., Banfill, K., Aznar, M. C., Whitehurst, P., & Faivre Finn, C. (2019). The evolving role of radiotherapy in non-small cell lung cancer. *The British Journal of Radiology*, 92(1104), 20190524. <https://doi.org/https://doi.org/10.1259/bjr.20190524>
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M., & Winterbourn, C. C. (1997). Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3), 361-366. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(97\)00104-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00104-4)
- Calapoğlu, N. (2016). Hipoksiye Karşı Hücrel Cevabın Düzenleyicisi: HIF-1 regulator of cellular response to hypoxia. *Smyrna Tıp Dergisi*, 48.
- Calapoğlu, N. Ş. (2016). HIF-1: iki ucu keskin bıçak. *Smyrna Tıp Dergisi*, 2(1), 54-58.
- Carnero, A. (2010). The PKB/AKT pathway in cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1), 34-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/138161210789941865>
- Chen, K., Shang, Z., Dai, A.-l., & Dai, P.-l. (2020). Novel PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors plus radiotherapy: strategy for non-small cell lung cancer with mutant RAS gene. *Life Sciences*, 255, 117816. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117816>

- Clark, B. R., & Engvall, E. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Theoretical and practical aspects. In *Enzyme Immunoassay* (pp. 167-180). CRC Press.
- Çoban, Z., & Güran, Ş. (2013). Hücre içi sinyal iletimi mekanizmalarının kanser tanı ve tedavisindeki rolü. *Cumhuriyet Medical Journal*, 35(2), 302-310. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7197/1305-0028.845>
- Çok, G. (2018). Akciğer Kanserinde TNM Evrelemesi. *Nükleer Tıp Seminerleri*, 4, 1-5. <https://doi.org/https://DOI:10.4274/nts.2018.001>
- Degirmencioglu, S., Tanriverdi, O., Oktay, E., Avci, E., Demiray, A. G., Senol, H., & Taskoylu, B. Y. (2019). Clinical Significance of Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels in Non-Small Cell Lung Cancer. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology*. <https://doi.org/https://doi:10.14744/ejmo.2019.79909>
- Diniz, G., Ünlü, İ., & Kömürcüoğlu, B. (2017). Histopathological and molecular features of lung cancer. *Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi*, 27(2), 77-87. <https://doi.org/https://doi:10.5222/terh.2017.077>
- Dirican, N., Anar, C., Atalay, Ş., Öztürk, Ö., Bircan, H. A., Çakır, M., & Akkaya, A. (2016). Hematolojik parametrelerin küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda prognoz üzerine etkileri. *Cukurova Medicine Journal*, 41(2), 333-341. <https://doi.org/https://DOI:10.17826/cutf.211197>
- Doğan, A. (2012). Primeri bilinmeyen kanserli hastalarda tanı stratejileri.
- Doğan, A. L., & Güç, D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Acta Medica*, 35(1), 34-42.
- Duman, İ., & Ün, İ. (2019). Sekosteroid hormon olarak D vitamini ve kanser ilişkisi. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 9(1), 19-29. <https://doi.org/https://doi.org/10.31020/mutftd.456806>
- Erbaycu, A. E. (2020). Akciğer Kanserinde Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri. *Türkiye Klinikleri Dergisi*, 1-5.
- Erbaycu, A. E., Batum, Ö., Gülpek, M., Tuksavul, F., Tapan, U., Uslu, Ö., & Güçlü, S. Z. (2009). Akciğer Kanserli Hastaların Teşhis Anındaki Semptomları. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi*, 13(2), 71-76.
- Globocan. (2020). Globocan 2018, Turkey. 2018; 703: 2018-2019. In.
- Gu, Q., He, Y., Ji, J., Yao, Y., Shen, W., Luo, J., Zhu, W., Cao, H., Geng, Y., & Xu, J. (2015). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and reactive oxygen species (ROS) mediates radiation-induced invasiveness through the SDF-1 α /CXCR4 pathway in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(13), 10893. <https://doi.org/https://doi.org/10.18632/oncotarget.3535>
- Huang, C. H., Williamson, S. K., Neupane, P., Taylor, S. A., Allen, A., Smart, N. J., Uypeckuat, A. M., Spencer, S., Wick, J., & Smith, H. (2016). Impact study: MK-0646 (Dalotuzumab), insulin growth factor 1 receptor antibody combined with pemetrexed and cisplatin in stage IV metastatic non-squamous lung cancer. *Frontiers in oncology*, 5, 301. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00301>
- İnal, A., Karakuş, A., & Kaplan, M. (2013). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde prognostik faktörler. *Selçuk Tıp Dergisi*, 29(1), 5-8.
- Infantino, V., Santarsiero, A., Convertini, P., Todisco, S., & Iacobazzi, V. (2021). Cancer cell metabolism in hypoxia: Role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5703. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms22115703>
- Ji, M.-T., Nie, J., Nie, X.-F., Hu, W.-T., Pei, H.-L., Wan, J.-M., Wang, A.-Q., Zhou, G.-M., Zhang, Z.-L., & Chang, L. (2020). 1 α , 25 (OH) 2D3 Radiosensitizes Cancer

- Cells by Activating the NADPH/ROS Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 945. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00945>
- Jiang, L., Zhang, J., Xu, Y., Xu, H., & Wang, M. (2022). Treating non-small cell lung cancer by targeting the PI3K signaling pathway. *Chinese Medical Journal*, 135(11), 1272-1284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/CM9.00000000000002195>
- Kanat, Ö., Evrensel, T., ÖZKAN, A., Demiray, M., Ercan, İ., Ender, K., Gönüllü, G., Arslan, M., DEMİRAY, H., & Manavoğlu, O. (2003). İleri Evre Yaşlı Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarının Tedavisinde Sisplatin ve Etoposid. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 29(1), 25-28.
- Karamouzis, M. V., Konstantinopoulos, P. A., & Papavassiliou, A. G. (2007). Roles of CREB-binding protein (CBP)/p300 in respiratory epithelium tumorigenesis. *Cell Research*, 17(4), 324-332. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/cr.2007.10>
- Kawase, A., Yoshida, J., Ishii, G., Nakao, M., Aokage, K., Hishida, T., Nishimura, M., & Nagai, K. (2011). Differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma prognostically equal? *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 42(3), 189-195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jjco/hyr188>
- Kılıç, S. (2013). Klinik karar vermede ROC analizi. *Journal of Mood Disorders*, 3(3), 135-140. <https://doi.org/https://doi:10.5455/jmood.20130830051624>
- Kısaçam, M. A., & Temizer Ozan, P. (2019). Kanser hücrelerinin metabolik ihtiyaçları ve bağımlılıkları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 31(1), 67-72.
- Kishimoto, M., Kohno, T., Okudela, K., Otsuka, A., Sasaki, H., Tanabe, C., Sakiyama, T., Hiram, C., Kitabayashi, I., & Minna, J. D. (2005). Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(2), 512-519.
- Küçükaya, R. D., ÇELİK, H. G., ALKAÇ, İ. M., & GÜNEL, T. (2018). Kanser ve Endotel Hücreleri. *LLM Dergisi*, 2(2):27-33
- Küçüköner, M. (2013). Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolağı ve mTOR inhibitörleri. *Dicle Tıp Dergisi*, 40(1), 156-160. <https://doi.org/https://doi:10.5798/diclemedj.0921.2013.01.0248>
- Lappe, J. M., Travers-Gustafson, D., Davies, K. M., Recker, R. R., & Heaney, R. P. (2007). Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(6), 1586-1591. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ajcn/85.6.1586>
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415-2418. <https://doi.org/https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>
- Li, Q., Yuan, D., Ma, C., Liu, Y., Ma, L., Lv, T., & Song, Y. (2016). A new hope: the immunotherapy in small cell lung cancer. *Neoplasma*, 63(3), 342-350. https://doi.org/https://doi.org/10.4149/302_151001N511
- Li, X., Qu, C., Wang, Y., Mao, Z., Wang, C., Li, W., & Yu, S. (2019). Associations of CYP24A1 copy number variation with vitamin D deficiency and insulin secretion. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 44(12), 1367-1370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/apnm-2019-0193>
- Lim, W.-T., Chuah, K. L., Leong, S. S., Tan, E. H., & Toh, C. K. (2009). Assessment of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in lung adenocarcinoma. *Oncology Reports*, 21(4), 971-975. https://doi.org/https://doi.org/10.3892/or_00000310

- Lin, A. V. (2015). Indirect elisa. *ELISA: methods and protocols*, 51-59.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_5
- Liu, J., Cui, J., Liu, F., Yuan, Y., Guo, F., & Zhang, G. (2019). Multi-subtype classification model for non-small cell lung cancer based on radiomics: SLS model. *Medical Physics*, 46(7), 3091-3100.
<https://doi.org/https://doi.org/10.18632/oncotarget.18766>
- Liu, J., Dong, Y., Lu, C., Wang, Y., Peng, L., Jiang, M., Tang, Y., & Zhao, Q. (2017). Meta-analysis of the correlation between vitamin D and lung cancer risk and outcomes. *Oncotarget*, 8(46), 81040.
- Lu, H., Forbes, R. A., & Verma, A. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23111-23115.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M202487200>
- Malekan, M., Ebrahimzadeh, M. A., & Sheida, F. (2021). The role of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha and its signaling in melanoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111873.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111873>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-1274.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Matsunawa, M., Amano, Y., Endo, K., Uno, S., Sakaki, T., Yamada, S., & Makishima, M. (2009). The aryl hydrocarbon receptor activator benzo [a] pyrene enhances vitamin D3 catabolism in macrophages. *Toxicological Sciences*, 109(1), 50-58.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp044>
- Nakagawa, K., Kawaura, A., Kato, S., Takeda, E., & Okano, T. (2005). 1α, 25-Dihydroxyvitamin D 3 is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*, 26(2), 429-440.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1093/carcin/bgh332>
- Norton, R., & O'connell, M. A. (2012). Vitamin D: potential in the prevention and treatment of lung cancer. *Anticancer Research*, 32(1), 211-221.
- Özdoğan, M. (2024). *ROS1 mutasyonu pozitif 4. evre akciğer kanseri tedavisinde yeni jenerasyon ilaçlar umut verici*. <https://www.drozdogan.com/ros1-pozitif-akciger-kanseri-enterectinib-lorlatinib-repotrectinib/>
- Öztuna, F., Özlü, T., & Bülbül, Y. (2003). Akciğer kanserini hangi evrede yakalıyor ve nasıl tedavi ediyoruz. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 51(2), 152-156.
- Rascio, F., Spadaccino, F., Rocchetti, M. T., Castellano, G., Stallone, G., Netti, G. S., & Ranieri, E. (2021). The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: an updated review. *Cancers*, 13(16), 3949.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cancers13163949>
- Sanaei, M.-J., Razi, S., Pourbagheri-Sigaroodi, A., & Bashash, D. (2022). The PI3K/Akt/mTOR pathway in lung cancer; oncogenic alterations, therapeutic opportunities, challenges, and a glance at the application of nanoparticles. *Translational Oncology*, 18, 101364.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101364>
- Sarris, E. G., Saif, M. W., & Syrigos, K. N. (2012). The biological role of PI3K pathway in lung cancer. *Pharmaceuticals*, 5(11), 1236-1264.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ph5111236>
- Schuurbiers, O. C., Kaanders, J. H., van der Heijden, H. F., Dekhuijzen, R. P., Oyen, W. J., & Bussink, J. (2009). The PI3-K/AKT-pathway and radiation resistance

- mechanisms in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 4(6), 761-767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181a1084f>
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine*, 77(7), C98-C101. <https://doi.org/https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
- Sharma, A., Sinha, S., & Shrivastava, N. (2022). Therapeutic targeting hypoxia-inducible factor (HIF-1) in cancer: cutting gordian knot of cancer cell metabolism. *Frontiers in Genetics*, 13, 849040. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fgene.2022.849040>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145309>
- Stegeman, H., Span, P. N., Peeters, W. J., Verheijen, M. M., Grénman, R., Meijer, T. W., Kaanders, J. H., & Bussink, J. (2016). Interaction between hypoxia, AKT and HIF-1 signaling in HNSCC and NSCLC: implications for future treatment strategies. *Future Science OA*, 2(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.4155/fso.15.84>
- Sun, Y. (2006). p53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer. *Molecular Carcinogenesis: Published in Cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 45(6), 409-415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mc.20231>
- Swinson, D. E., Jones, J. L., Cox, G., Richardson, D., Harris, A. L., & O'Byrne, K. J. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 α in non small cell lung cancer: Relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *International Journal of Cancer*, 111(1), 43-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.20052>
- Toker, A., & Kaya, S. (2009). Akciğer kanserinde VATS ile lobektomi. *Turkish Journal Thorac Cardiovasc Surgery*, 17(2), 139-143.
- Topu, Z., Ülger, F., & Numanoğlu, N. (2004). Ailesel kanser hikayesi ve akciğer kanseri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 52(2), 130-136.
- Upadhyay, S. K., Verone, A., Shoemaker, S., Qin, M., Liu, S., Campbell, M., & Hersherberger, P. A. (2013). 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH) $_2$ D3) signaling capacity and the epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer (NSCLC): implications for use of 1,25(OH) $_2$ D3 in NSCLC treatment. *Cancers*, 5(4), 1504-1521. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cancers5041504>
- Urbschat, A., Paulus, P., von Quernheim, Q. F., Brück, P., Badenhop, K., Zeuzem, S., & Ramos-Lopez, E. (2013). Vitamin D hydroxylases CYP 2R1, CYP 27B1 and CYP 24A1 in renal cell carcinoma. *European Journal of Clinical Investigation*, 43(12), 1282-1290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/eci.12176>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Wang, L., Cheng, L., Ma, L., Ahmad Farooqi, A., Qiao, G., Zhang, Y., Ye, H., Liu, M., Huang, J., & Yang, X. (2022). Alnustone inhibits the growth of hepatocellular carcinoma via ROS-mediated PI3K/Akt/mTOR/p70S6K axis. *Phytotherapy Research*, 36(1), 525-542. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ptr.7337>
- Wang, W., Hu, W., Xue, S., Chen, Q., Jiang, Y., Zhang, H., & Zuo, W. (2021). Vitamin D and lung cancer; association, prevention, and treatment. *Nutrition and Cancer*, 73(11-12), 2188-2200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1844245>

- Xu, F., Na, L., Li, Y., & Chen, L. (2020). RETRACTED ARTICLE: Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell & Bioscience*, 10(1), 54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13578-020-00416-0>
- Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of Clinical Investigation*, 39(7), 1157-1175.
- Yılmaz, U. (2018). Akciğer kanserlerinde tedavi yaklaşımları. *Nuclear Medicine Seminary*, 4, 32-38. <https://doi.org/https://doi:10.4274/nts.2018.005>
- Yılmaz, Ü., & Kabalak, P. A. (2024). Akciğer Kanserlerinde Tanı ve Evreleme. *Göğüs Hastalıkları Dergisi*, 129.
- Yiyan, S., Yang, S., Li, D., & Li, W. (2022). Vitamin D affects the Warburg effect and stemness maintenance of non-small-cell lung cancer cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Current Cancer Drug Targets*, 22(1), 86-95. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/1568009621666210729100300>
- Zhu, H., & Zhang, S. (2018). Hypoxia inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor signaling activation correlates with response to radiotherapy and its inhibition reduces hypoxia-induced angiogenesis in lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(9), 7707-7718. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcb.27120>

EKLER

EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Muhammed KÖKPINAR	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Biyokimya	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program	Doktora	
Türü		
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 6	% 15
II. Genel Bilgiler	% 32	% 35
III. Materyal ve Metod	% 20	% 35
IV. Bulgular	% 10	% 15
V. Tartışma	% 8	% 20
<i>Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.</i>		

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/464
Konu : Etik Kurul Kararı

04.11.2021

Sayın: Doç. Dr. Hilal KIZILTUNÇ ÖZMEN
Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz “Akciğer kanserli hastalarda radyoterapi öncesi/sonrası serumda Vitamin D, Phosphoinositide-3-kinase, Protein-kinase B, Hypoxia-inducible-factor-1 alpha seviyelerinin belirlenmesi” isimli bilimsel tez çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Akciğer kanserli hastalarda radyoterapi öncesi/sonrası serumda Vitamin D, Phosphoinositide-3-kinase, Protein-kinase B, Hypoxia-inducible-factor-1 alpha seviyelerinin belirlenmesi
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 07 Karar No: 32	Tarih:04.11.2021
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin BAP tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	