



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GLAUCOCALYXİN A'NIN AKCİĞER HÜCRE HATTINDA TGF
BETA 1/SMAD SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN EPİTELİYAL
FORMDAN MEZENKİMALE GEÇİŞ SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Merve BOZKURT

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Nuray BOSTANCIERİ

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem KARACA

GAZİANTEP

NİSAN-2025





T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GLAUCOCALYXİN A'NIN AKCİĞER HÜCRE HATTINDA TGF
BETA 1/SMAD SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN EPİTELYAL
FORMDAN MEZENKİMALE GEÇİŞ SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Merve BOZKURT

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Nuray BOSTANCIERİ

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem KARACA

GAZİANTEP

NİSAN-2025

**Bu tez Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından TF.UT.23.38 proje numarası ile desteklenmiştir.**

TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GLAUCOCALYXIN A'NIN AKCİĞER HÜCRE HATTINDA TGF BETA 1/SMAD
SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN EPİTELYAL FORMDAN MEZENKİMALE
GEÇİŞ SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Merve BOZKURT

24.04.2025

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof. Dr. Şevki Hakan EREN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Doç. Dr. Nuray BOSTANCIERİ
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ
2. Doç. Dr. Nuray BOSTANCIERİ
3. Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem KARACA

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatımda ve tez sürecimde bilgi birikiminden yararlandığım ve her türlü desteğini sunan kıymetli tez danışman hocam Doç. Dr. Nuray BOSTANCIERİ, mesleki hayatımda tanımaktan mutluluk duyduğum sayın hocam Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ, şefkatiyle koruyup kollayan ve motive eden kıymetli hocam Prof. Dr. Serap Sergül İNALÖZ başta olmak üzere bölümümüzdeki tüm hocalarıma,

Tez sürecimde üzerimde emeklerini esirgemeyen, bir abla gibi büyük bir sabır ve özveriyle yardım eden, tanışmaktan onur duyduğum sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem KARACA'ya, tez çalışmamı destekleyen Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine, tanışmaktan memnun olduğum, bilgi ve tecrübeleriyle bana örnek teşkil eden Uzm. Dr. Dilşad ARISOY DEMİR ve Uzm. Dr. GAMZE ÇAKMAK'a

Birlikte çalışmaktan gurur duyduğum canım arkadaşım Dr. Tuba ÖZTÜRK BERK'e, her türlü desteğiyle tez sürecini keyifli kılan canım arkadaşım Dr. Manolya SANCAKTAR'a, sevgisini ve güzel enerjisini üzerimde hissettiğim canım arkadaşım Dr. Nazlı ÖZDEN'e ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Dünyaya gözlerimi açtığımdan beri beni sevgi ve şefkatle büyüten, güzel yüreği gözlerinin ışıltısına yansıyan canım anneme, bilgi birikimi ve güler yüzüyle bana hep yol gösteren canım babama, manevi desteğini hep üzerimde hissettiğim canım anneanneme ve tez sürecimin bitmesini sabırsızlıkla bekleyen iki minik yüreğe, canım kuzenlerim Sıraç ve Lina'ya,

Teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Dr. Merve BOZKURT

NİSAN 2025

ÖZET

GLAUCOCALYXİN A'NIN AKCİĞER HÜCRE HATTINDA TGF BETA 1/SMAD SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN EPİTELYAL FORMDAN MEZENKİMALE GEÇİŞ SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Merve BOZKURT

Tıpta Uzmanlık Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı, Doç. Dr. Nuray BOSTANCIERİ

Nisan 2025

Amaç: Çalışmamızda A549 hücre hattında TGF- β ile oluşturulmuş EMT modelinde Glaucocalyxin A'nın TGF- β /SMAD ve NLRP3 düzeylerine ve hücre göçü kapasitesine etkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda A549 insan akciğer adenokanseri hücrelerine TGF- β verilerek EMT süreci indüklenmiştir ve Glaucocalyxin A'nın EMT sürecine etkileri E-cadherin, N-cadherin, vimentin, SMAD ve NLRP3 ekspresyonlarının immünositokimya ve PCR analizleri ve yara yeri deneyi ile incelenmiştir.

Bulgular: Yara yeri deneyinde TGF- β 'nın hücre göçünü hızlandırdığı, buna karşılık Glaucocalyxin A'nın bu durumu önlemeye çalıştığı izlenmiştir. İmmünositokimya ve PCR deneylerinde TGF- β grubunda E-cadherin düzeyinin düştüğü, N-cadherin ve vimentin düzeyinin artarak EMT sürecinin olduğu görülmüştür. Glaucocalyxin A'nın ise bu süreci tersine çevirdiği gözlenmiştir. Ek olarak Glaucocalyxin A'nın TGF- β grubunda artan p-SMAD 2/3'ü baskıladığı ve SMAD 2 ile SMAD 3 mRNA miktarını azalttığı saptanmıştır. Ayrıca Glaucocalyxin A'nın TGF- β ile artan NLRP3 ekspresyonunu düşürdüğü görülmüştür.

Sonuç: Bu veriler, Glaucocalyxin A'nın TGF- β ile etkinleştirilmiş EMT'yi TGF- β /SMAD ve NLRP3 düzeylerini baskılayarak önlemeye çalıştığını ve hücrelerin epitelyal formlarının korunarak mezenkimal fenotipe geçişini engellemeye katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Glaucocalyxin A, A549, EMT, TGF- β

ABSTRACT

EFFECT OF GLAUCOCALYXIN A ON THE TRANSITION FROM EPITHELIAL TO MESENCHYMAL FORM VIA THE TGF BETA 1/SMAD SIGNALING PATHWAY IN A LUNG CELL LINE

Dr. Merve BOZKURT

Residency Thesis in Medicine, Department of Histology and Embriology

Supervisor, Doç. Dr Nuray BOSTANCIERİ

April 2025

Objective: In our study, we aimed to investigate the effect of Glaucocalyxin A on TGF- β /SMAD and NLRP3 levels and cell migration capacity in TGF- β -induced EMT model in A549 cell line.

Materials and methods: In our study, A549 human lung adenocarcinoma cells were treated with TGF- β to induce the EMT process and the effects of Glaucocalyxin A on the EMT process were examined by immunocytochemistry and PCR analysis of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, SMAD and NLRP3 expressions and wound assay.

Results: In the wound site experiment, it was observed that TGF- β accelerated cell migration, whereas Glaucocalyxin A tried to prevent this situation. In immunocytochemistry and PCR experiments, it was observed that E-cadherin level decreased, N-cadherin and vimentin levels increased and EMT process occurred in TGF- β group. Glaucocalyxin A was observed to reverse this process. In addition, Glaucocalyxin A suppressed p-SMAD 2/3, which increased in the TGF- β group, and decreased the amount of SMAD 2 and SMAD 3 mRNA. In addition, Glaucocalyxin A decreased NLRP3 expression, which was increased by TGF- β .

Conclusion: These data suggest that Glaucocalyxin A works to prevent TGF- β -activated EMT by suppressing TGF- β /SMAD and NLRP3 levels and may contribute to prevent the transition of cells to mesenchymal phenotype by preserving their epithelial form.

Keywords: Glaucocalyxin A, A549, EMT, TGF- β

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER	VII
ŞEKİLLER.....	XV
TABLolar.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Solunum Sistemi	3
2.2. Akciğer Anatomisi.....	4
2.3. Akciğer Histolojisi	5
2.3.1. Solunum Epiteli.....	5
2.3.2. Bronş Ağacı ve Akciğer	6
2.3.2.1. Bronşlar	7
2.3.2.2. Bronşiyoller.....	7
2.3.2.2.1. Bronşiyolün Yapısı	7
2.3.2.3. Alveol Kanalları ve Alveol Keseleri	8
2.3.2.4. Alveoller	9
2.3.2.4.1. Tip I Alveol Hücreleri	10
2.3.2.4.2. Tip II Alveol Hücreleri	10
2.3.2.4.2.1. Pulmoner Sürfaktan.....	11
2.3.2.5. Alveolar Hücrelerde Yenilenme	11

2.4. Akciğer Embriyolojisi	12
2.4.1. Trakeanın Gelişimi	12
2.4.2. Bronşların ve Akciğerlerin Gelişimi	12
2.4.2.1. Akciğerin Olgunlaşması	14
2.4.2.1.1. Embriyonik Dönem	14
2.4.2.1.2. Pseudoglandüler Dönem	14
2.4.2.1.3. Kanaliküler Dönem	14
2.4.2.1.4. Terminal Kесе Dönemi.....	15
2.4.2.1.5. Alveolar (Postnatal) Dönem.....	15
2.5. Akciğer Fibrozisi.....	16
2.6. Akciğer Kanseri.....	17
2.6.1. Akciğer Kanseri Histopatolojisi	19
2.6.1.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	19
2.6.1.2. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	21
2.7. A549 Hücre Hattı	22
2.8. Epitelyal Mezenkimal Geçiş	22
2.8.1. Epitel Hücreleri	23
2.8.1.1. Epitel Hücrelerinin Membran Yüzeyi Özelleşmeleri.....	24
2.8.1.2. Bağlantı Kompleksleri	24
2.8.1.2.1. Sıkı Bağlantılar.....	25
2.8.1.2.2. Tutundurucu Bağlantılar	25
2.8.1.2.3. Oluklu Bağlantılar (Gap Junction).....	27
2.8.2. Mezenkimal Hücreler.....	27

2.8.3. Epitelyal Mezenkimal Geçiş Süreci	28
2.8.3.1. Emt Çeşitleri	29
2.8.3.1.1. Tip I Emt	29
2.8.3.1.2. Tip II Emt	30
2.8.3.1.3. Tip III Emt.....	31
2.8.3.2. Emt Belirteçleri	32
2.8.3.3. Emt Sinyal Yolakları	33
2.8.3.3.1. TGF-B Sinyal Yolağı.....	34
2.8.3.3.2. TGF-B/ SMAD Sinyal Yolağı.....	35
2.8.3.3.3. NLRP3 Inflamazomu	37
2.8.4. Glaucocalyxin A.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	41
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları.....	42
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Markaları.....	43
3.2. Çalışmada Kullanılan Metotlar	45
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattının Temini	45
3.2.2. A549 Hücrelerinin Açılması.....	45
3.2.3. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması.....	46
3.2.4. Hücrelerin Sayımı	46
3.2.5. Hücrelerin Dondurulması.....	46
3.2.6. Hücrelerin Çözdürülmesi	47
3.2.7. Glaucocalyxin A'ya Ait IC50 Dozlarının Belirlenmesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması	47

3.2.7.1. MTT Solüsyonunun Hazırlanması	48
3.2.7.2. MTT Analizinin Yapılması	48
3.2.8. Yara Yeri Oluşturma Deneyi.....	50
3.2.9. İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama	52
3.2.9.1. İndirekt İmmünohistokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi.....	54
3.2.10. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi (qRT-PCR)	55
3.2.10.1. qRT-PCR İçin Deney Grupları Oluşturulması ve Hücrelerin Kültür Ortamından Toplanması	55
3.2.10.2. RNA İzolasyonu	56
3.2.10.3. cDNA Sentezi	56
3.2.10.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Analizi .	58
3.2.11. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	61
4.1. GLA Doz Belirleme Deneyi Bulguları.....	61
4.1.1. MTT Analizi ve GLA'nın IC50 Değerinin Hesaplanması	61
4.1.2. Hücre Morfolojisinin İnverted Mikroskop Altında İncelenmesi.....	63
4.2. Yara Yeri (Hücre Göçü) Deneyi Bulguları	65
4.2.1. Gruplar Arasında Yara İyileşme Sürecinin Karşılaştırılması	65
4.2.2. Grupların Zamana Bağlı Yara Açıklığı Bulguları	71
4.3. İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama Deneyi Bulguları	76
4.3.1. E-cadherin	79
4.3.2. N- cadherin.....	80
4.3.3. Vimentin	81
4.3.4. p-SMAD 2/3.....	82

4.3.5. NLRP3	83
4.3.6. Gruplar Arasındaki İmmünohistokimyasal Boyanma Düzeyi.....	84
5. TARTIŞMA.....	96
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
7. KAYNAKLAR.....	104

EKLER



SİMGE VE KISALTMALAR

A549: İnsan akciğer karsinomu hattı

AFG: Arjinil-fruktozil-glukoz

ALR: Absent in melanoma 2 benzeri reseptörler

ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain

ATCC: American Type Culture Collection

BALT: Bronş ile ilişkili lenfoid doku

BMEC: Bovin meme epitel hücrelerinde

BMP: Kemik morfojenetik proteini

CLR: C-tipi lektin reseptörleri

Co-SMAD: Kompleksler oluşturan SMAD

DAMP: Tehlike ile bağdaştırılan moleküler kalıplar

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNES: Diffüz nöroendokrin sistem

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilkolin

E-cadherin: Epitelyal kadherin

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EMT: Epitelyal mezenkimal geçiş

EMT-TF: EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörleri

ERK: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

GDF: Büyüme ve farklılaşma faktörleri

GLA: Glucocalyxin A

IC50: İnhibe edici dozu

IgSF: İmmunoglobulin süper ailesi

IKK: IκB kinaz

IL-18: İnterlökin-18

IL-1 β : İnterlökin-1 β

İPF: İdiopatik akciğer fibrozisi

I-SMAD: İnhibitör SMAD

JNK: C-Jun amino terminal kinaz

KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri

KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

LPS: Lipopolisakkarit

μ g: Mikrogram

μ M: Mikromolar

MAPK: Mitojenle aktive edilen protein kinaz

MET: Mezenkimal epitelyal geçiş

ml: Mililitre

MMP: Matriksmetalloproteaz

MTT: Methyl-thiazolyl-tetrazolium

N-cadherin: Nöral cadherin

NLR: Lösin bakımından zengin nükleotid bağlayıcı alan içeren reseptör

NLRP3: NLR family pyrin domain containing 3

PAMP: Patojenlerle bağdaştırılan moleküler kalıplar

PBS: Phosphate-buffered saline

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PF: Akciğer fibrozisi

PI3K: Fosfatidilinositol-3 kinaz

PRR: Örüntü tanıma reseptörlerinin

RDS: Respiratuar distress sendromu

RLR: Retinoik asitle indüklenebilir gen-I benzeri reseptör

Rpm: Dakikadaki devir sayısı

R-SMAD: Reseptör tarafından düzenlenen SMAD

SGC: Sebase bez karsinomu

Shh: Sonic Hedgehog

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

TF: Transkripsiyon faktörü

TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü- β

TLR: Toll benzeri reseptörler

T β R: TGF- β reseptör kompleksi

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

Zeb: Zinc finger E-box binding

ZO1/TJP: Zonula okludens 1

ŞEKİLLER

Şekil 2.1: Akciğer kanserinin histolojik dağılım oranları.	19
Şekil 2.2: EMT ve MET Geçiş.....	28
Şekil 2.3: Embriyonik gelişimde ve erişkin dönemde EMT çeşitleri	29
Şekil 2.4: EMT'yi Düzenleyen Yaygın Sinyal Yolakları.	34
Şekil 2.5: TGF- β 'nin indüklediği kanonik ve kanonik olmayan sinyal yolları.....	36
Şekil 2.6: <i>Isodon japonicus</i> var. <i>glaucocalyx</i>	39
Şekil 3.1: MTT analizi için 96 kuyucuklu plateye hücre ekimi uygulaması	49
Şekil 3.2: Hücrelerin ekim yapıldığı ve deney gruplarının oluşturulduğu 6 kuyucuklu kültür plate	50
Şekil 3.3: 1000 μ L'lik mikropipet ucu kullanılarak yara yeri deneyi oluşturulması.....	51
Şekil 3.4: Hücrelerin invert mikroskop altında incelenmesi	52
Şekil 3.5: Şekil: İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama için kullanılan 8 gözlü hücre kültürü lamı	53
Şekil 3.6: İmmünohistokimyasal boyama deneyi yapılırken	54
Şekil 4.1: Deney gruplarında zaman içerisinde MTT sonuçları değişimi.....	62
Şekil 4.2: Deney gruplarının 24. saatteki morfolojisi	63
Şekil 4.3: Deney gruplarının 48. saatteki morfolojisi	64
Şekil 4.4: Deney gruplarının zaman içindeki yara yeri alanı değişimi	67
Şekil 4.5: Kontrol grubunun zaman içindeki yara yeri alanı değişimi.....	68
Şekil 4.6: TGF- β grubunun zaman içindeki yara yeri alanı değişimi	69
Şekil 4.7: GLA grubunun zaman içindeki yara yeri alanı değişimi	70
Şekil 4.8: TGF- β + GLA grubunun zaman içindeki yara yeri alanı değişimi	71
Şekil 4.9: Kontrol grubunda zaman içerisinde yara yeri alanındaki değişim	73
Şekil 4.10: TGF- β grubunda zaman içerisinde yara yeri alanındaki değişim	73
Şekil 4.11: GLA grubunda zaman içerisinde yara yeri alanındaki değişim	74
Şekil 4.12: TGF- β +GLA grubunda zaman içerisinde yara yeri alanındaki değişim.....	74
Şekil 4.13: E-cadherin immünohistokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı.....	79
Şekil 4.14: N-cadherin immünohistokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı	80

Şekil 4.15: Vimentin immünositokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı	81
Şekil 4.16: p-SMAD 2/3 immünositokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı	82
Şekil 4.17: NLRP3 immünositokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı	83
Şekil 4.18: İmmünositokimyasal analizin ortalama değerinin gruplara göre dağılımı	84
Şekil 4.19: E-cadherin immünositokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı	85
Şekil 4.20: N-cadherin immünositokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı.....	86
Şekil 4.21: Vimentin immünositokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı.....	87
Şekil 4.22: p-SMAD 2/3 immünositokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı.....	88
Şekil 4.23: NLRP3 immünositokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı	89
Şekil 4.24: E-cadherin ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması	90
Şekil 4.25: N-cadherin ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması	91
Şekil 4.26: Vimentin ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması.....	92
Şekil 4.27: SMAD 2 ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması	93
Şekil 4.28: SMAD 3 ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması	94
Şekil 4.29: NLRP 3 Ekspresyon Değişiminin Deney Gruplarında Karşılaştırılması.....	95

TABLOLAR

Tablo 3.1: Cihazlar ve Markaları	42
Tablo 3.2: Sarf malzemeler ve markaları	43
Tablo 3.3: Deney grupları	50
Tablo 3.4: cDNA Sentezi Reaksiyonu İçin Gerekli Malzemeler	57
Tablo 3.5: cDNA Siklus Protokolü.....	57
Tablo 3.6: Primer baz dizileri.....	58
Tablo 3.7: qPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	59
Tablo 3.8: Real Time PCR cihaz protokolü	59
Tablo 4.1: Gruplar Arasında MTT Değerlendirme Sürecinin Karşılaştırması	61
Tablo 4.2: Gruplar arasında yara iyileşme sürecinin karşılaştırması	65
Tablo 4.3: Grupların belirli saatlerdeki yara yeri alanının Tukey testi ile çoklu karşılaştırılması	66
Tablo 4.4: Grupların zamana bağlı yara yeri alanı değişimi	72
Tablo 4.5: Grupların zamana bağlı yara iyileşmesinin Tukey testi ile çoklu karşılaştırılması	75
Tablo 4.6: Grupların immünohistokimyasal veri dağılımları.....	77
Tablo 4.7: Gruplar arasında immünohistokimya gözlemlerinin LSD testi ile çoklu karşılaştırılması	78

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), epitelyal hücrelerin mezenkimal form kazandığı bir farklılaşma sürecidir. Bu dinamik ve tersine çevrilebilir süreçte, epitel hücreleri bağlantı noktaları ve bazo-apikal polarite gibi tipik özelliklerini kaybederken, göç etme ve evre dokuları istila etme yeteneği ile birlikte ön-arka polarite kazanırlar (1).

EMT, meydana geldiği koşullar bakımından üç tipte sınıflandırılır. Tip I EMT embriyonik dönemle ilişkiliyken, Tip II EMT doku rejenerasyonu ve fibrozis gelişiminde fonksiyon görür. Tip III EMT ise kanserli hücrelerin oluşmasına, gelişmesine ve yayılmasında rol alır (2). EMT sürecinde epitel hücre-hücre yapışma molekülü olan epitelyal kadherin (E-cadherin) kaybı gözlenirken, nöral kadherin (N-cadherin) ve vimentin gibi mezenkimal belirteçlerde artış gözlenir (3).

Dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) sinyalizasyonu, EMT’de rol alan en temel yoldur ve bu sinyal yolu çeşitli hücre içi haberciler aracılığıyla etki eder (4). TGF- β , SMAD bağımlı kanonik ve SMAD bağımsız kanonik olmayan yol üzerinden etkinlik gösterir (5). Kanonik yolda, SMAD-2 ve SMAD-3 olarak bilinen reseptör SMAD’lar TGF- β tarafından fosforillenir, ardından SMAD-4 ile kompleks yapı oluşturup ilgili genlerin düzenlenmesi ve transkripsiyonu için nükleusa iletilir (6).

NLRP3 inflamazomu, çeşitli uyarınlarla aktiveştirilen ve inflamatuvar sinyalizasyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir multiprotein kompleksidir. NLRP3 inflamazomunun pek çok inflamatuvar hastalıkların altta yatan mekanizmalarında görev aldığı bilinmektedir (7). Literatürde NLRP3 inflamazomunun TGF- β 1 sinyali ile EMT’yi düzenleyebildiği çalışmalar mevcuttur (8). Ek olarak TGF- β aracılı SMAD-2 ve SMAD-3 fosforilasyonunun da NLRP3 ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (9).

Akğer fibrozisi, ekstraselüler matriksin aşırı birikiminin neden olduğu inflamasyon ve doku mimarisinin yeniden şekillenmesi ile karakterize kronik, ilerleyici ve geri dönüşümsüz bir solunum yolu hastalığıdır (10). Akğer fibrozisi hastalarında ilerleyen dönemde akğer kanseri meydana gelme riskinin yüksek olduğu bilinmektedir (11).

Dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin büyük kısmı akciğer kanserinden kaynaklanmaktadır. Akciğer kanserlerinin %85'inden fazlası küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak sınıflandırılmıştır ve adenokarsinom bu vakaların yaklaşık yarısını temsil etmektedir (12).

Akciğer kanseri genellikle kötü prognozlidir, hastaların beş yıllık sağkalımı % 15 civarındadır. KHDAK'li hastaların ilk tanısı genellikle ileri evrelerde tespit edilmektedir. İleri hastalık evresinde kanser hücreleri genellikle agresif tutum sergiler, antikanser ilaçlara direnç ve metastaz yapma eğilimi gösterir (13). EMT'nin tümör hücrelerinin hareketlilik, invazyon yapabilme ve apoptotik uyarılara direnç gösterme gibi önemli metastatik özellikler kazanmasında rol aldığı ve hücrelerin kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (14). Nitekim EMT'nin meme kanseri, mide kanseri, karaciğer kanseri, kolorektal kanser ve mesane kanseri gibi pek çok kanser patogeneğinde rol aldığı bildirilmiştir (15-19).

Glaucocalyxin A (GLA), *Rabdosia japonica* bitkisinden izole edilen diterpenoid bir bileşiktir ve geleneksel Çin tıbbında yaygın şekilde kullanılmaktadır (20). Çalışmalar, Glaucocalyxin A'nın antiinflamatuvar, antioksidan, antifibrotik ve antikanser nitelikler dahil olmak üzere bir dizi biyolojik faaliyetler sergilediğini ortaya koymuştur (21).

Çalışmamızda Glaucocalyxin A'nın TGF- β ile EMT modeli oluşturulmuş A549 hücre hattındaki etkisini değerlendirmek amacıyla kontrol, TGF- β , GLA ve TGF- β +GLA grupları oluşturulması planlanmıştır. Bu bağlamda; Glaucocalyxin A'nın EMT sürecine etkisini yara yeri deneyi oluşturularak hücre göç potansiyeline etkisinin incelenmesi ve E-cadherin, N-cadherin, vimentin, SMAD ve NLRP3 ekspresyonuna etkisini immünohistokimya ve PCR analiziyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Solunum Sistemi

Solunum sistemi, iki akciğerden ve gaz alışverişini sağlayan hava yollarından oluşur. Hava yolları, akciğer içinde alveol olarak isimlendirilen en küçük hava boşluklarına ulaşıncaya dek giderek küçülen tüplere dallanır (22).

Hava; göğüs kafesi, interkostal kaslar, diyafram ve akciğerin elastik komponentlerini içeren solunum mekanizması ile akciğerler içerisinde ilerler. Solunum sistemi anatomik olarak üst solunum sistemi ve alt solunum sistemi olarak ikiye ayrılır. İşlevsel olarak ise iletili bölüm ve solunum bölümü olacak şekilde iki kısımda incelenir. İletici bölüm; burun boşlukları, nazofarinks, larinks, trakea, bronşlar ve terminal bronşiolardan oluşur. Solunum bölümü ise gaz değişiminin gerçekleştirildiği bölüm olup respiratuar bronşioler, alveolar kanallar ve alveollerden meydana gelir (23).

Solunum sisteminin üç temel görevi; solunan havanın iletimi, filtrasyonu ve gaz değişimidir. İletici bölüm; solunan havayı çeşitli partiküllerden temizler, ısıtır ve nemlendirir. Ayrıca gaz alışverişinin gerçekleştiği solunum bölümüne ilerleyen hava yollarından oluşarak geçit görevi görür. Kıkırdak, kolajen, elastik lif ve düz kas demetleri iletili bölüme gerekli bükülebilme ve uzayabilme kapasitesi sağlayarak yapısal destek sunar. Böylece kesintisiz hava iletimi sağlanır. Solunum bölümü; iletim bölümünün distal uzantısıdır. Respiratuar bronşioler, alveollere dek uzanan hava iletiminin ve gaz değişiminin olduğu geçiş bölgesidir. Alveoller, solunan hava ile kan arasındaki O_2 ve CO_2 değişiminin yapıldığı solunum sisteminin uç bölgesinde yer alan hava boşluklarıdır. Solunum sistemi, çeşitli hormon üretimi ve salgılanmasında görev alarak endokrin fonksiyonlarda ve solunan havadaki antijenlere karşı bağışıklık yanıtı oluşumunda da görev almaktadır (22-24).

2.2. Akciğer Anatomisi

Akciğer, toraks boşluğunda yer alan ve çift katmanlı seröz bir zar olan plevra ile çevrili solunum sisteminin esansiyel organıdır (25). Sağ ve sol akciğerler arasında kalbin, büyük kan damarlarının, bronşların, özofagusun ve diğer organların bulunduğu mediasten yer alır. Kalbin anatomik olarak sol tarafta daha fazla yer kaplamasından dolayı; sağ akciğer sol akciğerden nispeten daha büyüktür (26). Akciğerin bir apeksi, bir bazal kısmı, üç kenarı ve üç yüzü vardır ve apeks kısmı birinci kostanın üzerinde yer alır.

Akciğerin anterior, posterior ve inferior olmak üzere üç kenarı vardır. Anterior kenarı plevral kısım ile komşuluk yapar ve sol akciğerde kardiyak çentik oluşturur. Inferior kenar nispeten ince olup akciğerin bazal kısmını kostadan ayırır. Posterior kenar ise daha kalın olup akciğerin apeksinden alt kenara kadar uzanır.

Akciğerin kostal, medial ve diyafragmatik yüzü vardır. Kostal yüzü kostal plevra ile sarılı olup sternum ve kaburgalar boyunca uzanır. Akciğerin anterior ve posterior kenarları akciğerin medial yüzü ile birleşir. Akciğerin medial yüzünün ön kısmı sternum ile arka kısmı ise vertebralar ile ilişkilidir. Akciğerin inferior kenarı ise akciğerin diyafragmatik yüzü ile birleşir. Diyafragmatik yüzey içbükey olup diyafram kasının kubbesi ile temas halindedir (27).

Sağ akciğer; fissura horizontalis ve fissura obliqua ile ayrılarak lobus superior, lobus medius ve lobus inferior olmak üzere üç loba ayrılır. Lobus medius ve lobus inferior akciğerin diyafragmatik yüzünü oluşturur. Sol akciğer ise fissura obliqua ile iki loba ayrılarak lobus superior ve lobus inferioru oluşturur. Lobus inferior akciğerin diyafragmatik yüzünü oluşturur (28).

Hilum, akciğerin medial yüzeyinde yer alan çeşitli yapıların akciğere girdiği ve akciğerlerden çıktığı noktadır. Frenik sinir, lenfatik damarlar, lenf nodları ve bronşiyal damarlar, bronşlar ve pulmoner damarlar içerir. Sol hilumda bir ana bronş, sağ hilumda ise iki ana bronş bulunur. Önden arkaya doğru hilumdaki sıralama ven, arter ve bronş şeklindedir (27).

2.3. Akciğer Histolojisi

Akciğerler, toraks boşluğunda yer alan ve çift katmanlı seröz bir zar olan plevra ile çevrili solunum sisteminin esansiyel organıdır (25). Büyük çaplı hava iletim yollarının bir kısmı ekstrapulmoner yerleşimli iken, daha küçük çaplı hava iletim yolları ve solunum bölgesi intrapulmoner bölgede yerleşim gösterir (29).

Hava iletim yollarının ekstrapulmoner kısmı; nazal kaviteler, farinks, larinks, trakea ve primer bronşlardan oluşur. İntrapulmoner hava iletim yolları ise intrapulmoner bronşlardan terminal bronşiyollere dek dallanma gösteren kısımdır. Nazal kavitelerden bronşlara dek olan büyük hava iletim yollarının lümeni yalancı çok katlı silyalı prizmatik epitel olan solunum epiteli ile döşelidir. Ayrıca büyük hava iletim yollarının duvarı, içerdiği kemik ve/veya kıkırdak şeklindeki iskelet yapısıyla lümenin açık tutulmasına katkıda bulunur. Bronşiyolleri döşeyen tek katlı silyalı prizmatik epitel, lümen çapı azaldıkça tek katlı kübik epitele dönüşür. Kıkırdak içermeyen bronşiyollerin lümeni, duvarı çevreleyen fibroelastik bağ dokusuyla desteklenerek açık tutulur. Hava iletim yollarının lümen çapı duvarlarında bulunan düz kas hücreleriyle denetlenir (29).

2.3.1. Solunum Epiteli

Nazal kavitelerin ve solunum sisteminin iletili bölümünün büyük bir kısmı yalancı çok katlı prizmatik silyalı epitel ile döşelidir. Respiratuar epitel olarak da bilinen bu epitel 5 ana hücre tipi içermektedir.

- **Silyalı Hücreler:** Respiratuar epitelde sayıca en fazla bulunan yüksek prizmatik hücrelerdir. Her hücrenin apikal yüzeyinde yaklaşık 250-300 silya bulunur. Silyalar, koordine süpürme hareketiyle mukusu farinkse doğru süpürürler. Böylelikle inhalasyonla alınan partiküllerin akciğerden temizlenmesinde önemli rol oynar.
- **Goblet Hücreleri:** Respiratuar epitel hücrelerinin yaklaşık %30'unu oluştururlar. Çekirdeği bazalde yerleşmiş ve apikal kısmı müküsün glikoprotein granüllerinden zengin tek hücreli ekzokrin bezlerdir. Epitel yüzeyindeki hidrate müküs ile

trakeadaki partiküler maddelerin karışması sonucu visköz yapıda olan mukus oluşur. Hava yollarının kronik irritasyonu sonucunda silyalı hücrelerin sayısı azalırken müköz hücre sayısı artar.

- **Fırçamsı Hücreler:** Respiratuar epitel hücrelerinin yaklaşık %3'ünü oluştururlar. Prizmatik tipte olan bu hücrelerin apikal yüzeylerinde seyrek ve küt mikrovilluslar yer alır. Fırçamsı hücrelerin bazal yüzeyi afferent sinir sonlanmalarıyla sinaps yapar. Bu nedenle kemosensör reseptör hücreler olarak kabul edilirler.
- **Küçük Granüllü Hücreler (Kulchitsky Hücreleri):** Respiratuar epitel hücre popülasyonunun yaklaşık %3-4'ünü oluştururlar. Sentezledikleri polipeptid hormonları subnükleer bazal sitoplazmalarında küçük granüller şeklinde depolarlar. Lamina propriaya salgıladıkları bu hormonlar vasıtasıyla uzak hedeflere etki edebilir ya da lokal (parakrin) etki göstererek solunum fonksiyonlarını düzenleyebilirler. Ayrıca diffüz nöroendokrin sistemin bir parçası olan bu hücreler sinir lifleri ile iletişim kurarak pulmoner nöroepitelyal cisimcikleri oluşturur. Böylelikle lokal hipoksik koşullarda beyindeki solunum merkezini uyarak solunumun hızlandırılmasını sağlar.
- **Bazal Hücreler:** Diğer epitel hücre tiplerini oluşturabilme potansiyelinde olan ve mitoz etkinliği yüksek rejeneratif hücrelerdir. Respiratuar epitel hücre popülasyonunun yaklaşık %30'unu oluşturur.

2.3.2. Bronş Ağacı ve Akciğer

Trakea, iki dala ayrılarak primer bronşları oluşturur. Sağ primer bronş, soldakinden daha geniş ve daha kısadır. Bronşlar, hilumdan akciğerlere girdikten sonra sağ akciğerde üç, sol akciğerde iki adet sekonder (lober) bronşa dallanır. Sekonder bronşlar tekrar dallanarak tersiyer (segmental) bronşları oluşturur. Bir segmental bronş ve havalandırdığı akciğer parankimi bir bronkopulmoner segmenti oluşturur. Segmentler, kendi kan damar ağı ve bağ dokusu yapısında olan septumları sayesinde cerrahi rezeksiyona olanak veren alt birimlerdir. Sağ akciğerde 10, sol akciğerde 8 adet bronkopulmoner segment bulunur. Tersiyer bronşlar daha küçük dallara ayrılır ve bronşioller meydana gelir. Bronşioller de piramidal yapıdaki pulmoner lobüllerin içine girip burada dallanarak terminal

bronşiyolleri oluşturur. Bronş ve bronşiyollerin kas kasılması otonom sinir sisteminin sinirleri tarafından innerve edilir.

2.3.2.1. Bronşlar

Büyük bronşlar, trakea ile benzer histolojik yapıdadır. Bronşların akciğer içine girerek intrapulmoner bronşlara dönüştüğü kısımda bronş duvarının yapısında değişiklikler gözlenir. Kıkırdak halkalar yerini parçalı hiyalin kıkırdak plaklarına bırakır. Bronşlar dallandıkça çapları azalır, kıkırdak plaklarının boyutunda küçülme ve sayısında azalma meydana gelir. Havayolu çapı 1mm'ye indiğinde hiyalin kıkırdak plakları ortadan kalkar ve bronşiyoller oluşur.

2.3.2.2. Bronşiyoller

Bronkopulmoner segmentler bölünerek pulmoner lobüllere ayrılır. Her lobülü bir bronşiyol destekler. Pulmoner asinüsler lobülleri oluşturan daha küçük alt birimlerdir. Her asinüs bir terminal bronşiyolden, respiratuar bronşiyollerden ve alveollerden oluşur. Respiratuar bronşiyolar birim; pulmoner yapının en küçük fonksiyonel birimi olup bir respiratuar bronşiyol ve bu bronşiyölü destekleyen alveollerden meydana gelir.

2.3.2.2.1. Bronşiyölün Yapısı

Bronşiyoller, çapları 1 mm veya daha küçük olan intralobüler hava yollarıdır. Bronşiyollerde tıkHz bağ dokusu ve düz kas bulunmasına karşın mukozasında bez ve kıkırdak plakları bulunmaz. Büyük bronşiyollerde epitel hala yalancı çok katlı silyalı prizmatik yapıdayken, kanal daraldıkça kademeli şekilde tek katlı prizmatik ve tek katlı kübik epitele dönüşür. En geniş bronşiyollerde izlenebilen Goblet hücreleri, terminal bronşiyollerde bulunmaz. Sigara içen bireyler ve havadaki tahriş edici ajanlara maruz kalanlar bu durumun dışındadır. Bronşiyol lamina propriası düz kas ve elastik lifler içermektedir. Bronşiyoller dallanarak iletici bölümün son kısmı olan terminal

bronşiyolları oluştururlar. Terminal bronşiyollar de dallanarak respiratuar bronşiyolları meydana getirirler.

- **Terminal Bronşiyollar:** En küçük iletilci bronşiyollar olup Clara hücrelerinin silyalı hücrelerin arasında dağıldığı tek katlı kübik epitel ile döşelidir. Bronşiyolün distaline doğru Clara hücre sayısında artış ve silyalı hücre sayısında azalma görülür. Ayrıca terminal bronşiyolların epitelinde kemosenör görevi gören fırça hücreleri ve DNES (Diffüz nöroendokrin sistem) küçük granüllü hücreler ile küçük bir kök hücre popülasyonu mevcuttur. Clara hücreleri (Çomak hücreleri); silyasız, apikal yüzeyleri kubbe şeklinde olan, sitoplazmasında salgı granülleri içeren ekzokrin bronşiyol hücreleridir. Clara hücreleri, yüzey aktif ajan olan sürfaktan lipoproteinleri salgılayarak özellikle ekspirasyon sırasında hava yolu duvarının lümenal adezyonunu önlemede görev alır. Terminal bronşiyolların lamina propriasında mukozada kıvrım oluşturan elastik lif ve düz kaslar yer alır.
- **Respiratuar Bronşiyollar:** Respiratuar bronşiyollar, hava iletiminde ve gaz değişim mekanizmasında rol oynayarak solunum sisteminde geçiş bölgesi olarak görev alır. Her terminal bronşiyol, alveolleri içeren iki ya da daha fazla respiratuar bronşiyole ayrılır. Respiratuar bronşiyolların mukozası, lümenine açılan ince duvarlı alveollerin varlığı dışında histolojik olarak terminal bronşiyole benzemektedir. Lamina propriasında düz kaslar ve elastik bağ dokusu yer alır. Respiratuar bronşiyolün seyri boyunca granül hücreleri ve fırçamsı hücreler de yer alır. Respiratuar bronşiyolların distal kısmı alveollerin ağzına kadar uzanan alveol kanalına (duktus alveolaris) ve alveol kesesine (sakkulus alveolaris) açılır.

2.3.2.3. Alveol Kanalları ve Alveol Keseleri

Alveol kanalları ve alveollerin epiteli yassı epitel ile döşelidir. Lamina propria tabakası ince olup alveollerin giriş bölgesi bir dizi düz kas hücreleriyle çevrilidir. Alveol kanalı ve kanallara açılan alveollerin etrafında elastik ve kolajen liflerden oluşan matriks

yer almaktadır. Duktus alveolarisin distal kısmındaki alveollerin bir araya gelmesiyle sakkulus alveolaris olarak isimlendirilen geniş boşluklar yer almaktadır. Elastik ve retiküler liflerden oluşan ince bağ dokusu ile kapiller damar ağı alveolleri sararak birbirinden ayırır. Komşu alveolar hava boşlukları arasında yer alan dokuya alveolar septum (interalveolar septa) denir.

2.3.2.4. Alveoller

Alveoller, solunum sisteminin uç hava boşlukları olup kan ile hava arasında gaz alışverişinin yapıldığı asıl alanlardır. Her yetişkin akciğerinde 150-200 milyon alveol bulunmakta olup alveollerin toplam iç yüzey alanı yaklaşık 75 m²'dir. Her alveol, bir kenarı sakkulus alveolarise veya duktus alveolarise açılan küçük petek şeklinde yapıdır. Difüzyonu kolaylaştıracak şekilde özelleşmiş ince alveolar duvar yapısı sayesinde alveolleri saran kapillerlerden O₂ ve CO₂ değişimi gerçekleşir.

İki komşu alveol arasında bağ dokusu yapısında alveolar arası septum bulunur. Alveolar septanın bağ dokusunda az miktarda fibroblast ve ekstrasellüler matriks ile bol miktarda elastik ve retiküler lifler bulunur. Elastik lifler alveollerin inspirasyonda genişleyip ekspirasyonda pasif olarak büzülmesine imkân sağlarken, retiküler lifler de alveolün aşırı genişlemesini ve aşırı kapanmasını engellemede görev alır. Kapiller endotel hücreleri çok ince yapıda olmakla beraber kesintisiz seyreder ve pencere içermezler.

İnteralveolar septumda alveolar ve kapiller kompartımanlar arasında gazların difüzyonla geçmesi gereken hücre ve hücre ürünlerini ifade eden kan-hava bariyerini (respiratuar membran) bulunur. Kan-hava bariyeri; kapiller endotel hücresi, kaynaşmış bazal laminalar, tip I pnömosit ve ince bir sürfaktan tabakasından oluşur. Bu tabakaların toplam kalınlığı 0,1-1,5 µm arasındadır.

İnteralveolar septaların en ince olduğu yerlerde komşu alveollerin tip I pnömositleri ve kapiller damar ağını içeren çok ince bir bağ dokusu bulunur. İnteralveolar septaların en ince olduğu bu kısımda havanın alveoller arasından geçebildiği yer olarak bilinen ve yaklaşık 10-15 µm çapında olan alveolar delikler (Kohn porları) bulunur.

Bu delikler, farklı bronşiyollerin komşu alveollerini birbirine bağlar. Böylelikle bu alveollerde hava basıncı eşitlenir ve bronşiyollerden biri tıklandığı zaman kollateral sirkülasyonla havanın alveoller arasında geçişine imkân tanınır. Obstrüktif akciğer hastalığı gibi havanın alveole normal yoldan geçişine engel olan bazı patolojik durumlarda, tıkanıklığın distalindeki alveollerin komşu lobül ya da asinüsteki porlar aracılığıyla havalanmaya devam edebilmesi bu duruma örnek teşkil eder.

Alveol havasındaki O_2 , kan-hava bariyeri aracılığıyla kapilerdeki kana geçip eritrositlerdeki hemoglobine bağlanır; pulmoner kandan gelen CO_2 ise alveole geçer ve böylelikle gaz alışverişi gerçekleşmiş olur. Organel topluluklarının büyük bir kısmı nükleus etrafında yer alarak hücrenin etkin gaz değişimi fonksiyonuna olanak sağlarlar.

Alveolar epitelde tip I ve tip II alveolar hücreler ile az sayıda fırçamsı hücre yer almaktadır.

2.3.2.4.1. Tip I Alveol Hücreleri

Tip I pnömositler olarak da isimlendirilmektedir. Kan-hava bariyerinde yer alan bu hücreler, tüm alveolar döşeyici hücrelerin yaklaşık %40'ını oluşturmakla birlikte alveolar yüzeyin oldukça büyük bir kısmını (%95) döşemektedir. İnce yassı morfolojide olan tip I pnömositlerin organelleri, sitoplazmanın kalınlığını azaltacak şekilde nükleus etrafında gruplar oluşturarak yerleşim gösterir. İncelmiş sitoplazmalarında yer alan pinositik veziküller, sürfaktan çevriminde ve havadaki küçük parçacıkların dış yüzeyden uzaklaştırılmasında görev alır. Tip I pnömositler, desmozomlara ve alveoldeki hava boşluğu içerisine doku sıvısının girmesini engelleyen tıkalı bağlantılara sahiptir.

2.3.2.4.2. Tip II Alveol Hücreleri

Tip II pnömosit ya da septal hücre olarak da adlandırılan ve salgı yapan hücrelerdir. Tip I alveol hücreleri arasına dağılmış kübik yapıda olan bu hücreler, birbirlerine tıkalı bağlantılar ve desmozomlarla bağlanmıştır. Alveolar döşeyici

hücrelerin yaklaşık %60'ını oluşturmakla birlikte morfolojileri nedeniyle alveolar hava yüzeyinin sadece %5'ini kaplarlar. Tip II pnömositlerin nükleusları yuvarlak yapıda olup bol miktarda nükleolus içerir. Apikal sitoplazmalarında lameller cisimcikler olarak adlandırılan çok sayıda granüllü vezikül bulunmaktadır. Lameller cisimcikler, apikal yüzeyden ekzositozla salgılanan çeşitli lipitleri, fosfolipitleri ve proteinleri içerirler. Salgılanan bu materyal, alveollerin iç yüzeyine yayılarak pulmoner sürfaktan olarak etki gösterir. Sürfaktan film tabakası, hava-epitel etkileşimi süresince yüzey gerilimini düşürerek ekspirasyon sırasında alveollerin kollabe olmasını önler. Ayrıca inspirasyon sırasında daha az efor sarf edilmesini sağlar. Tip II pnömositler, sürfaktan salgılama fonksiyonunun yanı sıra tip I alveolar hücreler için progenitör özellik gösterir. Akciğer hasarı sonrasında proliferasyon olarak alveol içerisindeki her iki hücre tipinin de yenilenmesini sağlarlar. Tip II alveolar hücrelerin hiperplazisi, alveol hasarının ve alveol onarımının gösterilmesinde oldukça önemli bir belirteçtir.

2.3.2.4.2.1. Pulmoner Sürfaktan

Temel bileşenleri dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) fosfolipiti, 4 sürfaktan proteini ve kolesterol olan sürfaktan, tip II pnömositler tarafından üretilir. DPPC fosfolipidi, sürfaktanın hava-epitel arayüzündeki yüzey gerilimini azaltma işlevinde rol alır. Fetüste sürfaktan üretimi gestasyonun 35. haftasından sonra tip II pnömositlerin farklılaşması ile başlar. Sürfaktanın yeterince bulunmadığı durumlarda ekspirasyon esnasında alveoller kollabe olur. Bu durum, akciğerleri sürfaktan üretmek için yeterince gelişmemiş prematür infantlarda respiratuar distres sendromunda (RDS) görülür. Erken doğum riski olan gebelere kortizol uygulanması neonatal mortaliteyi azaltabilmektedir (24).

2.3.2.5. Alveolar Hücrelerde Yenilenme

Toksik gaz gibi maddelerin inhalasyonu sonucu akciğer alveollerde yer alan tip I ve tip II pnömositler hasar görebilir. Alveolar hücrelerin ölümü sonucu geride kalan tip II hücrelerde mitoz uyarılır ve tip II pnömositlerden proliferasyon olarak hücreler her iki hücre

tipini de oluşturur. Tip II pnömositlerin günlük yenilenme hızı yaklaşık %1 civarındadır. Ayrıca toksik stresin arttığı durumlarda kök hücreler de bölünmek üzere uyarılarak alveolar hücreleri oluşturabilirler (22, 23, 29).

2.4. Akciğer Embriyolojisi

Larinks, trakea, bronşlar ve akciğerler gibi alt solunum sistemi organları gelişimin 4. haftasında oluşmaya başlar. Pulmoner epitel ile larinks, trakea ve bronşların epitel dokusu ve bez yapıları ön barsak endoderminden köken alırken; kıkırdak, bağ dokusu ve düz kaslar ise splanknik mezoderminden gelişir.

Dördüncü haftada endodermal kökenli ön barsağın ventralinde tomurcuklanma oluşarak solunum divertikülü meydana gelir. Başlangıçta ön bağırsak lümeni ile bağlantılı olan solunum divertikülü, kaudale doğru büyürken 5. haftada trakeoözefagial katlantılar ortaya çıkar. Trakeoözefagial katlantılar derinleşip birbirine yaklaşarak septum oluştururlar. Bu septum ön bağırsağın kraniyal bölümünü, laringotrakeal tüpü oluşturan ventral kısma ve orofarinks ile özofagus primordiyumundan oluşan dorsal kısma ayırır.

2.4.1. Trakeanın Gelişimi

Özofagusla ayrılma sırasında, solunum divertikülünden trakea ve akciğer tomurcukları gelişir. Laringotrakeal tüpün endodermal tabakası larinksin distalinde trakeanın epitelyal yapıları ile pulmoner epitele farklılaşır. Trakeanın kıkırdak, bağ dokusu ve kasları ise laringotrakeal tüpün etrafındaki splanknik mezenkimden köken alır.

2.4.2. Bronşların ve Akciğerlerin Gelişimi

Laringotrakeal divertikülünün kaudal ucundan gelişen solunum tomurcuğu, beşinci haftanın başlarında primer bronşiyal tomurcuklar olarak isimlendirilen iki

keseciğe ayrılır. Bu tomurcuklar perikardiyoperitoneal kanalların içinde lateral şekilde gelişim sergiler. Daha sonra sekonder ve tersiyer bronşiyal tomurcuklar gelişir.

Bronşiyal tomurcuklar, çevrelerindeki splanknik mezenkimle beraber bronşlara ve akciğer içinde yer alan dallarına farklılaşır. Bronşiyal tomurcuklar, beşinci haftanın başından itibaren genişleyerek sağ ve sol ana bronşları oluşturur. Sağ ana bronş, sol ana bronştan bir miktar daha büyüktür ve daha dikey şekilde gelişmiştir. Ana bronşlar dallanarak lobar, segmental ve intersegmental dalları oluşturan sekonder bronşları oluştururlar. Her lobar bronş dallanarak akciğer içinde yol katetmeye devam eder. Yedinci haftaya kadar oluşmaya başlayan segmental bronşların sayısı sağ akciğerde on, sol akciğerde ise sekiz veya dokuz tanedir.

Her bir segmental bronş ve etrafındaki mezenkimal kitle bir bronkopulmoner segmentin öncül halini oluşturur. On altıncı haftada 14 dallanma daha gerçekleşir ve terminal bronşiyoller görülmeye başlanır. Yirmi dördüncü haftanın sonuna kadar yaklaşık on yedi kez dallanma meydana gelmiş ve respiratuar bronşiyoller oluşmuştur. Postnatal yaşamda ise yaklaşık altı dallanma daha olur.

Bronşlar gelişirken bronşların etrafında yer alan splanknik mezenkimden kıkırdak plakları, bronşiyal düz kas ve bağ dokusu yapıları ile pulmoner bağ dokusu, visseral plevra ve kılcıl damarlar meydana gelir. Göğüs bölgesinde yer alan vücut duvarı ise somatik mezodermden köken alan pariyetal plevra ile kaplıdır.

36. haftada uç dalların çevresi kapillerlerle istila edilir ve terminal keseler oluşur. Terminal keseler alveollerden oluştuğu için artık alveoller de izlenmeye başlanır. Doğumdan önce her akciğerde yaklaşık 20-70 milyon terminal kese bulunurken bu sayı olgun akciğerlerde 300-400 milyon civarındadır. Doğumdan sonra yeni alveol oluşumu daha çok mevcut alveolün kas dokusu ve kapiller damar bulunduran septumla ikiye ayrılması şeklinde meydana gelir. Yeni damarların oluşumundaki temel gelişim mekanizması ise mevcut damarların tomurcuklanarak yeni damarları oluşturması şeklindedir.

2.4.2.1. Akciğerin Olgunlaşması

2.4.2.1.1. Embriyonik Dönem

Solunum divertikülünün gelişiminden bronkopulmoner segmentlerin oluşumuna kadar giden ve solunum sisteminin temellerinin atıldığı bu dönem, embriyonik gelişimin yaklaşık ilk dördüncü ve yedinci haftaları arasını kapsar. Bu dönemin sonunda tersiyer bronşlar dahil tüm bronş yapıları oluşmuştur ve akciğerler plevral boşlukları doldurmak için büyümeye başlamıştır.

2.4.2.1.2. Pseudoglandüler Dönem

Yaklaşık altıncı-sekizinci haftadan 16. haftanın sonuna kadar süren dönemdir. Bu dönemin adlandırılmasında akciğerlerin bu evrede histolojik olarak ekzokrin salgı bezlerine benzetilmesi etkilidir. On altıncı haftanın sonuna kadar on dört kez dallanma gerçekleşmiş olup terminal bronşiyoller izlenmeye başlanmıştır. Ayrıca bu dönemde pulmoner arter sistemi de oluşmaya başlar. Akciğerin gaz alışverişi ile ilgili fonksiyon gören kısımları henüz gelişmediğinden bu dönemde doğan fetüsler solunum işlevini yerine getiremezler.

2.4.2.1.3. Kanaliküler Dönem

Gelişimin on altıncı haftasından yirmi beşinci haftasına kadar olan süreyi kapsayan bu dönemde bronşların ve terminal bronşiyollerin lümenleri genişler. 24. haftaya kadar her terminal bronşiyol tomurcuklanarak iki veya daha fazla respiratuar bronşiyolü oluşturur. Respiratuar bronşiyollerin her biri dallanarak yaklaşık üç-altı adet primordiyal alveolar kanallara ayrılır. Bu dönemde respiratuar bronşiyollerin uçlarında primordiyal alveoller olarak da isimlendirilen ince duvarlı terminal keselerin bir kısmı oluşmuştur. Akciğer dokusunda damar sistemi iyice gelişmiş olup kapillerler bronşiyol duvarına iyice yaklaşmışlardır. Kanaliküler evrenin sonunda solunum fonksiyonu mümkün hale gelir.

2.4.2.1.4. Terminal Kese Dönemi

Sakküler dönem olarak da bilinen bu dönem gelişimin yirmi dördüncü haftasından geç fetal döneme kadar olan evreyi kapsar. Bu evrede çok daha fazla sayıda terminal keseler gelişir ve bu kesenin epitelleri oldukça ince bir hal alır. Kapillerler de bu keselerin içine doğru ilerler, böylece epitel ve endotel hücreleri birbirine yaklaşmış olur. Epitel ve endotel hücreleri arasındaki bu yakın temas, gaz alışverişinde rol alan kan-hava bariyerinin oluşmasına katkı sağlar. Yirmi altıncı haftaya kadar, terminal keseler gaz alışverişinde görev alan endodermal kaynaklı tip I pnömositler ile döşenmiş olur. Gelişen alveollerin etrafında yerleşim gösteren mezenkimdeki kapiller ağ hızla çoğalır ve lenfatik damarlar da kapillere eşlik ederek eş zamanlı gelişim gösterir. Tip I pnömositler arasında yer alan yuvarlak şeklindeki tip II pnömositler, fosfolipid ve protein karışımı olan pulmoner sürfaktan salgılama fonksiyonunu yerine getirir. Sürfaktan üretimi, yirmi-yirmi ikinci haftalarda başlayıp gebeliğin son evrelerinde artış gösterir.

2.4.2.1.5. Alveolar (Postnatal) Dönem

Geç fetal dönemden sekizinci yaşa kadar olan bu dönemde akciğerlerin solunum fonksiyonunu yerine getirebildiği kabul edilir. Pulmoner difüzyon bariyeri olarak işlev gören alveolokapiller membran, gaz alışverişine olanak sağlayacak şekilde incelmıştır. Bu dönemde akciğerlerde meydana gelen çeşitli değişiklikler neticesinde gaz alışverişi plasentadan bağımsız hale gelir. Bu değişiklikler kısaca alveolar keselerde sürfaktan üretimi, akciğerlerin salgı yapan bir organdan gaz değişimi fonksiyonu gören bir organa dönüşmesi ile pulmoner ve sistemik dolaşımın oluşması şeklinde sıralanabilir.

Alveollerin yaklaşık %95'i postnatal dönemde gelişim gösterir. Respiratuar bronşiyoller ve alveolar keselerde küçük çıkıntılar şeklinde izlenen primordiyal alveoller, doğumdan sonra akciğerler genişledikçe büyürler. Akciğerlerin ölçülerindeki artış, alveollerin boyutlarındaki artıştan ziyade respiratuar bronşiyollerin ve primordiyal alveollerin sayısındaki artıştan kaynaklanır.

Alveolar gelişimin büyük bir kısmı üç yaşına kadar tamamlanmış olmakla beraber yaklaşık sekiz yaşına kadar yeni alveoller oluşabilir. Olgunlaşmamış alveoller ilave primordiyal alveol oluşturma potansiyeline sahiptir. Miadında doğan yenidoğan bir bebeğin akciğerlerinde yaklaşık 150 milyon civarında primordiyal alveol yer alırken, üç ile sekiz yaş arasında yetişkinlerde 300 milyon alveol bulunur.

Akciğerler; doğumda amniyotik kavitenin, akciğerlerin ve trakeanın salgı bezlerinden meydana gelen sıvıyla yaklaşık yarı-yarıya dolu vaziyettedir. Doğumda alveollerin içindeki sıvı çeşitli mekanizmalarla uzaklaştırılır. Bu mekanizmalar; sıvının vajinal doğum esnasında fetal toraks üzerindeki basıncın etkisiyle ağız ve burundan çıkması veya pulmoner arterler, venler, kapillerler ve lenfatiklerin içine sızması şeklinde sıralanabilir (30, 31).

2.5. Akciğer Fibrozisi

Akciğer fibrozisi (PF), kronik inflamasyon ve anormal düzeyde ekstraselüler matriks birikimi ile karakterize ilerleyici ve tedavi seçenekleri kısıtlı bir hastalıktır (32). Subklinik inflamasyon sonucu epitel ve alveolar kapiller bazal membran hasarlanıp yaygın fibroblast odakları oluşur; bunun sonucunda ise sağlıklı akciğer morfolojisi kaybolur (33). Alveol duvarındaki fibrotik değişiklikler gaz değişiminde kısıtlılık meydana gelir, bu durum solunum yetmezliğine yol açar (34). Romatoid artrit ve lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıklar, sigara ve partiküler maddeler gibi çevresel faktörler ve bleomisin gibi bazı ilaçların yan etkileri dahil olmak üzere birçok neden PF oluşumunda rol oynar (35). İdiopatik akciğer fibrozisi (İPF), sporadik olarak görülmekle birlikte hastalığın altta yatan genetik faktörlerle de ilişkili olabileceği düşünülmektedir. İPF'li hastaların yaklaşık %5-20'sinin iki veya daha fazla aile üyesinde de akciğer fibrozisi görüldüğü belirtilmiştir (36).

Hastalarının ortalama sağkalım süresinin yaklaşık 3 yıl olduğu bildirilmiştir (37). Hastalığın kötü prognozlu ve yüksek mortalite oranı ile seyretmesi temel olarak akciğer fibrozisinin ilerlemesinin değerlendirilmesi için güvenilir biyobelirteçlerin,

multidisipliner tanı tekniklerinin ve mevcut tedavi imkanlarının kısıtlılığından kaynaklanmaktadır (38). Hastalarda genellikle hipoksiden kaynaklanan nefes darlığı, kuru öksürük ve yorgunluk gibi semptomlar görülür (34, 35).

PF'nin patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamışsa da temel mekanizmanın yara iyileşme sürecinde tetikleyici faktörlere bağlı aşırı inflamatuvar ve fibrotik yanıtlar olduğu düşünülmektedir (39, 40). Normal iyileşme sürecinde tip I pnömositlerin yerini çoğalan ve farklılaşan tip II pnömositler ve kök hücreler alır; bu hücreler anjiyogenezi, fibroblastların etkinleşmesini ve göçünü ve kolajen sentezini sağlayarak alveolar bütünlüğü yeniden oluşturur. Dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi kemokinler bu süreçlerde görev alır. Alveolar epitelde tekrarlanan mikro düzeyde yaralanmalar, akciğer hücrelerinde profibrotik ve antifibrotik araçlar arasında dengenin fibrozis yönünde bozulmasına neden olur. Pnömositlerde hiperplazi gelişir ve mezenkimal hücre miktarı artar, böylelikle fibrotik süreç gelişir (41).

TGF- β , fibrozisin en karakteristik aracısı olarak kabul edilir. SMAD2/3 sinyal yolları aracılığıyla prokollajen I ve III gibi aşağı akış hedef genlerinin transkripsiyonunu arttırdığı bilinmektedir (39). Epitelyal akciğer kanseri hücrelerindeki profibrotik sinyalizasyonun kanserin ilerlemesine zemin hazırladığı düşünülmektedir. Buna paralel olarak çalışmalarda PF'li hastalarda akciğer kanseri gelişme riskinin genel popülasyona kıyasla beş kat arttığı belirtilmiştir. EMT süreci ile de ilişkili olan TGF- β sinyalizasyonunun kanser hücrelerine mitojenik uyarı sağladığı, bu yolağın blokasyonunu sağlayan ajanların ise küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarında mevcut tedavi seçeneklerine ek katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (42).

2.6. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri; dünya çapında kansere bağlı ölümlerin erkeklerde başlıca nedeni olup kadınlarda ise meme kanserinden sonra görülen en sık nedenidir. Akciğer kanserinin insidansı ve mortalitesi erkeklerde yaklaşık iki kat daha yüksek olmakla beraber bu oranlar

dünyanın farklı bölgelerinde değişkenlik gösterebilmektedir. Akciğer kanseri, 2022 yılında dünya genelinde 2,5 milyon yeni vaka ve 1,8 milyondan fazla ölümle yaklaşık her sekiz kanser vakasından birinden (%12,4) ve kansere bağlı ölümlerin beşte birinden (%18,7) sorumludur (43).

Primer akciğer tümörlerinin yaklaşık %95'ini karsinomlar oluşturmaktayken geriye kalan %5'ini karsinoidler, mezenkimal maligniteler, lenfomalar ve bazı benign lezyonlar oluşturur (44). Akciğer kanserinin prognozu kötü olup tüm evreleri göz önünde bulundurulduğunda beş yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %22'dir (45).

Akciğer karsinomları; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom ve bir nöroendokrin karsinom alt tipi olan küçük hücreli karsinom olarak histolojik olarak dört ana tipe ayrılmaktadır. Skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom sigara ile en yakından ilişkili karsinom tipleridir. Adenokarsinom, günümüzde en sık görülen primer akciğer tümörü tipi olmakla beraber hiç sigara kullanmayanlarda, 45 yaş altındaki bireylerde ve kadınlarda da en sık görülen primer tümörlerdir (44).

Sigara içimi, akciğer kanseri için bilinen en yaygın ve temel risk faktörüdür. Biyokütle yakıtlara maruz kalma, mesleki maruziyetler ve hava kirliliği, akciğer kanseri riskini artıran diğer yaşam tarzı ve çevresel maruziyetler arasında bulunmaktadır. Genetik yatkınlık ve cinsiyet diğer risk faktörleri arasında yer almaktadır (46). Erkeklerde en yüksek akciğer kanseri insidans oranları Polinezya, Doğu ve Güney Avrupa, Doğu ve Batı Asya'da görülür, Türkiye bu sıralamada en yüksek orana sahiptir (47).

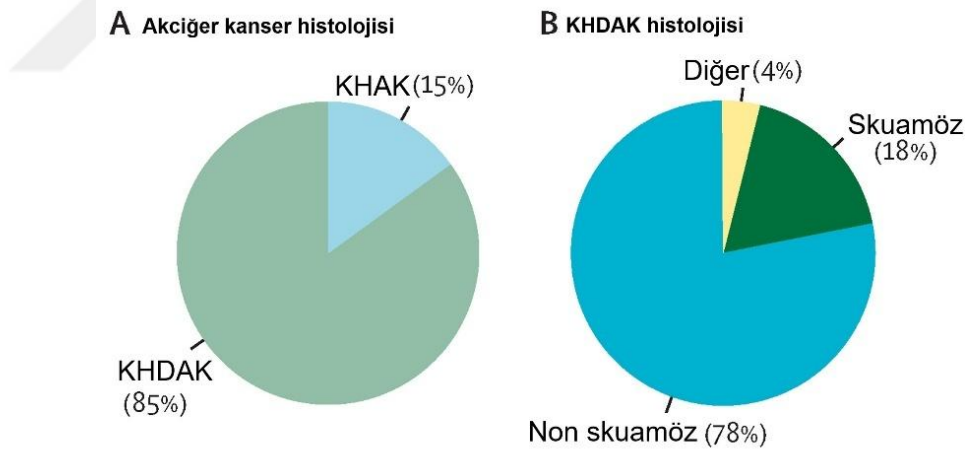
Akciğer karsinomları sinsi ilerleyen lezyonlardır. Olguların çoğu semptomlar görülmeye başlayana kadar metastaza uğramış olduğundan rezektabl tümörler değildir. Bazen kronik öksürük ve balgam, lokalize olan ve rezekte edilebilir evrelerdeki tümörlerde uyarıcı belirtiler olabilir. İlerleyen dönemlerde ses kısıklığı, göğüs ağrısı, superior vena kava sendromu, perikardiyal veya plevral effüzyon, kalıcı segmental atelektazi ya da pnömoni gibi diğer semptomlar görülebilir.

Prognoz kötü olup beyin, karaciğer ve kemik gibi çeşitli organlardaki metastatik tutulumlara bağlı olarak mental ya da nörolojik değişiklikler, hepatomegali, kemik ağrıları

gibi klinik bulgular gözlenir. Sürrenal bezler metastatik hastalık ile tümüne yakın tutulsa bile, genellikle fonksiyonları devam ettirecek kadar kortikal hücre adası kaldığı için adrenal yetmezlik nadir görülür (44).

2.6.1. Akciğer Kanseri Histopatolojisi

Akciğer kanseri histolojik olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki alt kategoriye ayrılmaktadır. KHAK, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. KHDAK ise yaklaşık %85'lik bir dilimi kapsamaktadır (48). (Şekil 2.1) KHDAK, kendi içinde adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt kategorilere ayrılır. Skuamöz olmayan karsinom, KHDAK'de akciğer kanserinin en yaygın görülen alt tipidir. Adenokarsinom, akciğer kanserinin en yaygın görülen histolojik tipidir (49).



Şekil 2.1: Akciğer kanserinin histolojik dağılım oranları (Türkçeleştirilmiştir) (49).

2.6.1.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

- **Adenokanser:** Sıklıkla mukozal bezlerden köken alan akciğer adenokarsinomu tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur. Sigara içmeyen kişilerde görülen en yaygın alt tip olup genellikle akciğerin periferinde yer alır. Ayrıca

birçok vakada skar dokusunda ve kronik inflamasyon alanlarında da saptanmıştır. Adenokarsinom da dahil olmak üzere tüm akciğer kanserleri için en önemli risk faktörü tütün kullanımıdır ve maruziyet miktarıyla orantılı olarak risk artar. Kadınlarda akciğer adenokarsinomunda son 40 yılda belirgin bir artış izlenmiş olup bu durum sigara kullanımıyla ilişkilendirilmiştir. Akciğer adenokarsinomu 20 yaşından önce nadir görülür ve tanı alma yaşı yaklaşık 71'dir (50). Adenokarsinom, son yirmi yılda skuamöz hücreli kanserin yerini alarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri kategorisinde en sık görülen kanser olarak literatüre geçmiştir (51). Akciğer biyopsisinden yapılan histolojik analiz neticesinde tümörün bronşiyal bezlerden kaynaklandığı ve yoğun mukus üretimi olduğu saptanır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasına göre adenokarsinomlar köken aldığı yere bağlı olarak asiner, papiller, bronkoalveoler ve mukus salgılayan tür olmak üzere çeşitli alt tiplere ayrılır. Evre 1 dışında adenokarsinomun prognozu skuamöz hücreli kanserden kötüdür (50).

- **Skuamöz Hücreli Akciğer Kanseri:** Tümör genellikle akciğerin santral kısmında veya sol veya sağ ana bronş gibi hava yollarında ortaya çıkar. Skuamöz hücreli akciğer kanseri, KHDAK arasında sigara ile en güçlü ilişkili olan türdür. Akciğerlerin SCC'si hava yollarını kaplayan skuamöz hücrelerin formunun değişmesinden kaynaklanır. Skuamöz hücreler, pek çok organı döşeyen ince ve yassı hücrelerdir. Farklılaşmış skuamöz hücrelerde keratinizasyon ve hücreler arası köprüler görülür. Rezeke edilen tümör kütlelerinin en az %10'unda keratinizasyon veya hücre içi köprüler gibi transformasyon bulguları gözlemlendiğinde, histolojik inceleme yoluyla SCC tanısı doğrulanır. Tümörün skuamöz yapısında farklılaşma minimal olduğu takdirde az diferansiye SCC tanısı konur (52). Dünya Sağlık Örgütüne göre skuamöz hücreli karsinomlar köken aldığı yere bağlı olarak keratinize, nonkeratinize ve bazaloid olarak sınıflandırılmaktadır (53).

- **Büyük Hücreli Akciğer Kanseri:** Büyük hücreli akciğer kanseri, nadir görülen ve malign seyreden nöroendokrin bir tümördür. KHDAK'nin alt tipi olan büyük hücreli akciğer kanseri, bir dışlama tanısıdır. Kötü diferansiye bir karsinom, akciğer kanserinin başka bir alt tipine farklılaşmasını önleyecek tanımlayıcı immünohistokimyasal belirteçleri göstermiyorsa büyük hücreli karsinom olarak tanımlanır. Vakaların yüzde 90'ında skuamöz, glandüler veya nöroendokrin farklılaşma izlenebilir (54). Büyük hücreli akciğer kanserinin biyolojik davranış biçimi KHAK'ye benzer ve diğer KHDAK'lerden daha agresif ve malign seyreder (55). Hastalarının %92,8'inde sigara içme öyküsü vardır, bu durum sigaranın büyük hücreli akciğer kanseri için bir risk faktörü olabileceğini göstermektedir (56). Hücrelerin boyutu büyük, nükleus/sitoplazma oranı düşük ve mitotik aktiviteleri oldukça yüksektir (57).

2.6.1.2. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli akciğer karsinomları (KHAK), akciğerin santral kısmında yerleşim gösteren ve parankime uzanan soluk gri renkli kitle şeklinde görülen karsinomlardır. Tanı anında genelde hiler ve mediastinal lenf nodlarında metastaz izlenir (44). Hasta profili genellikle 70 yaş üstü sigara kullanmış veya hala aktif sigara içen erkek hastalardır. Kansere genellikle birden fazla kardiyovasküler veya pulmoner komorbidite eşlik edebilir. Bununla birlikte, son 30 yılda kadınlarda görülme sıklığı artmış olup erkekler ve kadınlar arasındaki insidans farkı azalmıştır (58).

KHAK hücreleri, yuvarlak ya da füziform şekildedir ve nispeten az sitoplazmalı olup ince granüler kromatin bulundurur. Nispeten küçük tümör hücrelerinden meydana gelen bu karsinomların mitotik indeksi oldukça yüksektir. Nekroz varlığı karakteristik bir bulgudur. Tümör hücreleri oldukça frajildir, bu nedenle biyopsi örneklerinde hücreler genellikle parçalanarak ezilme artefaktına neden olur.

Az sitoplazmalı hücrelerin birbirlerine yakın yerleşimi neticesinde oluşan nükleer molding özelliği sitolojik örneklerde gözlemlenebilir. Ayrıca bu tümörler çeşitli

nöroendokrin belirteçleri eksprese ederek paraneoplastik sendromlara neden olan pek çok polipeptid hormon salgılamasında rol alabilirler (44).

2.7. A549 Hücre Hattı

Tip I ve tip II pnömosit olmak üzere iki hücre tipinden oluşan akciğer alveol epiteli, gaz değişiminde ve sürfaktan üretiminde rol oynar. Okludin, klaudin ve zona okludens proteinlerinden oluşan hücreler arası sıkı bağlantılar, epitelyal bariyer bütünlüğünün devamlılığını sağlar. Tip II pnömositler, sürfaktan üretiminin yanısıra progenitor özellik de göstermektedir (59, 60).

A549 hücre hattını başlatmak için kullanılan tümör kitlesi, 58 yaşındaki erkek hastaya yapılan lobektomi örneğinden elde edilmiştir. Yapılan histolojik incelemede alveollerin kümeler halinde epitelyal karsinom hücreleri ile döşeli olduğu görülmüştür. Ayrıca hücrelerde fosfolipid granülleri bulunabildiği bildirilmiştir. Epitelyal akciğer karsinomundan izole edilen ve tip II pnömosit kökenli olan A549 hücreleri, pek çok çalışmada model olarak kullanılmaktadır (61).

2.8. Epitelyal Mezenkimal Geçiş

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), hücre fenotiplerinin epitelyal formdan mezenkimale geçişini tanımlayan bir mekanizmadır. EMT, fizyolojik durumlarda görülebileceği gibi çeşitli patolojik olaylarda da rol alır.

EMT mekanizması, embriyonik gelişimde hücrelerin yeni doku ve organlar oluşturmak üzere bulundukları yerden ayrılıp göç etmelerine olanak tanır. Bununla birlikte EMT, kanser hücrelerinin primer tümör odağından yayılmasına imkan sağladığı için metastaz sürecinde de rol alır. Ayrıca yara iyileşmesi ve doku onarımında görev alan EMT, fibrozis gibi yıkıcı hastalıklara da neden olabilir (62-65).

2.8.1. Epitel Hücreleri

Epitel, birbirine sıkıca kenetlenmiş çok yüzeyi bulunan hücreler ve az miktarda ekstrasellüler matriksten oluşan avasküler bir dokudur.

Epitel; içerdiği hücre çeşitlerinin aktivitesine bağlı olarak vücudun farklı organlarında sekresyon, absorpsiyon, transport, bariyer fonksiyonu ve reseptör özelliği gibi pek çok işlevde rol oynar. Vücudun dış yüzeyi ile damarsal yapılar dahil olmak üzere vücut iç boşluklarını örten ve sindirim, solunum ve genitoüriner yollar gibi dış ortamla iletişim halinde olan tüp şeklindeki sistemleri döşeyen hücrelerden oluşan epitel türü örtü epiteli olarak isimlendirilir. Epitel hücrelerinin invajine olması sonucunda bezlerin salgı yapan bölümü ve kanalları gelişerek salgı epiteli meydana gelir. Epitel yüzeyine kanallar vasıtasıyla bağlantılarını devam ettiren ve salgıladıkları maddeleri bu kanallar yardımıyla boşaltan bezlere ekzokrin bezler denir. Bununla birlikte epitelyal yüzeyle ilişkisini kaybedip hücre adacıkları şeklinde bağ dokusunda yer alan bez grupları ise endokrin bezler olarak isimlendirilir ve salgıladıkları hormonları damarlara iletir. Bununla birlikte işitme, görme ve tat gibi özel duyular için reseptör işlevi gören tipi ise duyu epiteli olarak isimlendirilir.

Epiteli oluşturan hücrelerin başlıca üç temel özelliği bulunur:

- Bu hücreler, birbirine çok yakın konumda yer alıp C-CAM'ler gibi spesifik hücre-hücre adezyon molekülleri ile spesifik hücre bağlantıları aracılığıyla birbirlerine yapışırlar.
- İşlevsel ve morfolojik polarite sergilerler. Çeşitli işlevleri yerine getirmek için apikal, lateral ve bazal olmak üzere üç farklı morfolojik yüzey alanı bulunur. Her alanın özellikleri spesifik lipidler ve integral membran proteinleri tarafından düzenlenir.
- Bazal yüzeyleri; histokimyasal yöntemlerle ışık mikroskobu düzeyinde gözlemlenebilen, hücre barındırmayan ve bol miktarda protein-polisakkarit ihtiva eden bir tabaka olan alttaki bazal membranla temas halindedir.

Epitel dokusu, üç germ tabakasından da köken alır. Endoderm tabakasından pankreas, karaciğer, sindirim ve solunum sistemi kanalı epitelleri köken alırken ektoderm tabakasından derinin epidermisi, oral ve nazal mukoza, deri ve memenin bez oluşumları ve kornea gelişir. Buna ek olarak ürinifer böbrek tübülleri, dişi ve erkek genital sistem kanallarını döşeyen epitel, vücut boşluklarını örten mezotel ve damarsal yapılardaki endotel ise mezoderm tabakasından gelişir (66).

Örtü ve sınır fonksiyonu gören epitel, alttaki veya bitişiğindeki bağ dokusunu dış ortamdan, iç boşluklardan veya kan ve lenf gibi sıvı formdaki bağ dokusundan ayıran hücresel tabaka oluşturur. Ayrıca vücut boşlukları dahil olmak üzere dış ortam ile alttaki bağ dokusu arasında çeşitli maddelerin geçişini kolaylaştıran veya engelleyen seçici bariyer olarak işlev görür (67, 68).

2.8.1.1. Epitel Hücrelerinin Membran Yüzeyi Özelleşmeleri

Epitel hücrelerinin temel özelliklerinden biri olan polarite (kutuplaşma), organ ve sistemlerin spesifik fonksiyonlarının yerine getirilmesi için elzemdir. Kutuplaşma; lipidlerin ve proteinlerin dağılımı ile hücre iskeletinin yeniden şekillenmesiyle belirlenir.

Epitel hücreleri, üç ana geometrik bölümden oluşur:

- **Apikal Bölüm;** dış ortama ya da lümene bakan kısımda yer alan ve farklılaşma gösteren kısımdır.
- **Lateral Bölüm;** komşu epitel hücreleriyle birbirine hücre adezyon molekülleri ve bağlantı kompleksleriyle tutunmuş yan yüzeydir.
- **Bazal Bölüm;** epiteli altındaki bağ dokusundan ayıran ve bazal lamina ile ilişkili olan kısımdır. Bazal lamina-bağ dokusu kompleksi bazal membran olarak isimlendirilir (69).

2.8.1.2. Bağlantı Kompleksleri

Epitelyal hücrelerde polaritenin oluşturulmasından sorumlu moleküler mekanizmalar, komşu hücreler arasında işlevsel bir bariyer oluşmasına da katkı sağlar. Bu

özelleşmiş bağlantı bölgeleri sadece hücrelerin birbirine sıkıca yapışmalarında rol almaz; aynı zamanda epitelin osmotik gradyanına uygun şekilde su, iyon ve çözünen maddelerin hareketlerinin düzenlemesine de olanak sağlar. Hücre bağlantıları, iki komşu hücre arasında oluşan simetrik yapılardır. Sıkı bağlantılar, tutundurucu bağlantılar ve oluklu bağlantılar olmak üzere temel olarak üç ana sınıfa ayrılır.

2.8.1.2.1. Sıkı Bağlantılar

Sıkı bağlantılar, hücre zarındaki lipid ve proteinlerin apikal ve bazolateral bölgeler arasındaki serbest difüzyonunu engelleyerek epitel hücresinin kutuplaşma özelliğine katkı sağlar. Ayrıca hücre membran proteinlerinin ve suda çözünür maddelerin parasellüler yol ile geçişinin önlenip transsellüler transport ile taşınmasında görev alır.

Komşu hücrelerin birbirine bakan yüzeylerinde fokal membran kaynaşması gerçekleşir ve intersellüler aralık kaybolur. Zonula okludensin füzyon bölgelerinde okludin, klaudin ve bağlantı adezyon molekülleri olmak üzere üç temel transmembran proteini bulunur.

2.8.1.2.2. Tutundurucu Bağlantılar

Sıkı bağlantıların altında yer alan tutundurucu bağlantılar, komşu epitel hücrelerinin hücre iskeleti proteinleri aracılığıyla intersellüler lateral adezyonda görev alırlar. Böylelikle epitelin yapısal bütünlüğünün muhafaza edilmesine katkı sağlarlar. Hücrelerin lateral yüzeyinde zonula adherensler ve makula adherensler yer almaktadır. Bununla birlikte fokal adezyonlar ve hemidesmozomlar da tutundurucu bağlantılar arasında yer almakla birlikte hücrenin bazal kısmında bulunmaktadır.

- **Zonula Adherens:**

Zonula adherens, sıkı bağlantılar gibi epitel hücrelerini kuşak gibi saran hücre bağlantı kompleksidir. Bu bağlantı kompleksi, transmembran hücre-hücre adezyon molekülü olan E-cadherinlerden oluşmaktadır.

Aynı tip hücre adezyon molekülleri tarafından oluşan etkileşim homotipik bağlanma, farklı tip adezyon molekülleri tarafından oluşan etkileşim ise heterotipik bağlanma olarak isimlendirilir. Adezyon molekülleri arasındaki bu bağlantılar zayıf ve seçici özelliktedir; bu durum hücrelerin kolaylıkla bağlanıp ayrılmalarına imkan tanır. Cadherinler ve İmmunoglobulin süper ailesi (IgSF) homotipik etkileşime, integrinler ve selektinler ise heterotipik etkileşime örnektir.

Zonula ve makula adherenslerin sitoplazma plaklarının arasında yer alan kadherinler, adezyon ve morfogenezde görev alan Ca^{+2} bağımlı molekül ailesidir. E-cadherin kompleksi hücre adezyonunda rol oynamakla birlikte hücre polaritesinde ve farklılaşmasında, göçte, proliferasyonda ve epitel hücrelerinin yaşamsal fonksiyonlarının düzenlenmesinde işlev görür. E-cadherinlerin kaybı hücrelerin invaziv davranış kazanmasıyla ilişkilidir. N-cadherin ise merkezi sinir sisteminde fonksiyon görür.

- **Makula Adherens (Desmozom):**

Zonula adherensin altında yer alır. Epitel hücrelerinin yan ve bazal yüzeyinde bir noktadan diğerine uzanan keratin ara filamentleriyle ilişkili noktasal bağlantı birimleridir. Mekanik basınç altındaki epitel hücrelerinin birbirine sıkıca tutularak ayrılmalarını önler. Ayrıca sinyal moleküllerinin algılanıp işlenmesi fonksiyonuyla hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında ve morfogenezde rol alır.

- **Hemidesmozom:**

Epitel hücrelerini bazal laminaya bağlayan asimetric yapılarıdır. Ara filamentlerle ilişkili iç sitoplazma plağından ve hemidesmozomu bazal laminaya tutturarak dış zar plağından oluşur. Hücre iskeleti ara filamentlerini bazal lamina proteinlerine bağlayarak epitelin mukavemetini artırır.

- **Fokal Adezyonlar:**

Hücre iskeleti elemanlarından olan aktin filamentlerinin bazal membrana tutturulmasında görev alan zayıf bağlantı bölgeleridir. Fokal adezyonlar epitel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde ve fibroblastlarda yer alarak hücre göçünde rol oynar. Hücre sinyal yolu mekanizmalarında reseptör özelliği gösterir; böylece hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirilmesi, hücre göçü ve proliferasyonu gibi fizyolojik işlevlerin yanısıra tümör invazyon ve metastazında da rol alır.

2.8.1.2.3. Oluklu Bağlantılar (Gap Junction)

Nekus olarak da isimlendirilen, intersellüler iletişimde görev alan özelleşmiş membran bölgeleridir. Epitel dokusunun yanısıra kalp kası, düz kas ve sinir hücrelerinde de görev alır. Diğer bağlantı kompleksleri gibi hücrelerin birbirine bağlanmasında rol almakla birlikte nekusların asıl görevi hücreler arasında iyonların, çeşitli moleküllerin ve bilgi iletişimin gerçekleşmesini sağlamaktır. Böylelikle hücrelerin bireysel olarak değil, bir bütün olarak işlev görmesini sağlar. Morfogenezde, homeostazın sağlanmasında, hücre büyümesinde ve faarklılaşmasında rol aldığı öne sürülmektedir (66, 68, 69).

2.8.2. Mezenkimal Hücreler

Mezodermal ve spesifik nöral krest hücrelerinin proliferasyonu ve göç etmesi neticesinde erken embriyoda mezenkim (baş bölgesinde ektomezenkim) olarak isimlendirilen primitif bağ dokusu oluşur. Mezenkimin matürasyonu ve proliferasyonu sonucunda çeşitli bağ dokuları, kas, damar ve ürogenital sistemler ile vücut boşluklarını örten seröz zarlar meydana getirir. Mezenkimal hücrelerin çoğalma ve organize olma şekli, belirli bir bölgede oluşacak matür bağ dokusu tipi için zemin hazırlar (67).

Mezenkim, az sayıda kolajen lif içeren vizkoz ara maddeden oluşur. Mezenkimal hücreler ise yüksek düzeyde sentez aktivitesinin göstergesi olan belirgin çekirdekçik ve ince kromatin içeren büyük çekirdekli farklılaşmamış hücrelerdir. Dar sitoplazmalı bu

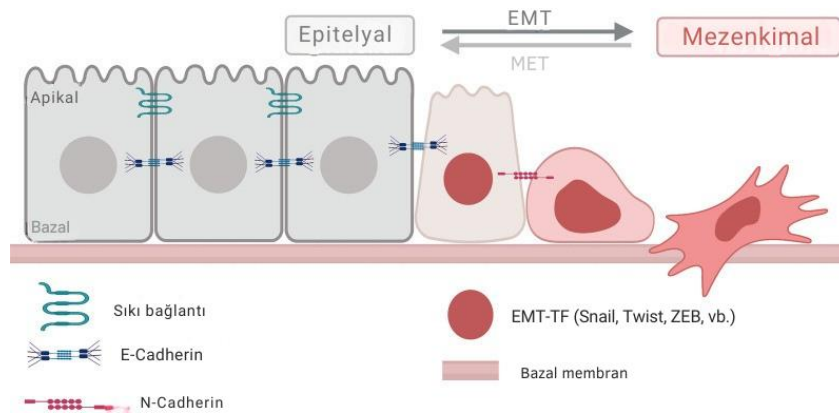
hücrelerin iki veya daha fazla sayıda ince sitoplazmik uzantıları hücreye iğsi bir görünüm kazandırır. Mezenkimal hücrelerin çevresinde kendilerinin sentezlediği hyalüronik asitten zengin ve az miktarda kollajen içeren ekstrasellüler matriks bulunur. Mezenkimdeki hücrelerin bir kısmı multipotent kök hücre özelliğinde olup rejeneratif tedaviler için kök hücre kaynağı olarak araştırılmaktadır (23).

2.8.3. Epitelyal Mezenkimal Geçiş Süreci

Epitelyal formdan mezenkimala geçiş; birbirlerine sıkıca bağlı, hareketsiz ve poligonal yapıdaki epitel hücrelerinin apikobazal polaritelerini kaybetmesi ve hücreler arasındaki bağlantıların zayıflaması sonucunda apoptoza dirençli, hareketli ve invazyon yapabilme kabiliyetine sahip fibroblast benzeri mezenkimal forma dönüştüğü geri dönüşümlü biyolojik bir süreçtir (70).

EMT, hücrelerin mikro ortamdan aldıkları sinyallere yanıt olarak tetiklenir. EMT sırasında gen ekspresyonunda ve posttranslasyonel modifikasyonda meydana gelen değişiklikler hücrelerin epitelyal özelliklerinin baskılanarak mezenkimal fenotip kazanmasına neden olur (71) (Şekil 2.2).

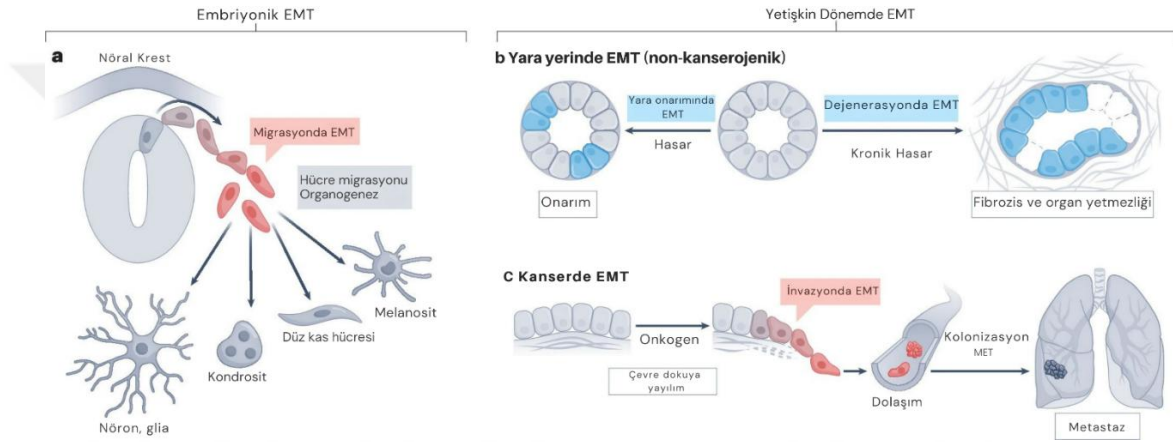
EMT'de hücreler E-cadherin, sitokeratin, zonula okludens ve okludin gibi epitelyal belirteçlerini kaybederken; N-cadherin, vimentin ve fibronektin gibi mezenkimal belirteçler kazanır (72, 73).



Şekil 2.2: EMT ve MET Geçiş (Türkçeleştirilmiştir) (74).

2.8.3.1. EMT Çeşitleri

Embriyogenezde kritik öneme sahip tip I EMT, yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve organlarda fibrozis gelişmesinde görev alan tip II EMT ve metastaz, invazyon gibi kanser süreci dahil olmak üzere pek çok patolojik durumun oluşumunda ve ilerlemesinde rol alan tip III EMT olmak üzere temel olarak üç tip EMT süreci tanımlanmıştır (75-78) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Embriyonik gelişimde ve erişkin dönemde EMT çeşitleri (Türkçeleştirilmiştir) (62).

2.8.3.1.1. Tip I EMT

Tip-1 EMT, implantasyon, embriyonik gelişim ve organogenez ile ilişkilidir. Embriyonik gelişimde, epitel hücrelerinin göç edebilme kapasitesine sahip mezenkimal hücrelere dönüşmesi ve göçten sonra hücrelerin tekrar epitel form kazanması söz konusudur. EMT ve mezenkimal epitelyal geçiş (MET) olarak isimlendirilen ve birbirleriyle ilişki halinde olan bu hücre dinamikler, embriyonik gelişimi yönlendiren temel süreçler olarak kabul edilmektedir (75, 79).

Gelişimin ilk aşamalarında görülen blastosist, trofoblast hücre tabakasının iç hücre kitlesini ve blastosöl boşluğunu çevrelemesiyle meydana gelir. Sinsityotrofoblast öncüleri olan trofoblast hücrelerinde EMT'nin etkinleşmesi, hücrelerin endometriyum tabakasına invazyonunu kolaylaştırır ve plasantanın doğru biçimde tutunabilmesine imkân sağlar.

Embriyonik gelişimin erken safhalarında blastosistin iç hücre kütlesi epiblast ve hipoblast tabakalarından oluşan bilaminar germ diskinde ve gastrulasyonu başlatan bir yapı olan primitif çizgi gibi çeşitli yapılara farklılaşır. Epiblast hücrelerinin EMT geçirerek primitif çizgiden içeriye doğru ilerleyerek göç etmesi sonucu primer mezenkim meydana gelir. Bu yapı daha sonra kalıcı mezoderm ve endoderm tabakalarına farklılaşır. Endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üç germ tabakasının olduğu bu olay gastrulasyon olarak isimlendirilir.

Gastrulasyonu takiben ektodermin kübik yapıdaki epitel hücreleri nöral plağı oluşturan prizmatik epitel hücrelerine dönüşür ve kendilerini çevreleyen pre-epidermal hücrelerden ayırt edilebilir hale gelir. Hücrelerin şeklinde ve yapışma özelliklerinde meydana gelen değişiklikler nöral plakanın bükülmesine yol açarak nöral tüpün oluşmasını sağlar.

Ayrıca bu süreçte epidermal tabaka ile nöral tüp arasında nöral krest oluşur. Nöral krest hücreleri EMT geçirerek nöral tüpün epitelinden ayrılır ve hedef bölgelere göç eder. Böylelikle nöronlar, glial hücreler, endokrin hücreler, melanositler ve kraniyofasiyal yapılar gibi periferik sinir sisteminin çoğu bileşeni gibi farklı türevlere farklılaşırlar. Nöral krest hücrelerindeki EMT'nin ilginç olan kısmı, hücrelerin organize bir birim olarak hareket ederek oluşturduğu karakteristik toplu hücre göçleridir. MET olarak bilinen ters süreç ise kalp gelişimi, böbrek morfogenez ve somitlerin oluşumunda rol oynar.

Buna ek olarak EMT ve MET, kalp kapakçıkları oluşumunda, iskelet kası ve damak oluşumu da dahil olmak üzere embriyonik gelişimin sonraki aşamalarında da gözlemlenir. Embriyonik gelişim sonrası, epitel hücreler dokuya özgü bir işlevi sürdürürken mezenkimal hücreler destek olarak kalır (70, 74, 80, 81).

2.8.3.1.2. Tip II EMT

Tip II EMT, yara yeri iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve organlarda fibrozis gelişmesi ile ilişkilidir. Travma ve inflamatuvar hasar durumunda dokuları onarmak üzere

epitelyal hücrelerin fibroblast benzeri hücrelere farklılaştığı bir süreçtir. Akut gelişmiş ve orta dereceli yaralanmalarda bu geçiş onarıcı fibrozis olarak kabul edilir. Onarım tamamlanıp inflamasyon azaldığında Tip II EMT sona erer. Ancak devam eden inflamasyon durumunda fibroblast benzeri hücrelerin anormal derecede oluşumu ve ekstrasellüler matriksin patolojik düzeyde birikimi sonucu fibrozis gelişebilir. Bu durum ise zamanla skar dokusu gelişimine ve organ disfonksiyonuna yol açabilir. TGF- β sinyalizasyonu; yara iyileşmesi ve fibrozis gibi fizyolojik ve patolojik durumlarda inflamasyon, hücre göçü, fibroblast benzeri hücre birikimi ve ekstrasellüler matriks gibi profibrotik olayları yönlendirir (79, 82). EMT'nin akciğer, kalp, karaciğer, böbrek ve bağırsak gibi organların fibrojenizde rol aldığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (39, 83-87).

2.8.3.1.3. Tip III EMT

Yunanca “yer değiştirme” anlamına gelen metastaz, primer tümörden ayrılan hücrelerin vücudun farklı bölgelerine göç etmesi sonucunda sekonder tümör odaklarının oluşmasını ifade eder (88). EMT'nin tümör hücrelerinin büyümesinde, proliferasyonunda, metastazda ve ilaç direnci gelişmesinde rol oynadığını bildirilmiştir (89).

Tip III EMT, fibroblast oluşumunu sağlayan mekanizmadan ziyade nodüler epitel tümör hücrelerinin hareketini ve yayılmasını kolaylaştırarak metastaz oluşmasına olanak tanıyan bir süreç olarak fonksiyon görmektedir (81).

Literatürde dolaşımdaki tümör hücrelerinin epitelyal belirteçlerini kaybedip EMT belirteçlerini eksprese etmesinin metastaz ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Buna ek olarak meme kanseri, mide kanseri ve kolanjiyokarsinomlu bireylerde EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin (EMT-TF) ekspresyonunun kötü prognozla korele seyrettiği bildirilmiştir (90).

2.8.3.2. EMT Belirteçleri

Epitelyal hücreler sıkı bağlantılar, adherent bağlantılar, desmozomlar ve gap junctionlar aracılığıyla birbirleriyle temas halindedir. EMT'nin başlamasıyla birlikte bu bağlantıların yapısı bozulur. EMT sırasında sıkı bağlantıların çözülmesine okludin ve klaudin ekspresyonunun azalması ve zonula okludens 1'in (ZO1/TJP) hücre-hücre temaslarından difüzyonu neden olur. E-cadherin plazma membranında parçalanarak ortadan kaldırılır ve adherent bağlantıların stabilizasyonu bozulur. Desmozomlar dejenere olur ve konneksin seviyelerinde azalma nedeniyle gap junctionların bütünlüğü tehlikeye girer. EMT süreci ilerledikçe bağlantı proteinlerinin ekspresyonu transkripsiyonel olarak baskılanır ve bu durum epitelyal bağlantıların kaybını sürdürür (91-93).

Nöral cadherin (N-cadherin), nöral hücreler ve osteoblastlar gibi epitelyal özellik göstermeyen hücre türlerinde ifade edilir. EMT sürecinin göstergesi olarak fonksiyon gören N-cadherinin yüksek düzeyde ekspresyonu çeşitli karsinom türleri ile ilişkilendirilmiştir (94).

E-cadherinin aşağı regülasyonu mezenkimal belirteç olan N-cadherinin artan ekspresyonu ile dengelenir ve bu durum hücre adezyonunu değiştiren bir “cadherin dönüşümü” ile sonuçlanır. Bu durum sonucunda hücreler epitelyal özelliklerini kaybeder ve daha zayıf etkileşim sağlayan N-cadherin yoluyla mezenkimal fenotipe dönüşerek göç ve istila etme yeteneği kazanırlar. Bu durum kanser hastalarında düşük sağkalım oranı ile ilişkilidir (95-97).

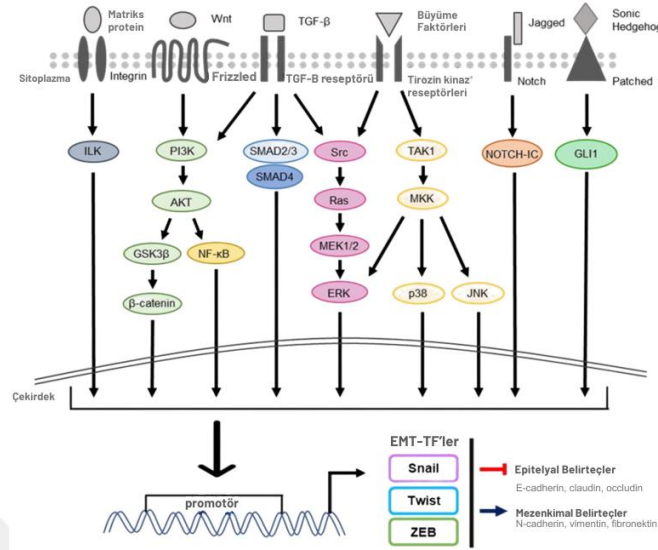
Hücre iskeleti; hücre mimarisinin şekillenmesi, hücre bölünmesi, endositoz, ekzositoz gibi fizyolojik işlevlerde görev almakla beraber kanser hücrelerinin göç ve istila etme gibi özelliklerinde kritik öneme sahiptir. Ara filamentlerin bazı çeşitleri hemen hemen tüm hücre tiplerinde bulunurken sitokeratin ve vimentin gibi bir kısım ara filamentler ise özelleşmiş dokularda görülür. Sitokeratin, epitel hücrelerinde eksprese edilir ve hücrelerin birbirine yapışmasına destek olur. Vimentin ise hücre-hücre adezyonunda rol almakla beraber polaritesi olmayan mezenkimal hücrelerde eksprese edilerek göçle ilgili strese karşı direnç sağlar. Vimentin, sitokeratinlerin aksine mekanik

stres ve basınca karşı doku düzeyinde değil hücre düzeyinde direnç sağlar. Göç eden bir hücre, doku istilası sırasında sıkışma ve gerilme kuvvetine uyum sağlamalıdır. Vimentin; lokal uygulanan mekanik stresi hücrenin diğer bölgelerine dağıtarak hücrenin gerinimini, esnekliğini ve gücünü artırarak hücre canlılığını koruyan bir ağ oluşturur, böylelikle hücre göçüne olanak tanınmış olur. EMT'de vimentin seviyelerindeki artış, hücre migrasyonu ve invazyonundaki artışın belirteci olarak rol alır (98-100).

Transkripsiyon faktörleri (TF), gen ekspresyonları üzerinde düzenleyici işleve sahip olup EMT sürecinde önemli görevler üstlenmektedir. Embriyonik gelişimde iç hücre kütlesi ve dış hücre kütlelerinin oluşumundan sorumludur. Bu olay esas olarak POU ailesi transkripsiyon faktörüne ait Oct 3/4 ve kaudal tip bir homeobox proteini olan Cdx2 transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilir (101). Buna ek olarak Snail Ailesi proteinleri olan Snail 1 ve Snail 2, Zinc finger E-box binding (Zeb) homeobox ailesi proteinleri Zeb1 ve Zeb2 ve TWIST ailesi proteinleri Twist 1 ve Twist 2 gibi TF'ler E-cadherin, okludin, kladin gibi epitelyal belirteçlerin ekspresyonunu baskılamak ve N-cadherin, vimentin, matriksmetalloproteaz (MMP) gibi mezenkimal belirteçleri aktive etmek üzere fonksiyon görür (70).

2.8.3.3. EMT Sinyal Yolakları

EMT süreci, epitelyal mezenkimal transkripsiyon faktörlerini aktive etmek üzere bir araya gelen çeşitli hücre içi sinyal yollarının devreye girmesi ile düzenlenir (102). TGF- β , kemik morfogenetik proteini (BMP), fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi pek çok büyüme faktörüne bağlı mekanizmaların yanı sıra, Wnt, Sonic Hedgehog (Shh), Notch ve integrin sinyalizasyonunun da bu sürece aracılık ettiği bildirilmektedir (Şekil 2.4). EMT'yi tetikleyen sinyal mekanizmaları genellikle hücre ve doku tipine özgü niteliktedir; bu durum hücrelerin mikroçevrelerine bağlı olarak belirli sinyalleri farklı şekilde entegre edebileceği anlamına gelir. Buna ek olarak hipoksik koşullara bağlı oluşan sinyaller de EMT sürecinde görev alır (4).



Şekil 2.4: EMT'yi Düzenleyen Yaygın Sinyal Yolakları (Türkçeleştirilmiştir) (103).

2.8.3.3.1. TGF- β Sinyal Yolağı

TGF- β , BMP, büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF), aktivin ve inhibin gibi çeşitli faktörlerden oluşan TGF- β ligand süper ailesinin esas elemanıdır. TGF- β , embriyonik gelişim safhalarında ve yetişkin dokuda temel homeostatik olaylarda görev alır (104).

TGF- β 'nin başlangıçta birçok büyüme faktörü gibi hücre çoğalmasını uyardığı düşünülse de, ilerleyen zamanlarda hücre çoğalması üzerinde uyarıcı ya da inhibe edici etkili olmak üzere çift yönlü bir düzenleyici olduğu görüş kabul görmeye başlamıştır.

Çok işlevli bir polipeptit sitokin olan TGF- β ; TGF- β I, TGF- β II ve TGF- β III olmak üzere üç alt tipe ayrılmakla birlikte aksi belirtilmediği sürece TGF- β I anlamına gelmektedir. TGF- β temel olarak ekstrasellüler matrikste latent bir kompleks olarak salgılanır ve depolanır, bununla birlikte yalnızca aktive edilmiş TGF- β işlevlerini yerine getirmek için TGF- β reseptör kompleksine (T β R) bağlanır. TGF- β sinyalizasyonundaki aksaklığın EMT'ye yol açtığı, böylelikle bağ dokusu bozuklukları, fibrozis ve pek çok kanser türlerinin patogeneğinde yer aldığı kabul edilmektedir. Bu nedenle bu hastalıkları tedavi etmek için son yıllarda, birçok klinik çalışma TGF- β -hedefli ilaçların çeşitli tümör

ve fibrotik hastalıklar üzerindeki terapötik etkisine odaklanmaktadır. Günümüzde anti-TGF- β antikor, TGF- β reseptör inhibitörü ve rekombinant proteinler gibi pek çok TGF- β hedefleyici ajanların mevcut tedavilere eklenmesi popüler tedavi stratejilerindendir (105, 106).

Hücre içindeki sinyalizasyonlarda önemli görev üstlenen TGF- β , esas olarak SMAD 2, SMAD 3 ve SMAD 4 transkripsiyon faktörlerinin aracılık ettiği kanonik yol üzerinden gerçekleşir (107, 108). Bununla birlikte çeşitli ligandların tirozin kinaz reseptörlerine bağlanmasıyla tetiklenen çok sayıda SMAD bağımsız nonkanonik yollar da bulunmaktadır. Etkinleşen TGF- β reseptörleri, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK) dahil olmak üzere mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolları gibi sinyal dönüştürücüler aracılığıyla bir yanıt sağlayabilir. C-Jun amino terminal kinaz (JNK), p38 MAPK, I κ B kinaz (IKK), fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K), Akt ve Rho ailesi GTPazları bu kaskada görev alabilir. EMT sürecinin inhibe edilmesi; çeşitli kronik inflamatuvar hastalıkların ve kanserlerin yayılmasının önüne geçmek için esas mekanizmalar arasında yer alabilir. Bu nedenle SMAD bağımlı ve SMAD bağımsız yolları bloke eden TGF- β antagonistlerinin tanımlanması güncel tedavilere yeni seçenekler eklenmesi açısından pek çok araştırmacının hedefi haline gelmiştir (109).

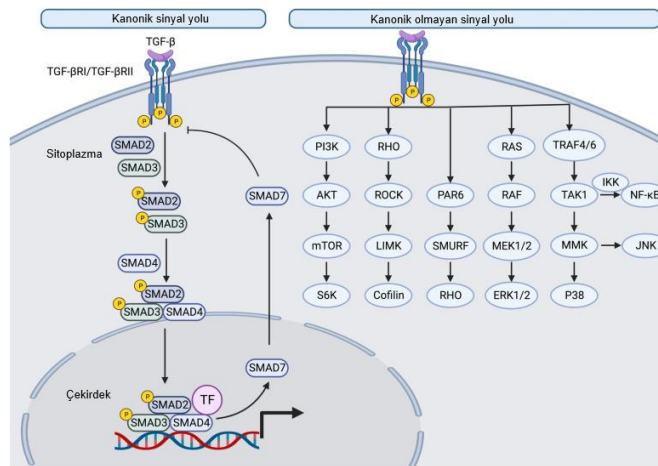
2.8.3.3.2. TGF- β / SMAD Sinyal Yolu

TGF- β sinyallerinin SMAD protein ailesi tarafından plazma membranından çekirdeğe iletildiği sinyal yoludur. Memelilerde sekiz çeşit SMAD proteini tanımlanmış olup bu ailenin üyeleri temel olarak üç gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar; aktive edilmiş tip I reseptör kinazlarla etkileşime giren ve bunlar tarafından fosforile edilen reseptörle düzenlenen (R) SMAD'lar (SMAD 1, SMAD 2, SMAD 3, SMAD 5 ve SMAD 8), etkinleştirilmiş R-SMAD'larla kompleksler oluşturan (Co) SMAD (SMAD 4) ve R-SMAD'larla rekabet ederek SMAD bağımlı sinyalizasyonu bloke eden inhibitör (I) SMAD'lar (SMAD 6 ve SMAD 7) olarak ifade edilmektedir. TGF β ailesinin tip I

reseptörleri ekseriyetle SMAD 2 ve SMAD 3 ile ilişkiliyken, BMP tip I reseptörleri ise SMAD 1, SMAD 5 ve SMAD 8 ile etkileşime girer (107, 110, 111).

Dinlenim durumunda, R-SMAD'lar genellikle sitoplazmada, Co-SMAD sitoplazma ve çekirdekte ve I-SMAD'ler esas olarak çekirdekte lokalize haldedir. TGF- β reseptör kompleksi, SMAD 2'nin ve SMAD 3'ün fosforilasyona uğramasından sorumludur. Fosforile edilerek etkinleştirilmiş olan SMAD 2 ve SMAD 3, SMAD 4 ile trimerik kompleksler oluşturur. Daha sonra, R-SMAD-SMAD 4 trimerik kompleksi nükleusa iletilir, burada hedef genlerin ekspresyonları EMT-TF yardımıyla düzenlenir. TGF- β /SMAD sinyaline ilgili yanıt verildikten sonra, çekirdekteki R-SMAD-SMAD4 kompleksleri defosforilaz tarafından defosforilasyona uğrar ve depolimerize olur. Ardından nükleer porlardan sitoplazmaya döner; böylelikle R-SMAD'ların ve SMAD4'ün geri dönüşümü gerçekleştirilir.

I-SMAD'lar TGF- β /SMAD sinyalizasyonunu negatif yönde düzenler. Ligandlar TGF- β reseptörlerine bağlandığında, SMAD 7 çekirdekten sitoplazmaya transloke olup reseptöre bağlanır, böylece R-SMAD'ların fosforilasyonu önlenir. SMAD 6 ise çekirdekten sitoplazmaya geçer ve SMAD4'e bağlanmak için SMAD 1 ile rekabet eder. Böylelikle TGF- β /SMAD sinyalizasyonu önlenmiş olur (82, 112) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: TGF- β 'nin indüklediği kanonik ve kanonik olmayan sinyal yolları (Türkçeleştirilmiştir) (113).

Epitelyal mezenkimal geçişin astım (114), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (115), fibrojenik akciğer hastalıkları (116) ve akciğer kanseri (117, 118) gibi akciğer hastalıklarının patogenezinde görev aldığı çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir (119).

EMT'nin tümörögenez, kanser invazyonu ve metastazında kilit rol oynadığı bilinmektedir (12). Kanser hücreleri metastatik nitelik kazanmak için motiliteye ve çevresindeki hücre dışı matriksi istila etme kabiliyetinin artmasına ihtiyaç duyar (13). Buna ek olarak epitel kökenli tümör hücrelerinin mezenkimal fenotip kazanması, hücrelerin göç kapasitesini arttırarak dolaşım ile diğer organlara yayılmasını ve çevre dokuya invazyonu ile ilişkilidir. Ayrıca bu durum hücrelerin apoptoza ve kemoterapötik maddelere karşı direnç geliştirmesine neden olur (12). Bu nedenle E-cadherin, N-cadherin ve vimentin gibi EMT belirteçlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesinin tümör gelişimi, metastazı ve ilaç direncini etkilediği düşünülmektedir; nitekim EMT mekanizmaları ile akciğer kanserinde kötü prognoz arasındaki belirgin ilişki yayınlarda vurgulanmıştır (120).

2.8.3.3.3. NLRP3 İnflamazomu

Doğal bağışıklık sistemi, çeşitli mikrobiyal patojenlere ve hücre hasara karşı ilk tepkiyi düzenleyen hücre savunma mekanizmasıdır. Patojenlerle bağdaştırılan moleküler kalıplar (PAMP) ve hücre hasara yanıt olarak üretilen tehlike ile bağdaştırılan moleküler kalıplar (DAMP), doğal bağışıklık hücrelerinde yer alan spesifik olmayan örüntü tanıma reseptörlerinin (PRR) etkinleştirilmesine neden olur (121, 122).

İnflamazomlar, çeşitli patojen mikroorganizmalar tarafından ve hücre hasarına yanıt olarak tetiklenen sitoplazmik multiprotein komplekslerdir. İnflamazomlar esas olarak sitozolik NLR veya ALR sensörü, adaptör protein olan ASC (kaspaz aktivasyonu ve işe alım alanı içeren apoptozla ilişkili benek benzeri protein, CARD) ve efektör protein olarak sıklıkla kullanılan kaspaz-1 molekülünü içermektedir (Şekil 2.10).

PAMP'lar ve DAMP'lar gibi enfeksiyon veya doku hasarı sinyallerini tanıyarak etkinleştirilen inflamazomlar, kaspaz-1'in aktif formuna dönüşmesine imkan tanır; bu

durum bağışıklık hücrelerini enfeksiyon ve yara bölgesine toplayan, inflamasyonu tetikleyen ve doku onarımına katkı sağlayan interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) gibi sitokinlerin salınımının artmasına neden olur. Aktivasyon mekanizmasına ve bünyesinde bulunan farklı protein bileşenlerine dayanarak, inflamazomlar kanonik ve kanonik olmayan inflamazomlar olmak üzere temel olarak iki ana gruba ayrılmıştır (123, 124). Kanonik inflamazomlar, kaspaz-1'in etkinleştirilmesine, bunun sonucunda matür formda IL-1 β ve IL-18 üretimine, hatta özel bir hücre ölüm çeşidi olan piroptoz oluşumuna neden olur. Lipopolisakkarit (LPS) gibi uyarımları tanıyan nonkanonik inflamazomlar ise insanlarda kaspaz-4/5'i, farelerde ise kaspaz 11'i etkinleştirir ve bu durum piroptozun indüklenmesine yol açar (125).

İnflamazom kompleksleri esas olarak doğal bağışıklık sistemi hücrelerinde incelenmiş olsa da, yapılan güncel araştırmalar inflamazomların göz, akciğer, böbrek, bağırsak, serviks ve deri epitel hücrelerinde de eksprese edildiğini, böylelikle inflamasyon, enfeksiyon ve yara iyileşmesi gibi süreçlere katkıda bulunduğunu belirtmiştir (126). Cryopyrin olarak da isimlendirilen NLRP3 inflamazomu, tanımlanan pek çok inflamazom içinde en karakteristik olanlarından (127-129). Güncel çalışmalar, tedavi almayan İPF hastalarının bronkoalveolar lavaj sıvısı makrofajlarında NLRP3 seviyelerinin önemli ölçüde arttığını bildirmiştir. Ayrıca NLRP3'ün pulmoner, renal ve hepatik fibroziste TGF- β 1 sinyal yolu üzerinden EMT'yi düzenleyebildiği çeşitli yayınlarda gösterilmiştir (124). Tüm bunlara ek olarak EMT ile ilişkili pek çok genin ekspresyonunun düzenlenmesinde NLRP3 ile SMAD 2/3 arasında bir etkileşim olduğu kanısı öne sürülmektedir.

NLRP3'ün EMT sürecinde rolünün iki şekilde gerçekleşebileceği öne sürülmektedir; biri inflamazom aktivasyonu ile etkinleşen IL-1 β 'in proinflamatuvar etkisi neticesinde TGF- β yolunun yukarı yönlü düzenlenmesi, diğeri ise inflamazom aktivasyonundan bağımsız olarak TGF- β /SMAD yolundaki reseptör SMAD'ları artıran NLRP3 reseptörünün vasıtasıyla meydana gelmesidir (130).

2.8.4. Glaucocalyxin A

GLA, başlıca Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Isodon* (*Rabdosia*) bitkisinde bulunan bir bileşiktir. Bu bitki özellikle tropikal ve subtropikal Asya'da görülür (131) (Şekil 2.6). Bilinen yaklaşık 150 türü olan bu bitkinin 30'dan fazla türü geleneksel tıpta tedavi amaçlı kullanılmaktadır. *Isodon* cinsi bitkilerden yaklaşık 500 çeşit diterpenoid izole edilmiş ve nitelendirilmiştir. Bu diterpenoidlerin bir kısmının antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antikanserojen özelliklerine karşın toksitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir.

Glaucocalyxin A (GLA), *Isodon*'dan elde edilen bir ent Kaurane diterpenoiddir. Geleneksel Çin tıbbında destekleyici takviye olarak Glaucocalyxin A içeren tabletler kullanılmakla beraber şu ana kadar Glaucocalyxin A içeren klinik bir ilaç bilinmemektedir (20).



Şekil 2.6: *Isodon japonicus* var. *glaucocalyx* (132).

GLA'nın; antioksidatif, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antitrombotik özellikler gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (133, 134). Ayrıca glioblastom,

lösemi, karaciğer ve mesane kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde anti tümöral etkinlik göstermektedir (135).

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda Glaucocalyxin A'nın akciğerde astımlı farelerin havayolunda antiinflamatuvar etkinlik gösterdiği, KHDAK'de apoptozu indüklediği; ayrıca karaciğer ve kalpte antifibrotik etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca Glaucocalyxin A'nın mide kanseri ve epitelial yumurtalık kanserinde EMT sürecini blokladığı bildirilmiştir (134-138).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Deneyler için insan adenokarsinoma hücre hattı olan A549 hücreleri kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları, sitotoksik aktivite tayinleri, qRT-PCR ve immünohistokimyasal boyama çalışmaları Gaziantep İslam Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda ve Gaziantep Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Tablo 3.1: Cihazlar ve Markaları

<u>Cihaz</u>	<u>Marka</u>
Biyogüvenlik Kabini	Thermo Scientific, SAFE 2020
Karbondiyoksitli İnkübatör	Thermo Forma Direct Heat
Santrifüj	Thermo, SL 16R
Su Banyosu	Memmert
Otomatik Pipet Seti	Thermo Scientific
Serolojik Pipet Tabancası	Thermo Scientific
Mikroplate Okuyucu	Thermo, MULTISKAN SkyHigh
Thermal Cycler	Thermo Fisher MiniAmp Plus
PCR Cihazı	Rotor Gene Q, QIAGEN
Vorteks	IKA Vortex basic
Hassas Elektronik Tartı	Denver Instrument
+4°C Buzdolabı	BOSCH
-20°C Derin Dondurucu	BOSCH
-80°C Derin Dondurucu	Thermo Scientific FORMA 88000 Series
Distile Su Cihazı	New Human Power I Scholar-UV
Işık Mikroskobu	Nikon Eclipse-Ni
Mikroskop Kamerası	Nikon DS-Ri2
İnvert Mikroskop	Olympus CKX53
Isıtıcı Blok	IKA DRY BLOCK HEATER 3
Mikrosantrifüj Cihazı	THERMO MICROCL 17R

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Markaları

Tablo 3.2: Sarf malzemeler ve markaları

<u>Malzeme</u>	<u>Marka</u>
Paraformaldehit	Sigma-Aldrich 158127 500 gr
Penisilin/Streptomisin	Hyclone, SV300V10
Trypsin 0.25% protease solution with porcine trypsin, HBSS, EDTA; without calcium, magnesium	Cytiva HyClone, SV30031.01
DMEM with High Glucose, with 4.0 mM L-Glutamine, without Sodium Pyruvate 500 ML	HYCLONE SH30022.01
FBS (Fetal Bovine Serum) SA sourced 500 ml	HYCLONE SV30160.03
DMSO (DIMETHYL SULFOXIDE $\geq 99.9\%$)	ISOLAB, 914.036.25 00, FOR ANALYSIS ACS 2,5 Litre
Sekonder Antikor Kiti	Abcam Rabbit specific HRP/AEC IHC Detection Kit (ab64260)
Harris Hematoksilen Solüsyonu	Beslab
Hydrogen Peroxide Block %3 Aqueous	LabVision/ThermoScientific TA-125-HP
MTT (Thiazolyol Blue Tetrazolium Bromide) 1 gr	BIOSHOP MTT222.1
FIREScript® RT cDNA synthesis KIT	SOLİS BİODYNE 06-15-00050
RiboEx™ Total RNA İzolasyon Kiti 100 ml	GENEALL 301-001
qPCR Mix Solis BİODYNE HOT FIRE Pol®	SolisGreen® 08-46-00001
E-cadherin Antibody 100 ul	Affinity Bioscience AF0131 -100ul
N Cadherin Antibody 100 ul	Affinity Bioscience AF5239-100ul
Vimentin Antibody 100 ul	Affinity Bioscience AF7013 -100ul
NLRP3 Antibody 100 ul	Affinity Bioscience DF7438 -100ul
Phospho-Smad2-S465/467 + Smad3-S423/425 Rabbit pAb	ABclonal-AP0548
96 Kuyucuklu Kültür Plakları	Corning™ Costar™ 96-Well, Cell Culture-Treated, Flat-Bottom Microplate
6 Kuyucuklu Kültür Plakları	SPL30006-1 Cell Culture Plate, PS, 6 well

OLIGOMER Primer sentezi 50nmol	E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin, NLRP3, SMAD2, SMAD3
Su Bazlı Kapatıcı (Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium)	Sigma-Aldrich SLBN4103V
TRITON® X-100	BIOSHOP, TRX506.500
Paraformaldehit	SIGMA, 158127- 500G
Serolojik Pipet 5 ml	Biosigma CLEARline Serological Pipettes
15 ml ve 50 ml şeffaf konik tabanlı santrifüj tüpleri	ISOLAB
Phosphate Buffered Saline (PBS), 1X, 0.0067M PO4, without Calcium, Magnesium, Phenol Red 500 ML	HyClone SH30256.01
25'lik Steril Hücre Kültür Flaskları	SPL 70025
75'lik Steril Hücre Kültür Flaskları	SPL 70175
Steril Şeffaf Pipet Ucu, 10 µl	KIRGEN, 10 µl, clear tips,DNas/RNase free, sterile, rack pack 96 TİPS
Steril Şeffaf Pipet Ucu, 100 µl	KIRGEN, 100 µl filter,DNas/RNase free, sterile, 96/rack
Steril Şeffaf Pipet Ucu, 1000 µl	KIRGEN, 1000 µl filter tips, blue, DNAs/RNAs free, sterile, 96/rack
qPCR STRIP TÜP	GUNSTER BIOTECH, MB QR4,0.1 ml 4'LÜ
Reaksiyon Tüpü	GRENIER BIO, GR.616201, 1,5 ML, PP, NATURAL, ATTACHED CAP, RADUATED, SUITABLE FOR EPPENDORF, 500 PCS/BAG
8 gözlü hücre kültür lamı	8 well cell culture chamber, on glass slide, removable frame, sterile, non-pyrogenic/endotoxin-free, non-cytotoxic
Recombinant Human TGFB1/TGF-beta 1 Protein (Active)	ELABSCIENCE PKSH03200 7-10ug
Termal ısıtıcı blok tüpleri	THERMO FISHER 0.2 mL flat cap thermal cycler block tubes, AB0620
Kriyotüp	Greiner BIO-ONE

3.2. Çalışmada Kullanılan Metotlar

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattının Temini

Çalışmamızda American Type Culture Collection (ATCC)'dan alınan A549 hücre hattı kullanılmıştır. A549 hücreleri, akciğer kanseri teşhisi konulmuş 58 yaşında Kafkas kökenli erkek hastanın akciğer dokusundan izole edilmiştir. A549 hücre hattı epitelyal morfolojiye sahip adherent özellikteki A549 hücrelerinden meydana gelmekte olup toksikoloji, kanser ve immünoonkoloji araştırmalarında kullanılabilmektedir.

3.2.2. A549 Hücrelerinin Çözdürülmesi

Laboratuvarın ve cihazların sterilitesi sağlandı, optimum koşullar gözetilerek çalışma ortamı hazırlandı. Hücre hattının özellikleri ve uygun üretim koşulları bilgileri için ilgili firmadan ürün bilgi reçetesi sağlanarak gerekli çalışma şartları oluşturuldu.

Kriyotüpteki hücre süspansiyonu -80°C'den çıkarılıp 37 °C'de steril hazırlanmış su banyosunda çözülmeye bırakıldı. Çözünen süspansiyonu santrifüj tüpüne alındı ve üzerine besiyeri medyumunu (%8 fetal bovin serum, %2 penisilin-streptomisin ve %90 L-glutamin ve yüksek glikozlu DMEM) eklenerek 1000 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpteki dimetil sülfoksit (DMSO) içeren süpernatant kısım dikkatlice uzaklaştırıldı, pelletin üzerine 1-2 ml medyum ilavesi yapıldı ve santrifüj işlemi üç kez tekrarlandı. Ardından 25 cm²'lik hücre kültür flaskına 5 ml medyum eklendi. Santrifüj sonrası tüpteki içeriğin süpernatant kısmı atılıp pellet üzerine 2-3 ml medium ilave edildi. Pipetaj işlemi yapıldı ve flaska hücre ekimi yapıldı. Hücre ekimi yapılan flasklar 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre alınmıştır. Hücrelerin yapışması ve diğer özellikleri invert mikroskop altında belirli sürelerde kontrol edildi.

3.2.3. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması

Hücreler yaklaşık %85 doygunluğa (confluent) ulaşmış flaskın yüzeyini tamamen kaplayınca pasajlandı ve tekrar inkübasyonu sağlandı. Bu işlem sırasında flaskların içerisindeki besiyeri ve ölü hücreler mikropipet yardımıyla alınıp ortamdaki uzaklaştırıldı ve flask 4 ml kadar PBS ile yıkandı. Yüzeye tutunmuş hücrelerin yüzeyden kaldırılması amacıyla flaska 3 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde bekletildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı invert mikroskopta kontrol edildikten sonra tripsin etkinliğini sonlandırmak amacıyla flask içerisine 2 ml kadar medium eklendi. Ardından flastaki içerik santrifüj işlemi gerçekleştirmek üzere 15 ml'lik tüplere aktarıldı. Süspansiyon 1000 rpm 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler taze hazırlanmış oda sıcaklığındaki medyum ile süspanse edilip 75 cm²'lik flastlara bölünerek yeniden pasajlandı. Hücreler konfluent hale geldiğinde pasaj işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.4. Hücrelerin Sayımı

A549 insan adenokarsinoma hücrelerinin pasajlanma sonrası canlılık ve sayılarının belirlenmesi Tripan mavisi ile hemositometrik yöntemle gerçekleştirildi. Bu yöntem ölü hücrelerin membran bütünlüğünün bozulması nedeniyle boyanması, canlı hücrelerin ise boyayı bünyelerine almaması prensibine dayanmaktadır. Pasaj işlemi sırasında hücreler flask yüzeyinden tripsin ile kaldırılıp santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra pelletteki yaklaşık 100 µl hücre süspansiyonu, 100 µl Tripan Mavisi eklenerek karıştırıldı. Sayım işlemini gerçekleştirmek üzere karışım Neubauer hücre sayım lamına mikropipet ile eklendi. Lam üzerinde bulunan 9 büyük kareden 5'i sayılarak ortalama canlı hücre sayısı belirlendi.:

$$\text{Toplam Hücre Sayısı/ ml} = \text{Toplam hücre sayısı} / 5 \times 2 \times 10^4$$

3.2.5. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler gerekli duyulduğu takdirde tekrardan kullanılmak üzere dondurulmuştur. İnkübe edilen flastaki hücreler invert mikroskopta kontrol edildi ve besiyeri

uzaklaştırıldı. Flask tüm yüzeyi kaplayacak şekilde PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Flaska 37°C'lik tripsin eklendi ve etüvde 5 dakika bekletilerek hücrelerin kalkması sağlandı. Hücrelerin kalktığı invert mikroskop altında kontrol edildikten sonra 15ml'lik santrifüj tüpüne hücre-tripsin karışımı eklendi. Tüpteki hücreler 1250 rpm bir buçuk dakika santrifüj edildi. Santrifüj devam ederken yeni bir 15 ml'lik santrifüj tüpünde %5 DMSO ve besiyeri içeren ortam hazırlandı. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. DMSO içeren besiyeri ile hücre pelleti çözündürülüp pipetajla nazikçe karıştırılmıştır. Santrifüj tüpündeki %5 DMSO'lu medyum ile çözündürülen hücreler kriyojenik tüplere paylaştırıldı ve tüpler -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.6. Hücrelerin Çözdürülmesi

Hücrelerin ürün bilgi reçetesine uygun olarak hücre çözme protokolü uygulandı. -80°C'de muhafaza edilen A549 hücreleri açılmadan önce sıcak su banyosunun sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı. Kriyotüpler 37°C'de dengelenmiş olan su banyosunda yaklaşık 3 dakika bekletildi ve üzerine 1 ml taze besiyeri eklendi. Hücreleri kriyoprotektan olarak kullandığımız DMSO solüsyonundan arındırmaktan için santrifüj tüplerinde 5 dakika 1000 rpm santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atıldı ve pellet 5 ml taze besiyeri ile karıştırılarak 25 cm²'lik steril hücre kültür flasklarına alındı. Hazırlanan flask, 37 °C'de, %5 CO₂'lik inkübatöre alındı.

3.2.7. Glaucocalyxin A'ya ait IC₅₀ Dozlarının Belirlenmesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi hücre canlılığını ve proliferasyonun belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Dalga boylarının ölçüldüğü kolorimetrik bu testte hücresel metabolik aktivite tayin edilir. Sarı renkli MTT tuzlarının, canlı hücrelerin NADPH bağımlı oksidoredüktazları vasıtasıyla mor renkli formazan kristallerine indirgenme miktarı spektrofotometre ile analiz edilir. Deneyde

MTT çözücüsü olarak DMSO ve asit alkol gibi maddeler kullanılır. Bu yöntem kullanılarak etken maddelerin uygulama süreleri ve dozlarına bağlı olarak gözlenen antiproliferatif ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi ve bu etkilerin izlendiği optimum düzeyde konsantrasyon değerinin (IC50 değerlerinin) belirlenmesi amaçlanmaktadır.

3.2.7.1. MTT Solüsyonunun Hazırlanması

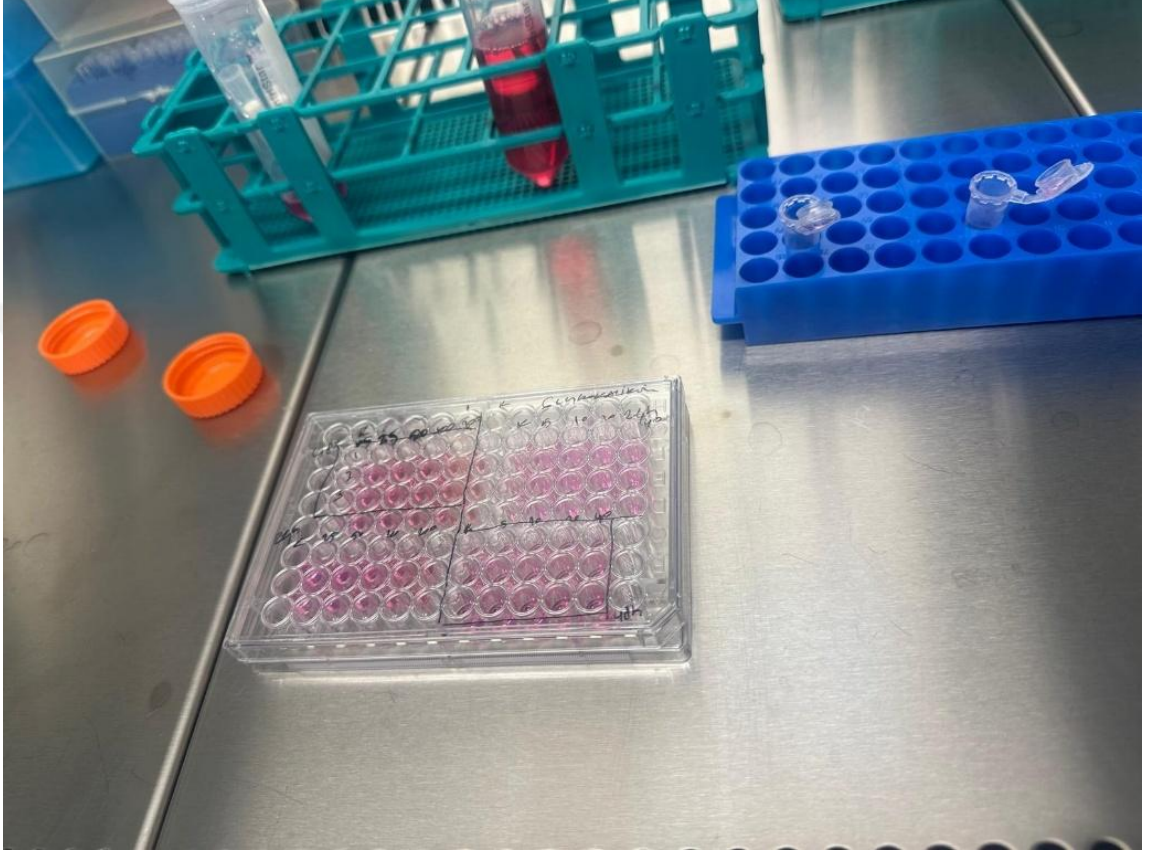
Toz halindeki 5 mg MTT, 1 ml distile suda çözündürüldü. Böylece stok solüsyon hazırlanmış oldu. Stok solüsyon, falcon tüpünde on kat distile su ile sulandırıldı. MTT solüsyonunu direkt ışık maruziyetinden korumak için tüp alüminyum folyo ile sarıldı.

3.2.7.2. MTT Analizinin Yapılması

Glaucocalyxin A'nın A549 hücre hattındaki sitotoksik etkileri MTT deneyi ile analiz edilmiştir. Glaucocalyxin A'nın çalışmada kullanılacak doz miktarı aralığının belirlenmesi için literatür taraması yapıldı. 5 mg Glaucocalyxin A, moleküler ağırlığı göz önünde bulundurularak yapılan hesaplamalara göre final konsantrasyonu 4000 μ M olacak şekilde 3,75 ml DMSO'da çözündürüldü. 96 kuyucuklu kültür plağına her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde A549 hücreleri ekildi. (Şekil 3.1)

Kültür plağı 37°C ve %5'lik CO₂ içeren inkübatörde 24 saat bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışması sağlandı. Ardından hücreler Glaucocalyxin A'nın artan konsantrasyonlarına (0, 5, 10, 20, 40 μ M) 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldı. Her kuyucuğun içindeki 100 μ l medyum ve hücre karışımı üzerine, 10 μ l hazırlanan MTT solüsyonu eklendi ve hücreler dört saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki medyum mikropipet yardımıyla alındı, 100 μ l MTT çözücü solüsyonu (DMSO) ilave edildi ve hücreler 20 dk daha inkübatörde bekletildi. İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikropalak okuyucu spektrofotometre (Thermo, MULTISKAN SkyHigh) cihazında absorbans yoğunluğu 570 nm olan dalga boyunda ölçüm yapılarak hücrelerin

proliferasyon aktiviteleri belirlendi. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı. Kontrol grubunda canlılık %100 olarak referans alınarak tüm gruptaki hücre canlılık oranları hesaplandı.

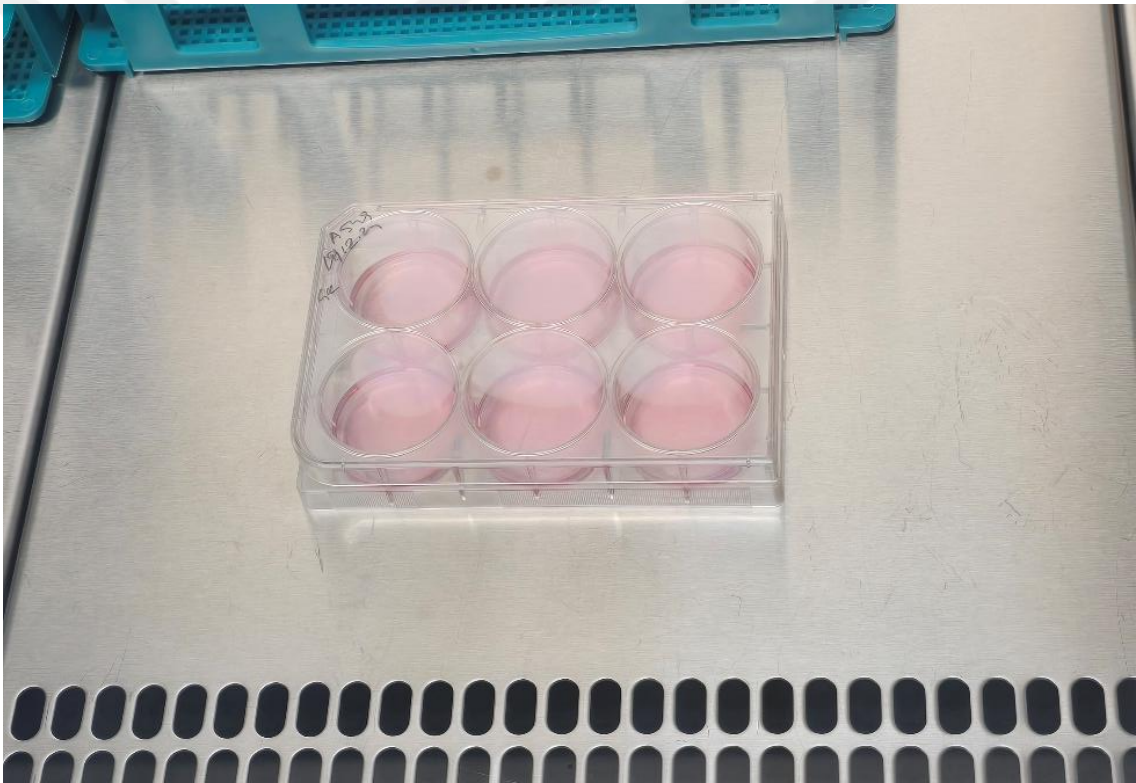


Şekil 1.1: MTT analizi için 96 kuyucuklu plateye hücre ekimi uygulaması

Yapılan MTT analizi sonucunda Glaucocalyxin A'nın inhibe edici dozu (IC₅₀) belirlenip Tablo 3.3' teki gruplar oluşturulmuştur.

Tablo 3.3: Deney grupları

GRUP I	Kontrol grubu
GRUP II	Glaucocalyxin A (10 μ M, 48 saat)
GRUP III	TGF- β 1 (5 ng/ml, 48 saat)
GRUP IV	TGF- β 1(5 ng/ml, 48 saat) + Glaucocalyxin A (10 μ M, 48 saat)



Şekil 3.2: Hücrelerin ekim yapıldığı ve deney gruplarının oluşturulduğu 6 kuyucuklu kültür plate

3.2.8. Yara Yeri Oluşturma Deneyi

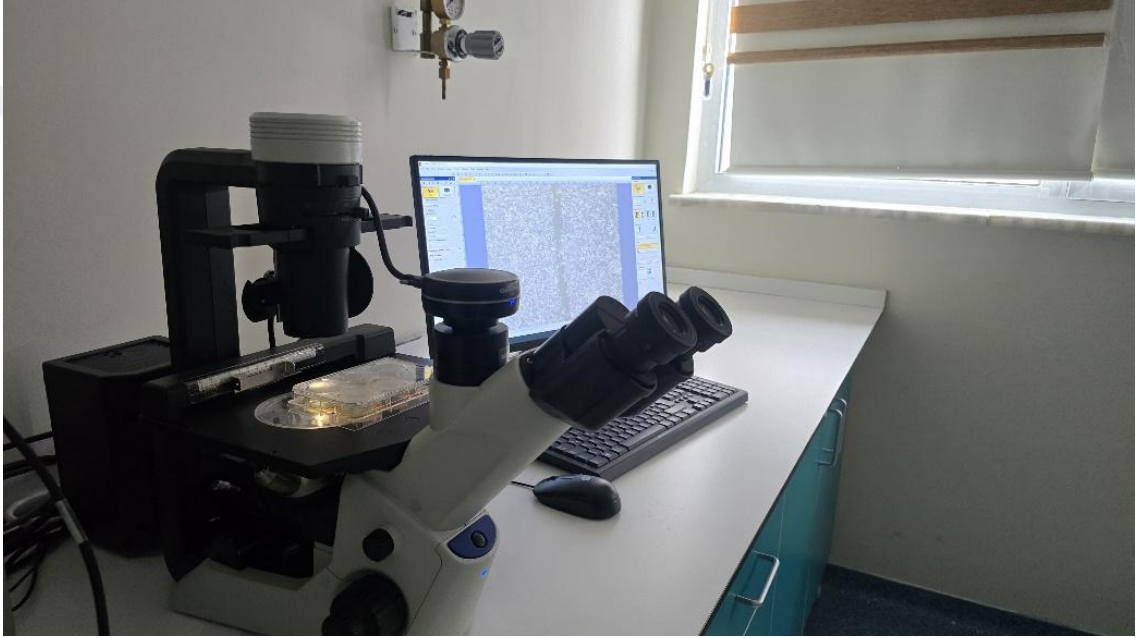
Yara yeri iyileşme deneyi, hücrelerin migrasyonunu saptamak amacıyla yapılır. Çalışmamızda yara iyileşme deneyi, TGF β ve Glaucocalyxin A maddelerinin etkilerini

incelemek amacıyla tekli ve kombine şekillerde A549 hücre hattında uygulandı. A549 hücreleri her platede 10×10^5 hücre olmak üzere 6 kuyucuklu plateye 4 grup olacak şekilde ekildi. (Şekil 3.2) Plate zeminine tutunmaları için hücreler 24 saat inkübe edildi. Hücreler yaklaşık %95 konfluent olduğunda platelerdeki medyum uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Hücrelerin migrasyonunu ve boşluğu kapatmasını gözlemlemek amacıyla 1000 μL 'lik steril mikropipet ucu yardımıyla petrinin bir ucundan sonuna kadar düz bir çizik atıldı. (Şekil 3.3) Ardından hücreler üç kez PBS ile yıkanarak petride tutunmayan hücre debrisleri uzaklaştırıldı.



Şekil 3.3: 1000 μL 'lik mikropipet ucu kullanılarak yara yeri deneyi oluşturulması

Daha sonra kuyucuklara taze besiyeri eklendi. Kontrol grubuna uygulama yapılmadı. TGF β grubuna 5 ng/ml TGF β 1 uygulandı. GLA grubuna hesaplanan IC50 dozunda Glaucocalyxin A uygulandı. TGF β + GLA grubuna ise 5 ng/ml TGF β ve Glaucocalyxin A ilave edildi. İnvert mikroskop ile hücrelerin çizik atılan boşluğu doldurma kapasiteleri 0. saat, 24. saat, 48. saat ve 72. saat olacak şekilde fotoğraflandı ve kaydedildi. (Şekil 3.4)



Şekil 3.4: Hücrelerin invert mikroskop altında incelenmesi

3.2.9. İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama

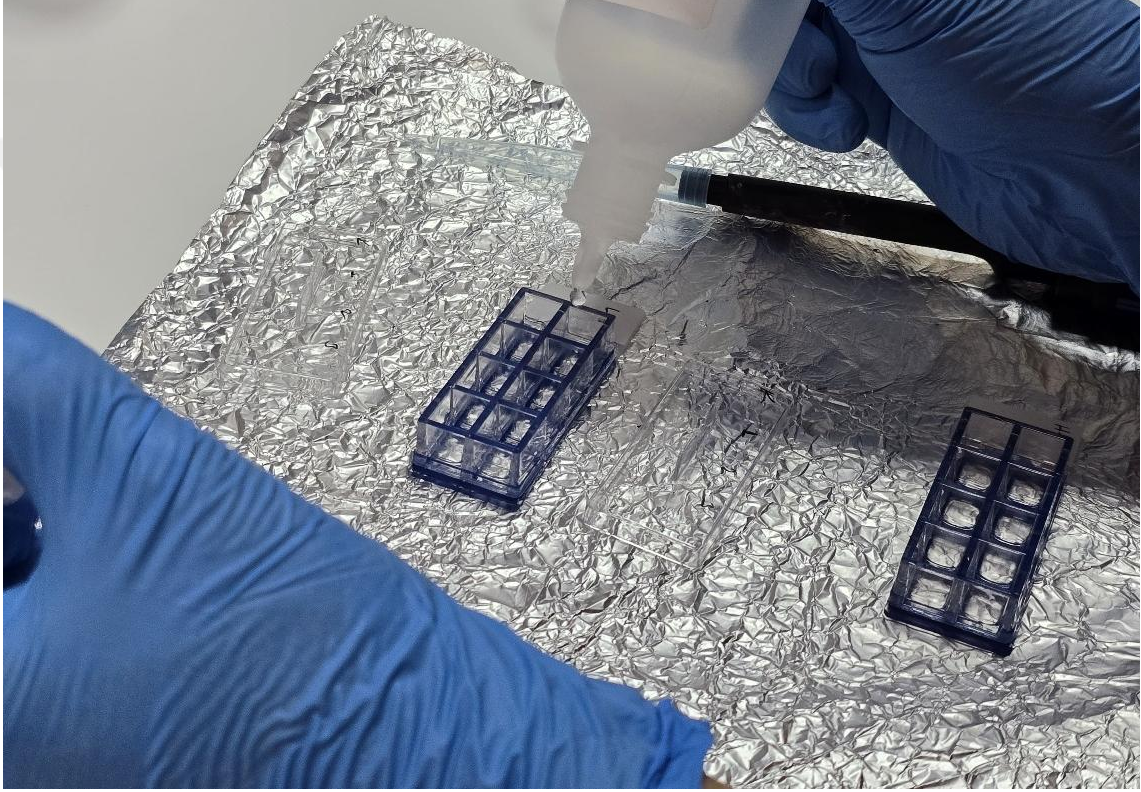
İndirekt immünohistokimyasal boyama ile E-cadherin, N-cadherin, vimentin, p-SMAD 2/3 ve NLRP3 proteinlerinin hücre içindeki dağılımları belirlendi. 8 gözlü hücre kültürü lamına her gözde 5×10^4 hücre ekimi yapıldı. (Şekil 3.5) Hücreler 37°C ve %5'lik CO₂ içeren inkübatörde 24 saat kültüre edildi. İnkübasyon işleminden sonra kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırıldı. Deney gruplarına 5 ng/ml TGF β ve Glaucocalyxin A ile hazırlanmış taze besiyerleri eklendi. Kontrol gruplarına ise Glaucocalyxin A ve TGF- β içermeyen besiyeri eklendi.



Şekil 3.5: Şekil: İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama için kullanılan 8 gözlü hücre kültürü lamı

Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve 5 dk PBS ile yıkandı. Hücrelerin fiksasyonu için kuyucuklara %4'lük paraformaldehit (PFA) eklendi ve lam 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 3 kez 5'er dakika yıkama işlemi sonrasında lam 5 dk oda sıcaklığında %3'lük H_2O_2 ile muamele edildi. Yıkama işleminin ardından 15 dakika %0,1'lik Triton X-100 uygulaması yapıldı. PBS ile yıkama işleminin ardından kuyucuklara blok solüsyonu eklenerek 1 saat bekletildi. Blok solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara E-cadherin (Affinity Bioscience AF0131 -100 ul), N-cadherin (Affinity Bioscience AF5239-100 ul), vimentin (Affinity Bioscience AF7013 -100 ul), p-SMAD 2/3 (ABclonal-AP0548) ve NLRP3 primer antikoru (Affinity Bioscience DF7438 100 ul) eklenerek $4^{\circ}C$ 'de 1 gece bekletilerek inkübasyonu sağlandı. Ertesi gün örnekler için yıkama işlemi yapıldı ve primer antikora uygun mouse spesifik biotin sekonder antikoru (Abcam Rabbit specific HRP/AEC IHC Detection Kit) eklenerek 30 dk bekletildi. Ardından Goat Rabbit HRP Streptavidin antikoru eklenerek 30 dk bekletildi. (Şekil 3.6) PBS ile 3 defa 5 dk yıkama yapıldı ve AEC kromojeni eklenerek

yaklaşık 2 dk beklenildi. Boyama işlemi sonrasında kuyucuklar 2 defa 5'er dakika distile su ile muamele edildi. Harris hematoksilen boyasıyla 3 dk boyama yapıldı ve PBS ile yıkama işlemi uygulandı. 8 kuyucuklu kültür lamını üzerinde yer alan kuyucuklu aparat çıkarıldı. Hücre kültür lamı kapatma medyumunu ile kapatıldı ve ışık mikroskobu altında incelendi.



Şekil 3.6: İmmünohistokimyasal boyama deneyi yapılırken

3.2.9.1. İndirekt İmmünohistokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi

Deney gruplarındaki hücrelerin immunreaktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla iki histolog tarafından ışık mikroskobu gözlemi yapıldı.

Görüntülerin skorlanması ve değerlendirmesi için görüntü işleme ve analiz yazılımı olan ImageJ yazılımı kullanıldı ve x20'lik büyütmede 5 farklı alan belirlendi. AEC pozitif boyanma, kırmızı renkli hücrelerin görünümü ile teyit edildi. Her alanda 100 hücre sayıldı ve boyanmamış olarak kabul edilen hücreler 0, az boyanmış hücreler 1, orta

düzeyde boyanmış hücreler 2 ve çok boyanmış hücreler 3 olacak şekilde değerlendirilerek H-skor yapıldı.

$$\text{H-skor} = \sum(I+1) \times \text{Boyanma \% 'si (I=Hücrelerin boyanma oranı)}$$

3.2.10. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi (qRT-PCR)

3.2.10.1. qRT-PCR İçin Deney Grupları Oluşturulması ve Hücrelerin Kültür Ortamından Toplanması

Çalışmamızda incelemek istediğimiz proteinlerin gen düzeyinde değişimlerini tespit edebilmek için qRT-PCR tekniği kullanıldı. RiboEx™ Total RNA İzolasyon Kiti ve trizol kullanılarak A549 hücrelerinde RNA izolasyonu yapıldı. RNA'lar kit prosedürüne uygun şekilde izole edildi. 75 cm² 'lik flasklara kontrol grubu, Glaucoalyxin A grubu, TGF-β grubu, ve TGF-β + Glaucoalyxin A grubunu oluşturmak için A549 hücre ekimleri yapıldı. Flasklarda yer alan hücrelerin zemine tutunup tutunmadıkları invert mikroskop altında kontrol edildi. Kontrol grubu olan Grup 1'e herhangi bir etken madde uygulanmadı. Grup 2 Glaucoalyxin A (10 µM), Grup 3 TGF-β (5 ng/ml), Grup 4 ise TGF-β (5 ng/ml) ve Glaucoalyxin A (10 µM) ile muameleye tabi tutulmuştur. Flasklar 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra invert mikroskop altında kontrol edildi. İnkübasyon süresi tamamlanan flasklar kabin içerisine alındı ve ilaç-besiyeri karışımı ilave edildi. Ardından hücreler PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak üzere flasklara 37°C'lik tripsin solüsyonu eklendi ve hücreler etüvde bekletildi. Mikroskop bakışıyla hücrelerin kalktığına kanaat getirildikten sonra flasktaki hücreler serolojik pipetle alınıp 15 ml'lik Falcon tüplere konuldu. Daha sonra RNA izolasyon kitinin prosedürü uygulanarak RNA'lar elde edildi.

3.2.10.2. RNA İzolasyonu

Hücrelerin yer aldığı Falcon tüplerinin üzerine mikropipet yardımıyla 1'er ml RiboEx eklendi. Hücre pelleti ve RiboEx karışımı pipetaj işlemiyle parçalanarak homojenize edildi. Meydana gelen homojenat 2 ml'lik Eppendorf tüplerine alındı ve beş dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından faz ayrımının gerçekleşmesi için her tüpe 200 µl kloroform ilave edildi. Tüp 10-15 saniye vorteks yardımıyla çalkalandı ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Elde edilen karışım 4°C'de 12000 g'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Böylelikle karışım alt tabaka, ara tabaka ve üstte renksiz sulu tabaka olmak üzere 3 katmana ayrıştı. Üstteki sulu ve renksiz tabaka yeni bir tüpe aktarıldı. Her çözeltiye 500 µl izopropil alkol eklendi ve tüpler birkaç defa ters çevrilerek hafifçe karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra 4°C'de 10 dakika boyunca 12000 g'de santrifüjlendi. Süpernatant kısım pelletten dikkatlice uzaklaştırıldı. RNA pelletine %75'lik etanolden 1 ml ilave edildi ve 4°C'de 5 dakika 7500 g santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatant ve etanol pelletten uzaklaştırıldı ve artakalan etanolün de uçması için tüplerin ağzı açık bırakılarak pellet 5 dk oda sıcaklığında kurutuldu. RNA peleti 35 µL RNaz içermeyen su ile çözdürüldü ve hücreler 56°C'de 15 dakika inkübasyona alındı. İzolasyon işleminden sonra RNA konsantrasyonları Thermo MULTISKAN SkyHigh cihazı ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Yapılan işlemler neticesinde izole edilen RNA'lardan cDNA sentez aşamasına geçildi.

3.2.10.3. cDNA Sentezi

FireScript cDNA Synthesis Kit kullanılarak protokolüne uygun şekilde RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kit içerisindeki kimyasallardan hazırlanan bir reaksiyonluk karışım için gerekli malzemeler ve kullanılan miktarları ile siklus protokolü sırasıyla Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4: cDNA Sentezi Reaksiyonu İçin Gerekli Malzemeler

Malzeme	Miktar	Final Konsantrasyon
Oligo (dT) primers (100uM)/ Random primers (100uM)/ Gene specific primers	1 µl	5 µM 5 µM 0.1-1 µM ²
dNTP MIX (20 mM each)	0.5 µl	500 µM
10x RT Reaction Buffer with DTT	2 µl	1x
FIREScript® Reverse Transcriptase (200 U/ul)	1 µl	10 U/µl
RiboGrip® RNase Inhibitor (220 U/ul) ³	0.1 µl	1.1 U/µl
Template RNA	0.1-5 µg	Variable
Nuclease-free water	up to 20 µl	
Toplam	20 µl	

Tablo 3.5: cDNA Siklus Protokolü

Adım	Sıcaklık Derecesi	Zaman
Primer Extension	25°C	5-10 min
Reverse Transcription	50°C	5 min
Enzyme İnactivation	85°C	5 min

Reaktifler oda sıcaklığında çözdürüldü ve her bir reaktif hafifçe vortekslenerek karıştırıldı. Her bir reaksiyonda toplamda 1'er µg RNA kullanıldı. Tablo 3.4'te yer alan reaksiyon bileşenleri ürünün bilgi reçetesine uygun oranda karıştırıldı. Meydana gelen reaksiyon karışımı Tablo 3.5'te yer alan protokole uygun olacak şekilde Thermo Fisher

MiniAmp Plus Thermal Cycler cihazında inkübe edildi. Sentezlenen cDNA'lar gen ekspresyonu analizlerinde kullanılmak üzere -20°C dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.10.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Analizi

A549 hücrelerinin deney gruplarında E-cadherin, N-cadherin, vimentin, SMAD 2, SMAD 3 ve NLRP3 genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonlarında oluşan değişimleri araştırmak için kullanılan primer baz dizileri Tablo 3.6'te yer almaktadır. Housekeeping primeri olarak GAPDH kullanılmıştır.

Tablo 3.6: Primer baz dizileri

Genlerin Primer Kodları	Baz Dizileri (5'→3')
GAPDH	F: CTGGGCTACACTGAGCACC R: AGTGGTCGTTGAGGGCAATG
E-Cadherin	F: TTCAATCCCACCACGTACAAG R: GCTGTTTTCAAATGCCATCGT
N-Cadherin	F: GAGTTTACTGCCATGACGTTTT R: CAGCAACAGTAAGGACAAACAT
Vimentin	F: AGTCCACTGAGTACCGGAGAC R: CATTTACGCATCTGGCGTTC
SMAD-2	F: ACCAGTTTTGCCTCCAGTATTA R: TCAACTGTTGGTCACTTGTTTC
SMAD-3	F: CCCAGAGCAATATTCCAGAGAC R: GCAGGTCCAAGTTATTATGTGC
NLRP-3	F: CCACAAGATCGTGAGAAAACCC R: CGGTCCTATGTGCTCGTCA

Çalışmada Tablo 3.7'de yer alan HOT FIRE Pol® Solis BIODYNE qPCR Mix kullanılmış olup bileşenler ürününün kullanım yönergesi takip edilecek şekilde bir PCR

tüpünde birleştirilmiştir. Her reaksiyonda toplam hacim 20 µL olacak şekilde reaksiyon başına 2’şer µL cDNA, 10’ar µL qPCR Supermix ve 0.5’er µL forward ve reverse primerler ilave edilmiş oldu. Meydana gelen karışım Tablo 3.8’de yer alan termal siklus şartları altında Rotor Gene Q (QIAGEN) pcr cihazında inkübe edildi.

Tablo 3.7: qPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı

Kullanılan Madde	Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
HOT FIREPol SolisGreen qPCR Mix(5x)	4	1x
Forward Primer (10 µM)	0.16-0.5 µl	80-250nM
Reverse Primer (10 µM)	0.16-0.5 µl	80-250nM
DNA template	variable	variable
H2O PCR grade	Up to 20µl	
Total	20µl	

Tablo 3.8: Real Time PCR cihaz protokolü

Siklus Adımı	Sıcaklık (°C)	Zaman	Siklus
İlk aktivasyon	95°C	10 min	1
Denaturasyon	95°C	10 second	40
Primerlerin Bağlanması ve Zincirin Uzaması	60°C -65°C	20 second	
Ekstensiyon	72°C	20 second	

Amplifikasyon işleminin sonunda gen ekspresyonlarında oluşan değişiklikleri belirlemek amacıyla relatif kantitasyon analizleri Rotor Gene Q (QIAGEN) PCR cihazı ile, cihazda daha önce optimizasyonu yapılmış programa uygun olacak şekilde gerçekleştirildi. Erime eğrisi analizi yapılarak amplifikasyonunun özgünlüğü kontrol

edildi. Gen ifadesi düzeyleri housekeeping genlerine göre optimize edildi. Elde edilen veriler göreceli ekspresyon ΔCt yöntemi kullanılarak hesaplandı.

3.2.11. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows, Release ver. 29.0) paket programından yararlanılmıştır. İlk aşamada yara iyileşme deneyi bulguları ortalama ve standart sapma tablosu ile incelenerek sütun grafiği ile görselleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelenmiş ve p değerlerinin 0,05 üzerinde çıkmasıyla normal dağılım varsayımının sağlandığı ispatlanmıştır. Bu bağlamda deney sonuçlarının sayısal değerlerin farklılaşması Anova testi ile araştırılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için pcr ve yara yeri deneyinde post-hoc testlerden Tukey testi, immünohistokimyasal boyama deneyi için LSD testleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakılarak hangi gruplar arasında fark olduğu incelenmiştir. Tüm analizler, istatistiksel yazılım kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. GLA Doz Belirleme Deneyi Bulguları

4.1.1. MTT Analizi ve GLA'nın IC50 Değerinin Hesaplanması

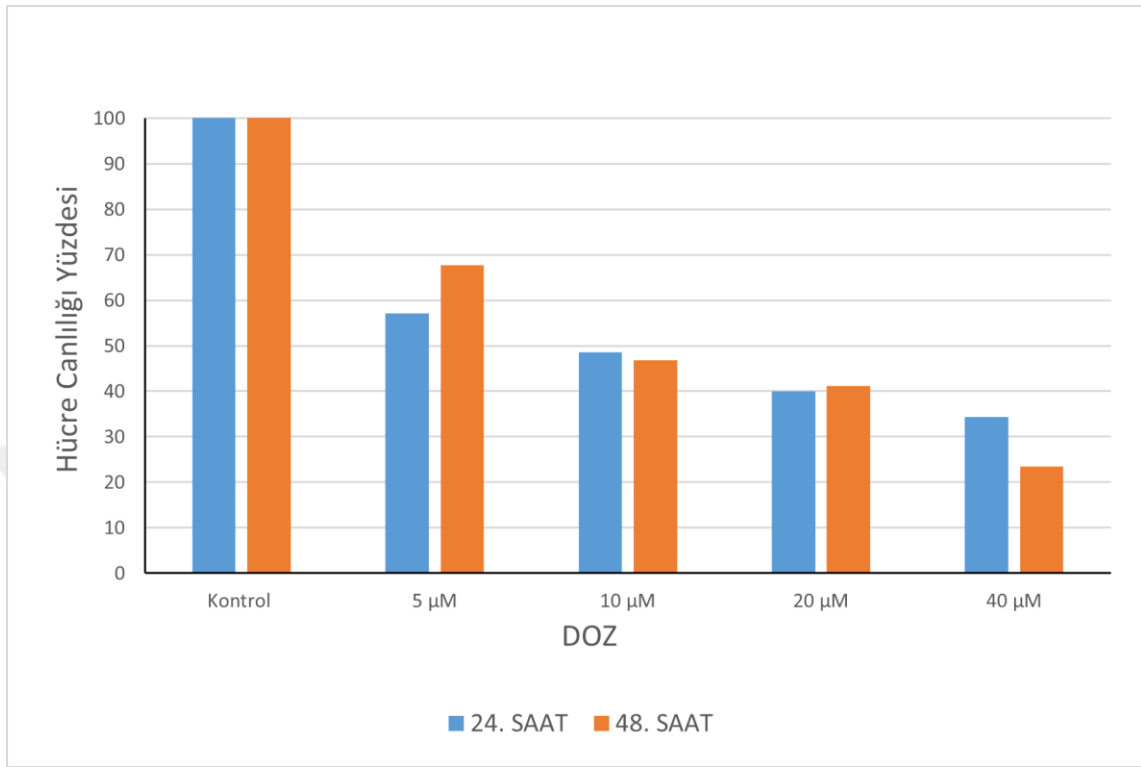
Glaucocalyxin A'nın A549 hücre hattındaki sitotoksik etkileri MTT deneyi ile analiz edilmiştir. A549 hücreleri 96 kuyucuklu plateye ekildi ve artan konsantrasyonlarda Glaucocalyxin A (0, 5, 10, 20, 40 μ M) kuyucuklara ilave edildi. Deney üç tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Hücreler 24 saatlik ve 48 saatlik olacak şekilde inkübe edildi. Spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda yapılan değerlendirme neticesinde elde edilen veriler hesaplandı. Kontrol grubunda canlılık %100 olarak referans alınarak tüm gruplardaki hücre canlılık oranları hesaplandı. İncelenen sonuçlar neticesinde Glaucocalyxin A'nın inhibe edici konsantrasyon (IC 50) değeri 10 μ M olarak belirlendi.

Tablo 4.1: Gruplar Arasında MTT Değerlendirme Sürecinin Karşılaştırması

MTT Analizi	$\bar{x}$	sd	p
Kontrol	100	0	<0,0001*
5 μ M	62,39	6,025	
10 μ M	47,67	2,486	
20 μ M	40,09	1,85	
40 μ M	28,41	5,635	

Anova Analizi * $p < 0,05$

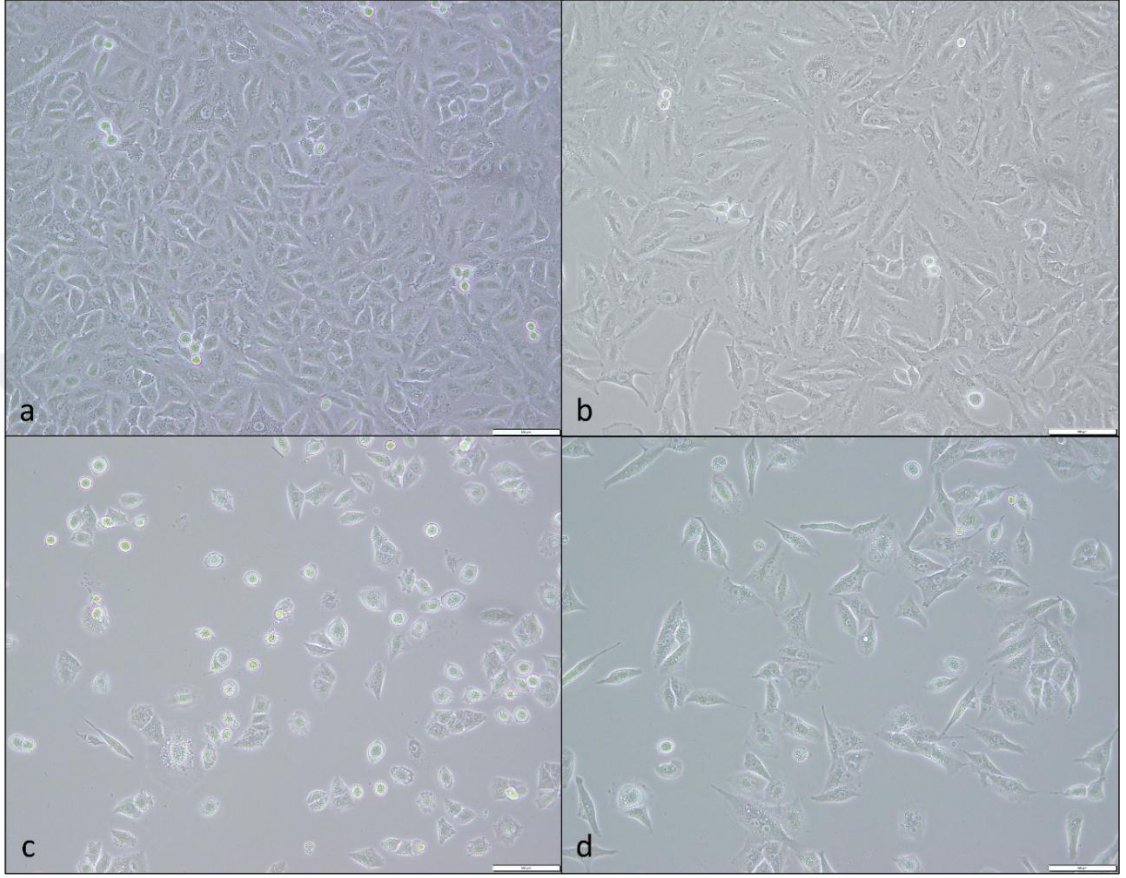
MTT değerlendirme sürecine ilişkin yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir ($p < 0,0001$). (Tablo 4.1) Bu durum, uygulanan farklı konsantrasyonlar arasında hücre canlılığı açısından önemli bir fark olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.1: Deney gruplarında zaman içerisinde MTT sonuçları değişimi

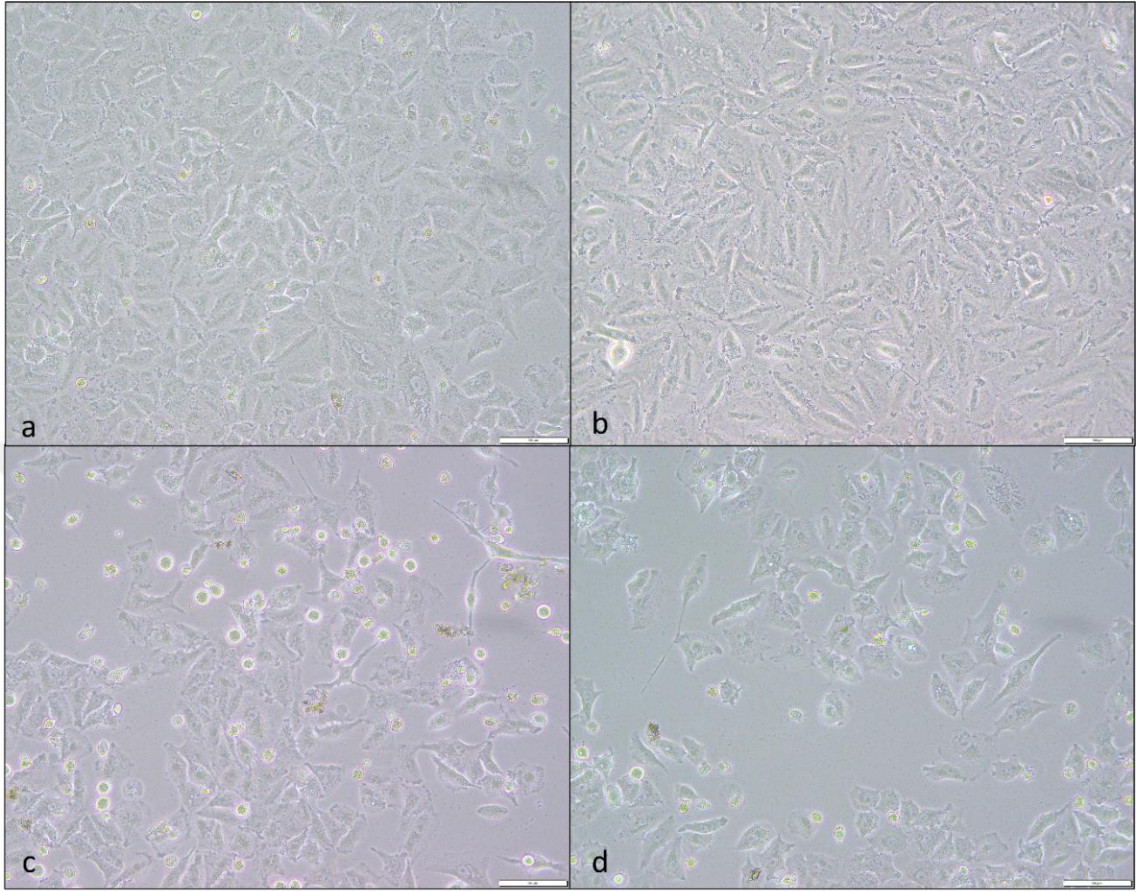
Grafikte deney gruplarında zaman içerisinde MTT sonuçlarının değişimi gösterilmektedir (Şekil 4.1). Kontrol grubunda hücre canlılığı 24. ve 48. saatlerde 100 olarak belirlenmiştir. 5 µM konsantrasyonunda uygulanan grupta hücre canlılık oranı GLA uygulanan diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak yüksek ölçülmüştür ($p < 0,0001$). 10 µM, 20 µM ve 40 µM konsantrasyonlarında ise hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlemlenmiş, bu etki kontrol grubuna kıyasla özellikle 40 µM grubunda en düşük seviyeye düşmüştür ($p < 0,0001$). 24. saatte ve 48. saatte IC50 değerine en yakın değer 10 µM GLA dozunda belirlenmiştir.

4.1.2. Hücre Morfolojisinin İverted Mikroskop Altında İncelenmesi



Şekil 4.2: Deney gruplarının 24. saatteki morfolojisi (x20 büyütme)

(a: Kontrol, b: TGF- β , c: GLA, d: TGF- β +GLA)



Şekil 4.3: Deney gruplarının 48. saatteki morfolojisi (x20 büyütme)

(a: Kontrol, b: TGF- β , c: GLA, d: TGF- β +GLA)

Kontrol grubunda hücreler poligonal şekilde olup hücrelerde bol miktarda sitoplazma görüldü (Şekil 4.2a ve Şekil 4.3a). Ayrıca hücrelerin birbirleriyle temas halinde olmasının hücreler arası kuvvetli bağlantı kompleksleri aracılığıyla sağlandığını, böylelikle hücrelerin morfolojisinin epitelyal karakterde olabileceği gözlemlendi.

TGF- β grubundaki hücrelerin sitoplazmalarının daralıp iğsi bir görünüm kazandığı görüldü (Şekil 4.2b ve Şekil 4.3b).

GLA grubundaki hücrelerin önemli miktarda dejenere olduğu ve morfolojilerinde farklılıklar meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2c ve Şekil 4.3c).

TGF- β ve GLA grubunda ise hücre yoğunluğunun azaldığı, ayrıca hücrelerin epitelyal görünümünün büyük ölçüde korunmuş olmakla birlikte az miktarda iğsi formda hücrelerin de bulunduğu görüldü (Şekil 4.2d ve Şekil 4.3d).

4.2. Yara Yeri (Hücre Göçü) Deneyi Bulguları

4.2.1. Gruplar Arasında Yara İyileşme Sürecinin Karşılaştırılması

Tablo 4.2: Gruplar arasında yara iyileşme sürecinin karşılaştırması

	$\bar{x}$ (μm^2)	sd (μm^2)	p
Kontrol	1.816.966	406.646	0,0191*
TGF- β	1.245.076	837.680	
GLA	2.412.322	93.156	
TGF- β +GLA	2.233.670	67.758	

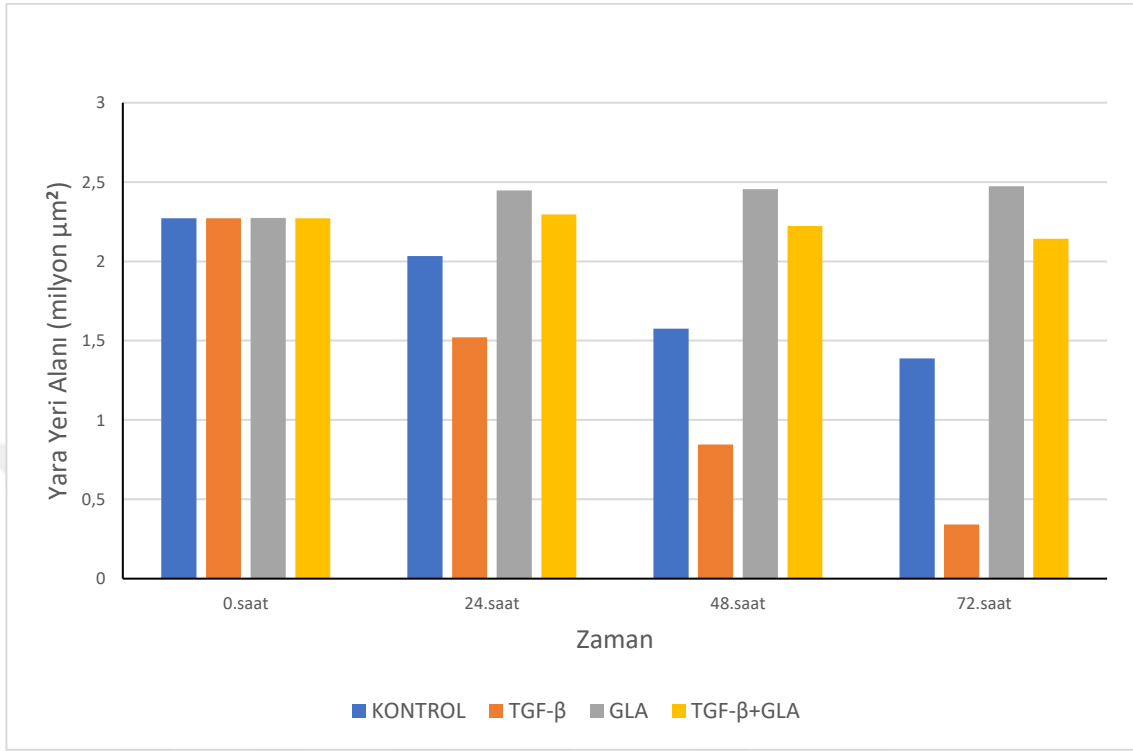
Anova Analizi * $p < 0,05$

Yara iyileşme sürecinin gruplar arasındaki farklılıklarını değerlendirmek amacıyla yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p = 0,0191$). (Tablo 4.2)

Tablo 4.3: Grupların belirli saatlerdeki yara yeri alanının Tukey testi ile çoklu karşılaştırılması

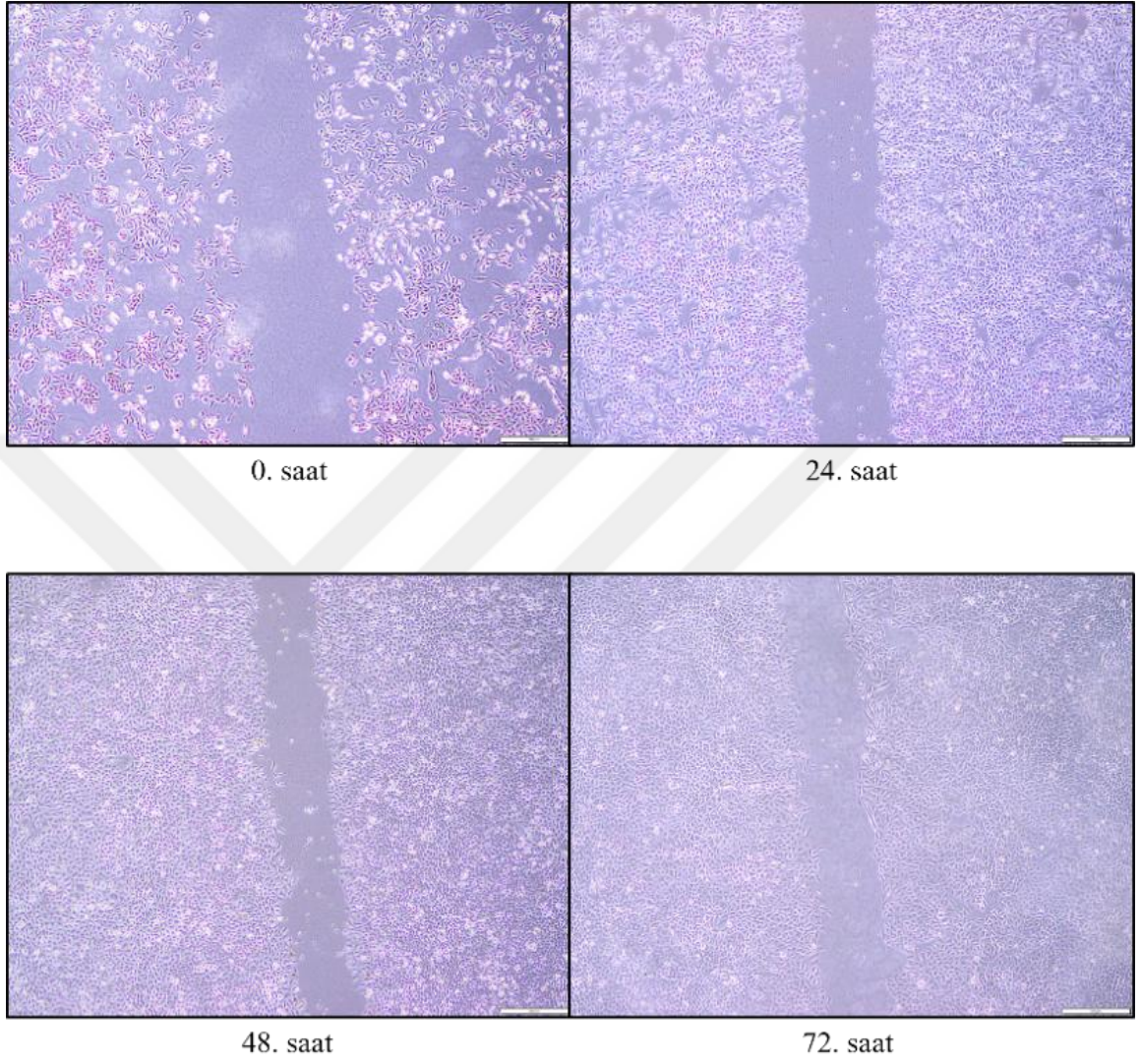
	Karşılaştırılan Gruplar	Mean Difference (Yara yeri alanı) μm^2	p
24. saat	Kontrol - TGF- β	511.855 (↑)	<0,0001*
	Kontrol - GLA	413.703 (↓)	
	Kontrol - TGF- β +GLA	262.237 (↓)	
	TGF- β - GLA	925.559 (↓)	
	TGF- β - TGF- β +GLA	774.092 (↓)	
	GLA - TGF- β +GLA	151.467 (↑)	
48.saat	Kontrol - TGF- β	729.305 (↑)	<0,0001*
	Kontrol - GLA	880.396 (↓)	
	Kontrol - TGF- β +GLA	649.339 (↓)	
	TGF- β - GLA	1.609.701 (↓)	
	TGF- β - TGF- β +GLA	1.378.644 (↓)	
	GLA - TGF- β +GLA	231.057 (↑)	
72.saat	Kontrol - TGF- β	1.046.214 (↑)	<0,0001*
	Kontrol - GLA	1.085.286 (↓)	
	Kontrol - TGF- β +GLA	754.297 (↓)	
	TGF- β - GLA	2.131.500 (↓)	
	TGF- β - TGF- β +GLA	1.800.511 (↓)	
	GLA - TGF- β +GLA	330.989 (↑)	

Tukey Testi ile Çoklu Karşılaştırma Sonuçları * $p<0,05$

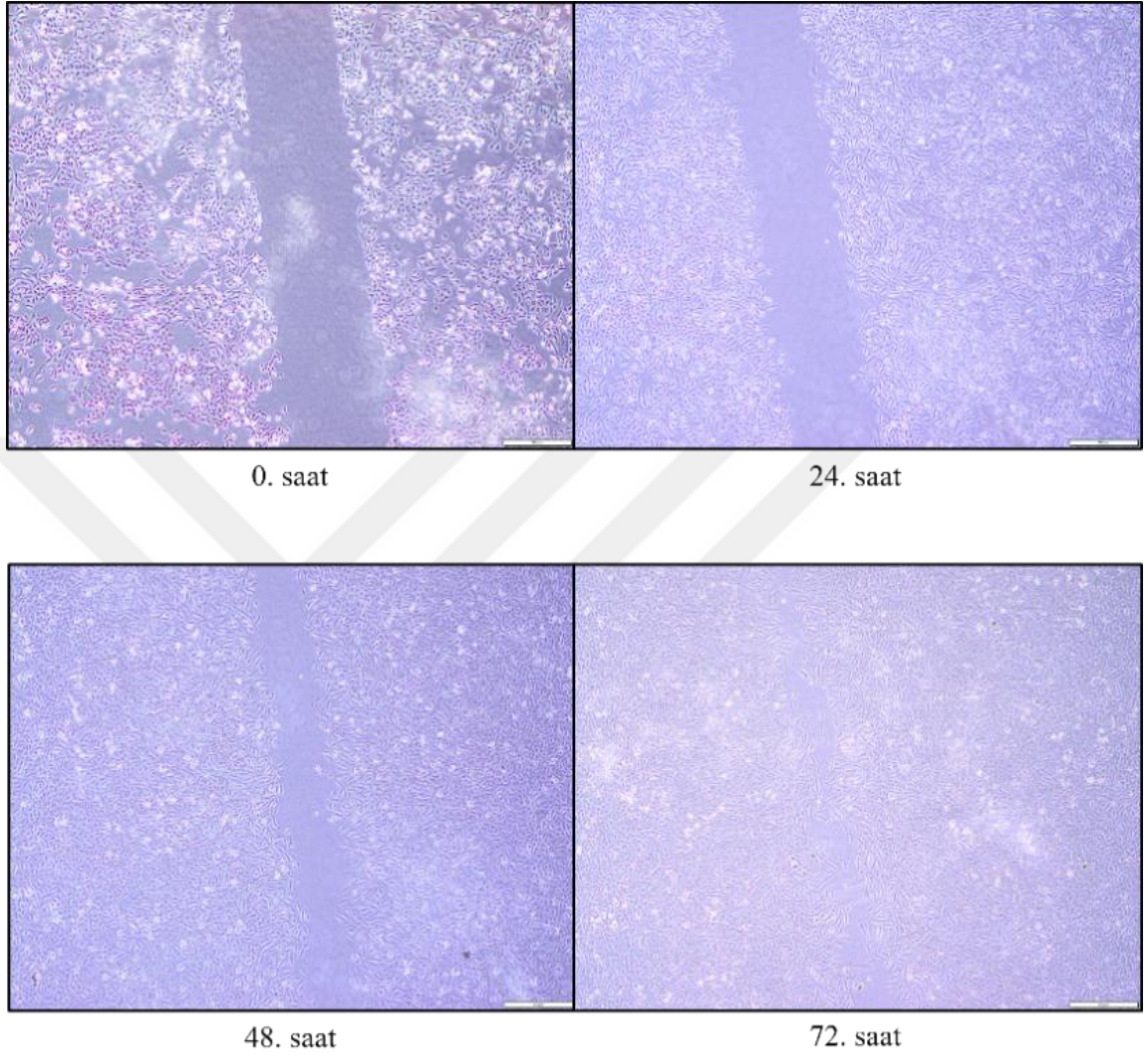


Şekil 4.4: Deney gruplarının zaman içindeki yara yeri alanı değişimi

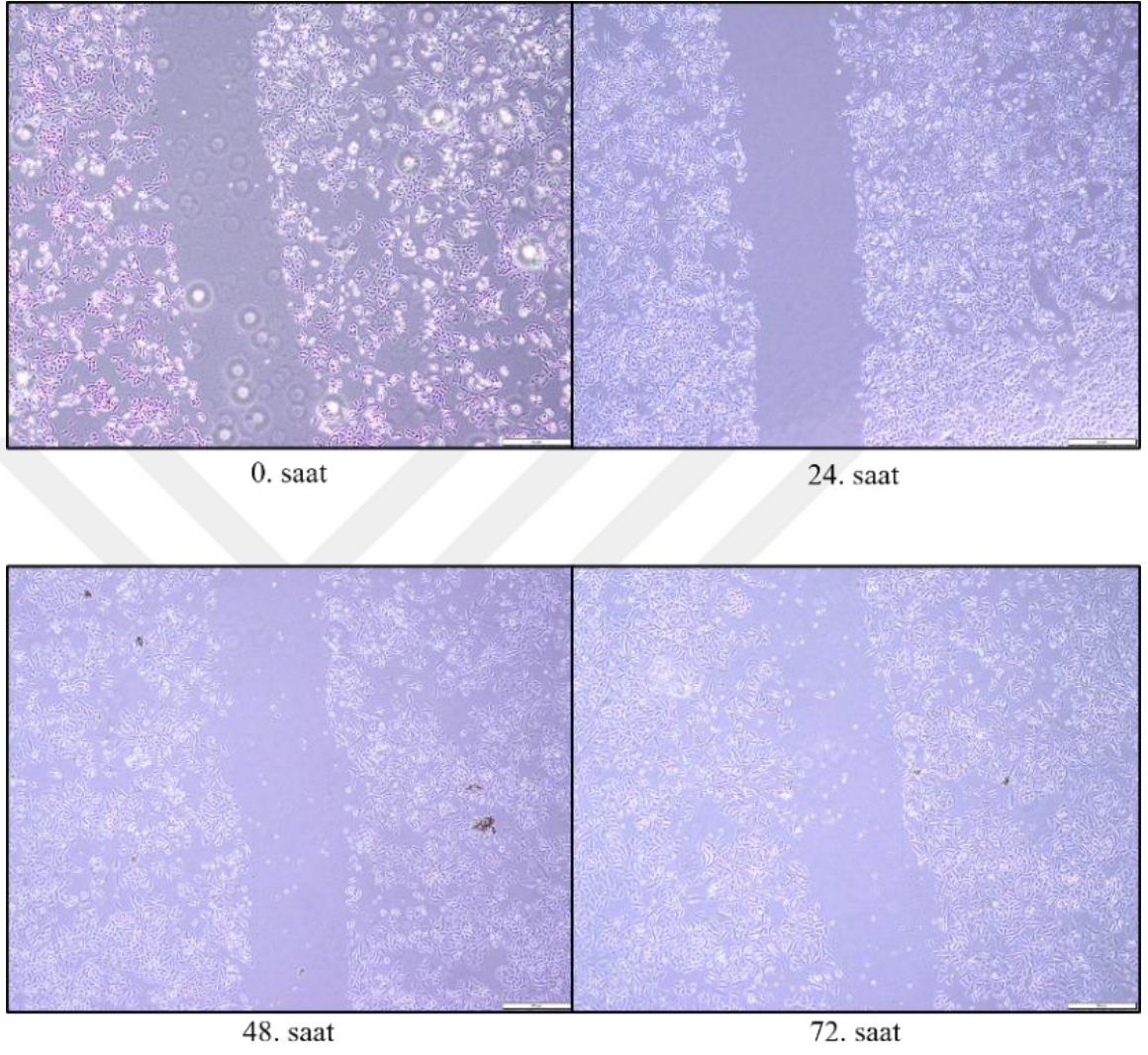
Tablo ve grafikte, deney gruplarının zaman içerisindeki yara yeri alanı değişimi gösterilmektedir (Tablo 4.3, Şekil 4.4). 24. saatte, kontrol grubuna kıyasla TGF-β grubunda yara açıklığının belirgin şekilde kapandığı dikkat çekmektedir ($p < 0,0001$). GLA ve TGF-β + GLA gruplarında ise yara yeri alanının kontrol ve TGF-β gruplarına göre daha yüksek seviyelerde olduğu gözlemlenmektedir ($p < 0,0001$). 72. saatte ise; TGF-β grubunda yara yeri alanı tüm gruplara oranla en düşük seviyede iken ($p < 0,0001$), kontrol grubunda orta düzeyde bir iyileşme görülmektedir. GLA grubu 72. saatte en yüksek yara yeri alanına ulaşmıştır ($p < 0,0001$). TGF-β + GLA grubunda ise 24. saatten sonra yara yeri alanında minimal azalma görülse de 48. ve 72. saatlerdeki yara açıklığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ölçülmüştür ($p < 0,0001$). Grupların zaman içindeki yara yeri alanındaki değişimlerin invert mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.



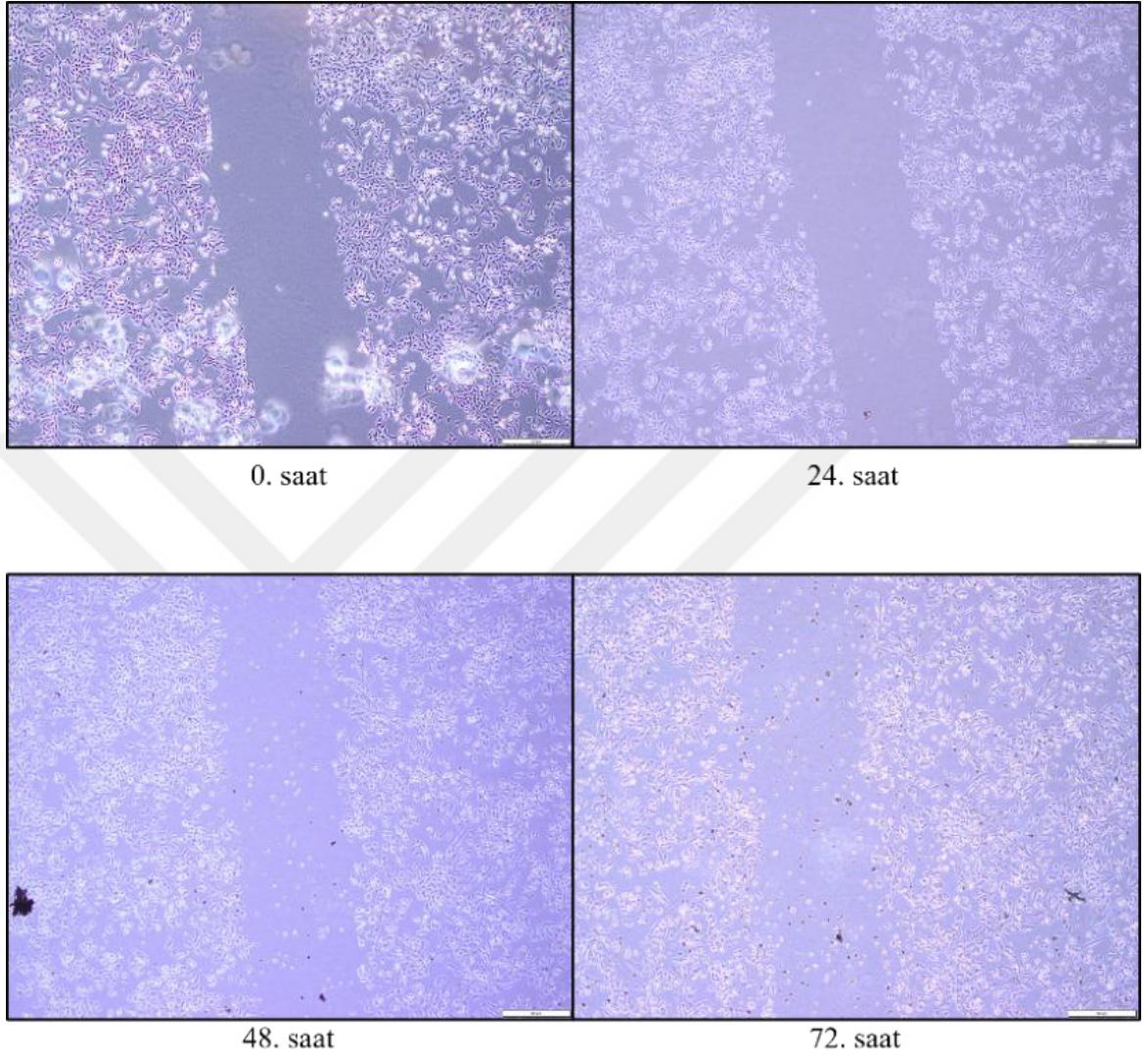
Şekil 4.5: Kontrol grubunun zaman içindeki yara yeri alanı değişimi (x4 büyütme)



Şekil 4.6: TGF- β grubunun zaman içindeki yara yeri alanı değişimi (x4 büyütme)



Şekil 4.7: GLA grubunun zaman içindeki yara yeri alanı değişimi (x4 büyütme)



Şekil 4.8: TGF- β + GLA grubunun zaman içindeki yara yeri alanı değişimi (x4 büyütme)

4.2.2. Grupların Zamana Bağlı Yara Açıklığı Bulguları

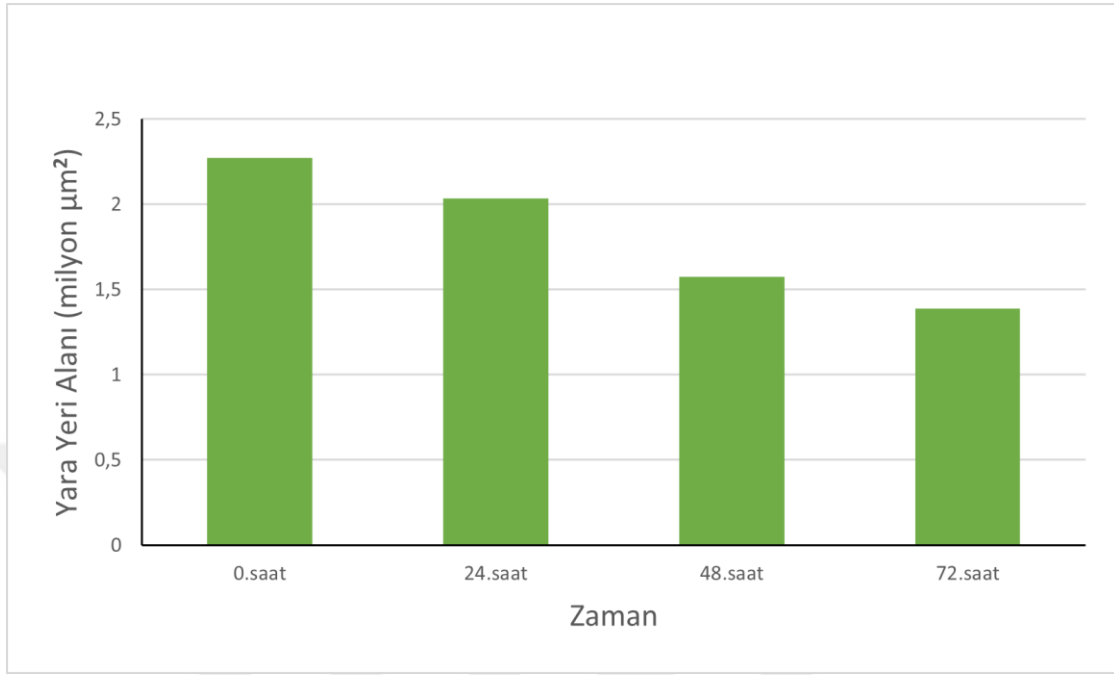
Bu bölümde kontrol, TGF β , GLA ve TGF β + GLA gruplarının kendi içinde zamana bağlı dağılımları araştırılmıştır. Grupların zaman içindeki değişimleri sütun grafiği ile görselleştirilmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4: Grupların zamana bağlı yara yeri alanı değişimi

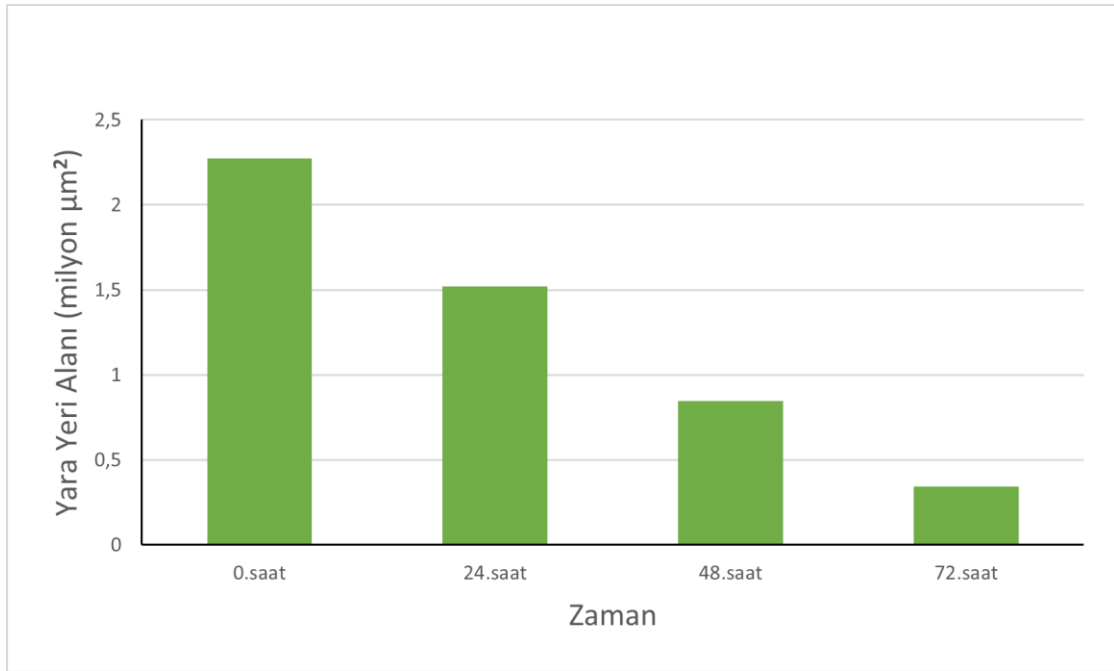
Grup (I)	Zaman	$\bar{x} \pm sd$ (μm^2)	p
Kontrol	0. saat	2.271.522 $\pm$ 200,00	<0,0001*
	24. saat	2.033.483 $\pm$ 200,0	
	48. saat	1.574.733 $\pm$ 200,0	
	72. saat	1.388.125 $\pm$ 100,0	
TGF-β	0. saat	2.271.339 $\pm$ 152,8	<0,0001*
	24. saat	1.521.628 $\pm$ 152,8	
	48. saat	845.428 $\pm$ 152,8	
	72. saat	341.911 $\pm$ 100,0	
GLA	0. saat	2.273.561 $\pm$ 251,7	<0,0001*
	24. saat	2.447.186 $\pm$ 152,8	
	48. saat	2.455.128 $\pm$ 102,6	
	72. saat	2.473.411 $\pm$ 152,8	
TGF-β+GLA	0. saat	2.272.467 $\pm$ 450,9	<0,0001*
	24. saat	2.295.719 $\pm$ 251,7	
	48. saat	2.224.072 $\pm$ 79,92	
	72. saat	2.142.422 $\pm$ 152,8	

Anova Analizi * $p < 0,05$

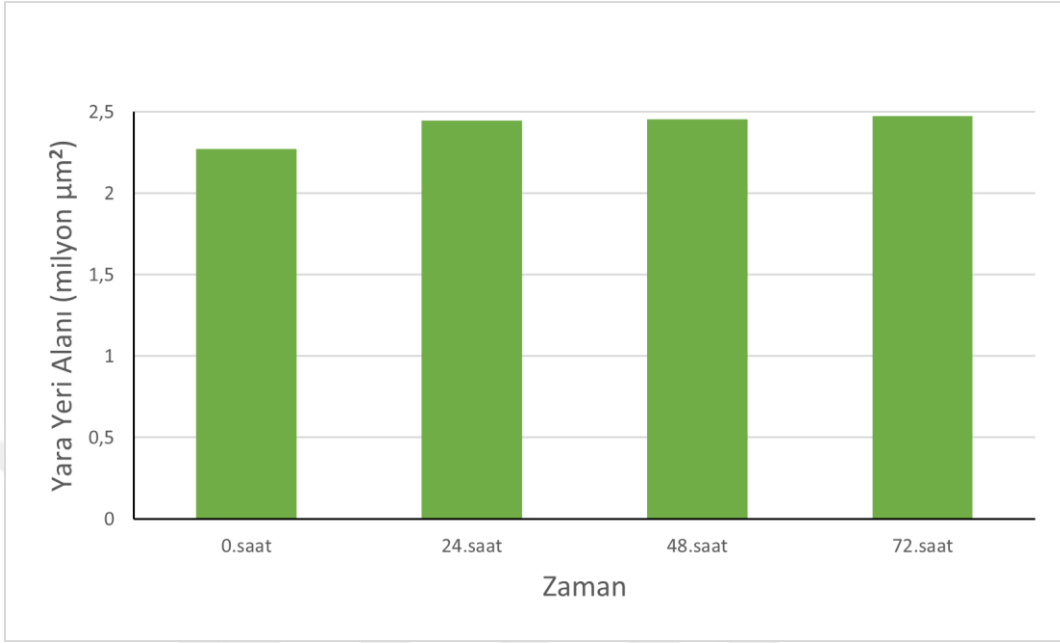
Tabloda, grupların zamana bağlı yara açıklığının ortalama değerleri verilmiştir. (Tablo 4.4) Deney gruplarına ait ölçümler belirli saatlerde alınmıştır. Her grubun belirli saatlerdeki ortalama değeri ($\bar{x} \pm sd$) ve istatistiksel anlamlılık (p) bulguları sunulmuştur. Kontrol ve TGF- β gruplarında yara yeri alanının kademeli bir şekilde kapandığı görülmektedir ($p < 0,0001$). GLA grubunda ise yara alanı kapanmamakla birlikte zamanla artmıştır ($p < 0,0001$). TGF- β + GLA grubunda yara yeri alanı 24. saatte en yüksek değerine ulaşmış, daha sonra ise minimal bir kapanma eğilimi göstermişse de 72. saatte kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p < 0,0001$).



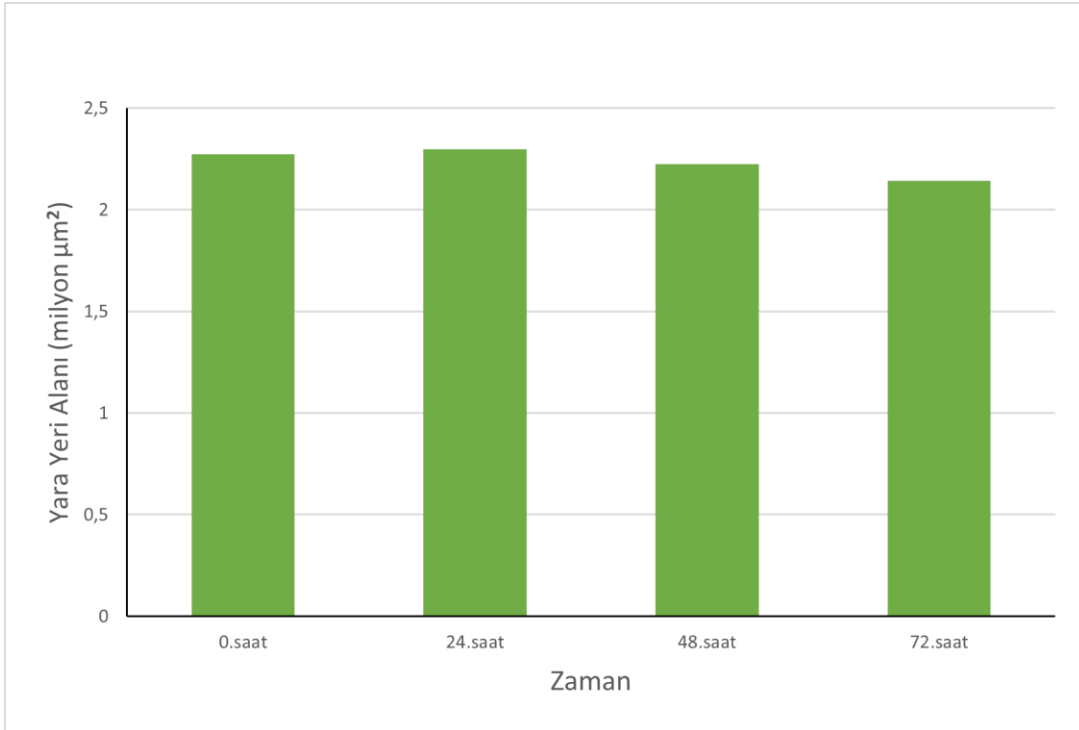
Şekil 4.9: Kontrol grubunda zaman içerisinde yara yeri alanındaki değişim



Şekil 4.10: TGF- β grubunda zaman içerisinde yara yeri alanındaki değişim



Şekil 4.11: GLA grubunda zaman içerisinde yara yeri alanındaki değişim



Şekil 4.12: TGF- β +GLA grubunda zaman içerisinde yara yeri alanındaki değişim

Tablo 4.5: Grupların zamana bağlı yara iyileşmesinin Tukey testi ile çoklu karşılaştırılması

	Saatler Arası Karşılaştırma	Mean Diff. (Yara Yeri Alanı) (μm^2)	p
KONTROL	0.saat- 24. saat	238.039 (↓)	<0,0001*
	0.saat- 48. saat	696.789 (↓)	
	0.saat- 72. saat	883.397 (↓)	
	24.saat- 48. saat	458.750 (↓)	
	24.saat- 72. saat	645.358 (↓)	
	48.saat- 72. saat	186.608 (↓)	
TGF-β	0.saat- 24. saat	749.712 (↓)	<0,0001*
	0.saat- 48. saat	1.425.912 (↓)	
	0.saat- 72. saat	1.929.428 (↓)	
	24.saat- 48. saat	676.200 (↓)	
	24.saat- 72. saat	1.179.717 (↓)	
	48.saat- 72. saat	503.517 (↓)	
GLA	0.saat- 24. saat	-173.625 (↑)	<0,0001*
	0.saat- 48. saat	-181.567 (↑)	
	0.saat- 72. saat	-199.850 (↑)	
	24.saat- 48. saat	-7.942 (↑)	
	24.saat- 72. saat	-26.225 (↑)	
	48.saat- 72. saat	-18.283 (↑)	
TGF-β+GLA	0.saat- 24. saat	-23.253 (↑)	<0,0001*
	0.saat- 48. saat	48.395 (↓)	
	0.saat- 72. saat	130.044 (↓)	
	24.saat- 48. saat	71.648 (↓)	
	24.saat- 72. saat	153.297 (↓)	
	48.saat- 72. saat	81.650 (↓)	

Tukey Testi ile Çoklu Karşılaştırma Sonuçları * $p<0,05$

Tablo ve grafikler incelendiğinde, zamana bağlı yara yeri alanındaki değişimler gruplar arasında farklılıklar bulunmuştur. (Tablo 4.5, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12) Kontrol ve TGF- β gruplarında saatler arasındaki karşılaştırmaların pozitif ve anlamlı bulunması, başlangıçtaki yara yeri alanının zamanla küçüldüğünü göstermektedir ($p<0,0001$).

GLA grubunda yara yeri alanındaki değişimlerin negatif ve anlamlı bulunması başlangıçtaki yara yeri alanının zamanla küçülmediğini, aksine arttığını göstermektedir ($p<0,0001$).

TGF- β +GLA grubunda ilk 24. saatte küçülen yara yeri alanının 48. saatte artması Glaucocalyxin A maddesinin bir süre sonra TGF- β 'ya karşı olan etkinliğini kaybetmeye başladığını göstermektedir ($p<0,0001$). Yine de TGF- β 'ya kıyasla TGF- β +GLA grubundaki final yara yeri alanı önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$).

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde en hızlı yara yeri kapanma süreci TGF- β grubunda saptanmıştır ve GLA uygulamasının bu kapanmayı önemli ölçüde önlemeye çalıştığı görülmüştür.

4.3. İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama Deneyi Bulguları

Bu bölümde kontrol, TGF- β , GLA, TGF- β + GLA gruplarının kendi içinde immünohistokimyasal (E-cadherin, N-cadherin, vimentin, NLRP3, p-SMAD 2/3) dağılımları araştırılmıştır. Deney grupları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,0001$). Grupların immünohistokimyasal skorları sütun grafiği ile görselleştirilmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6: Grupların immünohistokimyasal veri dağılımları

	GRUPLAR	$\bar{x} \pm sd$	p
E-cadherin	Kontrol	296,9 $\pm$ 1,222	<0,0001*
	TGF- β	122,8 $\pm$ 1,609	
	GLA	316,2 $\pm$ 1,834	
	TGF- β +GLA	314,3 $\pm$ 0,7937	
N-cadherin	Kontrol	135,1 $\pm$ 3,732	<0,0001*
	TGF- β	290,7 $\pm$ 2,452	
	GLA	128 $\pm$ 4,852	
	TGF- β +GLA	193 $\pm$ 3,592	
Vimentin	Kontrol	135,4 $\pm$ 1,442	<0,0001*
	TGF- β	312,3 $\pm$ 1,652	
	GLA	129,9 $\pm$ 2,401	
	TGF- β +GLA	139,2 $\pm$ 2,2	
p-SMAD 2/3	Kontrol	123,1 $\pm$ 1,706	<0,0001*
	TGF- β	304,1 $\pm$ 2,427	
	GLA	116,5 $\pm$ 1,947	
	TGF- β +GLA	178,4 $\pm$ 2,811	
NLRP3	Kontrol	138,4 $\pm$ 2,060	<0,0001*
	TGF- β	294,1 $\pm$ 2,774	
	GLA	129 $\pm$ 1,680	
	TGF- β +GLA	156,8 $\pm$ 2,406	

Anova Analizi * $p < 0,05$

Tabloda belirteçlerin gruplardaki immünohistokimyasal boyanma düzeylerinin ortalama ve standart sapması verilmiştir. (Tablo 4.6) Gruplar arasında anlamlı farklılık

tespit edilmiş olup ($p < 0,0001$) bu değişimin hangi gruplar arasında olduğunu saptanması amacıyla LSD testi yapılmıştır.

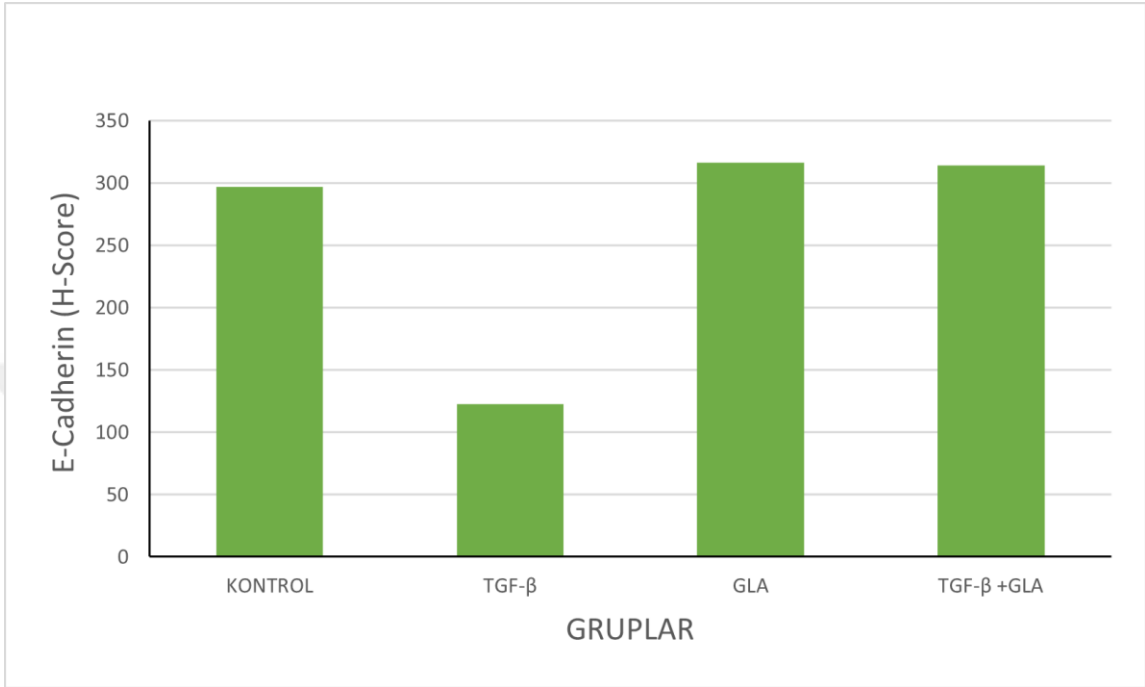
Tablo 4.7: Gruplar arasında immünositokimya gözlemlerinin LSD testi ile çoklu karşılaştırılması

	(Kontrol)- (TGF- β)	(Kontrol)- (GLA)	(Kontrol)- (TGF- β +GLA)	(TGF- β)- (GLA)	(TGF- β) – (TGF- β +GLA)	(GLA)- (TGF- β +GLA)
E-cadherin	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,1463
N-Cadherin	<0,0001*	0,0484*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
Vimentin	<0,0001*	0,0092*	0,0452*	<0,0001*	<0,0001*	0,0004*
p-SMAD 2/3	<0,0001*	0,0073*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
NLRP3	<0,0001*	<0,001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*

*LSD Testi ile Çoklu Karşılaştırma Bulguları * $p < 0,05$*

LSD testi ile gerçekleştirilen çoklu karşılaştırma analizine göre, gruplar arasında immünositokimyasal belirteçlerin ekspresyon seviyelerinde genel olarak istatistiksel anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p < 0,05$). (Tablo 4.7)

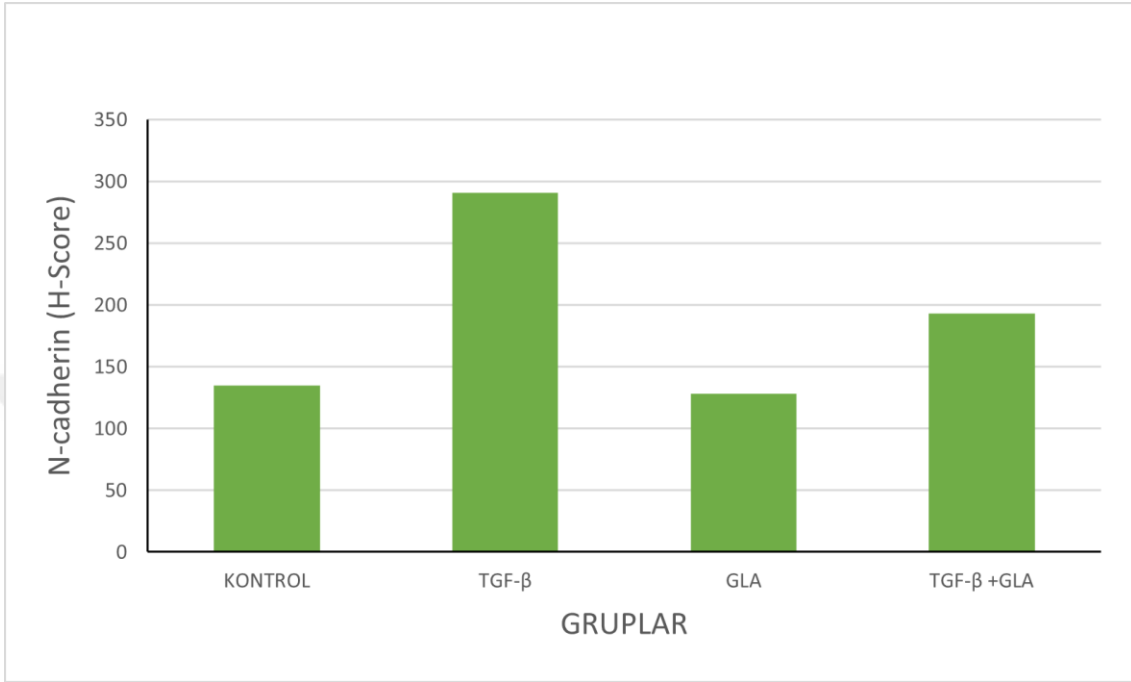
4.3.1. E-Cadherin



Şekil 4.13: E-cadherin immünohistokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı

Grafikte, farklı deney gruplarında E-cadherin seviyelerinin değişimi gözlemlenmektedir. (Şekil 4.13) Kontrol grubunda yüksek seviyede bulunan E-cadherin, TGF- β uygulaması sonrasında belirgin bir düşüş göstermektedir ($p < 0,0001$). GLA uygulamasının, kontrol grubuna kıyasla E-cadherin seviyesinde anlamlı bir artış görülmektedir ($p < 0,0001$). TGF- β +GLA grubunda ise E-cadherin seviyesi, kontrol grubuna kıyasla artmıştır ($p < 0,0001$), bununla birlikte GLA grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0,1463$).

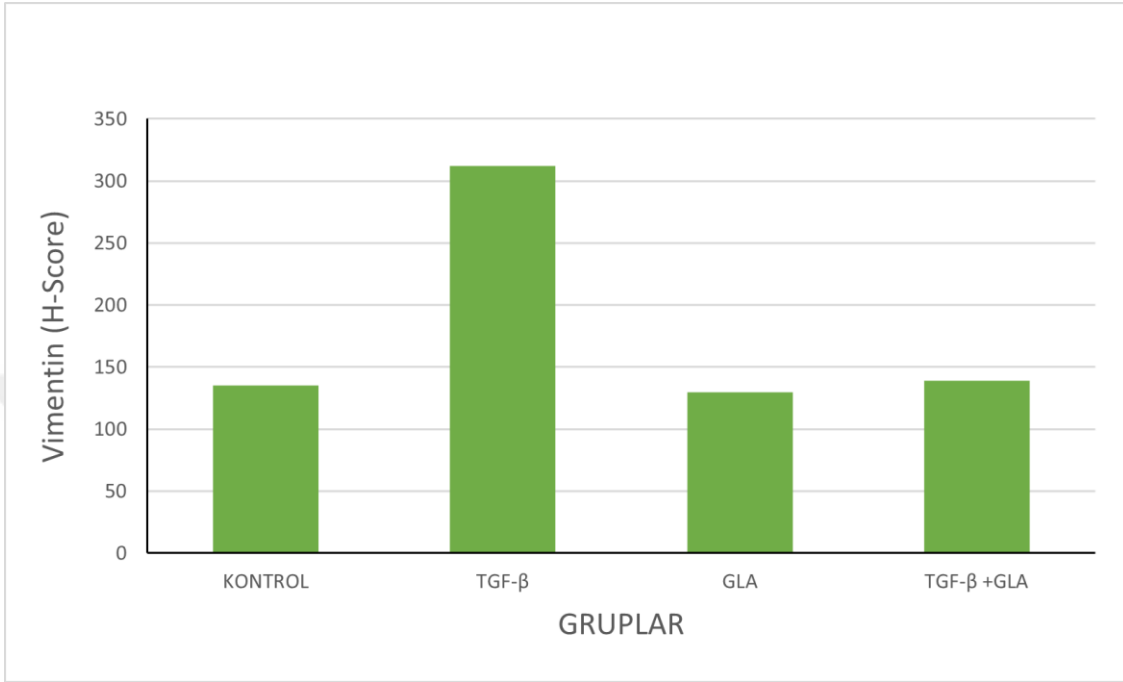
4.3.2. N- Cadherin



Şekil 4.14: N-cadherin immünohistokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı

Grafikte farklı deney gruplarında N-cadherin seviyelerinin değişimi incelenmektedir (Şekil 4.14). Kontrol grubuna kıyasla TGF- β uygulaması sonrasında N-cadherin düzeyinde belirgin bir artış görülmektedir ($p < 0,0001$). GLA grubunda N-cadherin seviyesinde ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p = 0,0484$). TGF- β +GLA grubunda N-cadherin seviyesinin, TGF- β grubuna kıyasla belirgin olarak düştüğü belirlenmiştir ($p < 0,0001$).

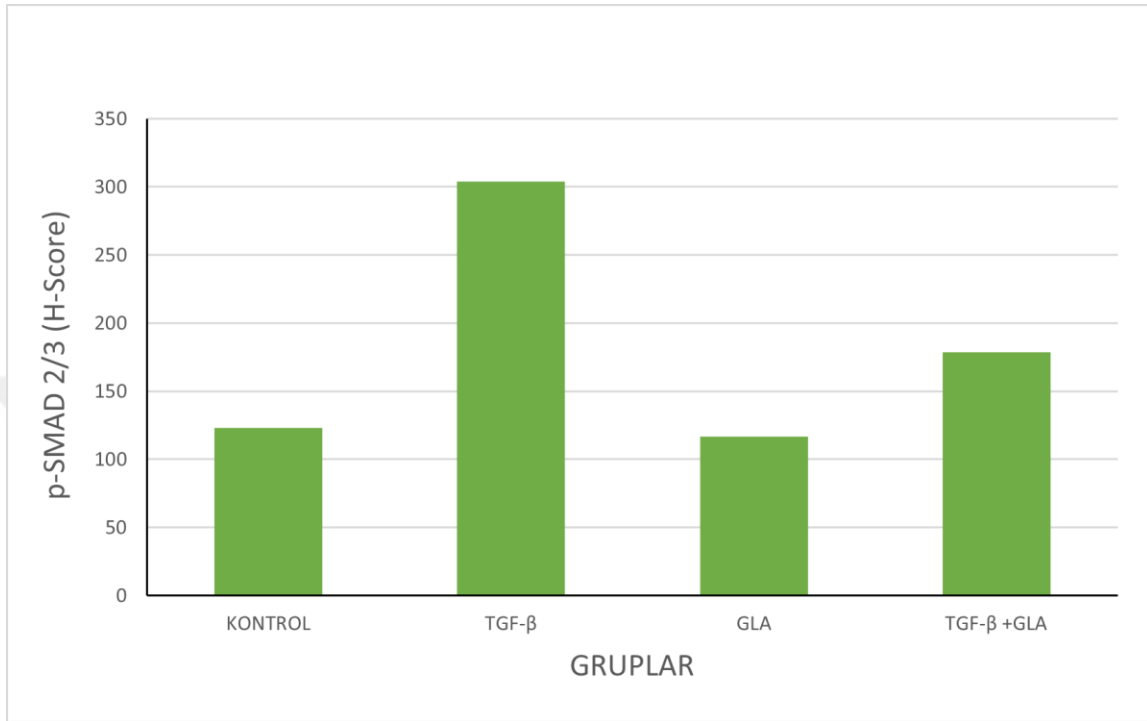
4.3.3. Vimentin



Şekil 4.15: Vimentin immünohistokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı

Grafikte farklı deney gruplarında vimentin seviyelerinin değişimi incelenmektedir. (Şekil 4.15) Kontrol grubuna kıyasla TGF- β uygulaması sonrasında vimentin düzeyinde belirgin bir artış görülmektedir ($p < 0,0001$). GLA grubunda vimentin seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düştüğü görülmektedir ($p = 0,0092$). TGF- β ile birlikte GLA uygulandığında ise vimentin seviyesinin TGF- β grubuna kıyasla belirgin bir şekilde azaldığı ($p < 0,0001$) kaydedilmiştir.

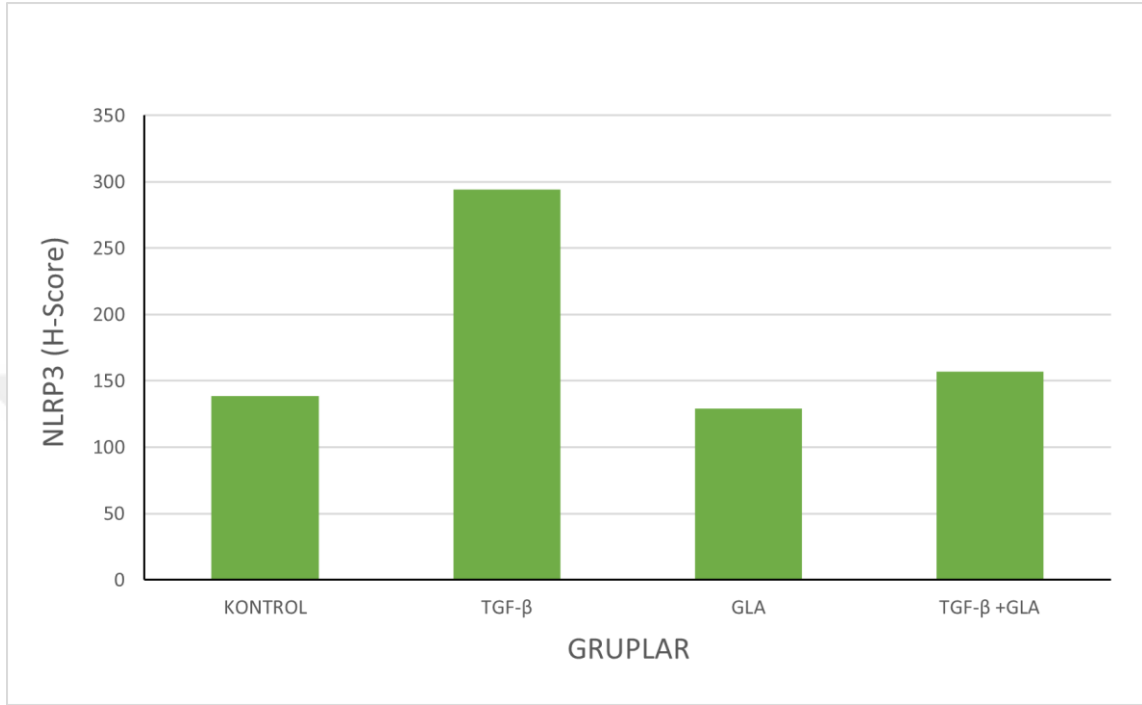
4.3.4. p-SMAD 2/3



Şekil 4.16: p-SMAD 2/3 immünohistokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı

Grafikte farklı deney gruplarında p-SMAD 2/3 seviyelerinin değişimi incelenmektedir. (Şekil 4.16) Kontrol grubunda bazal seviyede bulunan p-SMAD 2/3, TGF-β uygulaması ile belirgin bir artış göstermektedir ($p < 0,0001$). GLA grubunda ise p-SMAD 2/3 seviyesi kontrol grubuna oranla anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p = 0,0073$). TGF-β+GLA uygulandığı grupta p-SMAD 2/3 düzeyinin TGF-β uygulanan gruba kıyasla önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır ($p < 0,0001$).

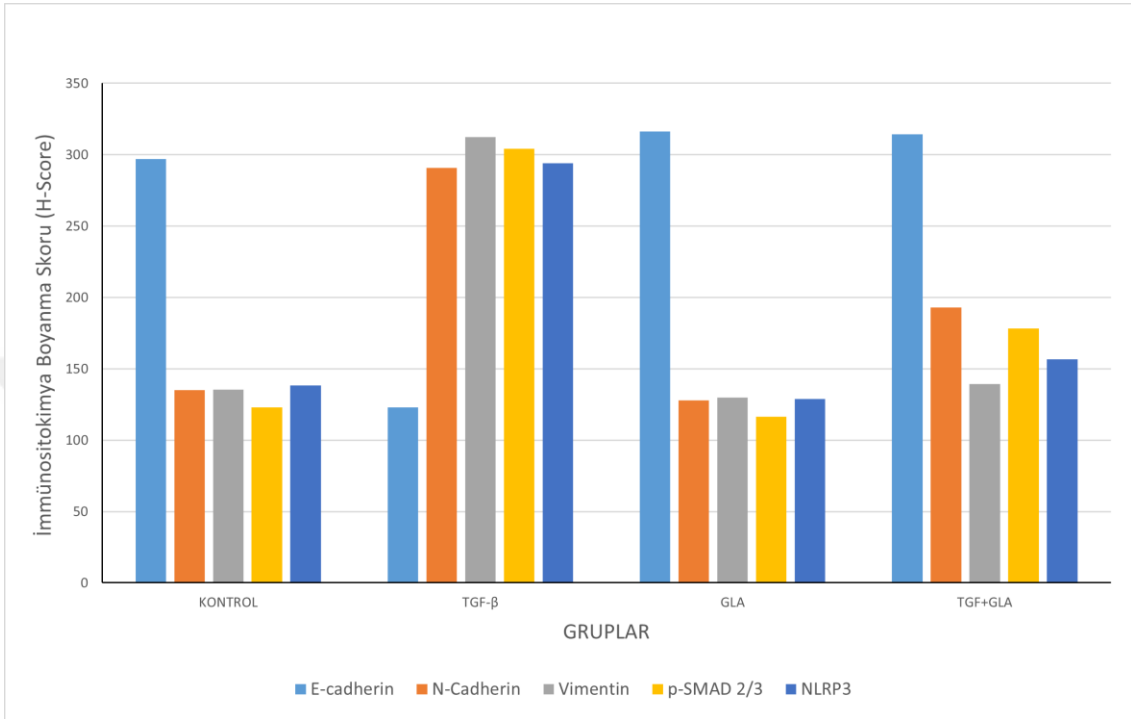
4.3.5. NLRP3



Şekil 4.17: NLRP3 immünohistokimyasal analizinin gruplara göre dağılımı

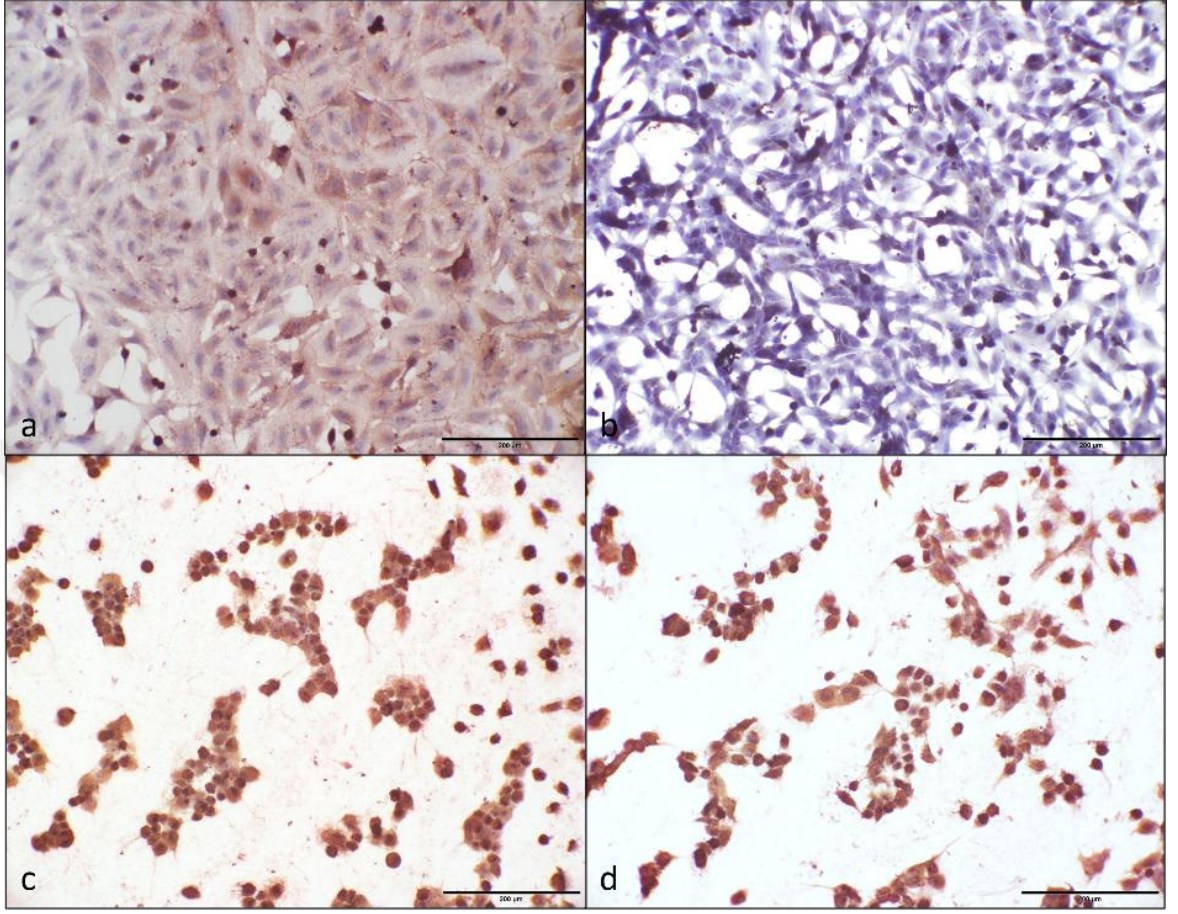
Grafikte farklı deney gruplarında NLRP3 seviyelerinin değişimi incelenmektedir. (Şekil 4.17) Kontrol grubuna kıyasla TGF-β grubunda NLRP3 düzeyinde belirgin bir artış görülmektedir ($p<0,0001$). GLA uygulaması NLRP3 seviyesinde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde düşüşe neden olmuştur ($p<0,001$). TGF-β ile birlikte GLA uygulandığında ise NLRP3 seviyesinin TGF-β uygulanan gruba kıyasla belirgin bir şekilde azaldığı ($p<0,0001$) gözlenmiştir.

4.3.6. Gruplar Arasındaki İmmünohistokimyasal Boyanma Düzeyi



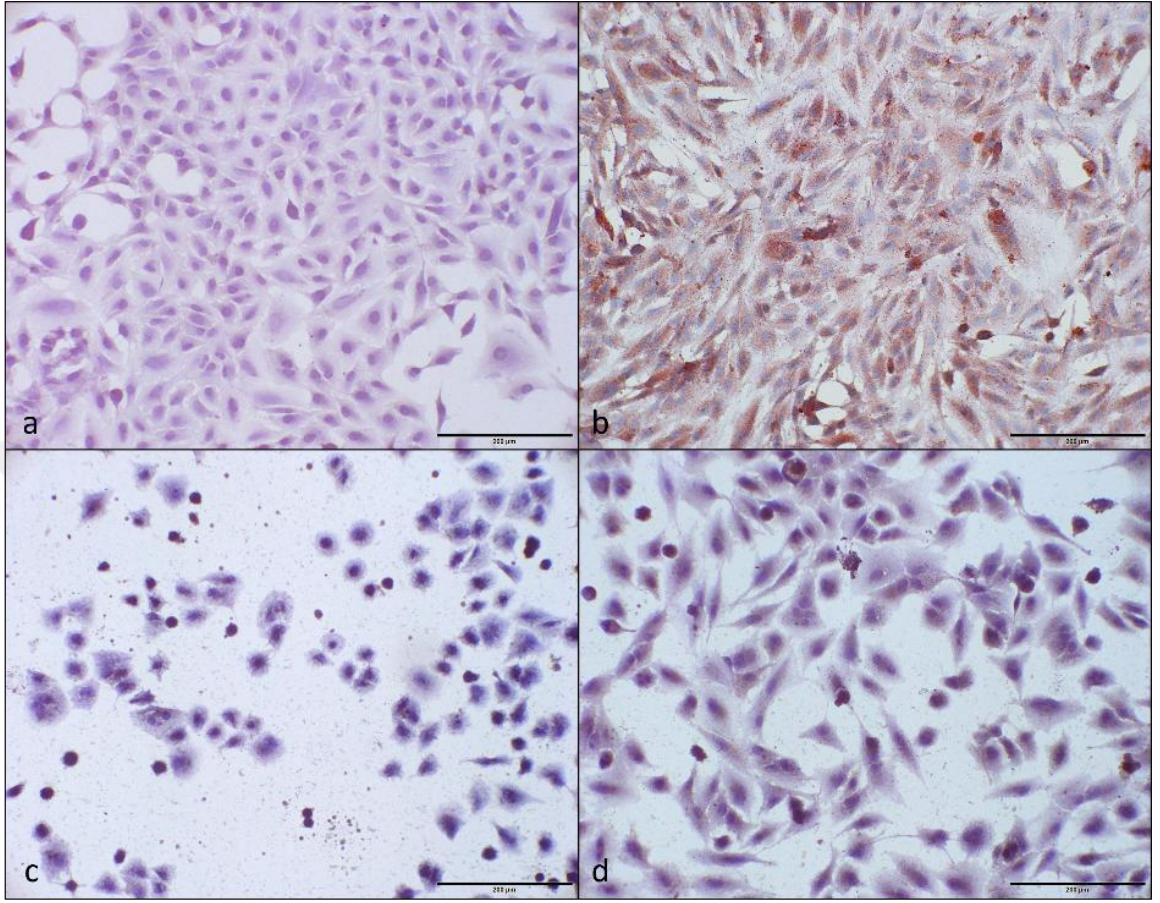
Şekil 4.18: İmmünohistokimyasal analizin ortalama değerinin gruplara göre dağılımı

E-cadherin, N-cadherin, vimentin, NLRP3 ve p-SMAD 2/3 belirteçlerinin ortalama değerlerinin deney gruplardaki düzeyi şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.18). E-cadherin düzeyi TGF- β grubunda en düşük seviyede ölçülürken, GLA grubunda en yüksek seviyede belirlenmiştir. N-cadherin ve vimentin düzeyleri diğer gruplara kıyasla TGF- β grubunda anlamlı olarak yükseldiği, GLA uygulamasının ise bu yükselişi baskıladığı bulunmuştur. p-SMAD ve NLRP3 düzeyleri TGF- β grubunda en yüksek seviyede kaydedilmiş olup GLA uygulanmasının bu artışı önemli ölçüde düşürdüğü gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal analizde gruplar arasındaki boyanma düzeylerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri aşağıda yer almaktadır. (Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23)

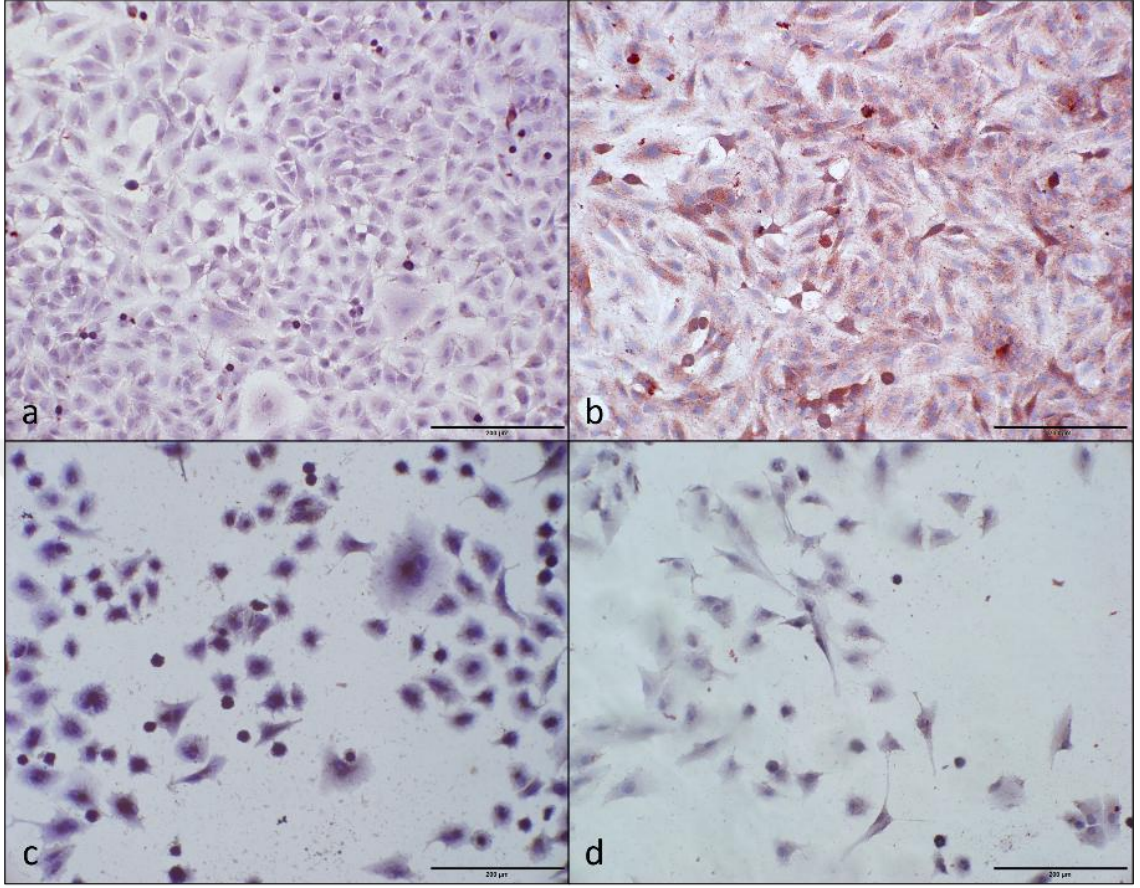


Şekil 4.19: E-cadherin immünohistokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı

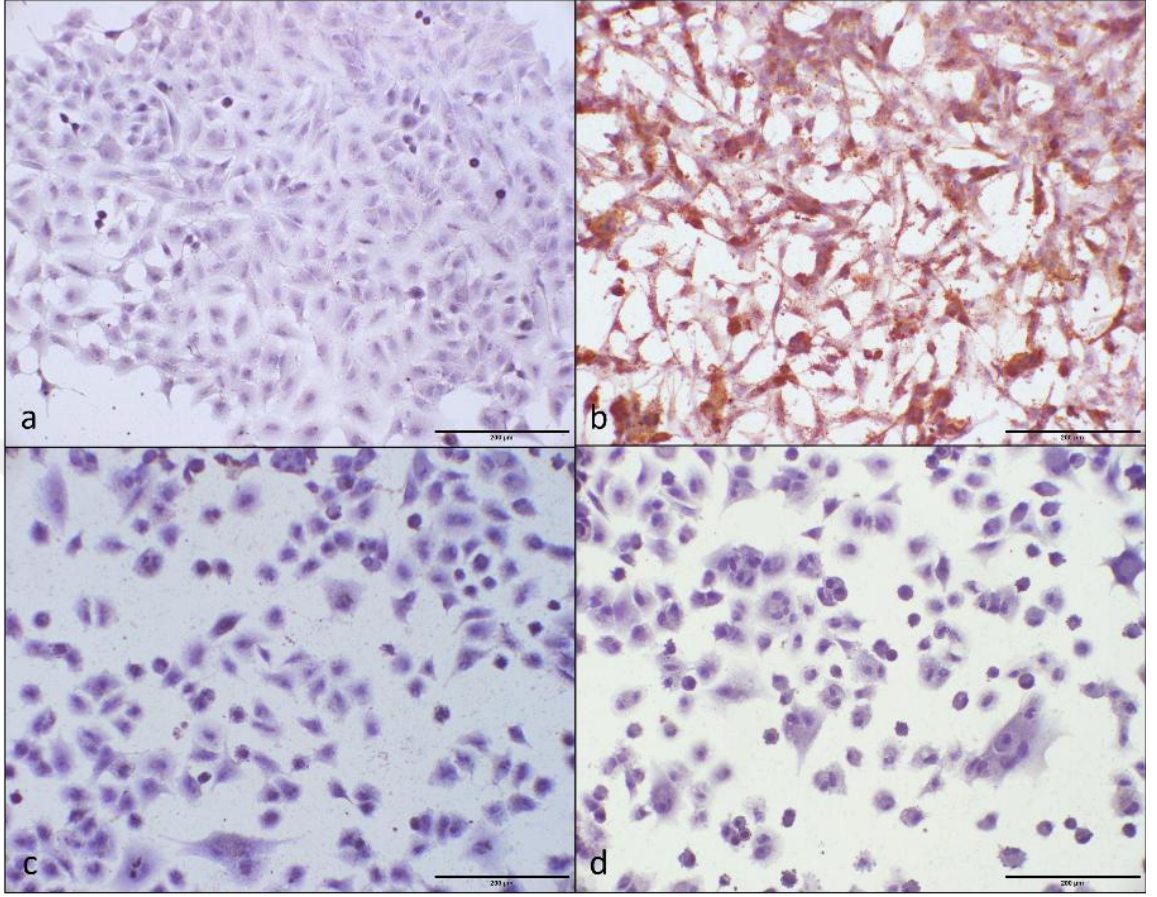
(A: Kontrol, B: TGF- β , C: GLA, D: TGF- β +GLA x20 büyütme)



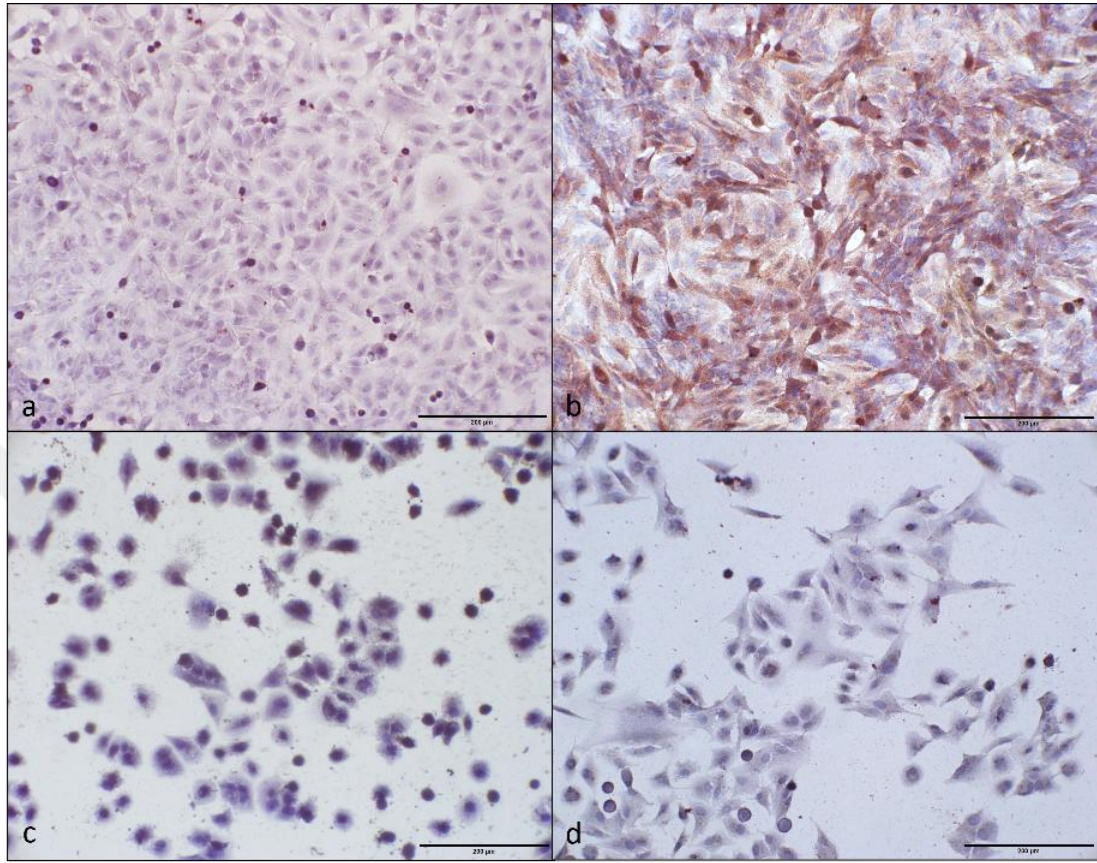
Şekil 4.20: N-cadherin immünohistokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı (A: Kontrol, B: TGF- β , C: GLA, D: TGF- β +GLA x20 büyütme)



Şekil 4.21: Vimentin immünohistokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı (A: Kontrol, B: TGF- β , C: GLA, D: TGF- β +GLA x20 büyütme)



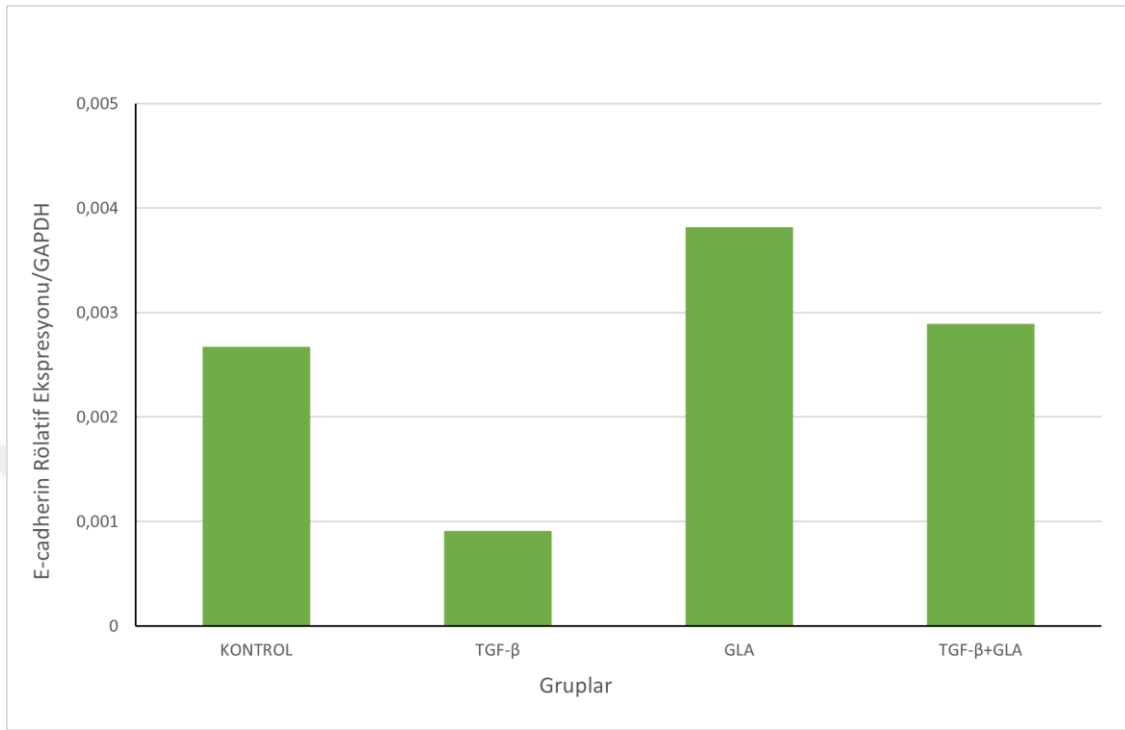
Şekil 4.22: p-SMAD 2/3 immünohistokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı (A: Kontrol, B: TGF- β , C: GLA, D: TGF- β +GLA x20 büyütme)



Şekil 4.23: NLRP3 immünositokimyasal boyamasının gruplara göre dağılımı (A: Kontrol, B: TGF- β , C: GLA, D: TGF- β +GLA x20 büyütme)

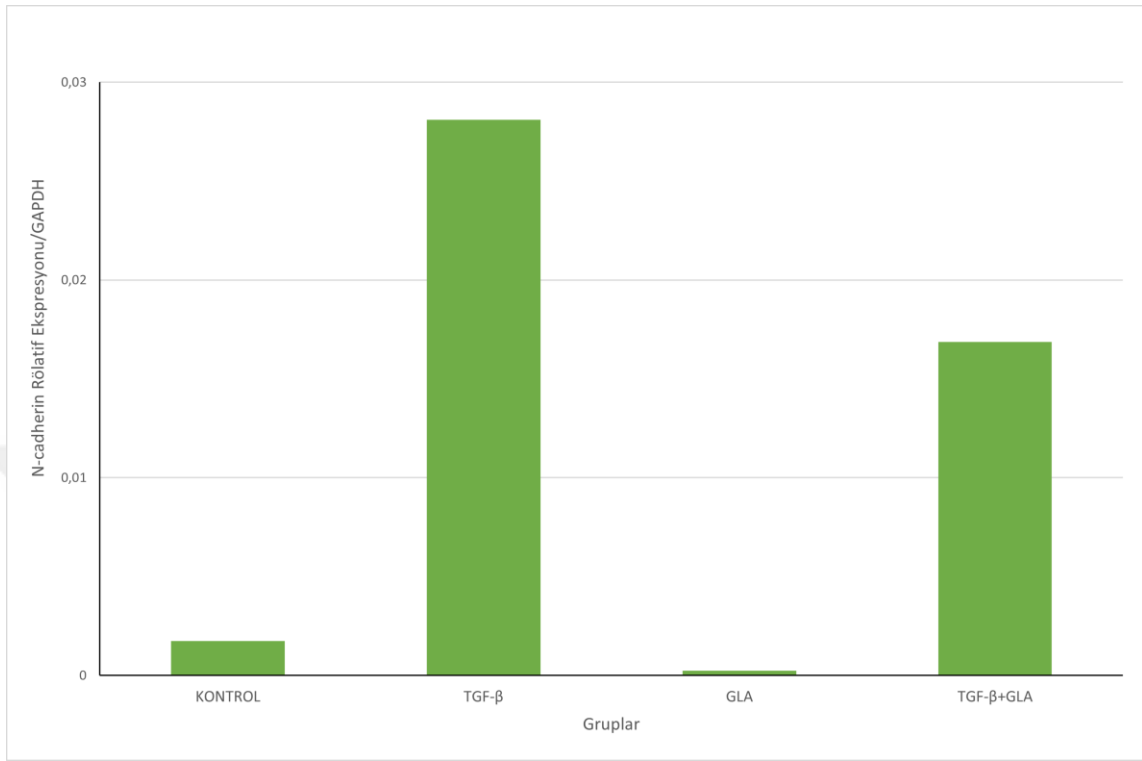
4.4. qRT-PCR Analizi

GAPDH, E-cadherin, N-cadherin, vimentin, SMAD2, SMAD3 ve NLRP3 rölatif gen düzeyleri PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. GAPDH housekeeping geni olarak kullanıldığı için gen ekspresyon analizinde normalize edici bir referans olarak değerlendirilmiştir. Tukey testi ile gerçekleştirilen çoklu karşılaştırma analizine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p < 0,0001$).



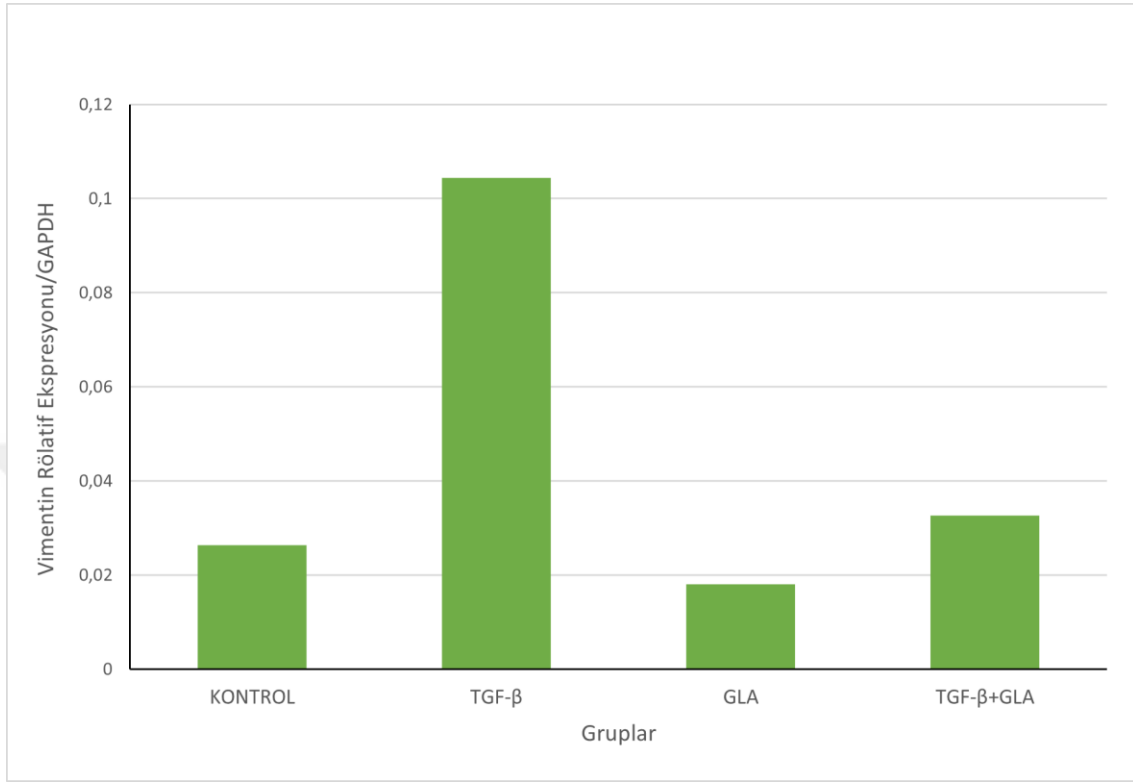
Şekil 4.24: E-cadherin ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması

Grafikte E-cadherin mRNA düzeyinin deney gruplarındaki değişimi gösterilmektedir. (Şekil 4.24) Kontrol grubunda belirli bir düzeyde ifade edilen E-cadherin, TGF-β grubunda en düşük düzeyde eksprese edilmiştir. GLA grubunda ekspresyon düzeyi tüm gruplara kıyasla en yüksek seviyede belirlenmiştir. TGF-β+GLA grubunda ise kontrol grubuna göre ekspresyon düzeyinde artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar, E-cadherin gen ifadesinin GLA grubunda en istikrarlı düzeye ulaştığını, TGF-β grubunda ise belirgin bir şekilde azaldığını göstermektedir ($p < 0,0001$).



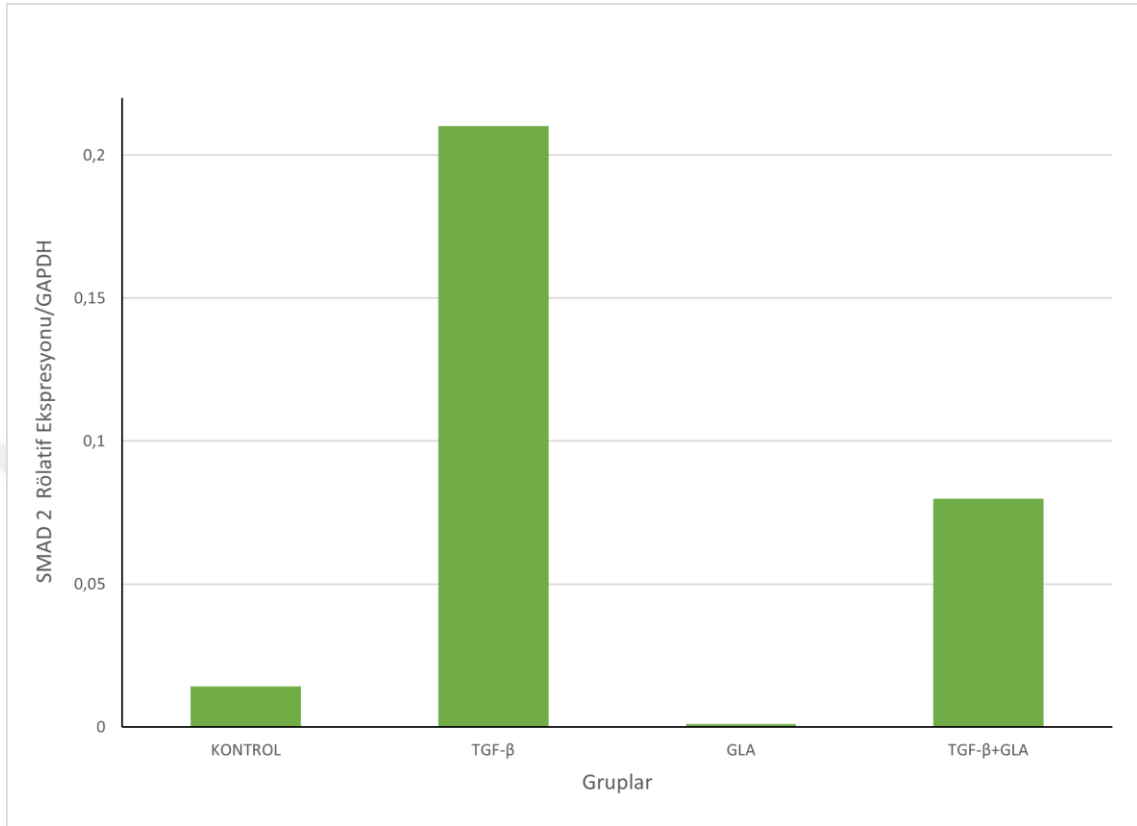
Şekil 4.25: N-cadherin ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması

Grafikte N-cadherin mRNA düzeyinin deney gruplarındaki değişimi gösterilmektedir. ( ekil 4.25) Kontrol grubunda belirli bir seviyede eksprese edilen N-cadherin, TGF-  grubunda belirgin bir artış sergilemektedir. TGF- +GLA grubunda ise bu artış önemli ölçüde baskılanmıştır. N-cadherin düzeyinin en düşük olduğu grup GLA olarak saptanmıştır. Bu veriler TGF-  grubunda artan N-cadherin ekspresyonunun TGF- +GLA grubunda belirgin bir şekilde azaldığını ortaya koymaktadır ($p < 0,0001$).



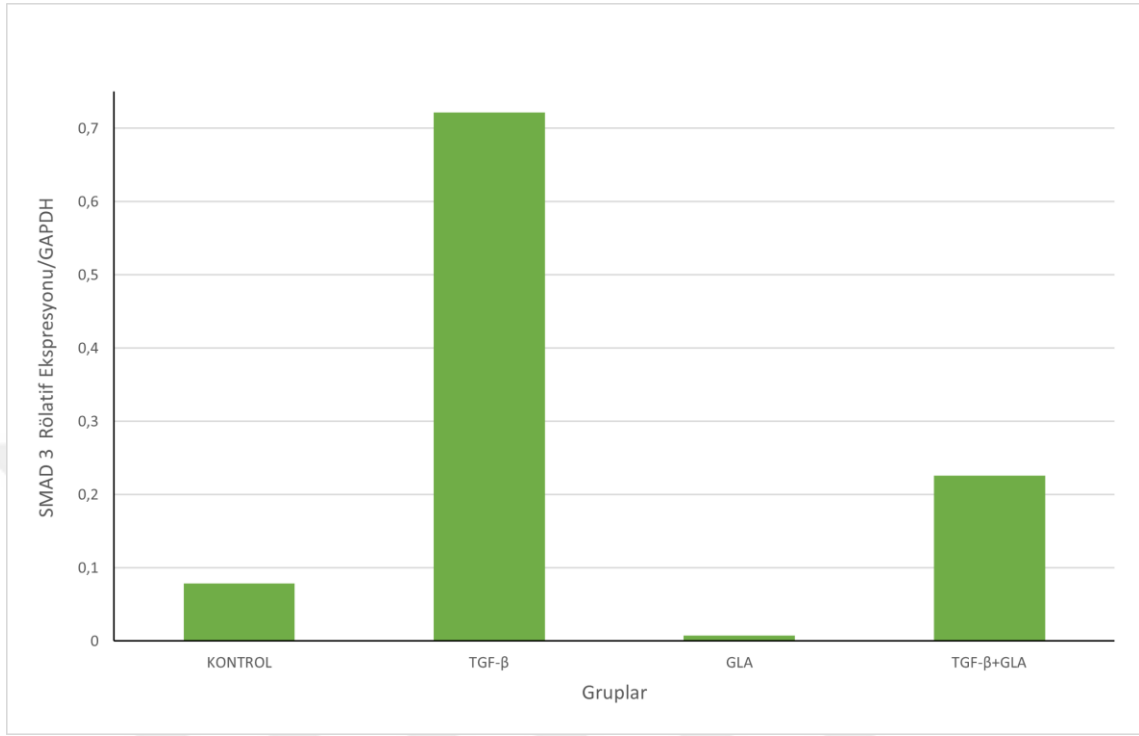
Şekil 4.26: Vimentin ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması

Grafikte vimentin mRNA düzeyinin deney gruplarındaki değişimi gösterilmektedir. (Şekil 4.26) Kontrol grubunda belirli bir düzeyde ifade edilen vimentin, TGF-β grubunda en yüksek seviyeye ulaşmıştır. TGF-β+GLA grubunda ise bu artışın anlamlı ölçüde önüne geçildiği görülmektedir. Vimentin gen düzeyinin en düşük olduğu grup GLA olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, kontrol grubuna kıyasla TGF-β grubundaki vimentin gen düzeyinin belirgin şekilde arttığını, GLA ve TGF-β+GLA grubundaki gen düzeylerinin ise TGF-β grubuna kıyasla önemli ölçüde baskılandığını ortaya koymaktadır ($p < 0,0001$).



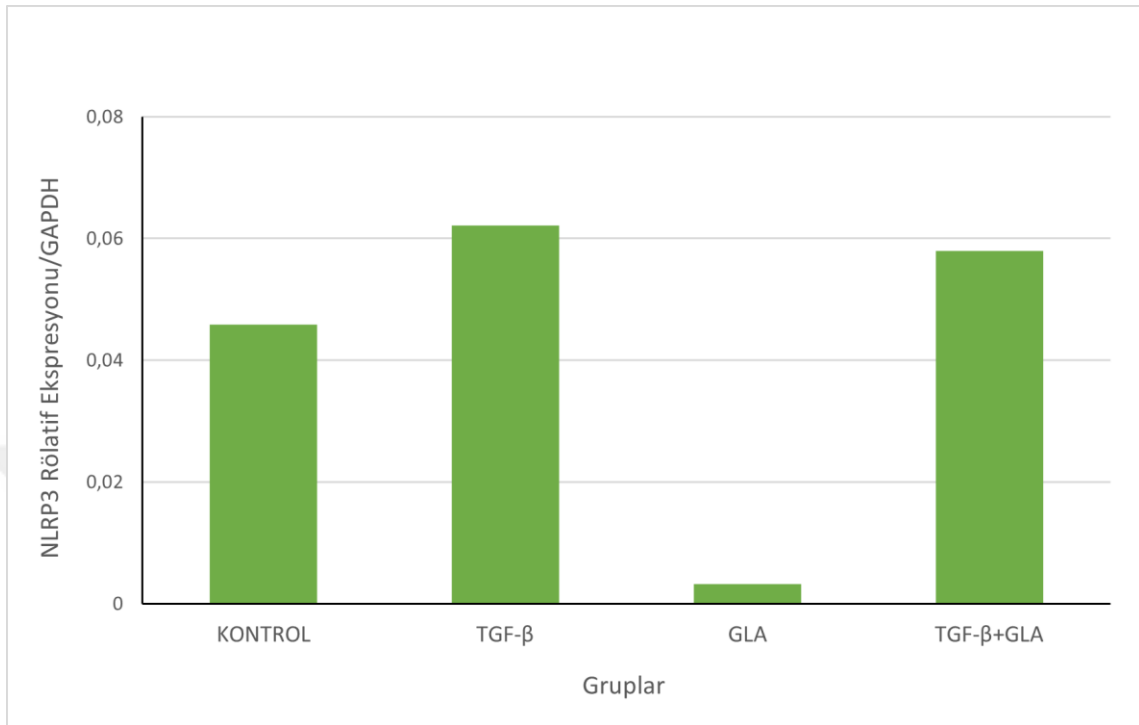
Şekil 4.27: SMAD 2 ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması

Grafikte SMAD 2 mRNA düzeyinin deney gruplarındaki değişimi gösterilmektedir. (Şekil 4.27) Kontrol grubunda bazal düzeyde eksprese edilen SMAD 2, GLA grubunda belirgin şekilde baskılanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla TGF-β grubunun SMAD 2 gen düzeyinde yüksek seviyede artış kaydedilmiştir. TGF-β+GLA grubunda bu yükseliş önemli ölçüde baskılanmış olmakla birlikte SMAD 2 gen düzeyi kontrol grubuna kıyasla yüksek seyretmiştir. Bu veriler, SMAD 2 gen düzeyinin deney grupları arasında anlamlı olarak değişkenlik gösterdiğini ve TGF-β grubunda en yüksek seviyede belirlenen gen ifadesinin GLA grubunda belirgin şekilde baskılandığını ortaya koymaktadır ($p < 0,0001$).



Şekil 4.28: SMAD 3 ekspresyon değişiminin deney gruplarında karşılaştırılması

Grafikte SMAD 3 mRNA düzeyinin deney gruplarındaki değişimi gösterilmektedir. (Şekil 4.28) Kontrol grubunda belirli bir düzeyde eksprese edilen SMAD 3, GLA grubunda belirgin şekilde baskılanmıştır. Tüm deney gruplarına kıyasla TGF-β grubunun SMAD 3 gen düzeyinde yüksek seviyede artış kaydedilmiştir. TGF-β+GLA grubunda bu yükseliş önemli ölçüde baskılanmış olmakla birlikte gen ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla yüksek seyretmiştir. Bu veriler, SMAD 3 gen ekspresyonunun deney grupları arasında anlamlı olarak değişkenlik gösterdiğini ve TGF-β grubunda en yüksek seviyede belirlenen gen ifadesinin GLA grubunda belirgin şekilde baskılandığını göstermektedir ($p < 0,0001$).



Şekil 4.29: NLRP 3 Ekspresyon Değişiminin Deney Gruplarında Karşılaştırılması

Grafikte NLRP3 mRNA düzeyinin deney gruplarındaki değişimi gösterilmektedir. ( ekil 4.29) Kontrol grubunda belirli bir seviyede eksprese edilen NLRP3, TGF-  grubunda anlamlı bir artış göstermiştir. GLA grubundaki NLRP3 mRNA seviyesi kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde azalmıştır. TGF- +GLA grubunda NLRP3 ekspresyonunun TGF-  grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, NLRP3 ekspresyonunun deney grupları arasında belirgin şekilde değişkenlik gösterdiğini ve TGF-  grubunda en yüksek seviyede  l  len NLRP3 mRNA miktarının GLA grubunda en düşük seviyeye indiğini ortaya ($p<0,0001$).

5. TARTIŞMA

EMT; embriyonik gelişim, yara onarımı, fibrozis, tümör invazyonu ve metastazı gibi olaylarda işleyen bir süreçtir ve TGF- β /SMAD, bu süreçte görev alan esas sinyal mekanizmalarındandır (107, 139). EMT mekanizmasının akciğer fibrozisi ve akciğer kanserinin ilerlemesine zemin hazırladığı bilinmektedir (140). Glaucocalyxin A, *Rabdosia* bitkisinden elde edilen antiinflamatuvar, antifibrotik ve antitümöral niteliklere sahip diterpenoid türevi bir bileşiktir (138). Biz de çalışmamızda TGF- β ile EMT modeli oluşturulmuş akciğer adenokanser hücre hattı üzerinde Glaucocalyxin A'nın etkisini inceledik.

Çalışmamızda suni yara yeri alanı oluşturarak A549 hücrelerinin göç kapasitesini inceledik. Kontrol grubunda yara alanının kademeli şekilde kapandığını gördük. TGF- β grubunun yara yeri iyileştirme kapasitesini tüm gruplara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulduk. 10 μ M Glaucocalyxin A uygulanan GLA grubunda yara alanı kapanmamış, aksine kademeli şekilde artmış olup 72. saatte yara açıklığı en yüksek seviyeye ulaşmıştır. TGF- β + GLA grubunda ise başlangıçta yara alanı az bir miktar açılmış, 72. saatte ise minimal düzeyde kapanma eğilimi göstermiştir. Bununla birlikte her iki grubun 72. saatte yara yeri alanı, kontrol ve TGF- β gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Bizim çalışmamıza paralel olarak Chen ve ark. (141) epitelyal over kanseri hücre hattında (SKOV3) yara yeri modeli oluşturmuşlar ve GLA'nın yara kapanma sürecini baskılayarak antimigratuar etkinlik gösterdiğini belirtmişler. Ayrıca bu çalışmada in vivo ksenograft deneyleri neticesinde 8,735 μ M dozdaki GLA'nın vitro ve in vivo olarak epitelyal over kanserinde hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve tümör büyüme sürecini baskılayabildiğini bildirmişlerdir. Zhou ve ark. (135) da MGC-803 insan gastrik kanser hücre hattında yaptıkları MTT, matrigel invazyon ve migrasyon deneylerinde GLA'nın artan dozlarda (2,5 μ M, 5 μ M ve 10 μ M) hücre canlılığı, göçü ve invazyon kapasitesi üzerinde engelleyici etkiler gösterdiğini bulmuşlar. Bir başka çalışmada araştırmacılar 10 μ M dozdaki GLA'nın insan gastrik kanser hücre hatlarında (HGT-1, SNU-1, SNU-16 ve NCI-N87) hücre proliferasyonu, adezyonu ve invazyonu gibi malign davranışlar üzerinde

inhibitor etki gösterdiğini gözlemlemişler (142). Bu veriler GLA'nın çeşitli kanser hücrelerinin çoğalma, göç etme ve invazyon yapma yeteneklerini önleyebildiği düşündürmektedir.

İnvert mikroskop altında hücrelerin morfolojilerini incelediğimizde, TGF- β grubunda hücrelerin iğsi bir görünüm kazanarak mezenkimal fenotipe geçmiş olabildiğini gözlemledik. GLA grubunda ise kanser hücrelerinin morfolojilerinin dejenere olduğunu, hücrelerin bir kısmının ölerek hücreler arası açıklığın arttığını gördük. Buna ek olarak, TGF- β +GLA grubunda bir kısım hücrelerin iğsi fenotipe geçmeye çalıştığını, ancak Glaucocalyxin A'nın bu geçişi geri çevirebildiğini düşündük. Nitekim Zhang ve ark. (143) invert mikroskopta A549 hücrelerine 5 ng/ml ve 20 ng/ml TGF- β uyguladıklarında hücrelerin EMT benzeri morfolojik değişim geçirdiğini gözlemlemişler. Yine aynı çalışmada immüno Floresan boyamada TGF- β ile uyarılan profibrotik değişimi, çeşitli fibrotik (α -SMA ve kolajen), mezenkimal (vimentin ve slug) ve epitelyal (klaudin-1 ve ZO-1) biyobelirteçlerini kantitatif analizi ile daha da doğruladıklarını ifade etmişler. Özellikle, 5 ng/ml ve 20 ng/ml TGF- β uygulanan gruplarda EMT belirteçlerinin ifade düzeyleri arasında anlamlı bir fark göstermediğini ve 5 ng/ml TGF- β 'nın akciğer epitel hücrelerinde EMT fenotipini indüklemek için yeterli olabildiğini vurgulamışlar (143).

Çalışmamızda E-cadherin, N-cadherin ve vimentin belirteçlerini indirekt immüno sitokimyasal boyama ve qRT-PCR analizi ile değerlendirdik. İmmüno sitokimya deneyimizde diğer gruplara kıyasla TGF- β grubunda E-cadherin ekspresyonunu en düşük, N-cadherin ve vimentin ekspresyonunu ise en yüksek düzeyde gözlemledik. GLA ve TGF- β +GLA gruplarında ise E-cadherin seviyesini kontrol grubuna oranla bir miktar yüksek bulmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık. Ek olarak TGF- β +GLA grubunda N-cadherin ve vimentin düzeyi TGF- β grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulduk.

Çalışmamıza benzer şekilde Feng ve ark. (144) da A549 hücre hattında TGF- β ile EMT modeli oluşturmuşlar ve immüno Floresan tekniğiyle doğal kumarin olan osthole bileşiğinin E-cadherin düzeyinde artış sağlayıp N-cadherin düzeyini baskıladığını, böylelikle EMT sürecini önemli ölçüde tersine çevirdiğini incelemişler. Myong ve Na-

Hye (145), serviks kanseri hastalarının doku örneklerini immünohistokimyasal analiz yöntemiyle değerlendirmişler. Karsinoma in situ doku örneklerinde E-cadherin kaybı ve vimentin ekspresyonunda artış gözlemlemişler. Bu bulgular neticesinde mikroinvaziv karakterdeki karsinoma in situnun invaziv kansere dönüşmesinde EMT mekanizmasının rol oynayabileceği sonucuna varmışlar.

Gao ve ark. (146) ise western blot yöntemi ile bir flovonoid bileşiği olan eriocitrin tedavisinin akciğer A549 ve H1299 hücrelerinde özel hücre ölüm yolu olan ferroptozu tetikleyerek E-cadherin ekspresyonunu artırıp, N-cadherin ve vimentin ekspresyonunu azaltarak anti-EMT özelliği gösterebildiğini analiz etmişler.

Wang ve ark. (147) sisplatin dirençli A549/DDP hücreleri üzerinde yaptıkları immünositokimya analizinde sisplatin dirençli protein (ERCC1) ve vimentin düzeyinde artış, E-cadherin düzeyinde ise düşüş gözlemlemişler. Ek olarak 120 KHDAC hastasının doku örneklerini immünohistokimyasal olarak incelemişler. Çalışmada sisplatin ilaç direnci ile ERCC1 ve vimentin arasında pozitif yönde, E-cadherin düzeyi ile negatif yönde ilişki saptamışlar. Bu sonuçlara dayanarak KHDAC hastalarında kemorezistansın EMT süreci ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşler. Bu veriler, GLA'nın hücrelerdeki E-cadherin düzeyini koruyup N-cadherin ve vimentin gibi mezenkimal belirteçleri baskılayarak KHDAC hastalarında ilaç direncinin önüne geçebileceğini düşündürmektedir.

Yaptığımız qRT-PCR analizinde E-cadherin gen ekspresyonu TGF- β grubunda en düşük seviyede tespit edilmiş olup, TGF- β +GLA grubunda da bu düşüşün önlenmeye çalışıldığı gözlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla GLA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Alaaeldin ve ark. (148) MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında tedavi edilmeyen gruplarda E-cadherin mRNA ekspresyonunu düşük bulmuşlar, buna ek olarak doksorubisin ve siprofloksasin kalkon tedavisinin ise bu süreci tersine çevirdiğini gözlemlemişler. Nitekim Tavakolian ve ark. (149) da doku örneklerinde yaptığı qPCR çalışmasında meme kanseri dokusunda E-cadherin ekspresyonunun normal dokuya kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Çalışmamızı destekleyen tüm bu araştırmalar ışığında biz GLA'nın epitelyal hücre

morfolojisinin korunarak akciğer adenokanserinde antitümöral etkinlik gösterebileceği kanaatine vardık.

Çalışmamızda N-cadherin gen ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla TGF- β grubunda anlamlı düzeyde yüksek görülmüştür. Bununla birlikte GLA ve TGF- β +GLA gruplarında ise N-cadherin gen düzeyi TGF- β grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamıza benzer şekilde MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin doğal bir terpen olan alantolactone tedavisi sonucunda N-cadherin gen ekspresyonunun düştüğü bildirilmiştir (150).

Lascombe ve ark. (151) yaptıkları immünohistokimya ve PCR analizlerinde kas dokusuna invaze olmuş ürotelyal karsinomlarda N-cadherin ekspresyonundaki artışın E-cadherin ekspresyonundaki kayıpla ilişkili olabileceğini belirtmişler. Ayrıca invaziv bir tümörden türetilen T24 hücrelerinde N-cadherin'in yüksek seviyede ifade edildiğini saptamışlar. Bu doğrultuda hücrelerin invazyon kabiliyeti kazanılmasında N-cadherinin önemli bir rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Ek olarak Nguyen ve ark. (152) baş ve boyun skuamöz kanseri doku örneklerinde ve hücre kültüründe yaptıkları PCR analizi sonucunda yüksek düzeyde N-cadherin ekspresyonunun hücrelerin invazyon ve metastatik özelliklerini destekleyebileceğini öne sürmüşler. Bu verilere dayanarak TGF- β 'nın A549 hücrelerinde N-cadherin düzeyini arttırarak invazyon ve metastaz yapma gibi malign özellikler kazandırdığı, GLA'nın ise N-cadherin düzeyini baskılayarak bu malign davranışı önleyebileceği kanısına varılabilir.

Yaptığımız PCR analizinde vimentin geni ekspresyonu diğer gruplara nazaran TGF- β grubunda en yüksek seviyede tespit edilmiştir. Ayrıca, TGF- β + GLA kombinasyonunun bu artışı belirgin şekilde düşürdüğü gözlenmiştir. Bizim çalışmamıza paralel olarak Li ve ark. (153) Li ve ark. TGF- β uygulanan tiroid kanser hücre hatlarında (IHH-4, FTC-133, 8505C) E-cadherin ekspresyonu düşerken vimentin gen düzeyinin arttığını gözlemlemişler.

Bhardwaj ve ark. (154) immünohistokimya ve PCR analiziyle sebace bez karsinomu dokularında vimentin ekspresyon düzeyini çalışmışlar. Araştırmada tümör boyutu büyük olan ileri evre materyallerde vimentin ekspresyonunun daha fazla olduğunu saptamışlar.

Ek olarak yüksek vimentin düzeyinin lenf nodu metastazının bir göstergesi olabileceğini vurgulamışlardır. Bir başka çalışmada araştırmacılar HK-2 böbrek tübüler epitel hücre hattında TGF- β uyguladıkları grupta vimentin gen düzeyinin yükseldiğini, panaks gingseng bitkisinden elde edilen Arjinil-fruktozil-glukoz (AFG) bileşeninin ise vimentin gen ifadesini baskıladığını bildirmişler (155).

Tüm bu veriler, A549 akciğer adenokanser hücrelerinde TGF- β verilmesinin E-cadherin ifadesinde düşüşe, N-cadherin ve vimentin ifadesinde artışa yol açması, böylelikle TGF- β 'nın EMT sürecine katkıda bulunduğunu, GLA uygulamasının ise EMT sürecini önlemeye çalıştığını göstermektedir.

İmmünotokimya ve PCR çalışmamızda SMAD 2 ve SMAD 3 ekspresyon düzeyi kontrol grubuna kıyasla TGF- β grubunda anlamlı bir artış sergilemiş ve GLA uygulaması bu artışı önemli ölçüde baskılamıştır. Başka çalışmada Chen ve ark. bovin meme epitel hücrelerinde (BMEC) TGF- β uygulamasından sonra mezenkimal belirteçlerin yanı sıra SMAD 2 ve SMAD 3 gen ekspresyonlarında da önemli ölçüde artış görüldüğünü kaydetmişler, buna ek olarak protein analizi ile fosforile SMAD 2 ifadesinde anlamlı bir artış bulmuşlardır (156).

Andugulapati ve ark. (157) ratlarda bleomisinle oluşturdukları akciğer fibrozisi üzerinde izoflavon türü bileşik olan biochaninin (BCA) etkisini PCR, Western ve immünohistokimyasal analizle değerlendirmişler. Araştırmacılar BCA tedavisinin TGF β /SMAD yolunu düzenlediğini ve akciğer doku örneklerinde fibrotik belirteçlerin (α -SMA, FN-I, CTGF, COL1A1 ve COL3A1) ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

Geng ve ark. (158) HK-2 hücre hattında western blot analiziyle Ganoderik asit kullanarak TGF- β ile EMT modeli oluşturmuş ve bu bileşiğin EMT sürecini SMAD bağımlı ve SMAD bağımsız yolda inhiye edebileceğini bildirmişler. Biz tüm bu çalışmaları da değerlendirerek GLA'nın A549 hücrelerinde TGF- β /SMAD sinyalizasyonunu baskıladığını, böylelikle akciğer kanserinin altta yatan mekanizmalarından biri olan EMT sürecini engellediği kanaatine vardık.

Çalışmamızda immünohistokimya ve PCR deneylerimizde NLRP3 ekspresyon düzeyi TGF- β grubunda en yüksek seviyede belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla GLA grubunda NLRP3, belirgin düzeyde düşük seyretmiştir. TGF- β +GLA grubunda ise TGF- β 'nın yol açtığı artışı Glaucocalyxin A'nın anlamlı düzeyde baskıladığı saptanmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde İzoprotoreol (ISO) ile kardiyak fibrozis modeli oluşturulmuş bir çalışmada, araştırmacılar ISO grubunda NLRP3 mRNA düzeyinde ve TGF- β /SMAD2/3 protein düzeyinde artış saptamışlar ve TGF- β /SMAD2/3 yolu ile NLRP3 arasında bir ilişki olabileceğini öne sürmüşler (159). Diyabetik fare modeli üzerinde yapılan başka bir çalışmada melatoninin NLRP3 inflamazomunu ve TGF- β /SMAD sinyal yolunu baskıladığı, böylelikle kardiyak disfonksiyona neden olan kardiyak fibrozisin önlenildiği ifade edilmiştir (160).

Xia ve ark. (161) siklosporin ile indükledikleri in vivo böbrek fibrozisi modelinde western blot ile TGF- β /SMAD yolunun aktive olduğunu gözlemlemişler. Ek olarak NLRP3 ve matür IL-1- β , kaspaz 1 gibi inflamazom ile ilişkili inflamatuvar ürünlerde artış saptamışlar. NLRP3 ile TGF- β /SMAD yolu arasındaki ilişkiyi daha iyi aydınlatmak için fibrozis modelinde NLRP3 inhibitörü olan MCC950'in etkisini incelemişler. MCC950 uygulamasının NLRP3, kaspaz-1 ve matür IL-1 β düzeyini düşürdüğünü, ayrıca TGF- β , p-SMAD 2/3 düzeylerini de anlamlı ölçüde baskıladığını bildirmişler. Böylelikle TGF- β /SMAD sinyal yolunun NLRP3 inflamazomunun ana aşağı akış yollarından biri olabileceğini vurgulamışlardır. Nitekim biz de çalışmamızda GLA'nın NLRP3 ve TGF- β /SMAD yolunu baskılayabildiğini gözlemledik. Bu sonuçlara dayanarak NLRP3 ve TGF- β /SMAD sinyal yolunun fibroziste rol oynadığını, GLA tedavisinin ise bu sinyalizasyonu önleyerek akciğer fibrozisi tedavisinde umut vaat eden terapötik seçeneklerden biri olabileceğini düşünmekteyiz.

Tüm bu verilere dayanarak Glaucocalyxin A'nın A549 hücre hattında TGF- β ile oluşturulmuş EMT sürecini TGF- β /SMAD ve NLRP3 üzerinden baskılayabildiğini, ayrıca NLRP3 düzeyini düşürerek antiinflamatuvar etkinlik gösterebildiği kanaatine vardık.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız, TGF- β uygulamasının A549 insan akciğer adenokanser hücre hattında mezenkimal hücre özellikleri değişikliklerine neden olduğunu göstermektedir. TGF- β grubundaki hücrelerin içsi morfoloji kazandığı invert mikroskop altında gözlenmiş ve göç kapasitesinin arttığı yara yeri deneyi ile gösterilmiştir. Yaptığımız immünohistokimya ve qRT-PCR analizleri neticesinde TGF- β grubunda E-cadherin ekspresyonunun azaldığı, N-cadherin ve vimentin düzeyinin ise arttığı saptanmıştır. Bu durum hücrelerde EMT sürecinin etkinleştiğini doğrulamıştır.

TGF- β uygulamasının hücrelerde p-SMAD2/3 ve NLRP3 düzeyini arttırdığı immünohistokimyasal boyama ile değerlendirilmiştir. Ek olarak diğer gruplara kıyasla TGF- β grubunda SMAD 2, SMAD 3 ve NLRP3 mRNA seviyesinde anlamlı düzeyde artış saptanmıştır. Bu doğrultuda TGF- β 'nın A549 hücrelerinde EMT sürecini SMAD sinyalizasyonu ve NLRP3 üzerinden indüklediği düşünülmektedir.

Invert mikroskopta GLA uygulanan gruplarda kanser hücrelerinin formunun dejenere olduğu saptanmıştır. TGF- β grubuna kıyasla GLA ve TGF- β +GLA gruplarında E-cadherin düzeyinin anlamlı ölçüde arttığı, N-cadherin ve vimentin ekspresyonunun anlamlı olarak düştüğü bulunmuştur. Ayrıca GLA tedavisi verilen gruplarda p-SMAD2/3 ve NLRP3 düzeyinin belirgin ölçüde düştüğü gözlenmiştir. Bu veriler qRT-PCR analiziyle de desteklenmiştir. Bu bulgular ışığında GLA'nın TGF- β /SMAD ve NLRP3 sinyalizasyonunu engellediği, ayrıca NLRP3 düzeyini düşürerek antiinflamatuvar etkinlik gösterebileceğini söyleyebiliriz.

Önceki çalışmalarda GLA'nın antiinflamatuvar, antifibrotik ve antitümoral etkilerine değinilmişse de literatürde A549 hücre hattında GLA'nın TGF- β /SMAD ve NLRP3 yolağı üzerinden EMT sürecini baskıladığını gösteren bir çalışmaya rastlamadık.

Çalışmamızda Glaucocalyxin A'nın akciğer adenokarsinom hücre hattında TGF- β /SMAD sinyal yolu üzerinden ve NLRP3 düzeyini baskılayarak EMT'yi engelleyebileceğini in vitro koşullarda gözlemledik. Bu durum ise akciğer fibrozisi ve akciğer kanserlerinde EMT sürecini baskılayan GLA'nın bu hastalarda terapötik bir

seçenek olarak sunulabileceğini işaret etmektedir. Glaucocalyxin A'nın akciğer fibrozisinde ve akciğer kanserinde klinik kullanıma girebilmesi, uygun doz aralığının tespit edilmesi ve olası yan etkilerin belirlenmesi için ileri düzey in vivo araştırmalara gereksinim duyulduğu kanaatindeyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Manfioletti G, Fedele M. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 2021. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10).
2. Meng Z, Yang T, Liu D. Type-2 epithelial-mesenchymal transition in oral mucosal nonneoplastic diseases. *Front Immunol.* 2022;13:1020768.
3. Jolly MK, Ward C, Eapen MS, et al. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease. *Dev Dyn.* 2018;247(3):346-358.
4. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 2014;7(344):re8.
5. Hiew LF, Poon CH, You HZ, Lim LW. TGF- β /Smad Signalling in Neurogenesis: Implications for Neuropsychiatric Diseases. *Cells.* 2021;10(6).
6. Kamato D, Do BH, Osman N, et al. Smad linker region phosphorylation is a signalling pathway in its own right and not only a modulator of canonical TGF- β signalling. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(2):243-251.
7. Blevins HM, Xu Y, Biby S, Zhang S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:879021.
8. Abd Elrazik NA, Helmy SA. Betanin protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating the NLRP3/IL-1 β /TGF- β 1 pathway-mediated epithelial-to-mesenchymal transition. *Food Funct.* 2024;15(1):284-294.
9. Zhang K, Fan C, Cai D, et al. Contribution of TGF-Beta-Mediated NLRP3-HMGB1 Activation to Tubulointerstitial Fibrosis in Rat With Angiotensin II-Induced Chronic Kidney Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:1.
10. Peng L, Wen L, Shi QF, et al. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- κ B/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation. *Cell Death Dis.* 2020;11(11):978.
11. JafariNezhad A, YektaKooshali MH. Lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2018;13(8):e0202360.

12. Otsuki Y, Saya H, Arima Y. Prospects for new lung cancer treatments that target EMT signaling. *Dev Dyn*. 2018;247(3):462-472.
13. Chanvorachote P, Petsri K, Thongsom S. Epithelial to Mesenchymal Transition in Lung Cancer: Potential EMT-Targeting Natural Product-derived Compounds. *Anticancer Res*. 2022;42(9):4237-4246.
14. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Aggressive Lung Cancers. *Adv Exp Med Biol*. 2016;890:37-56.
15. Wang H, Guo S, Kim SJ, et al. Cisplatin prevents breast cancer metastasis through blocking early EMT and retards cancer growth together with paclitaxel. *Theranostics*. 2021;11(5):2442-2459.
16. Li S, Cong X, Gao H, et al. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):6.
17. Yoshida GJ. Emerging role of epithelial-mesenchymal transition in hepatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35(1):141.
18. Zhang N, Ng AS, Cai S, Li Q, Yang L, Kerr D. Novel therapeutic strategies: targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2021;22(8):e358-e368.
19. Ping Q, Wang C, Cheng X, et al. TGF- β 1 dominates stromal fibroblast-mediated EMT via the FAP/VCAN axis in bladder cancer cells. *J Transl Med*. 2023;21(1):475.
20. Xiang Z, Wu X, Liu X, Jin Y. Glaucocalyxin A: a review. *Nat Prod Res*. 2014;28(24):2221-2236.
21. Zhou T, Ye Y, Chen W, et al. Glaucocalyxin A alleviates ulcerative colitis by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling. *Sci Rep*. 2025;15(1):6556.
22. Ross M, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. Palme Yayınevi, 2014.
23. AL M. Junqueira *Temel Histoloji Konu ve Atlas*. Güneş Tıp Kitabevi, 2019.
24. Eroschenko VP, Demir R. *Di Fiore'nini histoloji atlası: fonksiyonel ilişkileriyle*. Palme Yayıncılık, 2013.
25. Khan YS, Lynch DT. *Histology, Lung*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC., 2023.

26. Aung H, Sivakumar A, Gholami S, Venkateswaran S, Gorain B. An overview of the anatomy and physiology of the lung. *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*. 2019:1-20.
27. Chaudhry R, Bordoni B. *Anatomy, Thorax, Lungs*. StatPearls. Treasure Island (FL)2023.
28. Dudek RW, Louis TM. *High-Yield Makroskopik Anatomi*. Palme Yayıncılık, 2018.
29. Gartner LP, Lee LM. *Gartner ve Hiatt Histoloji Atlas ve Ders Kitabı*. İstanbul Tıp Kitabevi, 2023.
30. Dalçık H, Yıldırım M. *Moore Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevi, 2016.
31. Eşrefoğlu M. *Embriyoloji*. Ema Tıp Kitabevi, 2021.
32. Wang J, Xu L, Xiang Z, et al. Microcystin-LR ameliorates pulmonary fibrosis via modulating CD206(+) M2-like macrophage polarization. *Cell Death Dis*. 2020;11(2):136.
33. Alharbi KS, Fuloria NK, Fuloria S, et al. Nuclear factor-kappa B and its role in inflammatory lung disease. *Chem Biol Interact*. 2021;345:109568.
34. Savin IA, Zenkova MA, Sen'kova AV. Pulmonary Fibrosis as a Result of Acute Lung Inflammation: Molecular Mechanisms, Relevant In Vivo Models, Prognostic and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23).
35. Lv Q, Wang J, Xu C, Huang X, Ruan Z, Dai Y. Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo through regulating Wnt/GSK-3 β / β -catenin and TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathways. *Mol Med*. 2020;26(1):49.
36. Moss BJ, Ryter SW, Rosas IO. Pathogenic Mechanisms Underlying Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2022;17:515-546.
37. Strongman H, Kausar I, Maher TM. Incidence, Prevalence, and Survival of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in the UK. *Adv Ther*. 2018;35(5):724-736.
38. Diwan R, Bhatt HN, Beaven E, Nurunnabi M. Emerging delivery approaches for targeted pulmonary fibrosis treatment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2024;204:115147.
39. Ishida Y, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Immune Mechanisms of Pulmonary Fibrosis with Bleomycin. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4).

40. Koudstaal T, Funke-Chambour M, Kreuter M, Molyneaux PL, Wijsenbeek MS. Pulmonary fibrosis: from pathogenesis to clinical decision-making. *Trends Mol Med*. 2023;29(12):1076-1087.
41. Kinoshita T, Goto T. Molecular Mechanisms of Pulmonary Fibrogenesis and Its Progression to Lung Cancer: A Review. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6).
42. Tzouvelekis A, Gomatou G, Bouros E, Trigidou R, Tzilas V, Bouros D. Common Pathogenic Mechanisms Between Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer. *Chest*. 2019;156(2):383-391.
43. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2024;74(3):229-263.
44. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Temel Patoloji. Güneş Tıp Kitabevi, 2020.
45. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7-33.
46. Leiter A, Veluswamy RR, Wisnivesky JP. The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nature reviews Clinical oncology*. 2023;20(9):624-639.
47. Dorochowicz M, Krzemienowska-Cebulla A, Matus I, Senat H, Madej A. Navigating Lung Cancer: Exploring Progress and Obstacles-A Comprehensive Review. *Journal of Education, Health and Sport*. 2024;61:87-108.
48. Li Q, Yuan D, Ma C, et al. A new hope: the immunotherapy in small cell lung cancer. *Neoplasma*. 2016;63(3):342-350.
49. Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, Gainor JF, Heist RS. Lung cancer. *Lancet*. 2021;398(10299):535-554.
50. Myers DJ, Wallen JM. Lung Adenocarcinoma. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC., 2024.
51. Byun J, Schwartz AG, Lusk C, et al. Genome-wide association study of familial lung cancer. *Carcinogenesis*. 2018;39(9):1135-1140.
52. Sabbula BR, Gasalberti DP, Mukkamalla SKR, Anjum F. Squamous Cell Lung Cancer. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC., 2024.

53. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260.
54. Clark S, Alsubait S. Non-Small Cell Lung Cancer StatPearls. StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL) ineligible companies; 2023.
55. Kupeli M, Koseoglu RD. Large cell carcinoma with adenocarcinoma in lung. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2018;28(3):240-242.
56. Yang L, Fan Y, Lu H. Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2022;28:1610730.
57. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, et al. The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. *Journal of Thoracic Oncology*. 2022;17(3):362-387.
58. Basumallik N, Agarwal M. Small cell lung cancer. StatPearls [internet]. StatPearls Publishing, 2023.
59. Loubet F, Robert C, Leclaire C, et al. Effects of sevoflurane on lung alveolar epithelial wound healing and survival in a sterile in vitro model of acute respiratory distress syndrome. *Exp Cell Res*. 2024;438(1):114030.
60. Shimizu K, Endo O, Goto S, Sakoda A, Ono Y, Sakai Y. Bioassay-based evaluation of toxicity of suspended particulate matter in humans: integrated uses of alveolar cells (A549) in air-liquid interface culture and hepatocarcinoma cells (Hep G2). *Biochemical Engineering Journal*. 2004;22(1):1-9.
61. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973;51(5):1417-1423.
62. Youssef KK, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and degeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024;25(9):720-739.
63. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166(1):21-45.
64. Stone RC, Pastar I, Ojeh N, et al. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res*. 2016;365(3):495-506.

65. Yang J, Antin P, Berx G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2020;21(6):341-352.
66. KURUŞ M. HİSTOLOJİ. Akademisyen Kitabevi, 2020.
67. Pawlina W, Ross M. *Histology: a text and atlas. With Correlated Cell and Molecular Biology*. Wolters Kluwer, 2023.
68. Eşrefoğlu M. *Genel Histoloji*. İstanbul Tıp Kitabevleri, 2021.
69. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş, Dördüncü Baskıdan Çeviri*. Palme Yayınevi, 2021.
70. Debnath P, Huiem RS, Dutta P, Palchaudhuri S. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors. *Biosci Rep*. 2022;42(1).
71. Yang J, Antin P, Berx G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(6):341-352.
72. Odero-Marrah V, Hawsawi O, Henderson V, Sweeney J. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1095:101-110.
73. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15(2):117-134.
74. Amack JD. Cellular dynamics of EMT: lessons from live in vivo imaging of embryonic development. *Cell Commun Signal*. 2021;19(1):79.
75. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-890.
76. Usman S, Waseem NH, Nguyen TKN, et al. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19).
77. Ojima T, Kawami M, Yumoto R, Takano M. Differential mechanisms underlying methotrexate-induced cell death and epithelial-mesenchymal transition in A549 cells. *Toxicol Res*. 2021;37(3):293-300.
78. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-1428.

79. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. *Cells*. 2021;10(7).
80. Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh SK. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2018;182:80-94.
81. Can A. Kök Hücre: biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. Akademisyen Kitabevi, Ankara. 2021;2.
82. Lee JH, Massagué J. TGF- β in developmental and fibrogenic EMTs. *Semin Cancer Biol*. 2022;86(Pt 2):136-145.
83. Lurje I, Gaisa NT, Weiskirchen R, Tacke F. Mechanisms of organ fibrosis: Emerging concepts and implications for novel treatment strategies. *Mol Aspects Med*. 2023;92:101191.
84. Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell Tissue Res*. 2012;347(1):103-116.
85. Shu G, Yusuf A, Dai C, Sun H, Deng X. Piperine inhibits AML-12 hepatocyte EMT and LX-2 HSC activation and alleviates mouse liver fibrosis provoked by CCl(4): roles in the activation of the Nrf2 cascade and subsequent suppression of the TGF- β 1/Smad axis. *Food Funct*. 2021;12(22):11686-11703.
86. Zhang HJ, Zhang YN, Zhou H, Guan L, Li Y, Sun MJ. IL-17A Promotes Initiation and Development of Intestinal Fibrosis Through EMT. *Dig Dis Sci*. 2018;63(11):2898-2909.
87. Nebigil CG, Désaubry L. The role of GPCR signaling in cardiac Epithelial to Mesenchymal Transformation (EMT). *Trends Cardiovasc Med*. 2019;29(4):200-204.
88. Baldawa P, Shirol P, Alur J, Kulkarni VV. Metastasis: To and fro. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2017;21(3):463-464.
89. Babaei G, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother*. 2021;133:110909.
90. Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med*. 2019;216(5):1016-1026.
91. Lamouille S, Xu J, Derynck R. 7 Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-196.

92. Huang RY-J, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of cell science*. 2012;125(19):4417-4422.
93. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2009;28:15-33.
94. Loh CY, Chai JY, Tang TF, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*. 2019;8(10).
95. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *Journal of cell science*. 2008;121(6):727-735.
96. Theveneau E, Mayor R. Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current opinion in cell biology*. 2012;24(5):677-684.
97. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):939.
98. Kuburich NA, den Hollander P, Pietz JT, Mani SA. Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. *Semin Cancer Biol*. 2022;86(Pt 3):816-826.
99. Jacob JT, Coulombe PA, Kwan R, Omary MB. Types I and II keratin intermediate filaments. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2018;10(4):a018275.
100. Mendez M, Restle D, Janmey P. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophysical journal*. 2014;107(2):314-323.
101. Khan AQ, Hasan A, Mir SS, Rashid K, Uddin S, Steinhoff M. Exploiting transcription factors to target EMT and cancer stem cells for tumor modulation and therapy. *Semin Cancer Biol*. 2024;100:1-16.
102. Choi T, Ryu S, Bae JS, Yoo SH, Mo JH. Epithelial-Mesenchymal Transition in Chronic Rhinosinusitis. *J Rhinol*. 2024;31(2):67-77.
103. Kang E, Seo J, Yoon H, Cho S. The Post-Translational Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition-Inducing Transcription Factors in Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).
104. Pawlak JB, Blobe GC. TGF- β superfamily co-receptors in cancer. *Dev Dyn*. 2022;251(1):137-163.

105. Peng D, Fu M, Wang M, Wei Y, Wei X. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Mol Cancer*. 2022;21(1):104.
106. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(5).
107. Aashaq S, Batool A, Mir SA, Beigh MA, Andrabi KI, Shah ZA. TGF- β signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways. *Journal of Cellular Physiology*. 2022;237(1):59-85.
108. Wang X, Eichhorn PJA, Thiery JP. TGF- β , EMT, and resistance to anti-cancer treatment. *Semin Cancer Biol*. 2023;97:1-11.
109. Sisto M, Ribatti D, Lisi S. Organ Fibrosis and Autoimmunity: The Role of Inflammation in TGF β -Dependent EMT. *Biomolecules*. 2021;11(2).
110. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11).
111. David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(7):419-435.
112. Li SN, Wu JF. TGF- β /SMAD signaling regulation of mesenchymal stem cells in adipocyte commitment. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):41.
113. Tie Y, Tang F, Peng D, Zhang Y, Shi H. TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases. *Molecular Biomedicine*. 2022;3(1):45.
114. Liu T, Liu Y, Miller M, et al. Autophagy plays a role in FSTL1-induced epithelial mesenchymal transition and airway remodeling in asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313(1):L27-L40.
115. Sohal SS, Reid D, Soltani A, et al. Evaluation of epithelial mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2011;12(1):130.
116. Pozharskaya V, Torres-González E, Rojas M, et al. Twist: a regulator of epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis. *PLoS One*. 2009;4(10):e7559.
117. Larsen JE, Nathan V, Osborne JK, et al. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest*. 2016;126(9):3219-3235.

118. Wang LN, Zhang ZT, Wang L, et al. TGF- β 1/SH2B3 axis regulates anoikis resistance and EMT of lung cancer cells by modulating JAK2/STAT3 and SHP2/Grb2 signaling pathways. *Cell Death Dis.* 2022;13(5):472.
119. Lee HW, Jose CC, Cuddapah S. Epithelial-mesenchymal transition: Insights into nickel-induced lung diseases. *Semin Cancer Biol.* 2021;76:99-109.
120. Cui Y, Wang X, Zhang L, et al. A novel epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related gene signature of predictive value for the survival outcomes in lung adenocarcinoma. *Front Oncol.* 2022;12:974614.
121. Chauhan D, Vande Walle L, Lamkanfi M. Therapeutic modulation of inflammasome pathways. *Immunol Rev.* 2020;297(1):123-138.
122. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(7):407-420.
123. Xu Z, Kombe Kombe AJ, Deng S, et al. NLRP inflammasomes in health and disease. *Mol Biomed.* 2024;5(1):14.
124. Tian R, Zhu Y, Yao J, et al. NLRP3 participates in the regulation of EMT in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Cell Res.* 2017;357(2):328-334.
125. Li Y, Ling J, Jiang Q. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. *Front Immunol.* 2021;12:691013.
126. Santana PT, Martel J, Lai HC, et al. Is the inflammasome relevant for epithelial cell function? *Microbes Infect.* 2016;18(2):93-101.
127. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer.* 2018;17(1):158.
128. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012;481(7381):278-286.
129. de Carvalho Ribeiro M, Szabo G. Role of the Inflammasome in Liver Disease. *Annu Rev Pathol.* 2022;17:345-365.
130. Alyaseer AAA, de Lima MHS, Braga TT. The Role of NLRP3 Inflammasome Activation in the Epithelial to Mesenchymal Transition Process During the Fibrosis. *Front Immunol.* 2020;11:883.
131. Sun HD, Huang SX, Han QB. Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities. *Nat Prod Rep.* 2006;23(5):673-698.

132. Variety *Isodon japonicus glaucocalyx*. iNaturalist; 2024.
133. Hou X, Xu G, Wang Z, et al. Glaucocalyxin A alleviates LPS-mediated septic shock and inflammation via inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Int Immunopharmacol*. 2020;81:106271.
134. Su Q, Zhang Y. Glaucocalyxin A attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(3):1949-1954.
135. Zhou X, Ma W, Li X, Xu J. Glaucocalyxin a prevents hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in human gastric cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *J Recept Signal Transduct Res*. 2022;42(2):109-116.
136. Chen F, Sun F, Liu X, Shao J, Zhang B. Glaucocalyxin A Inhibits the Malignant Progression of Epithelial Ovarian Cancer by Affecting the MicroRNA-374b-5p/HMGB3/Wnt-beta-Catenin Pathway Axis. *Front Oncol*. 2022;12:955830.
137. Zhang D, Deng T, Yuan W, Chen T, Jiang S. Glaucocalyxin A induces apoptosis of non-small cell lung carcinoma cells by inhibiting the PI3K/Akt/GSK3beta pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2022;49(8):797-804.
138. Qu R, Zhang W, Ma Z, et al. Glaucocalyxin A attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and improves the associated gut microbiota imbalance. *Chem Biol Drug Des*. 2023;102(1):51-64.
139. Li L, Zheng J, Oltean S. Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transitions by Alternative Splicing: Potential New Area for Cancer Therapeutics. *Genes (Basel)*. 2023;14(11).
140. Königshoff M. Lung cancer in pulmonary fibrosis: tales of epithelial cell plasticity. *Respiration*. 2011;81(5):353-358.
141. Chen F, Sun F, Liu X, Shao J, Zhang B. Glaucocalyxin A Inhibits the Malignant Progression of Epithelial Ovarian Cancer by Affecting the MicroRNA-374b-5p/HMGB3/Wnt- β -Catenin Pathway Axis. *Front Oncol*. 2022;12:955830.
142. Liu Y, Chen P, Qi D, Chen L. Glaucocalyxin A Inhibits the Malignancies of Gastric Cancer Cells by Downregulating MDM2 and RNF6 via MiR-3658 and the SMG1-UPF mRNA Decay Pathway. *Front Oncol*. 2022;12:871169.
143. Zhang C, Zhu X, Hua Y, et al. YY1 mediates TGF- β 1-induced EMT and pro-fibrogenesis in alveolar epithelial cells. *Respir Res*. 2019;20(1):249.

144. Feng H, Lu JJ, Wang Y, Pei L, Chen X. Osthole inhibited TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) by suppressing NF- κ B mediated Snail activation in lung cancer A549 cells. *Cell Adh Migr*. 2017;11(5-6):464-475.
145. Myong N-H. Loss of E-cadherin and acquisition of vimentin in epithelial-mesenchymal transition are noble indicators of uterine cervix cancer progression. *Korean journal of pathology*. 2012;46(4):341.
146. Gao M, Lai K, Deng Y, et al. Eriocitrin inhibits epithelial-mesenchymal transformation (EMT) in lung adenocarcinoma cells via triggering ferroptosis. *Aging (Albany NY)*. 2023;15(19):10089-10104.
147. Wang J, Chen Y, Xiang F, et al. Suppression of TGF- β 1 enhances chemosensitivity of cisplatin-resistant lung cancer cells through the inhibition of drug-resistant proteins. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46(7):1505-1512.
148. Alaaeldin R, Abuo-Rahma GEA, Zhao QL, Fathy M. Modulation of Apoptosis and Epithelial-Mesenchymal Transition E-cadherin/TGF- β /Snail/TWIST Pathways by a New Ciprofloxacin Chalcone in Breast Cancer Cells. *Anticancer Res*. 2021;41(5):2383-2395.
149. Tavakolian S, Goudarzi H, Faghihloo E. E-cadherin, Snail, ZEB-1, DNMT1, DNMT3A and DNMT3B expression in normal and breast cancer tissues. *Acta Biochim Pol*. 2019;66(4):409-414.
150. Naderi R, Aziz SG-G, Haghighi-Asl AS. Evaluating the effect of Alantolactone on the expression of N-cadherin and Vimentin genes effective in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Annals of Medicine and Surgery*. 2022;73.
151. Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, et al. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clinical cancer research*. 2006;12(9):2780-2787.
152. Nguyen PT, Kudo Y, Yoshida M, Kamata N, Ogawa I, Takata T. N-cadherin expression is involved in malignant behavior of head and neck cancer in relation to epithelial-mesenchymal transition. *Histol Histopathol*. 2011;26(2):147-156.
153. Li Y, He J, Wang F, et al. Role of MMP-9 in epithelial-mesenchymal transition of thyroid cancer. *World J Surg Oncol*. 2020;18(1):181.
154. Bhardwaj M, Sen S, Chosdol K, et al. Vimentin overexpression as a novel poor prognostic biomarker in eyelid sebaceous gland carcinoma. *Br J Ophthalmol*. 2020;104(6):879-884.

155. Lin X, Xiang M, Chen H, Chen X. Arginyl-fructosyl-glucose from red ginseng alleviates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells. *Gen Physiol Biophys*. 2022;41(4):329-338.
156. Chen Q, Yang W, Wang X, et al. TGF- β 1 induces EMT in bovine mammary epithelial cells through the TGF β 1/Smad signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;43(1):82-93.
157. Andugulapati SB, Gourishetti K, Tirunavalli SK, Shaikh TB, Sistla R. Biochanin-A ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing the TGF- β mediated EMT, myofibroblasts differentiation and collagen deposition in in vitro and in vivo systems. *Phytomedicine*. 2020;78:153298.
158. Geng XQ, Ma A, He JZ, et al. Ganoderic acid hinders renal fibrosis via suppressing the TGF- β /Smad and MAPK signaling pathways. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41(5):670-677.
159. Ma Z, Bai Z, Li B, Zhang Y, Liu W. Extracts from *Artemisia annua* Alleviates Myocardial Remodeling through TGF- β 1/Smad2/3 Pathway and NLRP3 Inflammasome. *Curr Mol Pharmacol*. 2024;17:e18761429304142.
160. Che H, Wang Y, Li H, et al. Melatonin alleviates cardiac fibrosis via inhibiting lncRNA MALAT1/miR-141-mediated NLRP3 inflammasome and TGF- β 1/Smads signaling in diabetic cardiomyopathy. *Faseb j*. 2020;34(4):5282-5298.
161. Xia Z, Zhang C, Guo C, et al. Nanoformulation of a carbon monoxide releasing molecule protects against cyclosporin A-induced nephrotoxicity and renal fibrosis via the suppression of the NLRP3 inflammasome mediated TGF- β /Smad pathway. *Acta Biomaterialia*. 2022;144:42-53.